

Aus der Klinik und Hochschulambulanz für Psychiatrie und Psychotherapie der
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Veränderungen der Neurotrophinkonzentrationen in dem
Tiermodell der Depression - die Bulbus olfactorius ektomierte
Maus**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katharina Fink

aus Berlin

Gutachter/in: 1.: Prof. Dr. med. R. Hellweg
 2.: Priv.-Doz. Dr. med. habil. M.-Chr. Jockers-Scherübl
 3.: Prof. Dr. J.-P. Voigt

Datum der Promotion: 19.03.2010

	Seiten
1. Literaturübersicht/ Grundlagen	5-43
1.1. Depression beim Menschen	5-17
1.1.1. Definition, Einteilung und Symptomatik	5-6
1.1.2. Epidemiologie	6-7
1.1.3. Therapie der Depression	7-8
1.1.4. Hypothesen über die Entstehung der Depression, Ätiologie und Pathogenese	8-17
1.1.4.1. Multifaktorielle Entstehung der Depression: Genetik, Umwelt und psychosoziale Faktoren	9-10
1.1.4.2. Monoaminmangel-Hypothese der Depression und Wirkung von Antidepressiva	11
1.1.4.3. Stress-Hypothese und die Hypothese einer Hypothalamus- Hypophysen-Nebennierenrinden-Achsen-Dysregulation	11-14
1.1.4.4. Neuroplastizität und Neurogenese in der Depression und Erkenntnisse aus Magnetresonanztomographie und <i>post mortem</i> Studien	14-17
1.2. Neurotrophine in der Depression	17-25
1.2.1. Neurotrophine und Neurogenese	17-20
1.2.2. Neurotrophine und Stress	21-22
1.2.3. Neurotrophine und Depression	22-23
1.2.4. Neurotrophine und Antidepressiva	23-25
1.3. Tiermodelle der Depression	25-43
1.3.1. Überblick über die Tiermodelle der Depression	25-33
1.3.1.1. Tiermodelle basierend auf pharmakologischer Induktion	27-28
1.3.1.2. Tiermodelle basierend auf Stress	28-30
1.3.1.3. Tiermodelle basierend auf genetischen Veränderungen	30-31
1.3.1.4. Screeningstests für Antidepressiva	32-33
1.3.2. Das Tiermodell der Ektomie des Bulbus olfactorius bei der Maus	33-40
1.3.3. Neurotrophine und verschiedene Tiermodelle der Depression	40-43
2. Aufgabenstellung	44-45
3. Eigene Untersuchungen	46-67
3.1. Versuchstiere, Materialien und Methode	46-59
3.1.1. Versuchstiere und Vorbereitung der Gehirnproben	46-47

3.1.2. Verwendete Substanzen	47-49
3.1.3. Verwendete Geräte	49
3.1.4. Bestimmung der Neurotrophinkonzentrationen	49-58
3.1.4.1. ELISA zur Bestimmung der Konzentration von BDNF	53-56
3.1.4.2. ELISA zur Bestimmung der Konzentration von NGF	56-58
3.1.5. Datenaufbereitung und statistische Methode	58-59
3.2. Ergebnisse	59-67
3.2.1. Konzentrationen von BDNF in Mäusen nach Ektomie des Bulbus olfactorius und Scheinoperation	59-63
3.2.2. Konzentrationen von NGF in Mäusen nach Ektomie des Bulbus olfactorius und Scheinoperation	63-67
4. Diskussion	67-78
4.1. Methodendiskussion	67-68
4.2. Auswirkungen einer Ektomie des Bulbus olfactorius auf die Konzentration von BDNF in verschiedenen Hirnregionen der Maus	68-74
4.3. Auswirkungen einer Ektomie des Bulbus olfactorius auf die Konzentration von NGF in verschiedenen Hirnregionen der Maus	74-78
5. Zusammenfassung	78-80
6. Literaturverzeichnis	81-97
I Lebenslauf	98
II Selbständigkeitserklärung	99
III Publikationsliste	100
IV Danksagung	101
V Abkürzungsverzeichnis	102-104

1. Literaturübersicht/ Grundlagen

1.1. Depression beim Menschen

1.1.1. Definition, Einteilung und Symptomatik

Die Depression ist eine komplexe und multifaktorielle, psychiatrische Erkrankung des Menschen und gehört wie auch Manien, Dysthymien, bipolare Störungen und Zykllothymien zu den affektiven Störungen. Ihr klinisches Bild wird geprägt durch eine Beeinträchtigung der Affekte, der Kognition, Veränderungen der Motorik und des sozialen Verhaltens sowie durch psychosomatische und primär somatische Störungen. Hauptsymptome sind vor allem gedrückte Stimmung, Antriebshemmung und Denkschwierigkeiten. Hinsichtlich der Entstehung von Depressionen wird davon ausgegangen, dass neben biologischen und genetischen Faktoren vor allem Stress ein wichtiger Risikofaktor ist (Übersicht [1]). Gegenwärtig wird die Depression anhand klarer Ein- und Ausschlusskriterien diagnostiziert und klassifiziert. In Abbildung 1 sind diese zusammengestellt. Die Einteilung und Diagnosestellung affektiver Störungen erfolgt nach den beiden gültigen Klassifikationssystemen: ICD-10 der Weltgesundheitsorganisation (WHO) (*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th Revision Version for 2007 (ICD-10)* [2]) und *DSM-IV* der American Psychiatric Association (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition, Text Revision 2000 (DSM-IV-TR)* [3]), wobei in der Bundesrepublik Deutschland die *ICD-10-GM (German Modification)-Version 2008* das offizielle Klassifikationssystem ist [4]. In der ICD-10 [2] werden die affektiven Störungen in 6 Kategorien eingeteilt, wobei sie neben dem remittierenden Verlauf auch in ihre Schweregrade und die dazugehörigen zusätzlichen Symptome weiter unterteilt sind. So werden die *Manische Episode* (F30), die *Bipolare affektive Störung* (F31), die *Depressive Episode* (F32), die *Rezidivierenden depressiven Störungen* (F33), die *Anhaltenden affektiven Störungen* (F34), *Andere affektive Störungen* (F38) sowie *Nicht näher bezeichnete affektive Störungen* (F39) von einander unterschieden.

Zur besseren pharmakologischen Therapie kann die Depression anhand ihres Erscheinungsbildes in die gehemmte Depression mit verminderter Psychomotorik und Aktivität, in die agitierte Depression mit ängstlichem Getriebensein und Bewegungsunruhe und in die larvierte somatisierende Depression eingeteilt werden [5].

Für die Diagnosestellung einer Depressiven Episode nach der WHO muß heute keine bestimmte Anzahl an Haupt- oder Zusatzsymptomen vorhanden sein. Mit steigender Anzahl von Symptomen wird jedoch die Diagnosestellung sicherer, und der Schweregrad einer Depression wird höher.

Depressive Episode

Hauptsymptome

Interessenverlust, Freudlosigkeit
Antriebsmangel, erhöhte Ermüdbarkeit
Vermindertes Selbstwertgefühl und Selbstvertrauen, übertriebenes Schuldgefühl
Denkstörungen, Konzentrationsstörungen, Entscheidungsunfähigkeit
Todesgedanken, Suizidgedanken, Suizidhandlungen
Gefühl der Wertlosigkeit
Schlafstörungen
Appetitsverlust
Depressive gedrückte Stimmung

Begleitsymptome

Morgendliches Stimmungstief
Deutlicher Libidoverlust
Frühmorgendliches Erwachen
Mangelnde emotionale Reagibilität auf sonst freudige Ereignisse
Verlust der Freude an sonst angenehmen Tätigkeiten
Agitiertheit oder deutliche psychomotorische Hemmung
Gewichtsverlust und deutlicher Appetitsverlust

Abbildung 1: Zusammenstellung der Symptome, die zur Diagnosestellung der Depressiven Episode nach ICD-10 herangezogen werden [2].

Als Ursachen auszuschließen sind somatische Erkrankungen und medikamenteninduzierte Stimmungsveränderungen. In der Vorgeschichte sollte es keine manischen, hypomanen oder gemischten Episoden gegeben haben, und die Symptome sollten sich nicht durch eine einfache Trauer erklären lassen. Die Symptome müssen seit mindestens zwei Wochen bestehen und klinisch bedeutsames Leiden und Lebensbeeinträchtigung verursachen.

1.1.2. Epidemiologie

Affektive Störungen sind neben den Angsterkrankungen die häufigsten psychischen Erkrankungen bei deutschen Erwachsenen innerhalb der Gruppe der 18- bis 65-Jährigen. Die Ein-Jahres-Prävalenz, an einer Depressiven Episode in Deutschland zu erkranken, lag in einer Studie von 2004 bei 8,3%, mit einer Prävalenz für Frauen von 11,2% und unter Männern mit 5,5% [6]. In Deutschland leiden derzeit zirka vier Millionen Menschen an einer Depression [7]. Es ist bekannt, dass die Depressive Episode bei Frauen zweimal häufiger vorkommt als bei Männern [8]. Geschlechtsunterschiede variieren hinsichtlich der Inzidenz zudem mit dem Alter. So zeigen Mädchen und Jungen im Kindesalter ähnliche Inzidenzraten, jedoch ab dem 10.

Lebensjahr nimmt die Häufigkeit beim weiblichen Geschlecht zu. Mit dem mittleren Alter verschwinden die Unterschiede zwischen den Geschlechtern (Übersicht [9]). Bisher wurde davon ausgegangen, dass der Erstmanifestationsgipfel für depressive Erkrankungen vor der Mitte des dritten Lebensjahrzehnts liegt. Neuerdings wird das Manifestationsalter zwischen 20 und 25 Jahren angegeben [10], weil Depressionen vermehrt bei Jugendlichen und Kindern diagnostiziert werden. Meist verlaufen Depressionen als Episoden oder Phasen, häufig chronisch oder wiederkehrend. In der Regel dauert eine Episode ohne Behandlung, je nach Studie, 6 bis 8,4 Monate, und etwa die Hälfte der Patienten erholt sich von selbst nach zirka drei Monaten [11, 12]. Eine *Follow-Up* Studie des *National Institute of Mental Health* in den USA von 1992 zeigt, dass nach fünf Jahren 12% der Patienten chronisch depressiv bleiben, 55% mindestens eine weitere Depressive Episode erleiden und nur ein Drittel der Patienten gesund bleibt [13]. Bei der Behandlung der Depression gibt es neben Problemen der ungenügenden und nicht adäquaten Behandlung sowie der unzureichenden Compliance der Patienten auch das Problem, dass zirka 30% bis 40% der behandelten Patienten so genannte „*non-responder*“ sind, die auch auf eine korrekte medikamentöse Therapie nicht ansprechen [14].

1.1.3. Therapie der Depression

Zur Behandlung der Depression werden derzeit zahlreiche Medikamente, Elektrokonvulsionsbehandlung, Schlafentzug, Lichttherapie und Psychotherapie eingesetzt. Im Zentrum der biologischen Behandlungsverfahren steht heute die Gabe von Antidepressiva, denen eine stimmungsaufhellende und antriebsnormalisierende Wirkung nachgesagt wird. Entsprechend des eingesetzten Antidepressivums variieren jedoch die Nebenwirkungen. Antidepressiva können nach ihrer chemischen Struktur eingeteilt werden. So gibt es Tri- (TCA) (Imipramin, Clomipramin, Opipramol und Amitriptylin) und Tetrazyklische Antidepressiva (Mirtazapin und Mianserin). Diese sogenannten „klassischen“ Antidepressiva greifen wenig selektiv in mehrere Neurotransmittersysteme ein. Dabei entwickeln diese Antidepressiva ihre unerwünschten Wirkungen zum Beispiel durch die Beeinflussung weiterer nicht für den Therapieerfolg verantwortlichen Transmittersysteme (z.B. anticholinerge Nebenwirkungen) und durch die Einflussnahme auf Organsysteme (z.B. das blutbildende System) [15]. In der heutigen Einteilung werden die neueren Antidepressiva entsprechend ihren neurochemischen Wirkungen unterschieden, da eine strukturelle Einteilung in Gruppen nicht mehr möglich ist.

Hauptgruppen werden gebildet durch

- selektive Serotonin- und Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (Venlafloxin)
- Selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI) (Citalopram, Fluoxetin)
- Selektive Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (SNARI) (Reboxetin)
- Monoaminoxidasehemmer (MAO-Hemmer) (Moclobemid, Tranylcypromin) und

einige neuere Vertreter, die zusammengefaßt als „atypische“ Antidepressiva bezeichnet werden. Bei der Anwendung der Antidepressiva wird die Behandlung von agitiert-depressiven und gehemmt-depressiven Symptomen unterschieden [15]. In der Klinik werden die Antidepressiva nach dem Ausmaß ihrer antriebssteigernden-aktivierenden oder eher sedierenden-dämpfenden-angstlösenden Wirkung eingeteilt. Antidepressiva mit anderen als den oben angegebenen Wirkungsmechanismen, auch als „atypische“ Antidepressiva bezeichnet, beeinflussen primär die Wiederaufnahmehemmung von Serotonin (5-HT) oder Noradrenalin nicht. Zu den Antidepressiva mit anderen Wirkungsmechanismen gehören Trazodon, Nefazodon, Mirtazapin, Bupropion, Tianeptin. Trazodon und Nefazodon sind 5-HT₂-Rezeptor-Antagonisten und gleichzeitig Serotonin- beziehungsweise Serotonin- und Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer. Mirtazapin ist ein Hemmer des präsynaptischen α -2-Rezeptors. Bupropion wiederum verstärkt den therapeutischen Effekt von SSRIs und Venlafloxin. Es ist ein selektiver Dopamin-Wiederaufnahmehemmer. Doch wird der therapeutische Effekt wahrscheinlich durch einen Metaboliten ausgelöst, der die Noradrenalin-Wiederaufnahme hemmt. Die längerdauernde Einnahme von Tianeptin steigert primär die Serotoninaufnahme und führt später zu Veränderungen in der neuronalen Plastizität. Zusätzlich können auch Phytopharmaka wie Johanneskraut zur Behandlung der Depression genutzt werden.

Bei allen derzeit eingesetzten Antidepressiva ist der Eintritt der antidepressiven Wirkung um mehr als zwei Wochen verzögert, obwohl die Neurotransmitterkonzentration schon kurz nach der Antidepressivagabe angehoben ist (in Übersicht [16]) und die unerwünschten Wirkungen meist nach der ersten Einnahme auftreten.

1.1.4. Hypothesen über die Entstehung der Depression, Ätiologie und Pathogenese

Im Folgenden werden die Monoaminmangel-Hypothese, die Stress-Hypothese und die Neurotrophin-Hypothese der Depression sowie die multifaktorielle Genese der Depression genauer beschrieben. Es gibt jedoch weitere Konzepte zur Entstehung der Depression. So müssen die Virushypothese, die inflammatorische, die Makrophagen- und die glutamaterge

Hypothese, die Hypothese der verminderten GABAergen Funktion, die Neurotoxizitätshypothese und verschiedene neuroendokrine Hypothesen genannt werden. Zu den neuroendokrinen Hypothesen zählen die Dysregulation des Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Systems, die Hypothese der verminderten Wachstumshormon-Sekretion, die Hypothese des Mangels gonadaler Steroide und die weiter unten zusammen mit der Stresshypothese beschriebene Dysregulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (HHN)-Achse.

1.1.4.1. Multifaktorielle Entstehung der Depression: Genetik, Umwelt und psychosoziale Faktoren

Obwohl man die genaue Pathogenese der Depression bis heute nicht kennt, geht man von einer multifaktoriellen Entstehung dieser Erkrankung aus (Übersicht [17]). Angenommen wird, dass genetische Faktoren für die Neigung zur Depression verantwortlich sind. Psychische Erkrankungen kommen in bestimmten Familien gehäuft vor [18]. Wong und Sullivan konnten in Zwillings- und Familienstudien bestätigen, dass eine Heritabilität vorliegt. Die Erbbarkeit von Major Depression, die in Zwillings- und Adoptionsstudien untersucht wurde, wird mit 31% bis 42% angegeben (Übersicht [17, 19]). Auch die erfolgreiche medikamentöse Behandlung von Depressionen scheint von genetischen Faktoren mitbestimmt zu sein (Übersicht [20]). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine Variation in der Promotorregion des Serotonin-Transportergens für die unterschiedliche Reaktion auf psychosoziale Belastungen verantwortlich ist. Träger des kurzen Allels für das *Serotonin-Transporter-Length-Polymorphic-Region* (5-HTTLPR) Gen reagieren empfindlicher auf Stress und Belastungssituationen und sind somit vulnerabler, Depressionen zu entwickeln [21]. Ebenfalls neuere Beobachtungen zeigen, dass Menschen mit einem Single Nucleotid Polymorphismus im BDNF Gen, bei denen Valin durch Methionin in der Codonposition 66 ersetzt wird, einen höheren Neurotizismuswert in Persönlichkeitsfragebögen, wie im NEO-Fünf-Faktoren-Inventar, haben. Dies wiederum ist verbunden mit einer vermehrten Anfälligkeit, Depressionen zu entwickeln [22].

Neben der Genetik nehmen biotische und auch abiotische Umweltfaktoren, die auf das Individuum wirken, Einfluss auf die Entstehung der Depression. Dazu gehören die Jahreszeiten mit weniger Tageslicht und Sonneneinstrahlung (Übersicht [23]), verschiedene Medikamente mit Inhaltsstoffen wie Reserpin oder Isotretinoin (Übersicht [24, 25]), von denen bekannt ist, dass Depressionen im Behandlungsverlauf entstehen, und auch Infektionen.

Depressionen treten auch gehäuft im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen auf. So wird die Komorbiditätsrate der Parkinsonschen Erkrankung mit der Depression mit bis zu 50% beschrieben (Übersicht [26]). Bei der Demenz wird die Depression als Prodrom behandelt und als Risikofaktor für eine Verschlechterung der kognitiven Funktion betrachtet (Übersicht [27]).

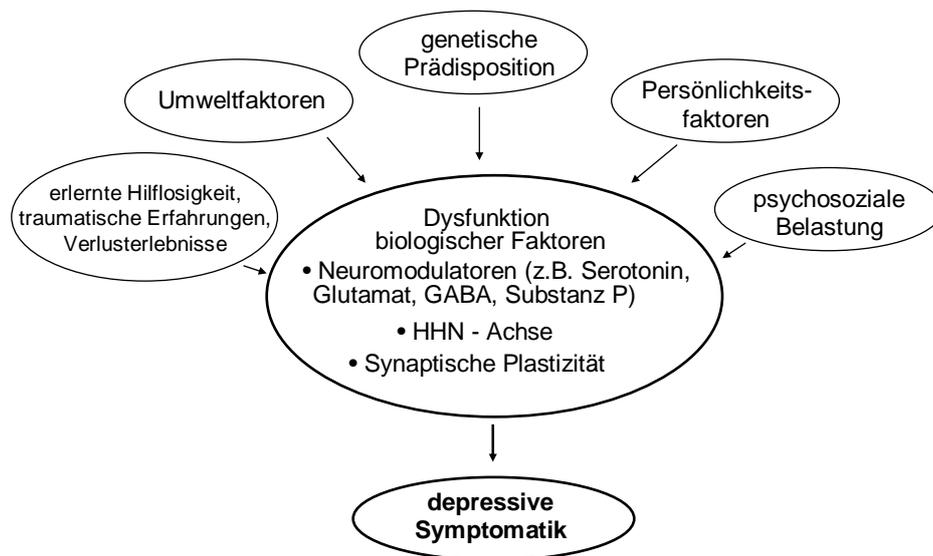


Abbildung 2: Multifaktorielle Pathogenese der Depression nach dem Vulnerabilitäts-Stress-Coping-Modell; modifiziert nach Schüle und Rupprecht, 2007 [28].

Als psychosoziale Faktoren werden Mobbing am Arbeitsplatz, Konflikte mit Angehörigen und Kollegen, Überforderung und auch Monotonie in Arbeit und Familie diskutiert. Lebensgeschichtliche Ereignisse wie Verlust einer geliebten Person, Trennung, Arbeitslosigkeit und verschiedene andere belastende traumatische Ereignisse können die Entstehung der Depression begünstigen. Die depressionsfördernde Wirksamkeit eines Lebensereignisses wird jedoch auch durch die individuelle Disposition des betreffenden Menschen, verschiedene Persönlichkeitsfaktoren wie Ängstlichkeit oder Introvertiertheit beziehungsweise die Fähigkeit mit Stress umzugehen, mitbestimmt (in Übersicht [29]).

Das Zusammenspiel der verschiedenen Faktoren, die ursächlich an der Entstehung der Depression beteiligt sind, wird im Vulnerabilitäts-Stress-Coping-Modell zusammengefasst [28].

1.1.4.2. Monoaminmangel-Hypothese der Depression und Wirkung von Antidepressiva

Eine auf neurobiologischen Grundlagen fußende Hypothese ist die Monoaminmangel-Hypothese. Es wird bei dieser Hypothese davon ausgegangen, dass die Depression auf einem Mangel von Serotonin und Noradrenalin beruht. In neuerer Zeit wurde festgestellt, dass auch ein Mangel an Dopamin an der Pathogenese der Depression beteiligt sein kann.

Nach wie vor hat die Hypothese eines Mangels verschiedener monoaminerger Neurotransmitter im Zentralnervensystem Bestand. Als Ursache werden entweder ein absoluter Mangel an Transmittern im synaptischen Spalt oder ein relativer Mangel durch eine verringerte Empfindlichkeit der Rezeptoren dieser Transmitter angesehen. Die Monoaminmangel-Hypothese konnte durch verschiedene laborchemische und histopathologische Untersuchungen bei depressiven Menschen bekräftigt werden. Im Liquor von Patienten mit Depressionen ist eine verminderte Konzentration an 5-Hydroxyindolessigsäure, einem Metaboliten des Serotonins, gemessen worden (Übersicht [30-32]). Der Serotoningehalt in verschiedenen Hirnregionen von Selbstmordopfern und von Patienten mit Depressionen ist reduziert (Übersicht [31]). Auch der Noradrenalinmetabolit, 3-Methoxy-4-Hydroxyphenylglykol, ist in Liquor, Plasma und Urin von depressiven Patienten erniedrigt [33].

Die Monoaminmangel-Hypothese entspricht der derzeitigen Strategie in der Therapie der Depression. Die Mehrzahl der Antidepressiva erhöht nach akuter Gabe die Monoaminkonzentrationen im synaptischen Spalt durch eine Hemmung der Wiederaufnahme oder des Abbaus von Serotonin und/oder Noradrenalin (siehe 1.1.3.). Mit der einfachen Monoaminmangel-Hypothese kann jedoch nicht erklärt werden, warum die Wirkung der Antidepressiva erst mit einer Latenz von mehr als zwei Wochen einsetzt, obwohl die Konzentrationen der Monoamine im synaptischen Spalt schon nach wenigen Minuten bis Stunden nach Gabe des Antidepressivums erhöht sind (Übersicht [15]).

1.1.4.3. Stress-Hypothese und die Hypothese einer Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achsen-Dysregulation

Menschen, die für lange Zeit chronisch kranke Angehörige pflegen, leiden öfter an Depressionen. Das relative Risiko für die Pflegenden von dementen Angehörigen wird zwischen drei und 39 in der Literatur beschrieben (Übersicht [34]). Chronischer Stress, der zum Teil unvorhergesehen auftritt und dem somit nur schlecht aus dem Weg gegangen werden kann, ruft auch in Labornagern Verhaltensänderungen, die Symptome der Depression widerspiegeln, wie

zum Beispiel Anhedonie (Übersicht [35]), hervor. Einige wenige Tiermodelle wie das Modell des chronisch milden Stressses (*chronic mild stress*) [35] oder das Modell der erlernten Hilflosigkeit (*learned helplessness*) (Übersicht [36]) (siehe 1.3.1.) wurden zur Prüfung dieser Hypothese der Depressionsauslösung entwickelt. Schon in den 60er/70er Jahren konnte Seligman in seinen Experimenten mit dem Modell der erlernten Hilflosigkeit einen Zusammenhang zwischen Stress und depressivem Verhalten feststellen [37].

Stress führt sowohl beim Menschen als auch beim Tier zu einer Aktivierung des HHN-Systems. Dabei kommt es infolge von Stresseinwirkung zu einer Erhöhung des Glucocorticoid-Spiegels (Mensch - Cortisol; Nagetier - Corticosteron) im Blut. Durch den Einfluss von Glucocorticoiden wird der gesamte Organismus in Alarmbereitschaft gestellt. Normalerweise hemmt das Cortisol über den Feedback Mechanismus im Hypothalamus und in der Hypophyse seine eigene Produktion. Damit wird einer Entgleisung dieses Systems entgegengewirkt.

Patienten mit einem *Cushing-Syndrom* zeigen erhöhte Cortisolspiegel im Serum. Neben Veränderungen im Erscheinungsbild und neben metabolischen Problemen entwickeln diese Patienten auch psychische Störungen. 50-68% der an *Morbus Cushing* leidenden Patienten erkranken an einer Depression [38]. Diskutiert wird, ob es durch die Veränderungen in der hypothalamischen-hypophysären Achse, die Verbindungen zum limbischen System unterhält, zu einer Störung der Neurotransmission im Thalamus kommt und dadurch die normale Funktion des Präfrontalcortex beeinflusst wird (Übersicht [39]).

In den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts formulierten verschiedene Arbeitsgruppen etwa zeitgleich die Hypothese, dass eine Stresshormondysregulation als Grund für die Depression angesehen werden kann. Diese Hypothese wurde basierend auf folgenden Befunden bei Patienten mit Depressionen formuliert:

1. Die Konzentrationen von Adreno-Corticotropes-Hormon (ACTH) und Cortisol im Serum sind erhöht. Dies wird auch reflektiert durch die erhöhte Konzentration an freiem Cortisol im Urin [40-43].
2. Die Corticotropin-releasing-Hormon (CRH) Konzentration ist im Liquor von Patienten mit Depression erhöht [44].
3. Die Anzahl an CRH ausschüttenden Neuronen war in Regionen des limbischen Systems (hypothalamischer Nucleus paraventricularis) in einer *post mortem* Untersuchung an Gehirnen von Patienten mit Depression erhöht [45].
4. Die Anzahl der Bindungsstellen für CRH im Frontalcortex von Suizidopfern ist sekundär reduziert infolge der erhöhten CRH Konzentrationen [46].

5. Die tageszeitlichen Rhythmusschwankungen des Cortisols sind gestört und abgeflacht [47].

Ein empfindlicher neuroendokriner Funktionstest, der eine HHN-Achsen-Dysfunktion aufzeigen kann, ist die Kombination des Dexamethason-Suppressionstest mit dem CRH-Test [48]. In dieser Testkombination werden Patienten mit einer niedrigen Einmaldosis an Dexamethason am Vorabend prämediziert und erhalten dann am nächsten Nachmittag intravenös CRH. Erwartet wird, dass durch die Dexamethasongabe die Ausschüttung von ACTH vermindert ist. Bei Depressiven ist diese Rückkopplung jedoch gestört, und es werden am folgenden Tag nach CRH Gabe hohe ACTH- und Cortisolmengen im Plasma gemessen. Eine Studie, in der die Wirkung von verschiedenen Dosen an Dexamethason vor CRH Gabe untersucht wurde, zeigt, dass die ACTH- und Cortisol-suppression bei Patienten mit Depressionen erst bei höheren Dosen von Dexamethason auftritt. Die Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve bedeutet, dass der negative Feedback Mechanismus über die Glucocorticoid-Rezeptoren, an die Dexamethason bindet, in Patienten mit Depressionen beeinträchtigt ist [49].

Die Gabe von Antidepressiva kann zur Normalisierung des Regelkreises führen [50-52]. Der klinische Erfolg einer Pharmakotherapie tritt jedoch erst ein, nachdem die neuroendokrinen Dysregulationen aufgehoben sind [53]. Beobachtet wurde weiterhin, dass sich die erhöhte CRH Konzentration im Liquor von an Depression erkrankten Patienten nach Einsetzen der Wirkung der antidepressiven Therapie normalisiert [52].

Stress kann durch die Aktivierung der HHN-Achse, vor allem durch die Anhebung der Glucocorticoidkonzentration im Organismus, zu einer strukturellen Veränderung im Hippocampus von Ratten mit einhergehender Verminderung des Volumens führen (Übersicht [54]). An Ratten konnte gezeigt werden, dass chronischer *Restraint*-Stress, dessen Stress-induzierendes Moment aus einer starken Einschränkung der Bewegungsmöglichkeit des Tieres besteht, über den Zeitraum von 21 Tagen zu einer Atrophie pyramidalen Zellen in einer Subregion des Hippocampus, der CA3 Region, führte. Diese Atrophie kommt durch einen reversiblen Umbau (Verminderung der Dendritenlänge und der Verzweigungspunkte) der apikalen Dendriten zustande. Die chronische (14 Tage) aber nicht die akute Gabe von kleinen Mengen von Corticosteroiden an Mäuse führt zu einer Abnahme der hippocampalen Zellproliferation und auch des Volumens des Hippocampus [55]. Verhindert werden konnte die Volumenverminderung durch chronische Gabe von Antidepressiva. Es wird diskutiert, ob die durch Stress und Hypercortisolämie vermehrt ausgeschütteten exzitatorischen Aminosäuren für den Schaden in den apikalen Dendriten zuständig sind (Übersicht [56]).

Außerdem wird davon ausgegangen, dass die Anfälligkeit der Neurogenese im adulten Gyrus dentatus, einer Region des Hippocampus, unter anderem von der Sensitivität der Vorläuferzellen von Neuronen gegenüber Glucocorticoiden abhängig ist. Glucocorticoide scheinen dabei zwei Wirkungen auf die Neurogenese im adulten Gyrus dentatus zu haben: Zum einen reguliert der absolute Glucocorticoidspiegel die Proliferationsrate der Vorläuferzellen. Die Neurogenese und das Überleben von neu generierten Zellen werden dabei durch hohe Glucocorticoidspiegel unterdrückt. Zum anderen beeinflusst ein intakter tageszeitlicher Rhythmus der Glucocorticoidausschüttung die Ausschüttung von Serotonin und Stickstoffmonoxid. Diese wiederum aktivieren die Progenitorzellen im Gyrus dentatus [57] zur Proliferation. In Patienten mit Hypercortisolismus bei *Morbus Cushing* konnte eine Atrophie des Hippocampus in der Magnetresonanztomographie (MRT) [58], (Übersicht [59]) nachgewiesen werden.

1.1.4.4. Neuroplastizität und Neurogenese in der Depression und Erkenntnisse aus Magnetresonanztomographie und *post mortem* Studien

Das adulte Gehirn besitzt mehr Plastizität, als man lange Zeit gedacht hatte. Man ging davon aus, dass neuronale Verbindungen bereits in der frühen Kindheit festgelegt werden und unveränderbar sind und dass die Neurogenese mit der Geburt abgeschlossen ist. Neurogenese, Wachstum und Verzweigung von Dendriten sowie Umbau der synaptischen Kontakte in verschiedenen Regionen des Gehirns treten jedoch kontinuierlich auch im erwachsenen Alter auf. Jetzt weiß man, dass in zwei Hirnregionen auch im Erwachsenenalter Neurogenese stattfinden kann, in der Subventrikuläre Zone der Seitenventrikel, so dass im Bulbus olfactorius täglich reife Nervenzellen gebildet werden können, und in der Subgranulären Zone des Gyrus dentatus im Hippocampus. Das Zentrale Nervensystem (ZNS) ist in der Lage, sich den ständig ändernden Erfordernissen anzupassen. Viele Befunde deuten darauf hin, dass die Depressive Episode mit einer Beeinträchtigung der strukturellen Plastizität in verschiedenen Regionen des ZNS verbunden ist. Bildgebende Verfahren zeigen eine Verminderung des hippocampalen und corticalen Volumens in Patienten mit Depression [60-62]. Die Volumenreduktion des Hippocampus korreliert mit der Dauer der Depression und der Anzahl an Rezidiven [60, 61, 63, 64]. Sheline et al. konnten zusätzlich nachweisen, dass eine antidepressive Therapie einer weiteren Abnahme des Hippocampusvolumens entgegen wirkt [65].

Die Beobachtung der Volumenreduktion im Hippocampus wird durch neuropathologische Studien an Patienten mit Depression unterstützt. *Post mortem* konnte ebenfalls eine Reduktion des corticalen Volumens gezeigt werden. Es wurden Neuronen- und Gliazellverluste sowie -

atrophien im Präfrontalcortex und im Orbitofrontalcortex [66] und eine Verminderung der Neuronengröße und Abnahme der Gliazelldichte im Gyrus cingulus [67] in Gehirnen von verstorbenen Patienten, die an Depression litten, beobachtet.

Volumenabnahmen im ZNS sind aber auch in anderen mit Stress verbundenen psychischen Erkrankungen vorgefunden worden, wie zum Beispiel beim Posttraumatischen Stresssyndrom [68]. Eine Abnahme des Hippocampusvolumens wurde auch bei neuropsychiatrischen Erkrankungen beobachtet, die mit hippocampalen Störungen, wie der Beeinträchtigung des Lernens und des Gedächtnis sowie der Konzentrationsfähigkeit einhergehen. Kognitive Funktionsstörungen wie verminderte Aufmerksamkeit, Lernschwierigkeiten und Konzentrationsprobleme von Patienten mit *Morbus Parkinson* und beginnendem *Morbus Alzheimer* korrelieren mit einem verminderten Volumen in Hirnregionen, die für das Gedächtnis und Lernen zuständig sind, wie zum Beispiel Hippocampus (in Übersicht [69]), Amygdala (Übersicht [70]), Präfrontalcortex und Gyrus cingulus [71]. An Tieren, die chronischem Immobilisationsstress (*Restraint-Stress*) ausgeliefert waren, wurde ebenfalls eine Verminderung des hippocampalen Volumens beobachtet [72] (siehe 1.1.4.3.). Der pathophysiologische Prozess, der diesen morphologischen Veränderungen im Gehirn zu Grunde liegt, ist derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Reduktion im Volumen des Hippocampus wird mit einer Abnahme der Neuroplastizität und einer damit einhergehenden Abnahme der Neurogenese im Hippocampus erklärt (in Übersicht [73]). Außerdem lassen klinische Daten vermuten, dass eine Verlagerung der Flüssigkeitsbalance zwischen den Ventrikeln und dem Hirngewebe für den deutlichen hippocampalen Volumenverlust verantwortlich ist [74].

Diskutiert wird, ob Stress und der damit einhergehende Hypercortisolismus und die Dysregulation der HHN-Achsen für eine Reihe von morphologischen Veränderungen im Hippocampus und Cortex verantwortlich sind (siehe Abbildung 3). Tupajas wurden psychosozialen Stress ausgeliefert, wobei sozial untergeordnete Tiere in einem Käfig zusammen mit sozial dominanten Tieren gehalten wurden. In den Gehirnen von untergeordneten Tieren konnte eine Veränderung der zellulären Morphologie mit Abnahme der apikalen Dendritenlänge und der Verzweigung der Pyramidenzellen in der CA3 Region des Hippocampus gezeigt werden [75, 76].

Zellschrumpfung sind für Neurone und Gliazellen beschrieben worden [76]. Zusätzlich konnten nach chronischem Stress auch eine Verringerung der Astrogliazellzahl [77] und eine reduzierte Gliogenese (Übersicht [67, 78]) nachgewiesen werden.

Auch Apoptose von Neuronen, der programmierte Zelltod, wird als ein Grund für die Volumenminderung angesehen, obwohl in Studien kein massiver neuronaler Verlust nach

chronischem Stress in Tieren gezeigt werden konnte (Übersicht [79, 80]). In einer *post mortem* Untersuchung an Hirnen von depressiven Patienten ist ebenfalls keine erhöhte Apoptoserate der Pyramidenzellen in der CA3 Region beobachtet worden, die für die Volumenminderung, die im MRT gezeigt wurde, allein verantwortlich sein könnte (Übersicht [81, 82]). Somit muss auch eine verminderte Neurogenese im Gyrus dentatus des Hippocampus (Übersicht [83]) als Ursache für die Volumenreduktion in Betracht gezogen werden.

Mögliche Ursachen für den hippocampalen Volumenverlust bei Stresseinwirkung

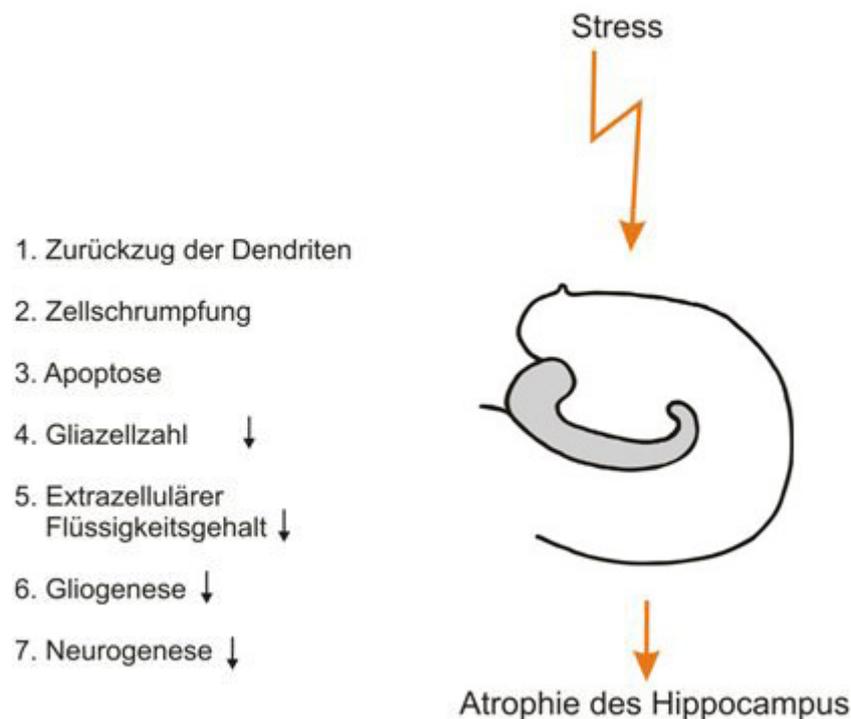


Abbildung 3: Zusammenstellung der Möglichkeiten, die für die Volumenminderung des Hippocampus durch Stress verantwortlich sein können. Modifiziert nach Czeh und Lucassen, 2007 (in Übersicht [84]).

Es wird diskutiert, ob eine neurotoxische Wirkung der Glucocorticoide für eine Hemmung der Neurogenese und Retraktion von Dendriten verantwortlich sein könnte (Übersicht [85]).

Die Anzahl der neu generierten Zellen bei gesunden Menschen ist jedoch sehr klein. Deshalb ist fraglich, ob eine Abnahme der Neurogenese im Gyrus dentatus und in der Subventrikulären Zone im MRT als Volumenabnahme sichtbar wird. Daher wird bezweifelt, ob eine Störung der adulten hippocampalen Neurogenese (Erstbeschreiber Jacobs, 2000, in Übersicht [86]) allein ursächlich für die Entstehung einer Depression ist [87].

Die gegensätzlichen Effekte von Antidepressiva und Stress auf die Neurogenese im Hippocampus lassen jedoch vermuten, dass Störungen der Neurogenese an der Entstehung der Depression beteiligt sind (Übersicht [88, 89]) (siehe 1.2.2. und 1.2.4.). Alle untersuchten Antidepressiva stimulieren die adulte Neurogenese in Tiermodellen der Depression und zeigen keine antidepressive Wirkung, wenn die adulte Neurogenese fehlt oder unterdrückt wird [90]. Die Wirkungslatenz der Antidepressiva könnte damit erklärt werden, dass die antidepressive Wirkung erst dann beim Patienten zu beobachten ist, wenn die Neurogenese bereits wieder normalisiert ist.

Neben Antidepressiva werden auch Elektrokonvulsionstherapien (ECT) und Transcranielle Magnetstimulation bei der Therapie der Depression eingesetzt. Während Antidepressiva und ECT nachweislich die Neurogenese fördern, hat die Transcranielle Magnetstimulation keinen Einfluss auf diese (Übersicht [83]). Das deutet darauf hin, dass für die erfolgreiche Therapie der Depression die Neurogenese nicht allein verantwortlich ist [91]. Unterstützt wird diese Ansicht dadurch, dass erlernte Hilflosigkeit bei Ratten, die zu dieser Verhaltensweise neigen und als ein genetisches Tiermodell der Depression eingesetzt werden, auch ohne Verminderung neugenerierter Zellen im Hippocampus auftritt und dass umgekehrt eine Herabsetzung der Neurogenese durch *Restraint*-Stress nicht zwangsläufig zu einem depressionsähnlichen Verhalten in den Tieren führt (Übersicht [83]). Dies lässt die Frage entstehen, ob die verminderte Neurogenese bei der Depressionsentstehung als Epiphänomen anzusehen ist.

Um der Komplexität der Entstehung einer Depression gerecht zu werden, sollte die Neurogenesetheorie der Depression auf die Neuroplastizitätshypothese der Depression ausgeweitet werden.

1.2. Neurotrophine in der Depression

1.2.1. Neurotrophine und Neurogenese

Neurotrophe Wachstumsfaktoren sind extrazelluläre Signalmoleküle, die eine grosse Anzahl von Funktionen in der Entwicklung und Erhaltung des Gehirns übernehmen. Das Nervensystem von Säugetieren benötigt ein kontinuierliches Angebot an solchen Polypeptidhormonen. Die klassische Neurotrophin-Hypothese [92] geht davon aus, dass unreife Neurone um limitierte, von Zielzellen dargebotene trophische Faktoren konkurrieren. Nur jene Neurone, die erfolgreich synaptische Verbindungen knüpfen, erreichen ausreichend viele dieser trophischen Faktoren, um überleben zu können. Die Neurotrophin-Hypothese der Depression besagt, dass ein vermindertes

Vorhandensein neurotropher Faktoren ein wesentliches pathophysiologisches Korrelat der Depression ist.

Es können folgende Klassen von neurotrophen Wachstumsfaktoren unterschieden werden (Übersicht [87]):

- Neurotrophine mit dem *Nerve Growth Factor* (NGF), *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) und die Neurotrophine NT-3, NT-4/-5, NT-6 und NT-7,
- *Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor* (GDNF),
- nicht-neuronale Wachstumsfaktoren wie *Hepatic Growth Factor* (HGF), die zur hepatozytären Wachstumsfaktorenfamilie gehören und
- Neurokine, neurotrophe Zytokine wie der *Ciliary Neurotrophic Factor* (CNTF) und Interleukin-6.

Derzeit sind drei verschiedene Möglichkeiten für die Wachstumsfaktoren bekannt, ihren Wirkort zu erreichen. Die neurotrophen Wachstumsfaktoren können durch retrograden Transport vom innervierten Ziel, durch anterograden Transport von afferenten Regionen (Übersicht [93, 94]) und durch autokrine Schleifen [95] zu ihrer Wirkungsstelle kommen.

Neurotrophine wie BDNF und NGF fördern im Gehirn das Überleben und die Differenzierung von Nervenzellen. Sie regulieren die Expression von Genen und Proteinen und fördern die Produktion verschiedener Botenstoffe. Durch wiederholte neuronale Aktivität, die durch Neurotransmitter vermittelt wird, können die Expression und Sekretion von BDNF und NGF sowie deren Wirkung an der Synapse verbessert werden. Damit werden die synaptische Transmission und die Verbindungen zwischen den Neuronen optimiert (Übersicht [96-98]).

Die Neurotrophine binden an die Tropomyosin Rezeptor Kinasen (Trk)-Rezeptoren und an den niedrig-affinen 75 kD *Nerve Growth Factor*-Rezeptor (p75).

An die verschiedenen hochaffinen Trk-Rezeptoren binden die einzelnen reifen Neurotrophine mit unterschiedlicher Affinität. Zum Beispiel bindet an den Trk A-Rezeptor NGF mit höchster Affinität, an den Trk B-Rezeptor binden BDNF, NT-4 und -5, und an den Trk C-Rezeptor bindet NT-3 mit sehr hoher Affinität (Übersicht [99-101]). Die Trk-Rezeptoren vermitteln das Überleben und die Differenzierung von neuronalen Zellen. Durch die Bindung der Neurotrophine an ihre Membranrezeptoren kommt es zu einer intrazellulären Signaltransduktion, welche die Apoptose regulieren kann. Signalkaskaden, die die Effekte der neurotrophen Faktoren durch die Bindung an die Trk-Rezeptoren übermitteln, schließen die Mitogen-Aktivierte Protein Kinase (MAPK), die Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) und die Phospholipase C- γ (PLC- γ) ein (Übersicht [102]). Die Aktivierung der MAPK-Kaskade kann eine Apoptose verhindern,

indem Bad (Bcl-2-Antagonist of Cell Death), ein proapoptotisches Protein, phosphoryliert wird und ein antiapoptotisches Protein Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) vermehrt exprimiert wird. Es ist möglich, dass die erhöhte Expression von Bcl-2 auf einem CREB (*cAMP-response element binding protein*) abhängigen Transkriptionsmechanismus basiert [103, 104].

Der p75-Rezeptor gehört zu den *Tumor Necrosis Factor*-Rezeptoren, und an ihn binden alle Neurotrophine, d.h. NGF und BDNF und auch NT-3, -4/ -5 mit gleicher und niedriger Affinität. Das bedeutet, dass die Neurotrophine erst in höheren Konzentrationen über diese Bindungsstelle Effekte auslösen. Der p75-Rezeptor kann die Affinität des Trk-Rezeptors zu seinen Liganden modulieren. Durch die Bindung der Neurotrophine an den p75-Rezeptor können der Transkriptionsfaktor NF (nukleärer Faktor)- κ -B oder eine mitogen aktivierte Proteinkinase, die c-jun N-terminale Kinase, die auf stressreiche Stimuli reagiert und in Prozesse wie die Apoptose involviert ist, aktiviert werden. Die Bindung von proNGF und proBDNF, die Vorstufen der Neurotrophine NGF und BDNF sind, an den p75-Rezeptor bei gleichzeitiger Bindung an Sortilin, einem Co-Rezeptor, kann den programmierten Zelltod induzieren (in Übersicht [105, 106]). Damit sind auch die Vorstufen der Neurotrophine aktiv. Sie entwickeln zum Teil entgegengesetzte Wirkungen und modulieren biologische Abläufe, die unterschiedlich von denen der reifen Neurotrophine sind.

Der Schwerpunkt wird im Folgenden auf die Beeinflussung der Neurogenese durch die beiden Neurotrophine BDNF und NGF gelegt.

BDNF und NGF werden in hohen Konzentrationen im adulten Hippocampus exprimiert [107]. Von den Neurotrophinen wird BDNF als der wichtigste Faktor für die Modulation der Neuroplastizität und insbesondere der Neurogenese angesehen.

Durch die folgenden Befunde wird diese Aussage untermauert: Physische Aktivität induziert die hippocampale Expression von BDNF mRNA und fördert sowohl die hippocampale Neurogenese als auch die Langzeitpotenzierung beim Lernen im Gyrus dentatus von adulten männlichen Sprague-Dawley Ratten [108]. In Patienten mit *Morbus Alzheimer* konnte eine verminderte Konzentration an BDNF Protein im Nucleus basalis im Vorderhirn gemessen werden [109]. BDNF induziert nach Infusion in den rechten lateralen Hirnventrikel die Neurogenese in der Subventrikulären Zone von adulten Ratten [110]. Heterozygote BDNF *knockout* (BDNF +/-) Mäuse weisen eine reduzierte adulte hippocampale Neurogenese auf [111]. Eine Überexpression von BDNF mit Hilfe eines viralen Vektors führt zu einer dauerhaften Induktion der Neurogenese im Bulbus olfactorius von adulten Ratten [112]. Unter pathologischen Bedingungen, wie dem Zustand nach Ischämie, kann BDNF entgegengesetzt wirken und sogar die Neurogenese in adulten Rattenhirnen unterdrücken [113]. Da bekannt ist, dass das BDNF Gen aus 8

verschiedenen Exons besteht und es verschiedene Splicevarianten gibt, existieren verschiedene BDNF Transkripte, die unter Umständen auch für die unterschiedlichen Wirkungen von BDNF stehen können (siehe Diskussion) [114].

Auch NGF spielt eine wichtige Rolle in der Beeinflussung der Neuroplastizität im ZNS (Übersicht [115]). Wie auch BDNF unterstützt NGF das Überleben von cholinergen Neuronen im basalen Vorderhirn [116]. Es ließ sich nachweisen, dass die intraventrikuläre Gabe von NGF bei adulten Ratten für die Synaptogenese nach Decortikation in angrenzenden Cortexregionen notwendig ist [117]. Die Ratten, die nach der Decortikation kein NGF erhielten, zeigten diese kompensatorischen Strukturveränderungen nicht und wiesen sogar weniger Synapsen und geschrumpfte cholinerge Boutons auf. Somit ermöglicht NGF kompensatorische Strukturveränderungen nach dem Setzen von Läsionen. In adulten Mäusen konnte dargestellt werden, dass für das Überleben und Bilden dendritischer Verzweigungen von sympathischen Ganglionzellen im Ganglion cervicale superior NGF benötigt wird [118]. Unter „*Enriched Environmental Conditions*“ [EC] mit körperlichen, sozialen und sensorischen Stimuli erhöhen sich die NGF Genexpression und die Proteinbildung im Hippocampus von Ratten (Übersicht [119]). EC werden durch das Halten der Tiere in Gruppen mit bis zu 12 Tieren in größeren Käfigen mit verschiedenen permanent vorhandenen Objekten wie Leitern, Laufrädern und Tunneln geschaffen.

Nach einer Langzeitinfusion von NGF über 20 Tage in den rechten lateralen Ventrikel von adulten männlichen Ratten konnte beobachtet werden, dass mehr neu gebildete Zellen im Stratum granulare, der Körnerzellschicht des Hippocampus, überleben als ohne NGF-Infusion [120]. Durch die intraventrikuläre Gabe von NGF werden eine Atrophie und der Tod von axotomierten cholinergen Neuronen im adulten ZNS von Ratten verhindert [121]. Alte Ratten, die für ihr schlechtes räumliches Gedächtnis ausgewählt wurden, vollbringen nach vierwöchiger intraventrikulärer NGF Infusion Leistungen in einfachen Tests, die vergleichbar sind mit gleichaltrigen Tieren ohne Defekte des räumlichen Gedächtnisses (Übersicht [122]). Auch an axotomierten olfactorischen Rezeptorneuronen wirkt exogen appliziertes NGF protektiv gegen eine Degeneration [123]. Nach dem Setzen von Läsionen mit Kainsäure im Hippocampus steigt die NGF Konzentration im Hippocampus unabhängig vom Alter der Ratten an und sorgt dort wahrscheinlich zusammen mit BDNF für eine synaptische Reorganisation nach der Verletzung [124]. Wie auch BDNF ist NGF somit wichtig für das Überleben und den Erhalt von Neuronen.

1.2.2. Neurotrophine und Stress

Es wird mittlerweile allgemein akzeptiert, dass Stress einen Einfluss auf die Entstehung von Depressionen hat und zu morphologischen Veränderungen des Gehirnes führt (siehe 1.1.4.3. und 1.1.4.4.). Von mehreren Autoren wird diskutiert, ob die Aktivierung der Glucocorticoid-Rezeptoren eine Suppression der Freisetzung der Neurotrophine nach sich zieht. Im Hippocampus sitzt eine bedeutende Anzahl von Glucocorticoid-Rezeptoren. Es wird angenommen, dass es unter chronischer Einwirkung von Stress, der zu einer Entstehung einer Depression führen kann, zu einer Dysregulation der HHN-Achse kommt. Damit einhergehend entsteht eine Hypercortisolämie, und durch zum Teil unbekannte Prozesse werden die Neurotrophine vermindert freigesetzt. Diese Annahme finden wir bestätigt in Ratten, die für drei Wochen täglich *Restraint*-Stress ausgesetzt waren (Übersicht [125, 126]). Bei ihnen ist ein Abfall von BDNF mRNA im Hippocampus beobachtet worden.

Pinnock und Herbert [57] konnten außerdem zeigen, dass die Wirkung von BDNF auf die Neurogenese im Gyrus dentatus von einem intakten tageszeitlichen Rhythmus der Glucocorticoidausschüttung abhängig ist (siehe 1.1.4.3.). Dieser kann bei chronischer Hypercortisolämie infolge von chronischem Stress und Depression aufgehoben sein.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben die Einwirkung von akutem und chronischem Stress auf Veränderungen der Neurotrophinkonzentrationen im Blut, beziehungsweise Plasma, beim Menschen untersucht. Nach chronischer Stresseinwirkung sind in Pflegekräften erhöhte NGF Werte im Plasma gemessen worden [127]. Bei akutem Stress, bei dem Probanden das erste Mal einen Fallschirmsprung absolvieren, ist NGF im Plasma vor und nach dem Sprung erhöht [128]. Eine andere Arbeitsgruppe hat keine Veränderungen in der NGF Konzentration im Serum vor und nach Halten eines akademischen Vortrages gezeigt [129]. Diese Befunde zu Veränderungen von NGF unter akutem und chronischem Stress sprechen beim Menschen gegen die genannte Annahme, dass die Neurotrophinfreisetzung durch Stresseinwirkung vermindert wird.

Eine Erhöhung der Neurotrophine unter akutem und chronischem Stress wäre damit erklärbar, dass NGF und BDNF neuroprotektive Eigenschaften besitzen. Durch die glucocorticoidinduzierte NGF Erhöhung würden die Zellen gegen die metabolisch schädigenden Wirkungen der Glucocorticoide geschützt sein (siehe 1.1.4.4.) [130] und die hippocampale Homeostase bleibt aufrechterhalten. Zusätzlich kann angenommen werden, dass die vermehrte Neurotrophinfreisetzung die neuronale Plastizität fördert, damit das Individuum mit neuen Stressoren und Stimuli umgehen kann [131].

Neuere Befunde, die zeigen, dass sowohl Neurotrophine als auch Glucocorticoide Trk-Rezeptoren aktivieren und neuroprotektive Vorgänge einleiten können, unterstützen diese Annahme [132]. Es konnte außerdem beobachtet werden, dass die Wirkungen der Glucocorticoide und der Neurotrophine durch eine gemeinsame Endstrecke übermittelt werden und dass Glucocorticoide neben ihrer Neurotoxizität auch neuroprotektive Vorgänge induzieren [132].

1.2.3. Neurotrophine und Depression

Unser derzeitiges Wissen über neurotrophe Faktoren und Depression beim Menschen basiert auf *post mortem* Studien, bildgebenden Verfahren, der Zuhilfenahme von Tiermodellen der Depression und den pharmakologischen Wirkungen der Antidepressiva und hat zur Neurotrophin-Hypothese der Depression geführt.

In Hippocampi und Präfrontalcortices von therapienaiven Patienten, die Suizid begangen hatten, sind geringere BDNF Konzentrationen gemessen worden als in Hirngeweben von Verstorbenen, die keinen Suizid begangen hatten, oder bei Patienten, die unter antidepressiver Therapie standen und Suizid begingen [133]. Jedoch zeigten sich keine Unterschiede in den BDNF Konzentrationen in den Hirnen von Suizidopfern mit unterschiedlichen vorbestehenden psychiatrischen Diagnosen. Neben dem erniedrigten Gehalt an BDNF konnte in Suizidopfern auch eine reduzierte Konzentration an CREB (*cAMP-response element binding protein*), das die Expression von BDNF initiieren kann, und eine reduzierte Zahl an Trk-B Rezeptoren gefunden werden [134, 135].

Im Plasma von depressiven Patienten war ebenfalls die BDNF Konzentration vermindert im Vergleich zu den Konzentrationen im Plasma von gesunden Studienteilnehmern [136]. Die Herkunft von BDNF, das im Blut zirkuliert, ist jedoch nicht genau bekannt. Thrombozyten, Endothelzellen und neuronale Zellen werden als Quelle für die BDNF Freisetzung in den Blutkreislauf betrachtet [137, 138]. Thrombozyten können Neurotrophine binden und in ihren α -Granula speichern und bei Aktivierung wieder freisetzen. Deshalb ist anzunehmen, dass eine Verminderung von BDNF im Serum durch eine geringere Ausschüttung von BDNF aus den Thrombozyten entsteht [137, 139]. Auch die Schwere der Depression korreliert negativ mit dem Gehalt von BDNF im Plasma. Dies konnte in mehreren Studien unter Zuhilfenahme verschiedener Rating Scales (*Montgomery-Asberg-Depression Rating Scale* und *Hamilton Depression Rating Scale*) bestätigt werden [136, 140]. Zusätzlich scheint auch das suizidale

Verhalten von depressiven Patienten mit erniedrigten Plasmakonzentrationen an BDNF assoziiert zu sein [141].

Zu NGF existieren nur wenige Untersuchungen. Zu bedenken ist, dass die Bestimmung von NGF, das in viel geringeren Konzentrationen als BDNF vorkommt, schwieriger ist. Das könnte auch begründen, warum die Ergebnisse widersprüchlich sind [142]. Bei Pflegekräften waren hohe Stresswahrnehmung (*high perceived stress*) und Depression mit erhöhten NGF Konzentrationen im Blut assoziiert [127]. Bei der Untersuchung von Hirngeweben von Suizidopfern wurden jedoch erniedrigte Protein und mRNA Konzentrationen von NGF im Hippocampus und ein erniedrigter Proteingehalt im Präfrontalcortex beobachtet [143].

1.2.4. Neurotrophine und Antidepressiva

Eine länger andauernde Behandlung mit Antidepressiva führt zu einer verbesserten Neuroplastizität im Bereich des Hippocampus (Übersicht [89]) und zu einer verstärkten Expression von neurotrophen Faktoren wie zum Beispiel BDNF. In letzter Zeit gewinnt zunehmend die Vorstellung an Bedeutung, dass längerfristige Anwendung von Antidepressiva durch Beeinflussung der Genexpression die Biosynthese neuroprotektiver Proteine steigert [144]. Antidepressiva bewirken die Phosphorylierung von CREB. Daraufhin kann CREB an den BDNF Promotor binden und die BDNF Transkription induzieren (Übersicht [89]). Damit kann angenommen werden, dass die Neurotrophine eine wichtige Rolle in der Effektivierung der therapeutischen Wirkung der Antidepressiva spielen. Transgene Mäuse mit reduzierter BDNF Expression und Signalweiterleitung, einem Tiermodell der Depression, zeigen keine entsprechende Antwort auf Antidepressiva. Daher wird angenommen, dass Antidepressiva nicht ohne BDNF bzw. Trk B-Rezeptor Aktivierung wirken können [145].

Die bilaterale Infusion von BDNF in den Gyrus dentatus des Hippocampus von Ratten zeigt einen „antidepressiven“ Effekt in einem Test auf antidepressive Wirkung, dem *Forced Swim Test*, und im Paradigma der erlernten Hilflosigkeit (*Learned Helplessness*). Dieser tritt drei Tage nach einmaliger Gabe auf und hält für 10 Tage an [146]. Durch die Infusion von BDNF in den Hippocampus werden in beiden Tiermodellen Verhaltenseffekte hervorgerufen, wie sie für Antidepressiva typisch sind [147, 148].

In einer *post mortem* Studie konnte gezeigt werden, dass die BDNF Immunoreaktivität im Hippocampus von Patienten mit affektiven Störungen, die zum Zeitpunkt des Todes unter antidepressiver Therapie standen, höher war als in Gehirnen von Patienten ohne Therapie [149]. In *post mortem* Studien an Suizidopfern mit Medikation waren die BDNF und NGF

Konzentrationen im Hippocampus und Präfrontalcortex genauso hoch wie in gesunden Kontrollen. In Opfern ohne Medikation waren sie erniedrigt [133, 143].

Mehrere Untersuchungen zeigen, dass die Konzentration von BDNF im Serum von Patienten mit Depressionen signifikant erniedrigt ist und unter antidepressiver Therapie wieder Normalwerte annimmt [136, 150] (siehe 1.2.3.).

Limitierend bei Untersuchungen im Serum ist die Unsicherheit, ob BDNF die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann und Serumveränderungen somit aussagekräftig sind.

Auch in Ratten konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Klassen von Antidepressiva die BDNF Expression in wichtigen Arealen des Hippocampus, wie CA1 und CA3 und dem Stratum granulare, signifikant erhöhen [151, 152]. Nach chronischer Gabe von Antidepressiva wie MAO-Hemmer [151], SSRIs [153], TCA [154] und Antidepressiva mit anderen Wirkungsmechanismen (Mianserin und NMDA-Antagonisten wie Memantin) [155] konnte eine erhöhte BDNF Konzentration im Hippocampus gemessen werden verglichen mit der BDNF Konzentration in nicht behandelten Kontrolltieren.

Außerdem wirken auch andere Therapiemaßnahmen, die zur Behandlung der Depression erfolgreich eingesetzt werden können, wie ECT [151], Transcraniellen Magnetstimulation [156] und physische Aktivität [154, 157] positiv auf die BDNF Expression in Ratten.

Eine nur kurzzeitige Gabe der Antidepressiva Tranylcypromin (MAO-Inhibitor) und Fluoxetin (SSRI) bewirkt jedoch keine erhöhte Expression von BDNF im Gyrus dentatus [153].

Wenn von der Neurotrophin-Hypothese ausgegangen wird (1.2.1.) und die Neurogenese entscheidend für Entstehung und Therapieerfolg einer Depression ist, dann ist es plausibel, dass die therapeutische Wirkung der Antidepressiva erst nach einer Latenz, die der Zeit für die Induktion der Neurogenese entspricht, auftritt. Diese Vorstellung wird unterstützt durch die Befunde, dass erst die chronische Therapie mit Antidepressiva die Neurogenese im Hippocampus von adulten Ratten [158] erhöht, während die kurzzeitige Gabe von Antidepressiva keine Wirkung zeigt.

Eine antidepressive Pharmakotherapie scheint die stressinduzierte Herabregulation der Neurogenese zu überwinden und auch zu verhindern (Übersicht [88]). Wird hingegen die Neurogenese durch Bestrahlung oder genetische Veränderungen verhindert, wird auch der Effekt der antidepressiven Therapie auf das Verhalten blockiert [90]. Die Wirkung der Therapie ist mit der neuronalen Plastizität eng verknüpft (Übersicht [159, 160]).

Obwohl die Neurotrophin-Hypothese der Depression so plausibel scheint, steht der direkte Beweis, dass eine verminderte BDNF Konzentration im Hippocampus ursächlich für die Entstehung depressiver Symptome ist, aus. Es wird derzeit kontrovers diskutiert, ob die Effekte

von Antidepressiva auf die Neurogenese eine Voraussetzung ihrer klinischen Wirksamkeit darstellen oder ob es sich hierbei lediglich um ein Epiphänomen handelt (Übersicht [83]). Einige Studien konnten einen entgegengesetzten (erniedrigte Genexpression von BDNF im Gyrus dentatus) oder gar keinen Effekt (Gleichbleiben der BDNF Konzentration und der mRNA für BDNF) [153, 161] von verschiedenen Antidepressiva, wie zum Beispiel Fluoxetin [162, 163], auf die BDNF Regulation zeigen. Auch gibt es Berichte, in denen die Fähigkeit von Antidepressiva, durch Stress verursachte Veränderungen im Bereich der Dendriten der CA3 Pyramidenzellen rückgängig zu machen, ohne Induktion der BDNF mRNA Expression vermittelt wird [164]. *Knockout*-Mäuse für CREB, bei denen Antidepressiva wegen des Fehlens des Transkriptionsfaktors CREB keine vermehrte Expression von BDNF induzieren, zeigen dennoch die übliche Reaktion auf die Gabe von Antidepressiva im *Forced Swim Test* und im *Tail Suspension Test* [165].

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass die Befunde zur Rolle der Neurotrophine in der Depression auf einem Zusammenhang zwischen Stress und Erniedrigung der BDNF Konzentrationen beziehungsweise antidepressiver Therapie und Erhöhung der BDNF Konzentration im Hippocampus und anderen Hirnregionen basieren. Die verminderten Neurotrophinkonzentrationen im Hippocampus könnten die primäre Ursache für die im MRT beobachtbaren Atrophien des Hippocampus darstellen (siehe 1.1.4.4.). Als Bindeglied gelten dabei die verminderte Neurogenese und Neuroplastizität infolge des Neurotrophinmangels. Dennoch führt die Unterbrechung des Signalweges zwischen BDNF und seinen Rezeptoren nicht zur Induktion depressiven Verhaltens. Somit scheint BDNF ein wichtiger Faktor für die Wirksamkeit von Antidepressiva, aber nicht der alleinige Mediator für die Depression zu sein.

1.3. Tiermodelle in der Depression

1.3.1. Überblick über die Tiermodelle der Depression

Die Depression ist eine multifaktoriell bedingte und komplexe psychische Störung. Daher ist es schwer, die Symptome dieser Erkrankung in nur einem Tiermodell nachzustellen. Viele der zur Diagnosestellung einer Depression führenden Symptome sind für den Menschen einzigartig. Hoffnungslosigkeit, Schuldgefühle und die wiederkehrenden Gedanken an Tod und Suizid können von Versuchstieren nicht erfragt werden. Im Laufe der Zeit sind in der tierexperimentellen Depressionsforschung mehrere valide Modelle entstanden, die im Einzelnen verschiedene Aspekte der Depression darstellen. Die Vorteile, die ein Tiermodell für experimentelle Depressionsforschung bietet, liegen vor allem darin, dass die

Studienbedingungen definiert werden können und auf der Suche der Pathogenese einzelne Regelsysteme beeinflusst oder ausgeschaltet werden können. Die Modelle werden verwendet, um die neurobiologischen Grundlagen aufzuklären.

Ein Tiermodell ist dann gültig, wenn es möglichst allen drei Kriterien Augenscheinvalidität (*face validity*), Vorhersagevalidität (*predictive validity*) und Konstruktvalidität (*construct validity*) entspricht [166]. Die Augenscheinvalidität gibt dabei die Analogie zwischen der Verhaltensänderung des Tieres und der Symptomatik beim Patienten an. Ein Tiermodell besitzt nicht nur gute Vorhersagevalidität, wenn es therapeutisch wirksame von unwirksamen Pharmaka unterscheiden kann, sondern auch den Erfolg anderer therapeutischer Interventionen vorhersagen kann. Die Konstruktvalidität bei einem Tiermodell liegt dann vor, wenn es auf den gleichen Mechanismen der Auslösung beruht, die auch beim Menschen für die entsprechende Krankheit als ursächlich betrachtet werden. Diese kann bei den Tiermodellen der Depression nur mit Einschränkungen erreicht werden, da die neurobiologischen Grundlagen der Depression nicht sicher bekannt sind.

Die Tiermodelle der Depression werden nach der Art und Weise der Induktion eingeteilt. Vier Gruppen von Tiermodellen für die Depression existieren, die durch verschiedene Entstehungsweisen gekennzeichnet sind. So können Tiermodelle der Depression basierend auf pharmakologischer Induktion, genetischen Veränderungen, Läsionen bestimmter Hirnregionen und die derzeit am häufigsten eingesetzten Modelle, die durch Stress induziert werden, unterschieden werden (siehe Tabelle 1).

Anfangs war es das Ziel, in Tiermodellen die gesamte Phänomenologie der Depression zu simulieren (Übersicht [167]). Mittlerweile versucht man, einzelne Aspekte der Depression getrennt nachzustellen, um diese dann vertieft untersuchen zu können.

Von den Tiermodellen der Depression in der pharmakologischen Forschung sind die am häufigsten eingesetzten Antidepressivatests zu unterscheiden. Das Ziel dieser Screeningtests ist, neue Antidepressiva zu entdecken und zu bewerten und auch neue molekulare Angriffsziele für Medikamente zu identifizieren.

Für den Screeningtest gilt die besondere Anforderung, dass er so einfach wie möglich zu handhaben sein sollte und dabei eine genaue Vorhersage über die antidepressive Aktivität des Pharmakons machen soll (Übersicht [168]). Zwei der bekanntesten Antidepressivatests sind der *Forced Swim Test* und der *Tail Suspension Test* [169]. Beide Tests untersuchen die Pharmakoneffekte nach akuter Gabe.

Tabelle 1: Beispiele für Tiermodelle der Depression

Tiermodelle basierend auf		
Pharmakologischer Induktion	Reserpin-Antagonismus	Willner (in Übersicht [166])
	Amphetamin-Entzug	Willner (in Übersicht [166])
	Chronische Corticosterongabe	Murray, et al., 2008 [55] Jacobsen, Mork, 2006 [170]
	Wiederholte ACTH Gabe	Kitamura, Gomita, 2008 [171]
Stress	<i>Learned Helplessness</i>	Overmier, Seligman, 1967 [172]
	Chronisch milder Stress (<i>Chronic Mild Stress</i>)	Katz, et al., 1981 [173]
	Maternale Separation	Greisen, et al., 2005 [174]
	Chronisch psychosozialer Stress	Alfonso, et al., 2004 [175]
Genetischen Veränderungen	<i>Congenital Learned Helplessness</i>	Henn und Vollmayr [36, 176]
	Flinders Sensitive Line	Overstreet (in Übersicht [177])
	Glucocorticoid-Rezeptor heterozygote Mäuse (GR+/-)	Ridder, et al., 2005 [178]
	Cannabinoid (CB1)-Rezeptor <i>knockout</i> -Maus	Aso, et al., 2008 [179]
Läsionen bestimmter Hirnstrukturen	Ektomie des Bulbus olfactorius (OBX)	Cairncross [180]

1.3.1.1. Tiermodelle basierend auf pharmakologischer Induktion

Eines der ersten Tiermodelle der Depression war die pharmakologische Behandlung von Ratten mit Reserpin. Reserpin ist ein Antisymphotonikum, das den vesikulären Monoamintransporter quasi irreversibel blockiert und so eine lang anhaltende Wirkung zeigt. Die Monoaminspeicher werden entleert. Es wurde zur Behandlung der Hypertonie eingesetzt. Dabei wurde beobachtet,

dass bei zirka 10% der Patienten schwere Depressionen mit Suizidgefahr auftraten [181]. Das war Anlass für Schildkraut in der Monoaminmangel-Hypothese der Depression zu formulieren [182], dass die Depression mit einer zentralen monoaminergen Dysfunktion assoziiert ist. Gut objektivierbare Reserpinwirkungen am Versuchstier sind vor allem Hypomotilität, Bradykardie und Hypothermie, die von den TCA und MAO-Hemmern antagonisiert werden. Dieses Modell besitzt jedoch nur eingeschränkte Vorhersagevalidität, da neuere Antidepressiva keine dopaminerge Wirkungen haben und deshalb in diesem Modell unwirksam sind. Dahingegen wirken Pharmaka, wie das Antiparkinsonmittel L-Dopa, falsch positiv in diesem Modell [166]. Die Augenschein-, Vorhersage- und Konstruktvaliditäten sind in diesem Modell nur bedingt gegeben [166]. Dieses Tiermodell wird heutzutage nur noch selten angewandt.

Weitere Tiermodelle basierend auf pharmakologischer Induktion sind die chronische Gabe von ACTH und Corticosteroiden. Dadurch kann eine Dysregulation der HHN-Achse bei Tieren induziert werden. Die Tiere entwickeln durch diese Dysregulation ein depressionsähnliches Verhalten im *Forced Swim Test* [55]. Es lassen sich auch neurobiologische Veränderungen im Gehirn der Tiere nachweisen, wie zum Beispiel Hippocampusatrophie und Verminderungen der BDNF Konzentrationen [170]. Durch die Gabe von Antidepressiva kann die Ausbildung dieses Verhalten verhindert werden.

1.3.1.2. Tiermodelle basierend auf Stress

Tiermodelle, die auf der Nachahmung von Verhaltensänderungen beruhen, die als Hauptsymptome der Depression angesehen werden, sind Modelle, die auf einer Induktion von Stress basieren. Da als ein Risikofaktor für die Entstehung der Depression Stress angesehen wird [183, 184], ist diesen Modellen ein gewisser Grad an Konstrukt- und Augenscheinvalidität geben. Es können Umweltstressoren von sozialen Stressoren unterschieden werden. Als Stressoren werden zum Beispiel leichte schmerzhaft Stromreize an der Fußsohle der Tiere, soziale Isolation in der adulten Phase und maternale Deprivation, das Eindringen eines sozial überlegenen in den Käfig eines sozial unterlegenen Tieres oder das Schwimmen in einem Gefäß ohne Rettungsmöglichkeit eingesetzt. Es sind Situationen, aus denen sich die Tiere nicht selbst befreien können. Diese Stressoren lösen bei den Tieren objektivierbare Verhaltensänderungen aus. Von Overmier und Seligman wurde 1967 [172] ein Versuchsansatz, der auf erlernter Hilflosigkeit basiert, beschrieben und als ein Tiermodell der Depression vorgestellt. Die Tiere werden unangenehmen nicht kontrollierbaren Reizen ausgesetzt, denen sie sich nicht zur Wehr setzen können beziehungsweise nicht ausweichen können (Trainingsphase). Zu Beginn wird von

den Tieren noch ein Abwehrverhalten gezeigt. Später in der Testphase wird ihnen die Möglichkeit gegeben, den Reiz zu vermeiden. Trotzdem nehmen sie diese Möglichkeit nicht wahr. Es entsteht eine Generalisierung der Hilflosigkeitserwartung, die man auch in anderen Situationen findet (*escape deficit behaviour*). Anfangs wurden dafür Hunde genutzt. Heute wird eine Abwandlung des Tests mit Ratten in einer *Shuttle box*-Apparatur verwendet, in dem die gestressten Tiere kein Fluchtverhalten in der Testphase mehr zeigen [185]. Die Tiere zeigen Passivität, Veränderungen in ihren Lauten und im Schlaf-Wach-Rhythmus [172, 186]. Der Serotoninspiegel im Cortex von hilflosen Ratten ist vermindert [187], wie es auch bei depressiven Patienten beobachtet werden konnte (siehe 1.1.4.2.) [188]. Außerdem ist ein erhöhter Plasma-Corticosteron-Spiegel gemessen worden [185], der ebenfalls vergleichbar mit den erhöhten Cortisol-Spiegeln bei Menschen mit Depressionen ist (siehe 1.1.4.3.). Damit ist in diesem Modell ein gewisser Grad an Augenscheinvalidität gegeben, und bezüglich der Konstruktvalidität wird diskutiert, ob ein ähnlicher Zustand wie bei den Tieren durch unkontrollierbare und aussichtslose Situationen auch beim Menschen erzeugt werden kann, und ob Hilflosigkeit ein zentrales Symptom der Depression beim Menschen ist. TCA, zum Beispiel Desipramin, und Vertreter der SSRIs sind bereits nach akuter Gabe wirksam bei diesen Tieren und steuern der Hilflosigkeit entgegen [189]. Das Modell hat insofern gute Vorhersagevalidität, als dass es auf verschiedene wirksame Therapien anspricht und keine falsch positiven Ergebnisse liefert [166]. Dennoch muss bedacht werden, dass die induzierten Verhaltensänderungen nicht länger als drei Tage anhalten, somit eine chronische Wirkung der Antidepressiva nicht erfasst werden kann.

Um die Vergleichbarkeit mit der klinischen Situation zu vergrößern, wurden Modelle mit mehr chronischem Charakter entwickelt. In diesen Modellen werden Ratten mindestens zwei bis drei Wochen verschiedenen Stressoren in einer unvorhersagbaren Sequenz ausgesetzt. Bei chronisch schwerem Stress (*Chronic Severe Stress*) werden unter anderem schmerzhaft Stromreize an der Fußsohle der Tiere oder Schwimmen im kalten Wasser als Stressoren angewandt. Am Ende dieser Periode werden die Tiere lautem Lärm und grellem Licht gefolgt von einem *Open Field Test* ausgesetzt. Erfasst wird im *Open Field Test* die herabgesetzte Aktivität des Tieres nach dem akuten Stressor [190]. Der chronische Stress führt dazu, dass die motorische Aktivität im *Open Field Test* vermindert ist. Weiterhin konnte Katz 1982 [173] beobachten, dass als Ausdruck der Anhedonie, die Tiere weniger süße Lösung zu sich nehmen. Dieses Defizit im Belohnungsverhalten ist vergleichbar mit der Anhedonie, die bei depressiven Patienten beobachtet wird. Damit besitzt dieser Test neben einer guten Konstruktvalidität (chronischer Stress gilt als ein Risikofaktor der Depression, siehe 1.1.4.3.) auch eine gute

Augenscheinvalidität. TCA, ECT, atypische Antidepressiva und MAO-Hemmer, SSRI, SNARI können das durch den chronischen Stress induzierte Verhalten wieder rückgängig machen (in Übersicht [35, 191]). Damit ist für dieses Modell auch ein gewisses Maß an Vorhersagevalidität gegeben.

Chronischer Stress wird als ein wichtiger Risikofaktor für die Depression betrachtet (siehe 1.1.4.3.). Einige Menschen sind mehr empfänglich, Depressionen zu entwickeln als andere. Auf dieser Basis wurde das Modell des chronisch milden Stresses etabliert. Über einen längeren Zeitraum werden die Tiere einer Anzahl von verschiedenen milden Stressoren ausgesetzt, wie zum Beispiel Futter- oder Wasserentzug oder Temperaturänderungen. Dies führt ebenfalls zu einer verminderten Trinkmenge von Zuckerlösung, was als ein Symptom der Anhedonie gewertet wird (Übersicht [35, 173, 192]). Neben dieser Anhedonie weisen die gestressten Tiere auch andere somatische Symptome auf, wie verringertes Körpergewicht, kardiovaskuläre und endokrinologische Veränderungen, wie erhöhte Corticosteronkonzentrationen im Serum (Übersicht [35]). Damit besitzt dieses Modell Augenscheinvalidität. Das Problem dieses Tiermodells liegt darin, dass es sich (Übersicht [35]) sehr schwer etablieren und standardisieren lässt. Auf Grund des chronischen Einwirkens von mildem Stress, der beim Menschen als ein Risikofaktor für die Entstehung der Depression angesehen wird, besitzt dieser Test eine sehr hohe Konstruktvalidität. Antidepressiva und auch der ECT, die sich in der Klinik als wirksam erwiesen haben, sind auch in diesem Modell wirksam. Das Verhalten, das in den Tieren als Anhedonie gedeutet wird, wird durch die antidepressive Therapie rückgängig gemacht. Außerdem gibt es keine falsch positiven Ergebnisse. Damit hat das Modell auch eine gute Vorhersagevalidität (Übersicht [35]).

1.3.1.3. Tiermodelle basierend auf genetischen Veränderungen

In einer größeren Population von Versuchstieren ist es möglich, dass einzelne Tiere Verhaltensabweichungen oder -störungen zeigen, die nicht durch äußere Umstände bedingt sind. Diese Tiere werden ausgewählt und weiter gezüchtet, wobei darauf geachtet wird, dass Tiere mit der stärksten Ausprägung des Merkmals, auf das Wert gelegt wird, gepaart werden. Es wird versucht, den genetischen Aspekt der Ätiopathogenese der Depression nachzustellen, indem bestimmte Verhaltensmerkmale der Depression in Tieren weiter gezüchtet werden. Zu diesem Zweck wurden Flinders Sensitive Ratten [177] und *congenital Learned Helplessness* Ratten [36] gezüchtet.

Flinders Sensitive Tiere reagieren stark auf cholinerge Agonisten und Acetylcholinesterase-Hemmer mit Hypothermie, Abnahme des Körpergewichts und Veränderung des Trinkverhaltens [177]. Diese Verhaltensänderungen entsprechen zum Teil dem klinischen Bild der Depression und sind durch TCA und SSRI aufhebbar. Die Flinders Sensitive Ratte hat einen hohen Grad an Augenscheininvalidität. Neben den Ähnlichkeiten im Verhalten zeigen die Tiere auch auf physiologischer Ebene Veränderungen, die bei der Depression des Menschen beobachtet werden können: Zum Beispiel Änderungen im REM-Schlaf und circadianem Rhythmus. Es wird von der Idee ausgegangen, dass ein cholinerg-noradrenerges Ungleichgewicht von Neurotransmittern bei der Depression auftritt.

In Übereinstimmung mit der cholinergen Hypothese der Depression zeigt dieses Tiermodell ein empfindlicheres cholinerges System. Damit ist auch in gewissem Maße die Konstruktvalidität des Modells gegeben. Bezüglich der Vorhersagevalidität muss hervorgehoben werden, dass Flinders Sensitive Tiere auf eine chronische aber nicht auf eine akute Gabe von Antidepressiva mit einer Verminderung der Immobilität reagieren. Damit erfüllt das Modell auch einige Kriterien der Vorhersagevalidität und entspricht allen drei Validitäten für ein Tiermodell der Depression (Übersicht [177]).

Henn und Vollmayr haben Ratten mit einem Spontanverhalten, das der erlernten Hilflosigkeit gleicht, gezüchtet [193]. Diese Tiere zeigen schon ein depressionsähnliches Verhalten, ohne dass sie die Trainingsphase durchlaufen haben. Diese Tiere gelten als ein Modell, das die Prädisposition bei den Menschen darstellt [194]. Die Augenscheininvalidität und die Konstruktvalidität wurden bereits beim Modell der erlernten Hilflosigkeit beschrieben.

Eine andere Möglichkeit der Induktion depressionsähnlichen Verhaltens in Tieren ist das Verändern oder Ausschalten von Rezeptoren. Eines dieser Modelle ist die für den Glucocorticoid-Rezeptor heterozygote *knockout*-Maus [178, 195]. Dieses Tiermodell zeigt ähnlich wie Patienten mit Depression eine Desinhibition der HHN-Achse und eine pathologische Antwort in der Kombination des Dexamethason-Suppressionstests mit dem CRH-Test. Außerdem wird in diesem Modell eine erhöhte Hilflosigkeit nach Stresseinwirkung beobachtet. Damit sind sowohl Augenschein- als auch Konstruktvalidität in diesem Modell gegeben. Auch in Untersuchungen an *knockout*-Mäusen für den CB1 Rezeptor konnte gezeigt werden, dass dieser Rezeptor in angst- und depressionsähnlichem Verhalten und Veränderungen der kognitiven Funktion involviert ist.

1.3.1.4. Screeningstests für Antidepressiva

Der am häufigsten genutzte Versuchsaufbau ist der Porsolt Swim Test [169]. Eine Abwandlung, bei der die Tiere einmalig getestet werden, ist der *Forced Swim Test*. Die Tiere werden gezwungen, in einem kleinen Gefäß ohne Rettungsmöglichkeiten zu schwimmen. Nach anfänglichen Rettungsversuchen, erkennbar an gesteigerter motorischer Aktivität, lassen sich die Tiere in einer charakteristischen Position treiben (*floating*). Das Aufgeben der Tiere wird als Verzweiflung (*behavioral despair*) gedeutet. Der Messparameter in diesem Test ist die Gesamtdauer immobiler Phasen (*floating*). In diesem Verhalten werden Parallelen zur Passivität und Antriebslosigkeit depressiver Patienten gesehen. 24 Stunden nach diesem ersten Testdurchlauf wird die Wirkung von antidepressiven Substanzen auf die Immobilität der Ratten getestet [166]. Die meisten klinisch wirksamen Antidepressiva zeigen in diesem Test die entsprechende Wirkung. Es können Neuroleptika und Anxiolytika von Antidepressiva abgegrenzt werden (Übersicht [196]). TCA, SNARI und Antidepressiva mit neueren Wirkungsmechanismen reduzieren die Immobilitätszeit [197]. Für die SSRIs gibt es jedoch keine einheitlichen Ergebnisse (aktiv [177, 198], inaktiv [199, 200]). Erst mit der Modifizierung des Testes, in der die Art der Aktivität (Immobilität, Schwimmen, Klettern, Tauchen) am Ende jeder fünf Sekunden dauernden Periode beobachtet wird, läßt sich auch eine Wirkung der SSRIs zeigen. Somit lassen sich Antidepressiva, deren Wirkung auf einen Angriff an noradrenergen Mechanismen (erhöhtes Kletterverhalten) basieren, von solchen, die primär auf das serotonerge (vermehrtes Schwimmen) System wirken, unterscheiden [198, 201, 202]. Zusätzlich konnte Detke zeigen, dass mit diesem Test Antidepressiva nach chronischer Gabe Wirkung zeigen: Nach chronischer (zwei Wochen) Niedrigdosierung von Desipramin oder Fluoxetin konnte ein ähnliches Verhalten gezeigt werden wie bei der subakuten aber hohen Dosierung [203]. Die Erkenntnis, dass Antidepressiva auch nach chronischer Gabe einen Effekt im *Forced Swim Test* zeigen, stärkt die Validität des *Forced Swim Test* als einen Verhaltenstest für Antidepressiva mit Eigenschaften ähnlich einem Tiermodell der Depression.

Der *Tail Suspension Test* ist eine Variante des *Forced Swim Test*. Die Tiere werden an ihrem Schwanz aufgehängt, eine vorgegebene Zeit beobachtet und zeigen über eine gewisse Zeitspanne ein Abwehrverhalten, bis sich Immobilität einstellt. Die Immobilitätsphase wird durch Antidepressiva wie Desipramin und Amitriptylin reduziert [204]. SSRIs, die sich im *Forced Swim Test* als unwirksam zeigen, sind hier besser wirksam [205]. Allerdings führen Psychostimulantien wie Amphetamine auch zu einer Verminderung der Immobilitätszeit, obwohl diese Stoffe klinisch keine antidepressive Wirkung haben. Betrachtet man an diesem Modell

jedoch die Kraft der Aufrichtungsbewegung, kann man die Spezifität dieses Testes steigern [206]. So zeigen Antidepressiva neben einer Verringerung der Immobilitätszeit auch eine Steigerung der Bewegungskraft (*power of movement*). Psychostimulantien haben darauf keine Wirkung, so dass in diesem Testaufbau weniger falsch positive Ergebnisse als im *Forced Swim Test* auftreten und die Vorhersagevalidität besser ist.

1.3.2. Das Tiermodell der Ektomie des Bulbus olfactorius bei der Maus

Der Bulbus olfactorius, eine Verlängerung des Telencephalons, empfängt chemosensorische Informationen und leitet diese weiter. Axone der zweiten Neurone der Riechbahn projizieren in die Amygdala, in die Area entorhinalis und darüber in den Hippocampus und sind mit dem limbischen System vernetzt. Das limbische System, das als Ort der Verarbeitung von Emotionen angesehen wird und an der Gedächtnisverarbeitung beteiligt ist, erhält somit wichtige Informationen über den Bulbus olfactorius (siehe Abbildung 4). Watson hat schon 1907 (in Übersicht [207]) erkannt, dass die Bulbektomie bei der Ratte zu Veränderungen im Verhalten führt. Mittlerweile werden als Versuchstiere Mäuse bevorzugt, da sie für gezielte genetische Veränderungen besser geeignet sind.

Bei Mäusen sind die markantesten Veränderungen im Verhalten nach Ektomie des Bulbus olfactorius (OBX) die Steigerung der Aktivität im *Open Field Test* und die Defizite im Erlernen des Vermeidungsverhaltens. Vorteil dieses Tiermodells ist, dass fast ausnahmslos eine chronische Gabe von antidepressiv wirkenden Pharmaka notwendig ist, um Verhaltenseffekte auszulösen. Dadurch ist die Möglichkeit gegeben, dass der zeitliche Verlauf der Entfaltung der Wirkung eines Antidepressivums verfolgt werden kann. Da dieses Tiermodell in der Ratte sehr viel intensiver untersucht wurde, sind die Symptome bei der Ratte detaillierter als bei der Maus beschrieben. Bei Ratten sind eine erhöhte Stressempfindlichkeit, Dysregulation der limbisch-hypothalamischen Achse, Störung von Immunfunktionen, abnormale Schlafmuster, Gewichtsabnahme, Anhedonie und Agitation aufgezeigt worden.

Die Ektomie des Bulbus olfactorius wird durchgeführt, indem in Narkose durch zwei Löcher im frontalen Schädelknochen beide Riechkolben, Bulbi olfactorii, durchtrennt [180] und durch Absaugen entfernt werden. Einige Arbeitsgruppen bevorzugen die Methode der Bulbektomie durch ein Loch in medialer Position (Übersicht [208]). Aufgrund der Verbindungen des Bulbus olfactorius mit subcorticalen und mesocorticalen Hirnregionen scheint die Bulbektomie wesentlichen Einfluss auf eine Vielzahl von Hirnfunktionen zu haben, die nicht nur durch eine Anosmie zu erklären ist. Nach 10 bis 14 Tagen treten Veränderungen an neurochemischen,

immunologischen und neuroendokrinen Parametern auf (Übersicht [207, 209]). Nach der ersten Woche zeigt sich im Verhalten eine Hyperaktivität der Tiere unter stressreichen Bedingungen [209].

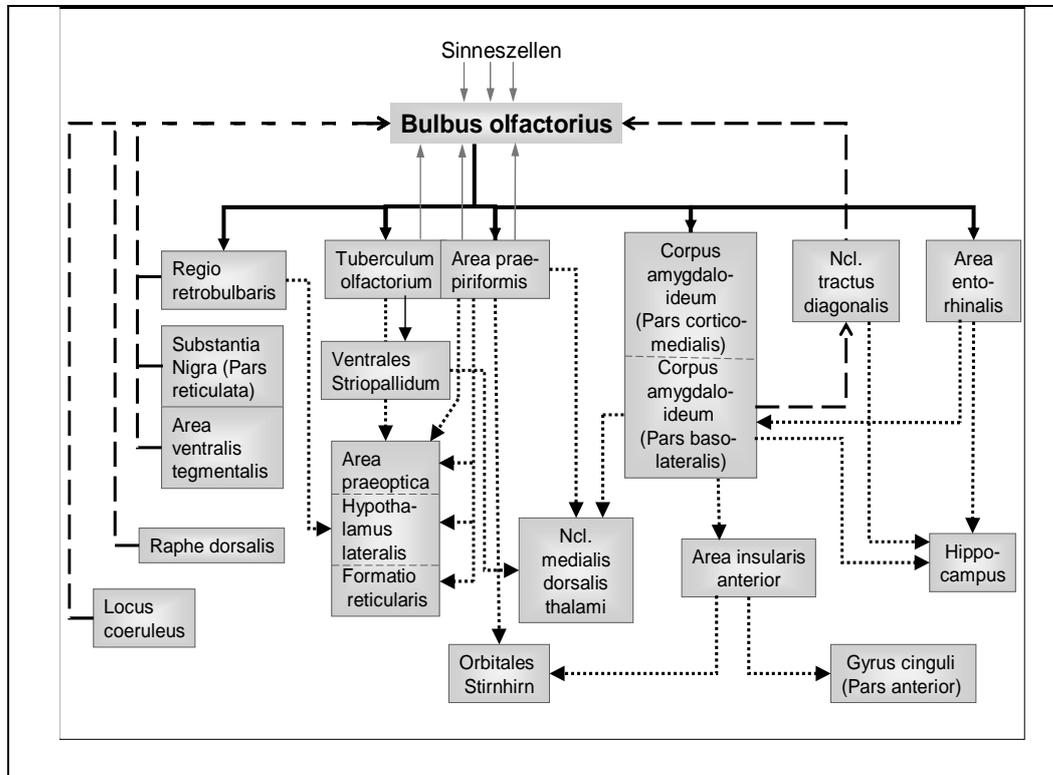


Abbildung 4: Schematische Darstellung der zentralen Geruchsbahn [210]. Die zentrale Geruchsbahn besteht aus primären, sekundären und tertiären Repräsentationsgebieten im Tel-, Di- und Mesencephalon. Der Bulbus olfactorius bildet die erste Zwischenstation. Direkte Projektionen (durchgängig schwarze Pfeile) vom Bulbus olfactorius beziehen die allokortikalen Graumassen, die die zweite Repräsentationsstufe bilden. Der Hippocampus erhält Informationen erst über tertiäre und quartäre Projektionen (gepunktete schwarze Pfeile). Die direkte zentrifugale Innervation des Bulbus olfactorius ist durchgängig grau dargestellt und die zentrifugale Innervation aus tertiären Repräsentationsgebieten gestrichelt schwarz.

Dass der Verlust des Riechens nicht allein zu den oben angeführten Veränderungen führt, konnte durch peripher induzierte Anosmie nach Gabe von Zinksulfat nachgewiesen werden. Gabe von Zinksulfatlösung in die nasale Kavität führt nach ein bis zwei Tagen zu einer nekrotischen Degeneration des olfaktorischen Epitels (Übersicht [208]). Es kommt nicht zur Steigerung der motorischen Aktivität der Tiere, wie es nach einer Bulbektomie beobachtet wird [211].

Verhaltensänderungen

Die Ektomie des Bulbus olfactorius führt zu bestimmten Veränderungen im Verhalten (siehe Tabelle 2). Zwei Wochen nach der Operation bildet sich das so genannte OBX Syndrom aus. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass viele der Verhaltens- und biochemischen Änderungen nach OBX durch die chronische Gabe von Antidepressiva rückgängig zu machen sind (Übersicht [180, 212, 213]). Die Untersuchung der Wirksamkeit von Antidepressiva wird zwei Wochen nach der Ektomie des Bulbus olfactorius durchgeführt. Die OBX Mäuse und Ratten zeigen ein hyperaktives Verhalten in einem hell erleuchteten *Open Field Test* und auch in anderen stressreichen Situationen. Die Ektomie des Bulbus olfactorius in Nagetieren wird daher auch als ein Modell für die chronisch psychomotorisch agitierte Depression angesehen. Somit ist für dieses Tiermodell eine gute Augenscheinvalidität gegeben (Übersicht [213, 214]). Bei der Untersuchung des Verhaltens der OBX Tiere müssen die Versuchsbedingungen standardisiert sein. Stockert [215] konnte zum Beispiel keine Hyperaktivität beobachten, weil er diesen Versuch bei niedriger Beleuchtung durchführte. Eine Erklärung für die veränderte Aktivität geben Song und Leonard (in Übersicht [207]): Die Hyperaktivität in einer neuen stressvollen Umgebung könnte aus einer verminderten Ausprägung von konkurrierenden Verhaltensweisen herrühren. Es ist beispielsweise die Erstarrungsreaktion nach einem leichten schmerzhaften Stromreiz an der Fußsohle wesentlich verringert, so dass mehr Zeit für die Exploration zur Verfügung steht. Zusätzlich ist die Habituation der Tiere im stressreichen *Open Field Test* vermindert [216]. OBX führt außerdem dazu, dass die Tiere eine gesteigerte nächtliche Aktivität [217] und Gedächtnis- und Lerndefizite haben (Übersicht [207]). Diese Gedächtnis- und Lerndefizite tragen zur verminderten Habituation bei. Die Gewöhnung an eine Umgebung setzt die Erinnerung an die erste Exposition voraus. Auch Defizite im Erlernen eines Vermeidungsverhaltens [218] konnten in Tests des inhibitorischen und aktiven Vermeidungsverhaltens gezeigt werden [212, 219]. Eine Beeinträchtigung im räumlichen Lernen zeigte sich im *Morris Labyrinth (Morris Water Maze)* (Übersicht [207]) und im *Radial Maze-Test* [220]. Die Tests zum Vermeidungsverhalten und die beiden zuletzt genannten Tests überprüfen Lern- und Gedächtnisvorgänge, die von der hippocampalen Funktion abhängig sind (Übersicht [207]). Weiterhin konnte in einem Test auf Impulsivität (*DRL72, food motivated behaviour test*) eine verminderte Impulsivität gezeigt werden. Die Tiere warten nach Einführung einer Wartezeit für grosse Portionen lieber auf diese, als die sofort verfügbaren kleinen Portionen zu fressen, wie es die scheinoperierten Tiere tun (Übersicht [207]). Die konditionierte Geschmacksaversion (*conditioned taste aversion learning*) ist bei den OBX Tieren zeitlich verkürzt. Die Tiere werden dabei konditioniert, süße Lösungen nach Zusatz von Bitterstoffen,

zum Beispiel von Lithiumchlorid, nicht zu konsumieren. Überläßt man den Tieren die Wahl zwischen Wasser und Zuckerlösung mit Lithiumchlorid, beginnen die Tiere schneller wieder die Zuckerlösung trotz des aversiven Reizes zu wählen [221]. In dem *Elevated plus-Maze* zur Testung des Angstverhaltens bei den Tieren zeigen diese eine längere Verweildauer und ein erhöhtes Eintreten in die offenen Arme des *Elevated plus-Maze*, was auf eine verminderte Angst in den OBX Tiere hindeutet - aber auch auf eine gesteigerte Aktivität in stressreicher Umgebung [222].

Tabelle 2: Verhaltensänderungen in OBX Tieren, modifiziert nach Song und Leonard, 2005 (in Übersicht [207])

Verhalten	Autoren
Erhöhte <i>Open Field</i> Aktivität unter heller Beleuchtung	Klein, Brown, 1969 [223]
Verstärktes exploratives Verhalten	Sieck, Gordon 1972 [224]
Defizite im inhibitorischen Verhalten	Thorne et al., 1973 [218]
Erhöhte nächtliche Hyperaktivität	Giardina, Radek, 1991 [217]
Beeinträchtigung des Lernens im <i>Morris Water Maze</i>	Redmond et al., 1994 (in Übersicht [207])
Verminderte Impulsivität	Leonard et al., 1979 (in Übersicht [207])
Reduzierte Geschmacksaversion gegen Lithiumchlorid	Jancsar, Leonard, 1981 [221]
Längere Verweildauer und häufigeres Eintreten in die offenen Arme des <i>Elevated plus-Maze</i>	Song et al., 1996 (in Übersicht [207])
Beeinträchtigt räumliches Gedächtnis und Lernen im <i>8-arm radial Maze</i>	Hall, Macrides, 1983 [220]
Reduzierte sexuelle Aktivität	Lumia et al., 1992 [214]
Erhöhter Kannibalismus	Fleming, Rosenblatt, 1974 [225]

Morphologische Veränderungen am Gehirn nach OBX

Durch die Bulbektomie kommt es zur retrograden Degeneration der Neurone vom und zum Bulbus olfactorius und zum Bulbus olfactorius accessorius. In der Folge treten neuronale Degenerationen in den Projektionsgebieten des Bulbus im Hippocampus, in der Amygdala [226], im dorsalen Raphekern [227] und im Locus coeruleus sowie im Cortex [207] auf. Die strukturellen Veränderungen im Locus coeruleus und in den Raphekernen könnten für die Dysfunktion des noradrenergen und serotonergen Systems verantwortlich sein [228]. Weiterhin werden eine Vergrößerung des dritten und der lateralen Ventrikel und eine damit einhergehende Verkleinerung des hippocampalen Volumens sowie verminderte Signalintensitäten im Cortex und in der Amygdala im MRT beobachtet [229]. Die strukturellen Veränderungen nach OBX im Cortex, in der Amygdala und im Hippocampus werden als Ursache für die Beeinträchtigung der

kognitiven Funktionen der OBX Tiere angesehen. Ähnliche Befunde konnten bei depressiven Menschen mit bildgebenden Verfahren und in *post mortem* Studien gemacht werden (siehe 1.1.4.4.). Somit ist diesem Tiermodell ein gewisser Grad an Konstruktvalidität gegeben. Auch zeigt dieses Tiermodell Augenscheininvalidität, wenn zum Beispiel die Veränderungen in den kognitiven Funktionen betrachtet werden. Vor allem im piriformen Cortex und im Hippocampus konnte eine Abnahme in der Anzahl der Synapsen und dendritischen Spines und Shafts beobachtet werden [220], die für die Beeinträchtigung der kognitiven Funktionen verantwortlich sein können. Diese strukturellen Veränderungen können durch chronische Antidepressivagabe rückgängig gemacht werden (Übersicht [159]). Hinsichtlich der neuronalen Regeneration und des synaptischen Remodelings ist es auffällig, dass es in der Amygdala zu einer verlängerten Expressionsdauer des *Immediate early Gene*, *c-jun*, kommt. *Immediate early Genes* werden nach zellulärer Stimulation als Regulatoren des Zellwachstums und der Differenzierung transkribiert. Das *c-jun* tritt für mindestens 8 Tage nach der Operation auf und könnte für die Regeneration beschädigter Neurone sprechen [230].

Veränderungen in Neurotransmissionssystemen nach OBX

In OBX Tieren wurde eine Verminderung der Konzentration an Serotonin, seinem Hauptmetaboliten und Noradrenalin in verschiedenen Hirnarealen beobachtet (Übersicht [214, 231, 232]). Kompensatorisch sind dafür die Adrenozeptoren im Cortex und in der Amygdala erhöht (Übersicht [232]). Jedoch wird angenommen, dass die Funktion dieser Rezeptoren beeinträchtigt ist, da beschrieben wird, dass es zu einer verminderten Hypothermieantwort auf Clonidingabe kommt (Übersicht [207]). Sowohl die Veränderungen im serotonergen als auch im noradrenergen System wurden durch chronische Gabe verschiedener Antidepressiva rückgängig gemacht (Übersicht [207, 233]). Bei der Beobachtung des Degenerationsprozesses nach OBX konnte eine serotonerge Innervation des Bulbus olfactorius, die von der Amygdala, vom Hippocampus, von der Stria terminalis und von den präoptischen Regionen stammt, gezeigt werden (Übersicht [208]). Ähnlich wie beim noradrenergen System kann beim serotonergen System eine Erhöhung der Rezeptorenzahl bei gleichzeitiger Einschränkung der Rezeptorfunktion beobachtet werden (Übersicht [207]).

Das agitierte Verhalten der OBX Ratten führt Masini [234] auf eine Erhöhung der Dopaminkonzentrationen im Striatum zurück. In einem Mikrodialyseversuch war der striatale extrazelluläre Dopamingehalt im Vergleich zu scheinoperierten Tieren erhöht, und nach Holmes et al. [235] war die Dichte dopaminergere D2-Rezeptoren im ventralen Striatum von OBX Tieren größer.

Veränderungen in den Neurotrophinkonzentrationen nach OBX

In einer Studie von van Hooymissen et al. wurde an Ratten die Auswirkungen von OBX auf die Neurotrophinexpression untersucht und im Hippocampus, im Nucleus accumbens, in der Area tegmentalis ventralis/Substantia nigra und im Piriformen Cortex keine Veränderungen in der Neurotrophinexpression beobachtet [236].

Pheromone

Bei der Bulbektomie kommt es zu einer Schädigung des vomeronasalen Organs, so dass keine Pheromone mehr erkannt werden können. Dieses vomeronasale Organ ist über den Bulbus olfactorius accessorius mit der Amygdala verbunden. Pheromone sind chemische Signalstoffe, die Informationen zum Verhalten und zum physiologischen Status der Tiere tragen. Diese Signalstoffe spielen bei Nagetieren während der Reproduktion eine wichtige Rolle, v.a. beim Erkennen des Geschlechts, der sozialen Dominanz innerhalb einer Gruppe und bei aggressivem Verhalten (Übersicht [208]). Die Durchtrennung des vomeronasalen Organs bewirkt bei nur etwa der Hälfte von untersuchten männlichen Hamstern eine Beeinträchtigung des sexuellen Verhaltens. Wird die vomeronasale Deafferentation mit der durch Zinksulfat erreichten Anosmie kombiniert, kommt es ebenfalls zur Beeinträchtigung des sexuellen Verhaltens, wohingegen die Anosmie allein keine Auswirkungen darauf hat. So scheint in einigen Tieren das vomeronasale Organ für die Paarung wichtig zu sein, in anderen Tieren scheint das olfaktorische Riechen verbunden mit anderen sensorischen Inputs zur Erregung des Tieres führen [237].

Wirkung von Antidepressiva

Die Hyperaktivität im *Open Field* ist der am häufigsten gemessene Parameter, an dem die Wirkung von Pharmaka überprüft wird. OBX Tiere sind vermehrt anfällig gegenüber Umweltstressoren. Leonard und Tuite postulierten, dass dieses Verhalten durch eine unangemessene oder überhöhte Reaktivität auf eine neue Umwelt und eine verlangsamte Gewöhnung an die neue Umgebung hervorgerufen wird (Übersicht [208]). Die Wirkung von Antidepressiva zeigt sich erst nach zirka zwei Wochen der chronischen Gabe [238, 239]. Die chronische Antidepressivagabe stellt das normale Ansprechen auf neue Stimuli wieder her, in dem die Tiere sich neuen Situationen effektiver anpassen [216]. Das Wirkspektrum ist nicht nur auf klassische Antidepressiva beschränkt, sondern es umfasst auch neuere Antidepressiva wie Mianserin [240].

Andere Tests, die nicht so häufig angewandt werden, sind *Morris Water Maze*, die konditionierte Geschmacksaversion und das Erlernen eines Vermeidungsverhaltens. Im *Morris Water Maze*

finden die OBX Tiere nach chronischer Gabe der SSRI, Paroxetin und Fluvoxamin, die unter dem Wasser liegende Plattform schneller. Die Auffindungsgeschwindigkeit ist mit der von Kontrolltieren vergleichbar (Übersicht [213]).

Im Test der konditionierten Geschmacksaversion konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die chronische Gabe von SSRI und TCA, wie Desipramin, zu einer Normalisierung des Verhaltens der OBX Tiere führt (Übersicht [213]). Die Tiere vermeiden dann die süße Lösung, wenn Lithiumchlorid zugegeben worden ist. In Tests des inhibitorischen und aktiven Vermeidungsverhaltens wurden bisher neben dem *Open Field Test* die meisten Antidepressiva überprüft. TCA, SSRIs, Antidepressiva mit anderen Wirkungsmechanismen und SNARI zeigen nach 14-tägiger Gabe eine Normalisierung des Lernverhaltens der OBX Tiere.

Nicht wirksam waren sowohl in scheinoperierten als auch in OBX Tieren das Neuroleptikum Chlorpromazin und das Sedativum Chlordiazepoxid und in den OBX Tieren der Moodstabilizer Lithiumsulfat [211]. Dieser Test scheint an OBX Tiere spezifisch für Antidepressiva zu sein und bringt eine hohe Vorhersagevalidität mit.

Tabelle 3: Einige ausgewählte Antidepressiva mit Wirkungen an OBX Tieren, modifiziert aus [207]

Klasse	Antidepressivum/ Moodstabilizer	Autoren
TCA	Desipramin, Amitriptylin	Connor et al., 2000 [241], Stockert et al., 1988 [215]
Noradrenalin- und Serotonin- Wiederaufnahmehemmer	Milnacipran	Redmond et al., 1999 [242]
SSRI	Sertralin, Fluoxetin, Paroxetin	Butler, Leonard 1990 [243], Cryan et al., 1998 [244]
SNARI	Reboxetin	Harkin et al., 1999 [245]
Antidepressiva mit anderen Wirkungsmechanismen	Mianserin	Leonard, O'Connor, 1987 [240]
MAO-A Hemmer	Moclobemid	Kelly et al., 1997 (in Übersicht [213])
Glucocorticoid-Antagonisten	Metyrapone	Healy et al., 1999 [246]

Veränderungen im endokrinologischen System

Der meist untersuchte Parameter der Depression am Menschen ist die Sekretion von Cortisol, die nicht im Dexamethason-Suppressionstest unterdrückt werden kann. Auch in OBX Tieren wurde die Glucocorticoidsekretion untersucht. Bisher gibt es keine einheitlichen Ergebnisse. Es wurden basal erhöhte Glucocorticoidkonzentration in OBX Tieren und erhöhte Glucocorticoidkonzentrationen unter Stresseinwirkung gemessen [247, 248], die durch die chronische Gabe von Antidepressiva rückgängig gemacht wurden [249]. Andere Autoren

konnten keine Veränderungen finden [250]. Es wird berichtet, dass OBX Ratten vor allem während der dunklen Phase des Hell-Dunkel-Rhythmus im Tierstall vermehrt Glucocorticoide ausschütten (Übersicht [213]). Hinsichtlich des Dexamethason-Suppressionstests gibt es ebenfalls keine einheitlichen Erkenntnisse. Es konnte sowohl eine funktionierende Suppression in den OBX Tieren beobachtet werden als auch keine Suppression durch Dexamethason gezeigt werden (Übersicht [213]).

In der neurowissenschaftlichen Forschung werden nicht nur OBX Ratten sondern auch OBX Mäuse als Modell einer chronisch psychomotorisch agitierten Depression beim Menschen angesehen. Die neurochemischen, neuroendokrinen und neuroimmunologischen Veränderungen entsprechen in vielerlei Hinsicht dem klinischen Bild der Depression (Übersicht [208, 232]). Da dieses Modell viele Parallelen zu den postulierten Theorien der Entstehung der Depression, wie zum Beispiel der HHN-Achsen-Dysregulation hat, scheint dieses Modell auch gewisses Maß an Konstruktvalidität zu haben. Zusätzlich erfüllt es Anforderungen an die Vorhersagevalidität: Nur die chronische Gabe von Antidepressiva führt zur Wiederherstellung des normalen Verhaltens vor der der Bulbektomie. Neben den klassischen Antidepressiva zeigen auch Antidepressiva basierend auf anderen Wirkungsmechanismen eine Wirkung. Wie beim Menschen mit Depression wirken die Antidepressiva auch bei den OBX Tieren erst nach einer Latenz von ungefähr zwei Wochen „antidepressiv“. Damit ist die Möglichkeit gegeben, in diesem Tiermodell Antidepressiva auf einen schnelleren Wirkungseintritt hin zu untersuchen.

1.3.3. Neurotrophine und verschiedene Tiermodelle der Depression

Für die Depression wurden Tiermodelle als Krankheitsmodelle entwickelt. Sie dienen dazu, neurobiologische Grundlagen dieser Erkrankung zu untersuchen und Einblicke in die Ätiologie und Pathogenese der Depression zu gewinnen. Außerdem werden sie genutzt, wirksamere, nebenwirkungsärmere und neuartige Antidepressiva aufzufinden. Einige dieser Tiermodelle konnten erfolgreich genutzt werden, um die Zusammenhänge zwischen Stress, körperlicher Aktivität, Glucocorticoidwirkung und Neurogenese zu untersuchen.

Im Verlauf der Entwicklung der Neurotrophin-Hypothese der Depression entstanden Zweifel an ihrer Gültigkeit. Hier wurden ebenfalls Tiermodelle der Depression eingesetzt, um zu prüfen, ob es zu Veränderungen der Neurotrophinkonzentrationen in relevanten Hirnregionen kommt. Die Konzentrationen von BDNF und BDNF mRNA und NGF und NGF mRNA wurden in verschiedenen Hirnregionen von mehreren Tiermodellen der Depression gemessen. In der Literatur wird berichtet, dass im Vergleich zu den Kontrolltieren die BDNF Konzentration im

Hippocampus in vier Tiermodellen der Depression erniedrigt war, in vier unverändert blieb und nur in einem erhöht war. Für BDNF mRNA wurde ein ähnliches Ergebnis gefunden. Diese war im Hippocampus in 6 Tiermodellen erniedrigt und blieb zwei Mal unverändert. Für den Frontalcortex konnte ein Gleichbleiben von BDNF in vier Tiermodellen und für die BDNF mRNA in zwei Tiermodellen beobachtet werden, und eine erhöhte corticale BDNF Konzentration wurde bisher nur in einem Tiermodell der Depression gesehen. Der Hypothalamus, der Parietalcortex und das Striatum wurden bisher kaum betrachtet (siehe Tabelle 2). BDNF und BDNF mRNA scheinen in der überwiegenden Zahl der Befunde entweder erniedrigt oder unverändert zu sein.

Um Aussagen zu Veränderungen von NGF in verschiedenen Hirnregionen bei Tiermodellen der Depression treffen zu können, ist die Zahl der Untersuchungen zu gering. In zwei Tiermodellen konnte im Hippocampus ein Gleichbleiben von NGF verglichen mit den Kontrolltieren beobachtet werden, und in einem anderen Tiermodell zeigte sich ein Anstieg der NGF Konzentration. Für die mRNA wurde sowohl ein Anstieg in zwei Tiermodellen als auch ein Abfall in zwei anderen Tiermodellen, unter anderem im Modell der Ektomie des Bulbus olfactorius bei der Ratte, festgestellt (siehe Tabelle 3).

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zu Veränderungen der Neurotrophinkonzentration und -expression in verschiedenen Tiermodellen der Depression zeigen kein einheitliches Bild. Dennoch kann zusammengefasst werden, dass entsprechend der Neurotrophin-Hypothese in den überwiegenden Fällen BDNF als Protein und auch die mRNA im Hippocampus in geringerer Konzentration vorkommt. Zu NGF ist auf Grund der kleinen Anzahl von Untersuchungen derzeit keine Aussage möglich.

Tabelle 4: Literaturangaben zu Veränderungen der Konzentrationen von BDNF und BDNF mRNA in verschiedenen Tiermodellen der Depression nach Hirnregion geordnet. ([↔]) unverändert im Vergleich zum Kontrolltier, ([↓]) erniedrigt im Vergleich zum Kontrolltier, ([↑]) erhöht im Vergleich zum Kontrolltier, [mRNA] Konzentration an mRNA kodierend für BDNF)

Tiermodell/-Test	Spezies	Autor	BDNF	Anmerkung
HIPPOCAMPUS				
<i>Learned Helplessness</i>	Maus	Schulte-Herbrüggen et al., 2006 [251]	↔	
	Maus	Song et al., 2006 [252]	(↓mRNA)	
	Ratte	Greenwood et al., 2007 [253]	↓ (↓mRNA)	
<i>Forced Swim</i>	Ratte	Greisen et al.,	↔	Ratten nach maternaler

<i>Paradigma</i>		2005 [174]		Separation
	Ratte	Russo-Neustadt et al., 2001 [157]	(↓mRNA)	
Maternale Separation	Ratte	Greisen et al., 2005 [174]	↑ (↔mRNA)	
<i>Chronic Mild Stress</i>	Ratte	Gronli et al., 2006 [254]	↔	
	Ratte	Lee et al., 2006 [255]	(↔mRNA)	
	Maus	Song et al., 2006 [252]	(↓mRNA)	
<i>Congenital Learned Helplessness</i>	Ratte	Vollmayr et al., 2001 [176]	↔	nach akutem Immobilisationsstress
Glucocorticoid-Rezeptor heterozygote Mäuse (GR+/-)	Maus	Ridder et al., 2005 [178]	↓	
Chronische Corticosterongabe	Ratte	Jacobsen, Mork, 2006 [170]	↓ (↓mRNA)	32mg pro kg Körpergewicht pro Tag s.c. für 21 Tage
Cannabinoid (CB ₁)-Rezeptor <i>knockout</i> -Maus	Maus	Aso et al., 2008 [179]	↓	
Wiederholte ACTH Gabe	Ratte	Kitamura, Gomita, 2008 [171]	(↓mRNA)	
Bilaterale Ektomie des Bulbus olfactorius	Ratte	Van Hooymissen et al., 2003 [236]	(↔mRNA)	
FRONTALCORTEX				
<i>Learned Helplessness</i>	Maus	Schulte-Herbrüggen et al., 2006 [251]	↔	
Flinders Sensitive Line	Ratte	Angelucci et al., 2004 (in Übersicht [256])	↑	in weiblichen Tieren gemessen
Maternale Separation	Ratte	Greisen et al., 2005 [174]	↔ (↔mRNA)	
Chronische Corticosterongabe	Ratte	Jacobsen, Mork, 2006 [170]	↔ (↔mRNA)	
Cannabinoid (CB ₁) Rezeptor <i>knockout</i> -Maus	Maus	Aso et al., 2008 [179]	↔	
HYPOTHALAMUS				
Maternale Separation	Ratte	Greisen et al., 2005 [174]	↔ (↔mRNA)	
Glucocorticoid-Rezeptor heterozygote Mäuse (GR+/-)	Maus	Schulte-Herbrüggen et al., 2007 [257]	↑	

PARIETALCORTEX				
Glucocorticoid-Rezeptor heterozygote Mäuse (GR+/-)	Maus	Schulte-Herbrüggen et al., 2007 [257]	↑	

Tabelle 5: Literaturangaben zu Veränderungen der Konzentrationen von NGF und NGF mRNA in verschiedenen Tiermodellen der Depression nach Hirnregion geordnet. ([↔]) unverändert im Vergleich zum Kontrolltier, [↓] erniedrigt im Vergleich zum Kontrolltier, [↑] erhöht im Vergleich zum Kontrolltier, [mRNA] Konzentration an mRNA kodierend für NGF)

Tiermodell/-Test	Maus/Ratte	Autor	NGF	Anmerkungen
HIPPOCAMPUS				
Maternale Separation	Ratte	Cirulli et al., 2000 [258]	(↑mRNA)	
	Ratte	Cirulli et al., 1998 [259]	↔ (↑mRNA)	nach kurzzeitiger maternaler Separation
Chronischer milder Stress	Ratte	Pham et al., 1997 [260]	↑	Postnatal (bis Tag 22) tägliche Separation von der Mutter für 10 Minuten
Chronisch psychosozialer Stress	Tupaja	Alfonso et al., 2004 [175]	(↓mRNA)	an männlichen Tupaja untersucht
<i>Learned Helplessness</i>	Maus	Schulte-Herbrüggen et al., 2006 [251]	↔	
Bilaterale Ektomie des Bulbus olfactorius	Ratte	Song et al., 2009 [261]	(↓mRNA)	vier Wochen nach der Bulbektomie
FRONTALCORTEX				
<i>Learned helplessness</i>	Maus	Schulte-Herbrüggen et al., 2006 [251]	↓	6 Stunden nach Stress vorübergehende Änderung
Flinders Sensitive Line	Ratte	Angelucci et al., 2004 (in Übersicht [256])	↑	in weiblichen Tieren gemessen
Glucocorticoid-Rezeptor heterozygote Mäuse (GR+/-)	Maus	Schulte-Herbrüggen et al., 2007 [257]	↑	
HYPOTHALAMUS				
Glucocorticoid-Rezeptor heterozygote Mäuse (GR+/-)	Maus	Schulte-Herbrüggen et al., 2007 [257]	↑	

2. Aufgabenstellung

Obwohl Antidepressiva relativ schnell die Neurotransmitterkonzentrationen anheben, lässt sich die klinische Wirkung der Antidepressiva erst nach mehreren Wochen erkennen. Die Monoaminmangel-Hypothese der Depression kann nicht mehr ausreichend die Pathogenese der Depression erklären. Das schnelle Ausgleichen der Transmitterkonzentrationen reicht nicht aus, um eine Depression erfolgreich zu behandeln. Vielmehr scheinen andere Langzeitmechanismen hinter der Entstehung und Behandlung der Depression zu stehen.

Die Depression wird in Verbindung gebracht mit einer Beeinträchtigung der Plastizität vor allem limbischer Strukturen wie des Hippocampus (siehe 1.1.4.4.). Neurotrophine als neurotrophe Wachstumsfaktoren sind entsprechend der Neurotrophin-Hypothese unerlässlich für das Überleben und das korrekte Funktionieren der Neurone auch im Erwachsenenalter (siehe 1.2.1.). Ein Neurotrophinmangel hat demnach strukturelle Veränderungen im Hirngewebe zur Folge, wie es zum Beispiel in heterozygoten BDNF *knockout*-Mäusen gezeigt werden konnte, die eine verminderte hippocampale Neurogenese aufweisen (siehe 1.2.1.).

In *post mortem* Studien an Suizidopfern mit Depression ist eine Erniedrigung der Neurotrophinkonzentration von BDNF und NGF im Hirngewebe gefunden worden (siehe 1.2.3.). Es konnte sogar festgestellt werden, dass die Schwere der Depression mit der Erniedrigung des BDNF Gehalts im Serum korreliert. NGF hingegen wurde in erhöhten Konzentrationen im Blut von chronisch gestressten Patienten mit Depressionen gemessen. Im Liquor konnten keine Veränderungen der Neurotrophinkonzentrationen unter Depression beobachtet werden. Entsprechend Abschnitt 1.2.5. kann auch in unterschiedlichen Tiermodellen, die auf die Konzentrationen von BDNF und NGF in verschiedenen Hirnregionen untersucht wurden, kein einheitliches Bild gezeichnet werden. Es stellt sich aber vor allem für BDNF in Tiermodellen der Depression heraus, dass im Hippocampus eine Erniedrigung der Proteinkonzentration und auch der mRNA Expression zu erwarten ist.

Diese Arbeit soll dazu dienen, das Verhalten zweier Neurotrophine in dem Depressionsmodell der OBX Maus zu untersuchen. Dazu werden die OBX Mäuse und die Sham Mäuse 16 Tage nach der bilateralen Ektomie des Bulbus olfactorius dekapitiert, und die Konzentration der Neurotrophine wird gemessen. Es wird davon ausgegangen, dass sich nach spätestens zwei Wochen mit Sicherheit das OBX Syndrom bei den Tieren ausgeprägt hat. Damit müssten auch Veränderungen auf morphologischer Ebene stattgefunden haben und begleitend Veränderungen in der Konzentration der beiden Neurotrophine nachzuweisen sein. Zur Kontrolle des Erfolges

der OBX Operation werden die Tiere am 14. Tag postoperativ im *Open Field* unter heller Beleuchtung auf ihre Verhaltensänderungen getestet.

Die Bestimmung der Neurotrophinkonzentrationen in Hippocampus, Frontalcortex, Hypothalamus, Striatum und Parietalcortex erfolgt mit einem fluorometrischen *Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay* (ELISA). Bei der Messung der Neurotrophine in depressionsrelevanten Hirnregionen in OBX Mäusen könnte man eine Reduzierung der Neurotrophinkonzentration vor allem im Hippocampus erwarten. Unsere Arbeitshypothese für die Messung der Konzentrationen von NGF und BDNF in den OBX Mäusen lautet: Die Konzentrationen von BDNF und NGF in Hirnregionen, vor allem aber im Hippocampus, von OBX Mäusen verglichen mit Sham operierten Mäusen, sind reduziert. Diese Methode der Konzentrationsbestimmung der beiden Neurotrophine BDNF und NGF ist bislang nicht bei OBX Mäusen angewandt worden.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Versuchstiere, Materialien und Methode

3.1.1. Versuchstiere und Vorbereitung der Gehirnproben

Verwendet wurden 24 Inzuchtmäuse vom Stamm C57Black/6N von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland), die 10 bis 12 Wochen alt waren. Das durchschnittliche Gewicht der Tiere betrug zum Zeitpunkt der Bulbektomie 25g. Es wurden männliche Tiere für diese Untersuchung genutzt. Nach dem Verfahren von Züger et al. [262] sind 11 Mäuse beidseitig durch Absaugen der durchtrennten Bulbi olfactorii, bulbektomiert worden. Die anderen 13 Tiere wurden scheinoperiert und erfuhren dieselbe Behandlung bis auf die Durchtrennung des Bulbus olfactorius. Diese Tiere werden im Folgenden mit Sham bezeichnet. Alle Tiere wurden im Zentralinstitut für Seelische Gesundheit in Mannheim in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Gass operiert. Der *Open Field Test* wurde bei heller Beleuchtung einen Tag vor der Operation und 14 Tage nach der Operation durchgeführt, um den Erfolg der Operation zu kontrollieren. Nur die bulbektomierten Tiere zeigten eine erhöhte Bewegungsaktivität. 16 Tage nach der Bulbektomie wurden die Tiere dekapitiert. Die Gehirne der Tiere wurden im Zentralinstitut für Seelische Gesundheit entfernt und die Hirnregionen Hippocampus, Frontalcortex, Striatum, Hypothalamus und Parietalcortex wurden präpariert, anschließend gewogen und bei -80°C eingefroren. Danach wurden die tief gefrorenen Hirnproben zum Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin transportiert und dort aufgetaut, gewogen (Feuchtgewichte siehe Anhang 1) und in destilliertem Wasser im Ultraschallbad homogenisiert. Für die Bestimmung der Monoamine und ihrer Metaboliten wurden 150µl des Homogenates mit 150µl 0,2% Perchlorsäure aufgenommen und zentrifugiert. Serotonin, Noradrenalin und Dopamin sowie die Metabolite 5-Hydroxyindoleacetat und 3,4-Dihydroxyphenylacetat wurden im Überstand ermittelt.

Für die Bestimmung von NGF und BDNF wurde das Homogenat 1:1 mit Homogenatpuffer aus 0,1 M Trishydroxymethylaminomethan-hydrochlorid (Tris-HCl), pH 7,0; 0,4 M NaCl, 0,1% Natrium-Azid (NaN₃) und dem Protease-Inhibitoren-Cocktail „Complete“ gemischt. Dadurch kann eine Proteindegeneration verhindert werden. Bei den Proben des Frontalcortex, Parietalcortex und aus dem Striatum sind je 250µl Homogenat und Homogenatpuffer genutzt worden. Hippocampusproben wurden mit je 300µl Homogenat und Homogenatpuffer und Hypothalamusproben mit je 180µl aufgearbeitet. Die so aufbereiteten Proben wurden wieder eingefroren, und im Neurobiologischen Institut der Klinik und Hochschulambulanz für Psychiatrie und Psychotherapie der Charité - Universitätsmedizin Berlin wurden die

Konzentrationen von NGF und BDNF im Hippocampus, Frontalcortex, Striatum, Hypothalamus und Parietalcortex bestimmt.

3.1.2. Verwendete Substanzen

Antikörper für BDNF Test

- ELISA-Kit BDNF Emax ® ImmunoAssay System (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) mit
- Anti-BDNF Monoclonal Antibody (mAb) (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland)
- BDNF Polyklonal Antibody (pAb) (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland)
- Anti-IgY, AP Conjugate (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland)
- Mouse IgG1 (MOPC 21, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)

Antikörper für NGF Test

- Anti- β (2,5S, 7S) NGF Antikörper, Klon 27/21 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)
- Anti- β (2,5S,7S) NGF- β -Gal, Antikörper 27/21 konjugiert mit β -Galactosidase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)
- Mouse IgG1 (MOPC 21, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)

Puffer

- Coating-Puffer **C** (0,05M Carbonatpuffer mit einem pH von 9,6)

Dieser wurde aus zwei Lösungen a) und b) im Verhältnis 1:0,6 gemischt.

Lösung a) 5,3g/l Na₂CO₃, Lösung b) 4,2g/l NaHCO₃

- Waschpuffer **W** (mit einem pH-Wert von 7,0)

0,05 M Trishydroxymethylaminomethan-hydrochlorid (Tris-HCl) und 0,2 M NaCl wurden in destilliertem Wasser gelöst.

pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt, bevor die folgenden Substanzen darin aufgelöst wurden:

0,1% Natrium-Azid (NaN₃)

0,75% Gelatine

0,1% Nonidet (Nonylphenylpolyethylenglykol) P-40 (NP-40)

- Standard-Conjugatpuffer **S/C** (mit einem pH-Wert von 7,0)
0,05 M Tris-HCl und
0,2 M NaCl wurden in destilliertem Wasser aufgenommen, und der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt. Danach wurden 0,1% NaN₃, 1,0% bovines Serumalbumin (BSA) und 0,1% NP-40 zugefügt.
- **S/C Pi** besteht aus **S/C** und dem Protease-Inhibitoren-Cocktail „Complete“ **Pi** (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland)
- Substratpuffer **SP** (0,1 M Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,3)
15,6g/l NaH₂PO₄* H₂O wurde zu
17,8g/l Na₂HPO₄*2H₂O hinzugegeben, bis ein pH-Wert von 7,3 erreicht wurde. Danach wurde der Puffer mit 1mM Magnesiumchlorid (MgCl₂) versetzt.
- Stop-Puffer **STOP**
11,26 g/l Glycin; 0,15M
Die pH-Wert Einstellung erfolgte mit NaOH auf 10,5.
- Homogenisierungspuffer **H**
0,1M Tris-HCl
0,4M NaCl
Diese beiden Komponenten wurden in einem Liter destilliertem Wasser aufgenommen, und der pH-Wert wurde mit konzentrierter Natronlauge NaOH auf 7,0 eingestellt. Anschließend wurde 0,1% Na-Azid hinzugefügt.
- **H/Pi** besteht aus Homogenisierungspuffer **H** und dem **Pi**, der im Verhältnis 1:100 dazugegeben wurde.
- Equilibrierpuffer **E**
0,2% NP-40 wurde in Aqua bidest aufgenommen.

MUG-Ansatz

4-Methylumbelliferyl-beta-D-Galaktoside wurde in Ameisensäuredimethylamid (Sigma Chemie, Deisenhofen, Deutschland) aufgelöst. In der Regel wurden 2 mg in 400µl aufgelöst und dann in 30ml Substratpuffer **SP** gegeben.

Weitere Chemikalien

AttoPhos (Roche GmbH, Mannheim, Deutschland)

Für den Standard des BDNF Test wurde *Brain-Derived Neurotrophic Factor human* (BDNF) (Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) verwendet, **BDNF-STOCK** (5000pg/μl).

Für den Standard des NGF Tests wurde *Nerve Growth Factor-β human* (NGF-β) (Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) verwendet, **NGF-STOCK** (100pg/μl).

3.1.3. Verwendete Geräte

- Fluorometer: Titertek Fluoroskan II (Labsystems, Helsinki, Finnland)
- Kühlzentrifuge: Megafuge 2.OR (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland)
- Waschautomat: Accuwash 2 Microplate Processor (Tri-Continent Scientific, Inc., Grass Valley, USA)
- Coulter Mixer (Coulter Electronics Ltd, Dunstable, U.K.)
- Ultraschall-Desintegrator-Branson Sonifier Modell B-12 (Branson Sonic Power Company, Danbury, USA)
- Schwarze 96-Loch (Well) Mikrotiterplatten (Microfluor 2 black Dynex Thermo LabSystems Vertriebs GmbH, Deutschland)
- Eppendorf-Gefäße (1,5ml) (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- 4 ml Polystyrol Reagenzröhrchen (Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- Eppendorf-Multipipette (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Falcon-Gefäße (Biosciences, Heidelberg, Deutschland)

3.1.4. Bestimmung der Neurotrophinkonzentrationen

Probenaufbereitung

Die Proben wurden aufgetaut und zwei Minuten im Ultraschallbad beschallt. Danach wurden sie mit Homogenisierungspuffer **H** auf 1200 μl aufgefüllt. Dies bedeutet für den Frontalcortex, den Parietalcortex und das Striatum, dass zu dem Probenhomogenat 700μl **H**, für den Hippocampus 600μl und für das Probenhomogenat des Hypothalamus 840μl **H** hinzugegeben wurden. Anschließend wurden diese Proben erneut im Ultraschallbad so weit homogenisiert, bis bei

Sichtkontrolle keine Gewebstücke mehr zu sehen waren. Die so gewonnenen Homogenate wurden sofort bei -80°C eingefroren. Zur Bestimmung der NGF und BDNF Konzentrationen wurden die Probenhomogenate aufgetaut und noch einmal im Ultraschallbad homogenisiert. 400 μl je Probe wurden in ein Eppendorfggefäß überführt und zentrifugiert. Für den Probenansatz wurden 220 μl aus dem Überstand des Probenhomogenats zu 220 μl **E** gegeben.

Für die Wiederfindungsrate (*Recovery*) wurden je 200 μl der Proben mit 10 μl *Recoveryansatz* gemischt und ebenfalls zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden 110 μl mit 110 μl **E** gemischt.

Danach wurden in die jeweils vorgesehenen Wells 50 μl der Flüssigkeiten (*Recoveryansatz* oder Probenansatz) pipettiert und über Nacht inkubiert.

ELISA

Die Antigenbestimmung erfolgte mit einem ELISA. Für die Bestimmung von BDNF wurde ein modifiziertes kommerzielles ELISA-Kit (siehe 3.1.2.) und für die Konzentrationsbestimmung von NGF wurde ein hochempfindlicher und spezifischer ELISA genutzt. Für die ELISA kam das Sandwich-Zwei-Seiten („*two-site*“)-Prinzip zur Anwendung. Die Konzentrationsbestimmung von BDNF und NGF erfolgte mit der fluorimetrischen Bestimmungsmethode.

Als erster Antikörper wurde für BDNF ein monoklonaler Antikörper (Anti-BDNFmAb), der BDNF mit hoher Spezifität bindet, genutzt. Als spezifischer Antikörper für NGF kam der Anti- β (2,5S,7S) NGF Antikörper, Klon 27/21 zum Einsatz. Dieser ist ebenfalls ein hochaffiner monoklonaler Maus-Antikörper, der sowohl Geflügel- und Nager- als auch Human-NGF mit sehr hoher Spezifität bindet [263-266]. Die Detektionsgrenze lag für BDNF bei 1 pg/ml und für NGF bei 0,25 pg/ml.

Bei dem zweiseitigen ELISA für die Bestimmung der Konzentrationen der Neurotrophine NGF und BDNF wurde die feste Oberfläche der Mikrotiterplatten mit dem ersten Antikörper im Überschuss beschichtet. Dieser ist gegen das zu bestimmende Antigen (BDNF bzw. NGF) gerichtet. Im zweiten Schritt wurde das Homogenat (siehe oben 3.1.4.), die Gewebeprobe, hinzugegeben. Durch Bindung an den ersten Antikörper wurden die enthaltenen Antigene, BDNF bzw. NGF, immobilisiert. Für die BDNF Bestimmung wurde nach dem zweiten polyklonalen Antikörper (BDNFpAb), der mit BDNF eine Bindung eingeht, ein dritter Antikörper (Anti-IgY, AP Conjugat) dazugegeben, der an den zweiten bindet und selbst mit einem Enzym (Alkalische Phosphatase) markiert ist. Für NGF ist der zweite Antikörper bereits an ein Enzym gebunden (Anti- β (2,5S,7S) NGF- β -Gal).

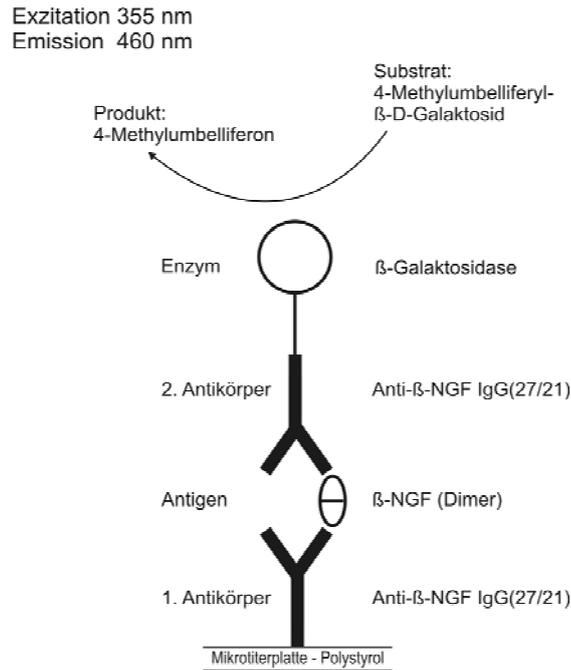


Abbildung 5: Darstellung des „two-site“ NGF ELISA, modifiziert nach Hellweg et al. [264].

Die Enzyme (alkalische Phosphatase im Assay für BDNF und β -Galactosidase für das NGF Assay) katalysieren die Umsetzung eines Substrates (für das BDNF Assay wird AttoPhos eingesetzt und für das NGF Assay 4-Methylumbelliferyl- β -D-Galaktosid MUG) zu einem fluoreszierenden Produkt (im BDNF Assay 2-Benzothiazolyl-6-Hydroxybenzothiazol und im NGF Assay 4-Methylumbelliferon). Diese Produkte können mit einer fluormetrischen Messung quantitativ bestimmt werden und sind direkt proportional der Anzahl der immobilisierten Antigene (BDNF bzw. NGF). Gleichzeitig wurde die Emission bekannter Antigenkonzentrationen ermittelt, um eine Standardkurve zu erstellen. Mit dieser konnte dann die Antigenkonzentration in den Gewebeproben ermittelt werden.

NGF und BDNF sind dimere Proteine. Bei Bindung des ersten und des zweiten Antikörpers behindern sich diese beiden Antikörper sterisch nicht [265, 266].

Diese Methode wurde bereits mehrfach in verschiedenen Veröffentlichungen beschrieben [264, 265].

- Erstellen der Standardkurve

Für jeden Assay wurden mit 6 Proben definierter NGF bzw. BDNF Konzentrationen eine Standardkurve, die einer Funktion dritten Grades folgt, zweimal auf den Mikrotiterplatten Nummer zwei und fünf erstellt. Die Funktion dritten Grades wurde aus den fluormetrisch erhobenen Messwerten die BDNF/ NGF Konzentrationen der Gewebeproben ermittelt. Für die

Standardkurve des BDNF Assays wurden 1µl **BDNF-STOCK** (5000pg/1µl) in 10ml **S/C Pi** gemischt (500pg BDNF/1ml **S/C Pi**). Danach wurden je 600µl **S/C Pi** mit 300µl aus der vorhergehenden Verdünnung gemischt, bis 7 Verdünnungen erhalten wurden. Die entstandenen Konzentrationen an BDNF in **S/C Pi** waren: 166,7pg/ml; 55,56pg/ml; 18,52pg/ml; 6,17pg/ml; 2,06pg/ml und 0,69pg/ml. Das Ablesen der Werte wurde bevorzugt im linearen Teil der Kurve durchgeführt.

Für die Standardkurve des NGF Assays wurden 15µl **NGF-STOCK** (100pg/1µl) und 985µl **S/C Pi** mit **Pi** gemischt (1500µl NGF/1ml **S/C Pi**). Danach wurden je 900µl **S/C Pi** mit 300µl aus der vorhergehenden Verdünnung gemischt, bis 7 Verdünnungen vorhanden waren. Damit erhielt man folgende Konzentrationen 375pg NGF/1ml **S/C Pi**, 93,75 NGF/1ml **S/C Pi**, 23,44pg NGF/1ml **S/C Pi**, 5,86pg NGF/1ml **S/C Pi**, 1,46pg NGF/1ml **S/C Pi** und 0,37pg NGF/1ml **S/C Pi**.

Abgelesen wurde auch hier bevorzugt im linearen Teil der Kurve.

- Erstellen des *Recovery*ansatzes

Durch Bindung der NGF/BDNF Proteine an vorhandene NGF/BDNF Rezeptoren im Gewebe entgehen diese Proteine ihrer Bestimmung. Daher wurde in den Assays die Wiederfindungsrate, auch *Recovery* genannt, bestimmt. Es handelt sich dabei um ein Maß für den NGF/ BDNF Verlust während des Assays. Zur Bestimmung der *Recovery* wurde die Konzentration der Neurotrophine in jedem Gewebehomogenat einmal ohne und einmal mit einem Zusatz einer bestimmten Menge BDNF (250pg/ml) bzw. NGF (125pg/ml) ermittelt. Am Ende der Untersuchung wurde dann die ermittelte Konzentration an BDNF bzw. NGF in den Proben ohne den Zusatz von BDNF bzw. NGF von der Konzentration an BDNF bzw. NGF plus Zusatz abgezogen. Es wurden mindestens 250pg BDNF/ml bzw. 125pg NGF/ml vorgelegt. Bei einer *Recovery* von 100% müsste bei der Subtraktion der Konzentrationen der Homogenate von den Konzentrationen von Homogenat und dem Neurotrophinzusatz die Ausgangskonzentrationen der zusätzlich zu den Proben hinzugegebenen Konzentrationen an BDNF und NGF wieder gefunden werden. In den BDNF Assays lag die *Recovery* in den drei durchgeführten Assays bei 7,46%, 6,62% und 3,91% und für die drei NGF Assays bei 83,35%, 94,60% und 84,93%. Damit konnte die Konzentration von BDNF und NGF relativierend berechnet werden.

- Der Leerwert (Blank)

Auch die Wells der Mikrotiterplatten und die verwendeten Substanzen können Signale aussenden, die als „Hintergrundrauschen“ beschrieben werden. Um dieses zu berücksichtigen, wurden Leerwerte bestimmt. Dabei wurden die Platten ebenfalls mit dem ersten Antikörper beschichtet, und es wurden auch die anderen Antikörper hinzugegeben, jedoch wurde nur der Homogenisierungspuffer ohne das Probenhomogenat verwendet. Das somit gemessene Signal

wurde nicht durch die Proteine BDNF und NGF verursacht und wurde von dem Signal der Proben abgezogen. Die Blanks wurden 8 Mal pro Assay bestimmt.

- Die unspezifische Bindung

Zusätzlich wurden die Bindungen ermittelt, die der erste Antikörper mit anderen Gewebsbestandteilen und nicht mit BDNF bzw. NGF eingeht. Diese Bindungen werden auch unspezifische Bindungen genannt. Dafür wurden Wells der Mikrotiterplatten statt mit dem Anti-BDNFmAb bzw. dem Anti- β NGF Antikörper mit IgG1, dem Subtypen dieser monoklonalen Antikörper beschichtet. Dieser bindet nicht die Proteine BDNF bzw. NGF und ermittelt somit alle restlichen Bindungen, die jeweils der erste Antikörper (Anti-BDNFmAb bzw. Anti- β NGF Antikörper) noch eingehen könnte. Die unspezifische Bindung wurde daraufhin berechnet durch die Subtraktion der signalgebenden Bindungen der „unspezifischen“ Blanks von den signalgebenden Bindungen in den Wells, die mit IgG1 beschichtet wurden und in die das Probenhomogenat gegeben wurde. Die Signalgebung der unspezifischen Bindung musste danach korrigierend von den Signalen der spezifischen Bindung abgezogen werden. Die spezifischen Bindungen sind dabei die Bindungen, die durch den ersten monoklonalen Antikörper und die durch ihn immobilisierten Neurotrophine aus den Probenhomogenaten gebildet werden. Alle Werte wurden jeweils als Quadruplikate bestimmt.

3.1.4.1. ELISA zur Bestimmung der Konzentration von BDNF

- Beschichten, d.h. „Coaten“ der Mikrotiterplatten mit dem ersten Antikörper

Der erste Schritt des Versuches enthielt das „Coaten“ der Platten mit dem ersten Antikörpern Anti-BDNFmAb für die spezifischen Bindungen und IgG1 für die Ermittlung der unspezifischen Bindungen. Der primäre Antikörper wurde 1:750 in C verdünnt. IgG1 wurde mit C im Verhältnis 1:8000 verdünnt. Mit einer Eppendorf-Multipipette wurden pro Well 50 μ l (IgG1 oder Anti-BDNFmAb) aufgetragen. Für die Proben sind je 8 Wells mit Anti-BDNFmAb und vier Wells mit IgG1 beschichtet worden. Ein leichtes Klopfen an den Seiten der Mikrotiterplatten läßt die Antikörperverdünnungen in den Wells gleichmäßig verteilen. Sofort nach dem Pipettieren lagerten die Platten abgedeckt in einer fest verschlossenen Kammer bei 4°C über Nacht im Kühlschrank. Nach der nächtlichen Inkubation wurden die Platten viermal gewaschen.

Probe	Probe	Probe	Blank	Blank	1	2	3	4	5	6	7
Probe											

Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Mikrotiterplatte mit 96 Wells. Exemplarisch ist das Auftrageschema des ersten Antikörpers für die spezifische Bindung und für IgG1 zur Ermittlung der unspezifischen Bindungen dargestellt. Dabei wurden für die vier Proben je 8 Wells (weiß) mit dem ersten monoklonalen Antikörper und vier Wells (grau) mit IgG1 beschichtet. Für die Blanks, die zur Ermittlung des „Hintergrundrauschens“ dienen, wurde in vier Wells IgG1 und in vier anderen Wells der erste monoklonale Antikörper aufgetragen. Für die Verdünnungsreihe zur Ermittlung der Standardkurve (1 bis 7) wurden für jede Verdünnung vier Wells mit dem ersten monoklonalen Antikörper beschichtet. [weiß=erster monoklonaler Antikörper, grau=IgG1]

- Vorbereiten der Proben, des *Recoveryansatzes*, der Blanks und der Proben für die Standardkurve

Nach dem Auftauen und der nochmaligen Beschallung im Ultraschallbad wurden 400µl Probenhomogenat in Eppendorfgefäße überführt.

Für die Bestimmung der Wiederfindungsrate sind 10µl des *Recoveryansatzes* (aus 476µl **H/Pi** und 1µl **BDNF-STOCK** hergestellt) in Eppendorfgefäße vorgelegt und 200µl Probenhomogenat hinzugefügt worden. Um zelluläre Bestandteile zu trennen, wurden die Ansätze für die *Recovery* und die Probenhomogenate 25 Minuten lang bei 6000 Umdrehungen und einer Temperatur von 10°C zentrifugiert.

220µl aus dem Überstand der Probenhomogenate sind in Eppendorfgefäße mit 220µl **E** übertragen worden. 110µl aus dem Überstand des *Recoveryansatzes* wurden in ein Eppendorfgefäß mit 110µl **E** gefüllt. Nun befanden sich in den Eppendorfgefäßen mit dem *Recoveryansatz* mindestens 250pg BDNF in 1ml *Recoveryansatz*.

- Auftragen und Inkubieren der immobilisierten Anti-BDNFmAb mit dem BDNF Standard, den Proben, dem *Recoveryansatz* und den Blanks

Nach dem Entfernen des Waschpuffers wurden zum ersten Antikörper die zuvor hergestellten Probenhomogenate mit **E** und die Proben mit dem *Recoveryansatz* und **E** sowie die Blanks und

die Verdünnungen von BDNF zur Ermittlung der Standardkurve aufgetragen. Dabei wurden die Wells mit je 50µl gefüllt. Nach dem Abdecken der Platten lagerten diese über Nacht in fest verschlossenen Kammern im Kühlschrank bei 4°C.

Probe	Probe	Probe	Blank	Blank	1	2	3	4	5	6	7
Probe											

Abbildung 7: Schematische Darstellung einer Mikrotiterplatte mit 96 Wells. Exemplarisch ist das Auftrageschema der Probenansätze und des *Recovery*ansatzes sowie **S/C Pi** für die Blanks und die Verdünnungen der Standardkurve (1 bis 7) dargestellt. [dunkelgrau=*Recovery*ansatz, weiß=Probenansätze, hellgrau=**S/C Pi** und grau=Verdünnungen für die Ermittlung der Standardkurve mit von 1 nach 7 zunehmender Konzentration]

- Inkubation mit Anti-BDNFpAb

30 Minuten vor Versuchsbeginn wurden die Mikrotiterplatten aus dem Kühlschrank genommen und anschließend viermal gewaschen. Danach wurde der zweite polyklonale Antikörper Anti-BDNFpAb in einer 1:500 Verdünnung mit **S/C** aufgetragen, und in jedes Well wurden 50µl hinein pipettiert. Die Inkubation erfolgte bei abgedeckten Platten und Raumtemperatur (22°C) für zwei Stunden im Dunkeln.

- Inkubation des dritten Antikörpers

Die Platten wurden anschließend viermal gewaschen, und der dritte Antikörper wurde mit je 50µl in einer Verdünnung 1:1000 in **S/C** gelöst aufgetragen. Die Platten wurden wieder abgedeckt und eineinhalb Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach mussten die Platten erneut gewaschen werden, diesmal fünfmal. Anschließend wurden die Platten mit dem **SP** 150µl pro Well zweimal gewaschen.

- Inkubation der Platten mit AttoPhos

Die Platten wurden entleert. Danach kam in jedes Well 50µl des 1mM AttoPhos. Die Platten wurden über Nacht in einer feuchten Kammer, die mit angefeuchteten Handtüchern ausgelegt war, auf sogenannten Schwimmern gelagert.

- Unterbrechen der Reaktion von AttoPhos zu 2-Benzothiazolyl-6-Hydroxybenzothiazol mit Stop-Puffer und Messen der Farbintensität

Die Reaktion in den Platten wurde kurz vor der Messung durch die Zugabe von jeweils 200µl Stop-Puffer unterbrochen. Nach diesem Vorgang wurden die Platten sofort wieder abgedeckt. Die Fluoreszenzemission wurde bei 538nm mit einem Mikrotiterplatten-Fluorometer gemessen. Zur Anregung diente Licht einer Wellenlänge von 483nm. Die Auswertung der Messdaten erfolgte am Computer (siehe 3.1.5.).

3.1.4.2. ELISA zur Bestimmung der Konzentration von NGF

- Beschichten der Mikrotiterplatten mit dem ersten Antikörper

Für die Herstellung der Antikörperverdünnung zum „Coaten“ der Platten mit dem spezifischen Antikörper, wurde Anti-β (2,5S, 7S) NGF Antikörper (Klon 27/21) 1:200 in „Coating“- C Puffer verdünnt. Diese Verdünnung wurde für die spezifische Bindung genutzt. Für die Herstellung der Antikörperverdünnung, um die unspezifischen Bindungen bestimmen zu können, wurde Immunglobulin IgG1 1:2000 mit C-Puffer verdünnt. Diese Verdünnungen wurden in Falcongefäßen angemischt und mit dem Coulter Mixer vermischt. Für den ersten Antikörper, der die spezifischen Bindungen bildet, wurden für jede Probe in 8 Wells 50µl der Antikörperverdünnung mit der Multipipette gegeben. Von der IgG1-Verdünnung wurden für jede Probe 50µl in vier Wells pipettiert. Leichtes Klopfen an den Seiten der Mikrotiterplatten garantierte die gleichmäßige Verteilung der Antikörperverdünnungen in den Wells. Anschließend wurden der Deckel aufgesetzt und die Platten im Dunkeln bei Raumtemperatur zwei bis drei Stunden inkubiert. Das ungebundene Material wurde durch dreimaliges Waschen der Mikrotiterplatten im Waschautomaten mit 200µl Waschpuffer je Well entfernt. Der Waschpuffer ist so hergestellt, dass er keine Bindungen stört.

- Vorbereiten der Proben, des *Recovery*ansatzes, der Proben für die Standardkurve und der Blanks

Die Homogenate wurden aufgetaut und zu je 400µl in die entsprechenden Eppendorfgefäße abpipettiert. Für die Bestimmung der *Recovery* wurden 10µl *Recovery*ansatz (aus 570µl **H/Pi**

und 30µl **NGF-STOCK** hergestellt) in die Eppendorfgläser vorgelegt und 200µl Probenhomogenat zugefügt. Zusammen mit den Ansätzen für die *Recovery* wurden die Probenhomogenate 25 Minuten lang bei 6000 Umdrehungen und einer Temperatur von 10°C zentrifugiert, um zelluläre Bestandteile zu trennen. 220µl aus dem Überstand der Homogenate wurden in Eppendorfgläser mit 220µl **E** übertragen. 110µl aus dem Überstand des *Recovery*-Ansatzes wurden in ein Eppendorfglas mit 110µl **E** überführt. Nun befanden sich in Eppendorfgläsern mit dem *Recovery*-Ansatz mindestens 125pg NGF auf 1ml *Recovery*-Ansatz.

- Inkubation des ersten Antikörpers mit den Proben, den *Recovery*-Ansätzen, den Proben für die Standardkurve und der Blanks

Nach dem Waschen der Mikrotiterplatten und Entfernen des **W** wurden 50µl der Probenhomogenate gemischt mit **E** auf die Platten aufgetragen. Dabei wurden vier der vorher mit dem ersten Antikörper beschichteten Wells und die vier Wells mit IgG1 mit den Proben befüllt. Außerdem wurden die Blanks und die NGF Verdünnungen für die Ermittlung der Standardkurve aufgetragen. Die Platten wurden wieder abgedeckt und über Nacht für 16 Stunden in einer fest verschlossenen Kammer bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

- Inkubation mit dem zweiten Antikörper

Die Platten wurden 45 Minuten vor Versuchsbeginn aus dem Kühlschrank genommen und wie oben schon einmal beschrieben dreimal gewaschen. Die letzte Waschlösung **W** verblieb in den Wells und wurde erst kurz vor der Zugabe des zweiten Antikörpers entfernt. Mit der Eppendorf-Multipipette wurden je Well 50µl des Anti-β (2,5S, 7S) NGF-β-GAL, Klon 27/21, in einer Verdünnung von 1:75 in **S/C** Puffer gelöst hinzugegeben. Das ist der zweite Antikörper, der kovalent das Enzym β-Galaktosidase bindet. Diese Platten mussten nun erneut zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert werden. Danach wurden die Platten dreimal gewaschen, und die letzte Waschlösung **W** verblieb dann 30 bis 45 Minuten in den Wells.

- Auftragen des Substrates für die Galaktosidase, die am zweiten Antikörper gebunden ist

Der Waschpuffer wurde entfernt, und sofort danach wurden in jedes Well 150µl **SP** gegeben. Der Substratpuffer **SP** durfte nicht länger als 20 Minuten in den Wells belassen werden. Dieser Vorgang dient der Milieuangleichung und findet zweimal statt. Als nächster Schritt wurde das Substrat hinzu gegeben. Für 1,5 bis 2mg **MUG** werden 30ml **SP** benötigt. Die **MUG** Menge wurde in 300 bis 400µl Ameisensäure gelöst, und zu dieser Lösung wurden dann 30ml **SP** hinzugefügt. Nach Entfernung des **SP** wurden 50µl **MUG** Ansatz in jedes Well gegeben, und die Platten wurden wieder abgedeckt. Abschließend wurden die Platten zur Inkubation in der fest verschlossenen Kammer über Nacht im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

- Stoppen der Reaktion

Eineinhalb Stunden vor der Messung wurden die Platten im Dunkeln auf Raumtemperatur gebracht. Die Reaktion in den Wells wurde kurz vor der Messung mit dem **STOP**-Puffer unterbrochen. Mit der Eppendorf-Multipette wurden 200µl pro Well zu den bereits vorliegenden 50µl **MUG** Lösung gegeben. Der Deckel mußte dann sofort wieder aufgesetzt werden. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 355nm angeregt und bei 460nm mit einem Mikrotiterplatten-Fluorometer gemessen. Die Auswertung erfolgte am Computer (siehe 3.1.5.).

3.1.5. Datenaufbereitung und statistische Methode

Die Konzentrationen an BDNF und NGF in den einzelnen Wells wurden fluormetrisch gemessen. Es wurden Quadruplets gebildet, indem von jeder Hirnregion in vier Wells die Neurotrophinkonzentrationen gemessen wurden. Proportional zur Menge an immobilisiertem BDNF oder NGF im Gewebe wurde Licht ausgesandt, dessen Intensität vom Fluorometer gemessen wurde.

Mit der erstellten Standardkurve aus den Neurotrophinverdünnungen, die ebenfalls in Quadruplets bestimmt wurden, konnten mit den ermittelten Fluoreszenzintensitäten und dem eingesetzten Feuchtwicht die Konzentrationen von BDNF und NGF in den Gewebeproben berechnet werden. Im Labor stand für die Ermittlung der Konzentrationen ein Computer mit einem speziell für die Neurotrophinassays erstellten Excelprogramm (Microsoft Office Excel) zur Verfügung. Nach Eingabe der gemessenen Intensitäten in den Wells, der eingesetzten Feuchtwichte und der Verdünnungsquotienten (siehe 3.1.1.) wurden aus den Quadruplets die Mittelwerte für die Konzentrationen von BDNF und NGF in den einzelnen Hirnregionen ermittelt. Die Mittelwerte für die Neurotrophinkonzentrationen für jede Hirnregion pro Tier wurden in pg/mg Feuchtwicht angegeben. Zur Auswertung wurde das Statistikprogramm SPSS 13.0 für Windows der SPSS GmbH verwendet.

Ob eine Normalverteilung der Messwerte vorlag, wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft. Dabei zeigte sich bei einem $\alpha < 0,05$, dass die Messwerte für BDNF im Parietalcortex von Sham Mäusen und für NGF im Frontalcortex und Parietalcortex von Sham Mäusen und im Hypothalamus von OBX Mäusen nicht normal verteilt vorliegen. Die Nullhypothese musste abgelehnt werden. Für die anderen Werte kann jedoch nicht im Umkehrschluss angenommen werden, dass die Nullhypothese, die besagt, dass diese Werte normalverteilt vorliegen, angenommen werden kann.

Da nicht alle Datensätze normal verteilt waren und nur eine kleine Stichprobenmenge von $n=11$ für die OBX Tiere und $n=13$ für die Kontrolltiere vorlag, wurde der parameterfreie Mann-Whitney-U-Test angewandt. Dies ist ein parameterfreier Rangsummentest. Der Test prüft die Irrtumswahrscheinlichkeit, dass zwei Verteilungen fälschlicherweise als unterschiedlich angenommen werden. Dieser Test setzt rangskalierte Merkmale voraus. Die Irrtumswahrscheinlichkeit α lag bei 5%. Die Nullhypothese (N_0) lautete, dass es keine Unterschiede in den Neurotrophinkonzentrationen zwischen den OBX Tieren und den Sham Tieren gab. Die Alternativhypothese $N(1)$ besagte, dass die Verteilung der Neurotrophinkonzentrationen in den OBX Tieren und den Sham Tieren unterschiedlich ist. Die Anzahl der untersuchten Tiere war 24, wovon 11 Tiere OBX und 13 Tiere Sham waren. Die Verteilung der Konzentrationen von BDNF und NGF in den einzelnen Hirnregionen wird in Box-Plots graphisch veranschaulicht. Dargestellt sind der Median, der Interquartilsbereich, und der kleinste und der größte Wert innerhalb des 1,5-fachen Interquartilsbereichs. Dieser wurde gebildet aus dem 25. und der 75. Perzentil. Ausreißer innerhalb des dreifachen Interquartilsbereichs wurden mit einem Kreis eingezeichnet. Extremwerte außerhalb des dreifachen Interquartilsbereichs sind mit einem Stern markiert worden. Ausreißer und Extremwerte werden mit laufender Nummer aus Tabelle 6 und 8 bezeichnet.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Konzentrationen von BDNF in Mäusen nach Ektomie des Bulbus olfactorius und Scheinoperation

Für BDNF galt die Nullhypothese $N(0)$, dass die Konzentrationen von BDNF in den Sham operierten und den OBX operierten Tieren gleich sind. Die Nullhypothese konnte für die Hirnregionen Parietalcortex, Hypothalamus und Striatum angenommen werden. In diesen Hirnregionen kam es zu keinen signifikanten Veränderungen in den BDNF Konzentrationen durch die OBX Operation. Für den Hippocampus und den Frontalcortex musste sie jedoch abgelehnt werden, da hier die Konzentrationen des Proteins BDNF signifikant höher in den OBX operierten Tieren als in den Sham operierten Tieren waren.

Tabelle 6: Mittelwerte der Konzentration des Proteins BDNF [pg/mg Feuchtgewicht] für die verschiedenen Hirnregionen im einzelnen Tier. [Hippo = Hippocampus, FC = Frontalcortex, Hypo = Hypothalamus, Str = Striatum, PC = Parietalcortex].

Laufende Nummer	Tier-Nummer	Hippo [pg/mg]	FC [pg/mg]	Hypo [pg/mg]	Str [pg/mg]	PC [pg/mg]
Sham Mäuse						
12	39	35,87	17,13	113,11	26,07	37,45
13	04	41,08	28,76	136,75	36,50	
14	10	32,08	26,43	96,82	41,00	48,19
15	11	26,02	19,56	112,70	62,97	46,31
16	14	44,29	25,57	136,02	47,78	23,61
17	23	34,61	28,29	156,23	52,64	
18	29	32,55	23,49	178,25	37,82	56,99
19	44	41,27	27,40	213,12	37,15	37,36
20	47	41,65	28,87	210,70	50,22	39,59
21	50	33,21	23,79	118,64	53,75	63,72
22	56	23,48	35,94	178,74	41,71	44,55
23	59	43,01	25,60	146,02	29,66	130,01
24	60	26,23	13,86	167,82	20,94	39,49
OBX Mäuse						
01	07	125,47	59,41	139,59	83,96	52,82
02	08	38,72	27,44	90,23	27,01	
03	09	95,50	37,57	114,23	46,38	35,77
04	12	53,68	31,24	78,53	36,07	17,39
05	20	78,61	46,60	83,68	41,85	23,56
06	21	49,61	24,31	85,56	34,24	47,72
07	24	32,81	29,51	199,25	28,63	37,18
08	25	61,55	28,34	134,25	29,40	42,19
09	27	161,26	57,17	224,85	64,08	42,42
10	28	70,99	44,64	183,81	57,56	53,95
11	30	36,61	20,29	150,47	33,58	35,01

Tabelle 7: Mediane (\bar{x}) für die Konzentrationen von BDNF [pg/mg Feuchtgewicht] in den einzelnen Hirnregionen.

Hirnregionen	\bar{x} für Sham Mäuse	\bar{x} für OBX Mäuse
Hippocampus	34,61	61,55
Frontalcortex	25,60	31,24
Hypothalamus	146,02	134,25
Striatum	41,00	36,07
Parietalcortex	44,55	42,16

Hippocampus

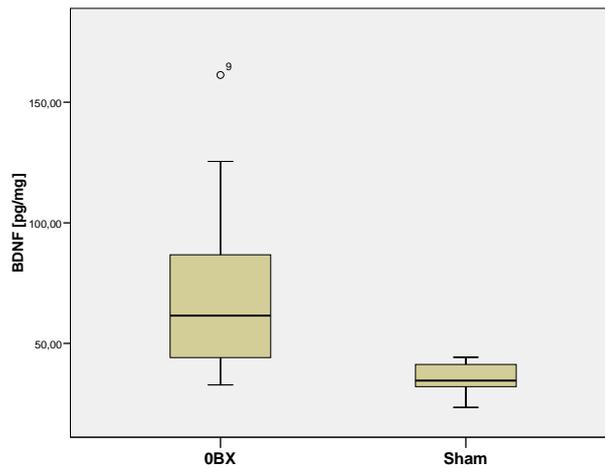


Abbildung 8: Box-Plot der BDNF Konzentrationen [pg/mg Feuchtgewicht] im Hippocampus der OBX (n=11) und Sham (n=13) operierten Tiere.

Es liegt ein signifikanter Unterschied ($\alpha=0,002$) zwischen den Konzentrationen von BDNF in den OBX Tieren und den Sham Tieren im Hippocampus vor. Die Konzentration im Hippocampus ist in den OBX Tieren höher als in den Sham Tieren.

Frontalcortex

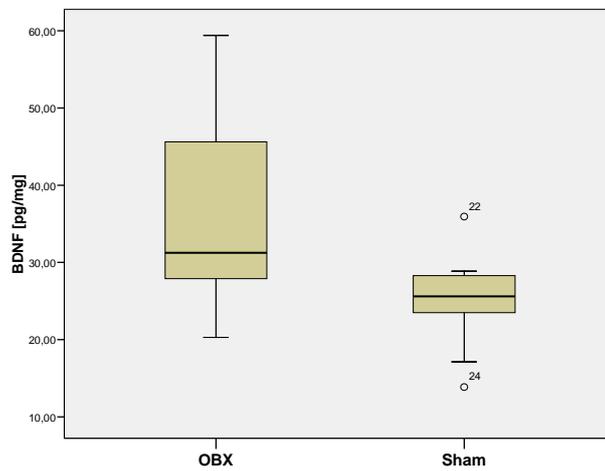


Abbildung 9: Box-Plot der BDNF Konzentrationen [pg/mg Feuchtgewicht] im Frontalcortex der OBX (n=11) und Sham (n=13) operierten Mäuse.

Es liegt ein signifikanter Unterschied ($\alpha=0,01$) zwischen den Konzentrationen von BDNF in den OBX Tieren und den Sham Tieren im Frontalcortex vor. Die Konzentration im Frontalcortex ist in den OBX operierten Tieren höher als in den Sham operierten Tieren.

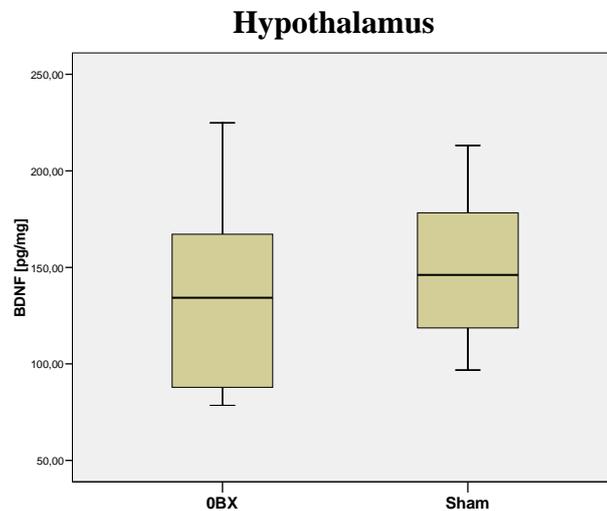


Abbildung 10: Box-Plot der BDNF Konzentrationen [pg/mg Feuchtgewicht] im Hypothalamus der OBX (n=11) und Sham (n=13) operierten Tiere.

Es liegt kein signifikanter Unterschied ($\alpha=0,339$) vor. Die Nullhypothese ist angenommen.

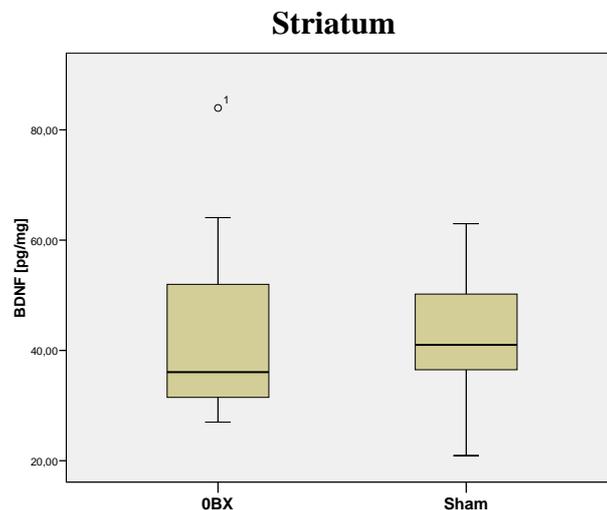


Abbildung 11: Box-Plot der BDNF Konzentrationen [pg/mg Feuchtgewicht] im Striatum der OBX (n=11) und Sham (n=13) operierten Tiere.

Es liegt kein signifikanter Unterschied ($\alpha=0,885$) vor. Die Nullhypothese ist angenommen.

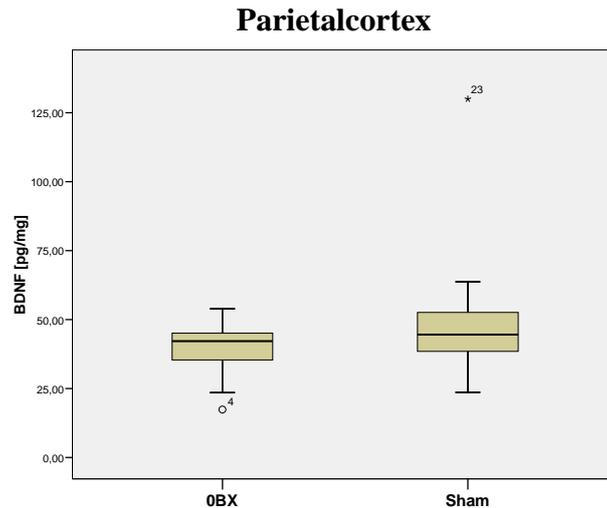


Abbildung 12: Box-Plot der BDNF Konzentrationen [pg/mg Feuchtgewicht] im Parietalcortex der OBX (n=11) und Sham (n=13) operierten Tiere.

Es liegt kein signifikanter Unterschied ($\alpha=0,200$) vor. Die Nullhypothese ist angenommen.

3.2.2. Konzentrationen von NGF in Mäusen nach Ektomie des Bulbus olfactorius und Scheinoperation

Tabelle 8: Mittelwerte der Konzentration des Proteins BDNF [pg/mg Feuchtgewicht] für die einzelnen Hirnregionen und für jedes Tier. [Hippo = Hippocampus, FC = Frontalcortex, Hypo = Hypothalamus, Str = Striatum, PC = Parietalcortex].

Laufende Nummer	Tier-nummer	Hippo in [pg/mg]	FC in [pg/mg]	Hypo in [pg/mg]	Str in [pg/mg]	PC in [pg/mg]
Sham Mäuse						
12	39	2,75	1,57	2,10	0,55	6,37
13	04	1,99	2,33	2,13	0,51	2,72
14	10	1,18	1,15	1,75	0,53	2,66
15	11	1,86	1,76	1,72	0,60	2,89
16	14	2,24	1,81	2,19	0,57	3,58
17	23	1,61	2,88	2,52	0,48	5,42
18	29	1,74	2,26	1,85	0,69	3,48
19	44	2,70	2,06	6,78	0,35	2,16
20	47	2,11	10,08	3,20	0,52	11,51
21	50	1,89	2,24	2,61	0,45	2,90
22	56	1,70	2,20	4,58	0,53	2,34
23	59	2,20	2,63	2,71	0,59	10,26
24	60	2,08	2,94	4,57	0,61	4,71

OBX Mäuse						
01	07	2,41	1,73	1,21	0,63	1,53
02	08	1,83	1,08	2,37	0,45	2,33
03	09	2,51	2,06	2,28	0,63	3,11
04	12	2,31	2,52	10,88	0,30	7,04
05	20	2,80	2,85	3,06	0,55	2,45
06	21	2,85	1,41	1,84	0,46	2,30
07	24	1,87	1,66	3,29	0,58	3,27
08	25	2,13	1,19	1,76	0,57	3,56
09	27	2,41	1,80	2,95	0,76	4,72
10	28	2,38	4,72	3,59	0,92	5,17
11	30	2,67	2,76	6,52	0,62	4,45

Tabelle 9: Mediane (\bar{x}) für die Konzentrationen von NGF [pg/mg Feuchtgewicht] in den einzelnen Hirnregionen.

Hirnregion	\bar{x} für Sham Mäuse	\bar{x} für OBX Mäuse
Hippocampus	1,99	2,41
Frontalcortex	2,24	1,80
Hypothalamus	2,52	2,95
Striatum	0,53	0,58
Parietalcortex	3,48	3,27

Hippocampus

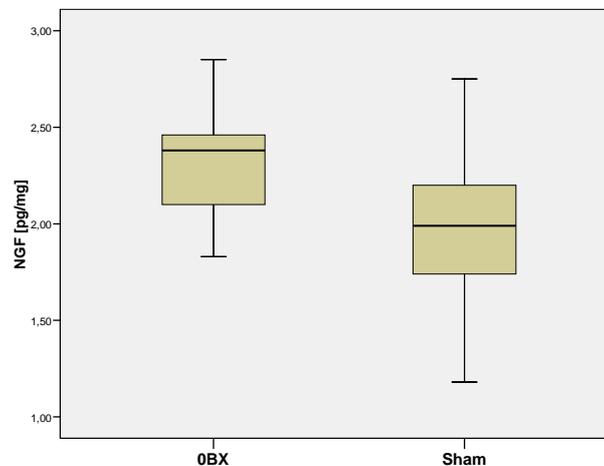


Abbildung 13: Box-Plot der NGF Konzentrationen [pg/mg Feuchtgewicht] im Hippocampus der OBX (n=11) und Sham (n=13) operierten Tiere.

Es liegt ein signifikanter Unterschied ($\alpha=0,046$) zwischen den Konzentrationen von BDNF in den OBX Tieren und den Sham Tieren bezüglich der NGF Konzentration im Hippocampus vor. Die Konzentration im Hippocampus ist in den OBX operierten Tieren höher als in den Sham operierten Tieren.

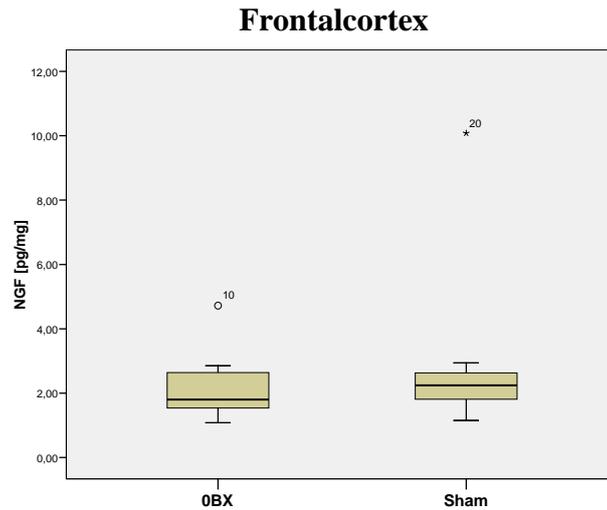


Abbildung 14: Box-Plot der NGF Konzentrationen [pg/mg Feuchtgewicht] im Frontalcortex der OBX (n=11) und Sham (n=13) operierten Tiere.

Es liegt kein signifikanter Unterschied ($\alpha=0,325$) vor. Die Nullhypothese ist angenommen.

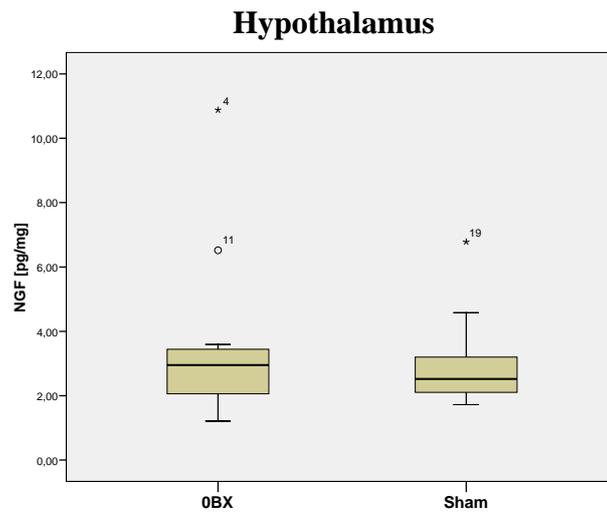


Abbildung 15: Box-Plot der NGF Konzentrationen [pg/mg Feuchtgewicht] im Hypothalamus der OBX (n=11) und Sham (n=13) operierten Tiere.

Es liegt kein signifikanter ($\alpha=0,664$) Unterschied vor. Die Nullhypothese ist angenommen.

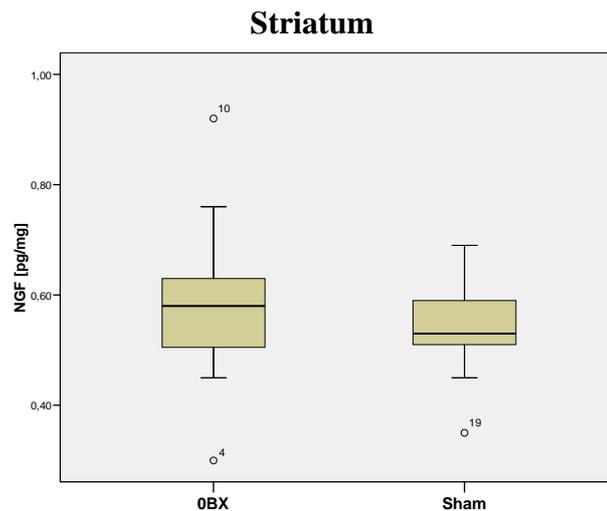


Abbildung 16: Box-Plot der NGF Konzentrationen [pg/mg Feuchtgewicht] im Striatum der OBX (n=11) und Sham (n=13) operierten Tiere.

Es liegt kein signifikanter Unterschied ($\alpha=0,270$) vor. Die Nullhypothese ist angenommen.

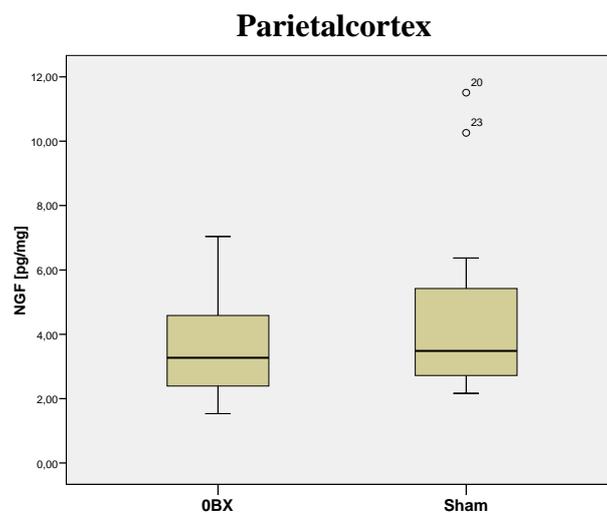


Abbildung 17: Box-Plot der NGF Konzentrationen [pg/mg Feuchtgewicht] im Parietalcortex der OBX (n=11) und Sham (n=13) operierten Tiere.

Es liegt kein signifikanter Unterschied ($\alpha=0,505$) vor. Die Nullhypothese ist angenommen.

Im Gegensatz zu BDNF waren die NGF Konzentrationen nur im Hippocampus ($p<0,05$) signifikant erhöht. In den anderen vier untersuchten Regionen blieb die NGF Konzentration unverändert. Die OBX Mäuse hatten im Hippocampus ($p<0,05$) und im Frontalcortex ($p<0,05$)

eine erhöhte BDNF Protein Konzentration. Die BDNF Konzentrationen waren 16 Tage nach der OBX Operation im Hypothalamus, Striatum und Parietalcortex unverändert.

Damit bewirkte die OBX Operation im Hippocampus sowohl eine Erhöhung der BDNF Konzentration als auch eine Erhöhung der NGF Konzentration. Im Frontalcortex bewirkte die OBX Operation nur eine BDNF Konzentrationserhöhung.

4. Diskussion

4.1. Methodendiskussion

Die Neurotrophin-Hypothese der Depression besagt, dass durch eine Verminderung in der Konzentration der Neurotrophine eine Abnahme der Neuroplastizität und auch der Neurogenese zu erwarten sei.

Ein Tiermodell der Depression mit bestimmter Vorhersage-, Augenschein- und Konstruktvalidität ist die Maus mit ektomiertem Bulbus olfactorius. Dieses wurde hier als Modell der chronischen psychomotorisch agitierten Depression eingesetzt, um neurobiologische Veränderungen der Depression zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurden in verschiedenen Hirnregionen der OBX Maus die beiden Neurotrophine BDNF und NGF gemessen.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Operation wurden die Mäuse im *Open Field* am 14. Tag nach der Ektomie des Bulbus olfactorius unter heller Beleuchtung getestet. Alle OBX Mäuse zeigten eine lokomotorische Hyperaktivität, die typisch ist für eine Ektomie des Bulbus olfactorius in Mäusen (siehe 1.3.2.). Zwei Tage später wurden die Tiere dekapitiert. Bei der Messung der Neurotrophinkonzentrationen von BDNF und NGF im Hippocampus, Frontalcortex, Hypothalamus, Striatum und Parietalcortex zeigten sich erhöhte BDNF Konzentrationen in Hippocampus und Frontalcortex und eine gesteigerte NGF Konzentration im Hippocampus in den OBX Mäusen im Vergleich zu den Sham Mäusen.

Bei den Messungen der beiden Neurotrophine sind die absoluten Konzentrationen für BDNF stets größer gewesen als für NGF (siehe Tabelle 6 und Tabelle 8). Dies stimmt mit Untersuchungen anderer Gruppen überein [267].

In Studien anderer Untersucher lagen die BDNF Konzentrationen im Hippocampus von Kontrolltieren (Maus) zwischen 44pg/mg Feuchtgewicht [257] und 217pg/mg Feuchtgewicht [268]. In unseren Untersuchungen liegt die BDNF Konzentration im Hippocampus in den Sham Tieren bei einem Mittelwert von 35pg/mg Feuchtgewicht. Damit sind diese Ergebnisse vergleichbar mit der ersten zitierten Studie [257], die im gleichen Labor durchgeführt wurde. Der

höhere Wert für die BDNF Konzentration von Kolbeck [268] wurde mit einer Methode erhalten, die abweichend von unserer eine Ansäuerung der Proben verwendet. Durch die Ansäuerung wird eine Unterdrückung der BDNF bindenden Proteine erreicht.

Für NGF Konzentrationen im Hippocampus von Mäusen, die als Kontrolltiere dienten, wurden in der Literatur Werte zwischen 1,8pg/mg Feuchtgewicht [257] und 145pg/mg Protein [269] beobachtet. In unseren Experimenten liegt der Mittelwert bei 2,0pg/mg Feuchtgewicht. Damit sind diese Werte vergleichbar mit den Ergebnissen der zitierten Studie [257], die im gleichen Labor durchgeführt wurde. Der hohe Wert in [269] für die NGF Konzentrationen wurde mit einem Verfahren bestimmt, bei dem die Probenhomogenate angesäuert wurden.

In den letzten Jahren ist die Maus als Versuchstier in den Vordergrund gerückt, da verschiedene Methoden der Erzeugung transgener Tiere nur bei der Maus eingesetzt werden können. So ist das Modell der Ektomie des Bulbus olfactorius bei der Maus etabliert worden und von verschiedenen Arbeitsgruppen charakterisiert und mit der Anwendung der Ratten verglichen worden (Übersicht [270]).

Mäuse des Stammes C57Black/6N wurden in dieser Arbeit deshalb verwendet, weil sie schon in verschiedenen anderen Tiermodellen der Depression erprobt wurden und sich in Tests auf antidepressive Wirkungen als geeignet zeigten [271-274]. Bis jetzt sind im Tiermodell der Ektomie des Bulbus olfactorius nur Mäuse der Stämme DBA und C57Black/6N systematisch verglichen worden. Beim letzten Stamm ist dabei eine bessere prädiktive Validität festgestellt worden [275]. Nur die C57Black/6N bulbektomierten Mäuse zeigten gegenüber den DBA Stämmen eine Beeinträchtigung des aktiven und passiven Vermeidungsverhaltens. Der aussagefähigste Parameter, die Lokomotion, wurde auch in unseren Untersuchungen zur Prüfung des Operationserfolgs verwendet.

4.2. Auswirkungen einer Ektomie des Bulbus olfactorius auf die Konzentration von BDNF in verschiedenen Hirnregionen der Maus

Es wurde eine Arbeitshypothese entwickelt, die der Neurotrophin-Hypothese der Depression folgt. Die Arbeitshypothese für die Untersuchung der Neurotrophinkonzentration im Hirngewebe der OBX Maus war, dass die Konzentrationen von BDNF und NGF in verschiedenen Hirnregionen, vor allem aber in depressionsrelevanten Hirnregionen wie dem Hippocampus und dem Frontalcortex, reduziert sind. Die BDNF und die NGF Konzentrationen im Hippocampus und die BDNF Konzentration im Frontalcortex waren in den OBX Mäusen, die 16 Tage nach der Ektomie des Bulbus olfactorius dekapitiert wurden, signifikant erhöht im Vergleich zu den Sham

operierten Tieren. Die Ergebnisse unserer Untersuchung stehen im Gegensatz zu den postulierten erniedrigten BDNF Werten, die entsprechend der Neurotrophin-Hypothese der Depression erwartet wurden. Die Arbeitshypothese muss daher abgelehnt werden. Gründe für die Konzentrationsanstiege könnten sein, dass es zu einer vermehrten Produktion der Neurotrophine oder zu einem verminderten Abbau oder Abtransport der Proteine gekommen ist.

Entsprechend der Neurotrophin-Hypothese der Depression sind erniedrigte Werte für die Konzentration von BDNF und NGF erwartet worden, weil die OBX Maus als ein Modell der Depression angesehen wird. Die Depression ist mit einer Abnahme der Neuroplastizität und deshalb auch mit einer Abnahme der Neurogenese verbunden. Ob die verminderte Neurogenese ursächlich oder als Epiphänomen der Depression zu werten ist, wird derzeit diskutiert (Übersicht [83]). Durch bildgebende Verfahren konnte eine Verminderung des hippocampalen und corticalen Volumens in Patienten mit Depressionen beobachtet werden [60-62] (siehe 1.1.4.4.). Bestätigt wurden diese Beobachtungen durch *post mortem* Untersuchungen an Gehirnen von Patienten, die an einer Depression erkrankt waren [66, 67]. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass Depressive Episoden mit einer Beeinträchtigung der Neuroplastizität in verschiedenen Hirnregionen einhergehen. Dabei wird angenommen, dass auch die Neurogenese als ein Teil der strukturellen Plastizität vermindert ist. BDNF gilt als einer der wichtigsten Faktoren für die Modulation der Neuroplastizität und adulten Neurogenese [276]. Wenn es zu einem Mangel an neurotrophen Faktoren kommt, kann das eine Neurodegeneration zur Folge haben. So zeigen heterozygote BDNF knockout Mäuse eine reduzierte adulte hippocampale Neurogenese [111]. In Gehirnen von Menschen nach Suizid, die ante mortem an Depressionen litten und nicht therapiert wurden, waren im Hippocampus und Präfrontalcortex niedrigere BDNF Konzentrationen zu beobachten als in Patienten, die nicht durch Suizid starben und keine Depressionen hatten [133]. Für die Neurotrophin-Hypothese sprechen auch die Ergebnisse bei den Messungen der BDNF Konzentrationen in verschiedenen Tiermodellen der Depression (siehe 1.3.3.).

In einem transgenen Mausmodell der Depression mit genetisch veränderter Glucocorticoid-Rezeptor-Expression, bei dem depressionsähnliche Zustände durch Stress induziert wurden, konnte in den heterozygoten Mäusen (GR+/-) eine Abnahme der BDNF Konzentration im Hippocampus demonstriert werden [178]. Außerdem zeigten stressresistente Mäuse, die den Glucocorticoid-Rezeptor überexprimieren, erhöhte BDNF Konzentrationen im Hippocampus [178].

Es gibt jedoch auch gegenteilige Befunde. So wurden eine mit unseren Untersuchungen übereinstimmende Heraufregulation der BDNF Konzentration im Hippocampus im Tiermodell

der maternalen Separation in Ratten [174] beobachtet. Keine Veränderung in der Konzentration von BDNF im Hippocampus wurde in verschiedenen Tiermodellen (Flinders sensitive Ratten und *congenital learned helplessness* Ratten) der Depression gefunden (Übersicht [176, 256, 267]). Van Hooissen konnte in seiner Studie an OBX Ratten zwar keine signifikante Erhöhung von BDNF mRNA im Hippocampus nachweisen, aber ein Trend zur Erhöhung von BDNF mRNA deutet sich an [236]. Außerdem wurde beobachtet, dass die Induktion der erlernten Hilflosigkeit, die als ein Tiermodell der Depression eingesetzt wird, unabhängig von der Konzentration der Neurotrophine ist. Ratten, die BDNF bilateral in den Gyrus dentatus injiziert bekamen, wiesen trotzdem erlernte Hilflosigkeit auf [253].

Die Befunde in der Literatur, die nicht einheitlich dafür sprechen, dass in Tiermodellen der Depression eine Herabregulation der BDNF Konzentration erfolgt, werden durch unsere Untersuchungen dahingehend ergänzt, dass in Tiermodellen wahrscheinlich kein kausaler Zusammenhang zwischen depressionsähnlichem Verhalten und BDNF Konzentrationen im Gehirn existiert. Es gibt auch Untersuchungen, die zeigen, dass erhöhte BDNF Konzentrationen, wie sie von uns in den OBX Mäusen im Hippocampus und Frontalcortex gemessen wurden, mit depressionsähnlichem Verhalten in einen Zusammenhang gebracht werden können (siehe 1.3.3.). Mäuse, die in einem Nest aufgezogen wurden, das sich drei Mütter teilen, und die dadurch in einer stark sozial stimulierenden Umwelt aufwuchsen, weisen erhöhte BDNF Protein Konzentrationen im Hippocampus auf. Jedoch zeigen sie vermehrt depressives und ängstliches Verhalten in verschiedenen Tests [277].

Eisch und Mitarbeiter veränderten in ihren Untersuchungen den BDNF Gehalt in der mesolimbischen Leitungsbahn. Die Tiere, die eine Infusion von BDNF für 7 Tage bekamen, wiesen im *Forced Swim Test* eine reduzierte Latenzzeit bis zur Immobilität auf, d.h. sie gaben eher auf. Das wird als ein depressionsähnliches Verhalten gewertet [278]. Die Tiere, die durch ein virales Vektorplasmid einen verkürzten, funktionsunfähigen Trk B-Rezeptor exprimieren, der die Wirkung von BDNF verhindert, zeigten dahingegen eine bis zu fünffach höhere Latenzzeit bis zur Immobilität im *Forced Swim Test* als Tiere mit normaler Trk B-Rezeptor Expression [278].

Auch im Modell der sozialen Niederlage (*social defeat stress*) konnte ein entsprechender Befund erhoben werden. Mäuse wurden 10 Tage sozialem Stress im Rahmen des Modells der sozialen Niederlage ausgesetzt und zeigten eine Zunahme des depressionsähnlichen Verhaltens, das einher ging mit einem Anstieg der BDNF Konzentration im Nucleus accumbens 24 Stunden und 28 Tage nach letzter Stresseinwirkung [279]. Das depressionsähnliche Verhalten könnte nicht induziert werden, wenn die BDNF Expression im ventralen Tegmentum unterdrückt wurde

[279]. Die selektive Deletion des BDNF Gens im Gyrus dentatus, nicht jedoch der selektive Verlust von BDNF in der CA1 Region des Hippocampus, erhöhte die antidepressive Wirkung von Desipramin und Citalopram im *Forced Swim Test* in Mäusen [280].

Für die Entstehung der Depression wird die Beteiligung von chronischem Stress mit einer Dysfunktion der HHN-Achse und Hypercortisolämie diskutiert. Einige Autoren diskutieren eine Herabregulation der Neurotrophine, speziell von BDNF, durch die Hypercortisolämie und erklären damit die Verminderung der Neuroplastizität [281]. Glucocorticoide verhindern die durch BDNF vermittelte Reifung der synaptischen Verbindungen in hippocampalen Neuronen durch eine verminderte Aktivierung der MAPK Kaskade [282].

Niemand konnte bisher in mit Stress verbundenen Tiermodellen der Depression, wie zum Beispiel dem Modell des chronisch milden Stresses (*chronic mild stress modell*) oder dem Modell der erlernten Hilflosigkeit (*learned helplessness*) zeigen, dass die durch Stress induzierte Herabregulation von BDNF tatsächlich mit der Entstehung eines depressiven Phenotyps korreliert (Übersicht [253, 256, 283]). In dem Depressionsmodell der erlernten Hilflosigkeit haben Greenwood und Mitarbeiter [253] gezeigt, dass das Verhalten der erlernten Hilflosigkeit unabhängig von der BDNF Konzentration im Hippocampus ist: Die erlernte Hilflosigkeit kann ohne Erniedrigung der BDNF Konzentration im Hippocampus auftreten. Zusätzlich machten sie die Beobachtung, dass die erlernte Hilflosigkeit nicht vermieden werden kann, wenn die durch Stress induzierte BDNF Reduktion durch die einmalige Gabe von Fluoxetin verhindert wurde. Die Entstehung depressionsähnlichen Verhaltens ist in diesem Fall unabhängig von der Neurotrophinkonzentration. Dies könnte auch für das Modell der OBX Maus zutreffen. Das Auftreten des depressionsähnlichen Verhaltens könnte unabhängig von der BDNF Konzentration sein, und die Erhöhung der BDNF Konzentration müßte andersweitig begründet sein.

Mittlerweile gibt es vermehrt Zweifel, ob der reduzierte BDNF Gehalt in verschiedenen Hirngebieten als ein Zeichen für die Depression in Menschen und depressionsähnliches Verhalten in Tieren zu werten ist. *Knockout*-Mäuse für BDNF, die weniger als 60% BDNF bilden und Mäuse, bei denen durch viralen Gentransfer in der CA1 und im Gyrus dentatus des Hippocampus die Bildung von BDNF vollständig unterdrückt ist, zeigen kein depressionsähnliches Verhalten in unterschiedlichen Paradigmen [280, 284]. Bei diesen Tieren ist jedoch die hippocampale Cholinesteraseaktivität reduziert [284]. Depressionsähnliche oder mit Stress verbundene Zustände in Versuchstieren sind somit nicht zwingend mit einer Reduzierung der Konzentrationen an BDNF verbunden [176, 285].

In OBX Ratten wird eine erhöhte Corticosteronsekretion im Blut beschrieben [247]. Andere Autoren beobachten jedoch keine Beeinflussung von Corticosteron durch die OBX Operation

[250]. Eine Untersuchung der Corticosteronkonzentrationen in OBX Mäusen ist noch nicht durchgeführt worden. Würde man eine Desinhibition der HHN-Achse mit hohen Corticosteronwerten erwarten, kann diese höchstwahrscheinlich jedoch nicht für die von uns gemessenen Konzentrationsänderungen von BDNF in OBX Mäusen verantwortlich sein, da Hypercortisolämie als ein Grund für beobachtete reduzierte BDNF Konzentrationen angesehen (Übersicht [286]) wird.

In unseren Untersuchungen ist eine signifikant erhöhte BDNF Konzentration im Hippocampus und Frontalcortex gemessen worden. Damit ist es nicht zu der in der Arbeitshypothese formulierten Erniedrigung der BDNF Konzentration gekommen. Welche Gründe es für diese Erhöhung gibt, ist zu diskutieren.

Zum einen könnte der operative Eingriff ursächlich für die Änderung der BDNF Konzentration sein. Von anderen Autoren wurden die Konzentrationsänderungen von BDNF im Hippocampus von Ratten nur bis zu vier Tagen nach Setzen von Läsionen durch die Infusion von Kainsäure in den rechten lateralen Ventrikel [124] verfolgt. Es wurde wie in unserem Experiment eine Erhöhung der BDNF Konzentrationen im Hippocampus von Ratten mit Läsionen gefunden. Eine Beobachtung der Konzentrationen der Neurotrophine im Hippocampus bis zu 16 Tagen nach Setzen einer Läsion wurde noch nicht durchgeführt. Die Folgen der Durchtrennung des Bulbus olfactorius können zu einer unspezifischen Erhöhung von BDNF führen. Dafür sprechen Beobachtungen, wonach traumatische Verletzungen im ZNS zu Konzentrationserhöhungen von BDNF, NGF und anderen neurotrophen Faktoren führen [124]. Neurotrophine können nach Verletzungen neuroprotektive Effekte haben, und eine Kombinationsgabe von neurotrophen Faktoren nach Rückenmarksverletzungen begünstigt die Reparatur der Nervenfasern am Ort der Verletzung (in Übersicht [287, 288]).

Anzumerken ist, dass wir in unseren Experimenten nicht die Region der Bulbus olfactorius selbst untersucht haben. Es wurden Hirnregionen betrachtet, in die der Bulbus olfactorius projiziert. Eine Änderung der Neuroplastizität in den Projektionsregionen des Bulbus olfactorius könnte die erhöhten Neurotrophinkonzentrationen erklären.

Weiterhin muss die motorische Hyperaktivität, die sich nach der Bulbektomie entwickelt, als ein Grund für den Anstieg der BDNF Konzentration diskutiert werden. Verschiedene Studien konnten nach längerfristigem Laufradzugang der Tiere sowohl eine erhöhte BDNF mRNA als auch eine Erhöhung der BDNF Konzentration im Hippocampus messen [154, 289]. Neeper [290] konnte eine Erhöhung der mRNA von BDNF und NGF im Hippocampus von Ratten bereits nach zwei Nächten des freien Zugangs zum Laufrad zeigen. Van Praag beobachtete in Mäusen nach

mehreren Wochen der freien Benutzung des Laufrades ad libitum eine Zunahme der Neurogenese im Gyrus dentatus [291, 292].

Bis zum Zeitpunkt der Dekapitierung zwei Wochen postoperativ hat sich normalerweise neben der lokomotorischen Hyperaktivität im hellerleuchteten *Open Field* auch die nächtliche Hyperaktivität vollständig ausgebildet. Diese könnte für die erhöhte Neurogenese im Hippocampus verantwortlich sein und möglicherweise mit einer Konzentrationserhöhung von BDNF im Hippocampus verbunden sein. Die lokomotorische Hyperaktivität im hellerleuchteten *Open Field*, die nur für 10-15 Minuten geprüft wird, ist wahrscheinlich von zu kurzer Dauer, um für die erhöhte Konzentration von BDNF verantwortlich zu sein.

Unterstützendes Argument dafür ist der Sachverhalt, dass Sport einen antidepressiven Effekt in Patienten mit Depression hat, der vergleichbar mit konventionellen antidepressiven Therapien und Psychotherapie ist. In *Follow-Up* Studien konnte gezeigt werden, dass körperliches Training effektiver in der Verhinderung eines Rückfalls als eine antidepressive Medikation ist [293, 294]. Weiterhin wurde beobachtet, dass nach körperlicher Aktivität die Konzentration von BDNF im menschlichen Serum [295] erhöht ist.

Es ist jedoch auch gezeigt worden, dass die *knockout*-Maus ohne Trk B-Rezeptor, die als ein Tiermodell der Depression mit reduzierter BDNF Wirkung angesehen wird, ebenfalls motorische hyperaktiv ist [296]. Auch Menschen mit einem genetischen Defekt, der mit dem funktionellen Verlust einer Kopie des BDNF Gens verbunden ist, sind hyperaktiv (Übersicht [297]).

Wenn der BDNF Konzentrationsanstieg mit der Hyperaktivität im Zusammenhang steht, müsste BDNF zu verschiedenen Zeiten bestimmt werden, wie zum Beispiel sofort nach OBX und vor und nach Auftreten der Hyperaktivität. Damit könnte verfolgt werden, ob der BDNF Konzentrationsanstieg zeitgleich mit der Hyperaktivität auftritt. Außerdem müssten Konzentrationsmessungen der Neurotrophine mit einem größeren Abstand zur OBX Operation durchgeführt werden, um die unspezifische Erhöhung von BDNF durch die OBX Operation auszuschließen, die nach der Reparatur des verletzten Gewebes abklingen müsste. So könnte geprüft werden, ob die BDNF Konzentrationserhöhung ein Phänomen der Hirnverletzung ist oder wirklich spezifisch für dieses Modell ist.

Der Verlust des Geruchssinnes und die dadurch verbundene Neuorientierung müssen ebenfalls als ein Grund für die Erhöhung der BDNF Konzentration im Hippocampus und Frontalcortex diskutiert werden. Die OBX Tiere, die ihren Geruchssinn verloren haben, werden in ihrer Umgebung Schwierigkeiten haben, sich mit ihren noch erhaltenen Sinnen anfangs zu orientieren. Für Nagetiere ist der Geruchssinn einer der wichtigsten Sinne, er ist wesentlich wichtiger als bei uns Menschen. Die OBX Mäuse müssen erlernen, ihren verlorenen Geruchssinn zu

kompensieren. Dafür muss das Gehirn eine Lernleistung vor allem in den ersten Tagen und Wochen nach der OBX Operation erbringen. Für das Lernen und für das Gedächtnis ist der Hippocampus eine der wichtigsten Regionen, aber auch der Frontalcortex ist für die Herstellung einer Ordnung des Erlernten einzuschließen. Aufgrund einer bildgebenden Studie an Londoner Taxifahrern existiert die Idee, dass es eine Verbindung zwischen räumlichen Lernen und hippocampaler Neurogenese beim Menschen gibt (Übersicht [87]). Bei den Taxifahrern waren die räumlichen Herausforderungen, die die Fahrer zu meistern hatten, mit einer Zunahme des hippocampalen Volumens assoziiert. Außerdem gab es eine positive Korrelation zwischen der Zeit, die mit Taxifahren verbracht wurde und mit dem Volumen des Hippocampus [298]. Der kausale Zusammenhang zwischen Lernfähigkeiten und hippocampaler Neurogenese ist noch nicht bewiesen. Allerdings wurde bei Mäusen beobachtet, dass eine angereicherte Umgebung (enriched environment) zu erhöhter Neurogenese im Hippocampus und Überleben von neu generierten Zellen führt [299]. Verschiedene hippocampale Funktionen, wie das Lernen, sind wahrscheinlich an eine adulte Neurogenese gebunden [300]. Eine Idee ist es, dass Zellen im Hippocampus und Bulbus olfactorius nicht „auf Nachfrage“ gebildet werden, sondern dass unreife Nervenzellen kontinuierlich entstehen und bei Bedarf rekrutiert werden können. Die körperliche Bewegung spielt eine wichtige Rolle bei der Förderung der Neurogenese [87, 301]. Die synaptische Plastizität könnte notwendig sein, um diese unreifen Zellen in ein Netzwerk von Neuronen zu integrieren [87]. Dies könnte die Grundlage für die Verarbeitung von neuen Informationen und für Lern- und Gedächtnisprozesse sein. BDNF ist ein wichtiger Faktor der neuronalen Plastizität beim Lernen. Minichiello [302] beschreibt, dass die *Long-Term* Potenzierung auf Hirnschnittebene von BDNF abhängig ist.

Die höheren BDNF Konzentrationen im Hippocampus und Frontalcortex nach der OBX Operation könnten durch den Verlust des Geruchssinns und die dadurch notwendige Lernleistung, sich ohne den olfaktorischen Sinn in der Umwelt zu Recht zu finden, und die nächtliche Hyperaktivität bedingt sein.

4.3. Auswirkungen einer Ektomie des Bulbus olfactorius auf die Konzentration von NGF in verschiedenen Hirnregionen der Maus

Die Literaturbefunde zu NGF Konzentrationen und der Expression von mRNA für NGF im Hippocampus von Tiermodellen der Depression sind widersprüchlich. In einer Studie an Tupajas im Tiermodell des chronisch psychosozialen Stresses wurde eine erniedrigte mRNA Expression für NGF beobachtet [175]. Dies wurde ebenfalls im Tiermodell der bilateralen Ektomie des

Bulbus olfactorius bei der Ratte gefunden. Zwei andere Studien zeigten keine Veränderungen in den NGF Konzentrationen im Hippocampus. Auch bei Mäusen im Tiermodell der erlernten Hilflosigkeit und in einer Studie an Ratten zur maternalen Separation wurden keine Veränderungen beobachtet [251, 259].

Unsere Ergebnisse stimmen mit denen aus zwei anderen Studien überein. Ratten, die chronisch mildem Stress ausgesetzt waren, zeigten eine gesteigerte NGF Konzentration im Hippocampus [260]. In einer anderen Studie zur maternalen Separation bei der Ratte konnte ebenfalls eine erhöhte NGF Konzentration im Hippocampus gemessen werden [258, 303].

Es muss die Frage gestellt werden, wie es zu der erhöhten NGF Konzentration im Hippocampus nach Induktion des OBX Syndroms in den Mäusen kommen kann. Wie auch bei BDNF kann es zu einer Erhöhung der NGF Konzentration durch eine gesteigerte Synthese des Proteins oder durch eine Beeinträchtigung des Abtransportes und des Metabolismus der Proteine kommen. Die Konzentration an NGF mRNA muss dabei nicht der gebildeten Menge an NGF entsprechen. Dies könnte erklären, warum Song in seinen Untersuchungen erniedrigte NGF mRNA findet und wir in unseren Untersuchungen jedoch eine erhöhte Konzentration an Protein vorfinden.

Eine weitere Überlegung zur Interpretation unserer Befunde ist, dass es durch die neuronale Verletzung nach der Ektomie des Bulbus olfactorius zu einer Erhöhung der NGF Konzentration im Hippocampus gekommen sein könnte. Neuronale Verletzungen können zu Konzentrationsveränderungen von NGF auch in entfernt gelegenen unverletzten Hirnregionen führen. Sohrabji [304] zeigte, dass eine Läsion am Bulbus olfactorius mit NMDA in Ratten im Bulbus selbst eine Erhöhung der NGF Konzentration bewirkte. In einer Afferenz des diagonalen Band von Broca, dem Gyrus cingulus, wurde eine erhöhte Konzentration der beiden Proteine beobachtet. Im diagonalen Band von Broca, das eine Afferenz des Bulbus olfactorius ist, wurden dahingegen niedrigere BDNF und NGF Konzentrationen gemessen. Ebenfalls wurden die Neurotrophine im Hippocampus betrachtet. Nach der Läsion des Bulbus olfactorius durch NMDA ließen sich jedoch keine Veränderungen in den Konzentrationen von BDNF und NGF messen. Dennoch ist den Ergebnissen von Sohrabji zu entnehmen, dass Läsionen auch in entfernteren Gehirnstrukturen, die mit der geschädigten Region in Verbindung stehen, zu Konzentrationsveränderungen der Neurotrophine führen können.

NGF als neurotropher Wachstumsfaktor ist für die Differenzierung und das Überleben von Neuronen des peripheren Nervensystems und Teilen des ZNS, dort vor allem für die cholinergen Neurone (Übersicht [305]), während des gesamten Lebens zuständig. Zusätzlich ist NGF wie auch BDNF an der Neuroplastizität zentralnervöser Neurone des cholinergen basalen Vorderhirns beteiligt (Übersicht [115]). Im ZNS wird NGF hauptsächlich im Hippocampus,

Cortex und im Bulbus olfactorius gebildet. Retrograd wird NGF aus diesen Regionen zu den cholinergen Neuronen im basalen Vorderhirn (Septumregion und Nucleus basalis Meynert) transportiert (Übersicht [306]).

Veränderungen in der Konzentration von NGF treten nach Setzen von spezifischen Läsionen der cholinergen septohippocampalen Bahn auf. Ein Anstieg der NGF Konzentration könnte notwendig sein, damit die neuronale Funktion aufrechterhalten oder wiederhergestellt wird. Der NGF Anstieg kann aber auch durch den Verlust des retrograden Transportes durch Deafferation der Zielregionen entstehen [307]. Erhöhte NGF Konzentrationen wurden auch bei Beeinträchtigungen kognitiver Fähigkeiten gemessen. In *post mortem* Untersuchungen an Gehirnen von Alzheimerpatienten wurden erhöhte Konzentrationen im Frontal- und Temporalcortex gefunden. In einem präklinischen Zustand zum *Morbus Alzheimer* wurden jedoch erniedrigte NGF Konzentrationen im Frontalcortex gemessen [308].

Durch die vielen Verbindungen zwischen dem Bulbus olfactorius und dem Hippocampus könnte an eine „rettende“ Erhöhung des NGF Proteins im entfernten Hippocampus gedacht werden. Die Höhe der NGF Konzentration ist dabei vom Ausmaß der Schädigung und von der Menge der noch existierenden Neurone, die eine neurotrophe Unterstützung benötigen, abhängig [307]. An Kindern wurde nach Schädel-Hirn-Traumen ebenfalls eine positive Korrelation von Höhe der NGF Konzentration und Schwere des Traumas zwei Stunden nach dem Trauma sowie dem *outcome* bei Messung der NGF Konzentration im Liquor 48 Stunden nach dem Trauma beobachtet [309]. Eine Abhängigkeit der Neurotrophinkonzentration vom Zeitpunkt der Dekapitierung nach OBX Operation könnte erklären, warum die Konzentration der mRNA von NGF in den OBX Ratten von Song erniedrigt war. Die Tiere in den Untersuchungen von Song wurden vier Wochen nach der Bulbektomie dekapitiert. Nach dieser Zeit könnte die akute Reparaturphase abgeklungen sein.

NGF scheint außerdem die BDNF Konzentration zu beeinflussen. Eine Infusion von NGF intrathekal führt zu einer Heraufregulation von BDNF in dorsalen Wurzelganglien nach Durchtrennung des Nervus ischiadicus in Ratten [310]. Eine synergistische Erhöhung von NGF und BDNF im Hippocampus nach Läsion des Vorderhirns mit Kainsäure ist auch von Shetty beobachtet worden [124]. Die Tiere wurden jedoch bereits vier Tage nach Kainsäureinfusion getötet, so dass es keinen Überblick über das Verhalten von NGF über einen mit unseren Untersuchungen vergleichbaren Zeitraum von mindestens 16 Tagen gibt. Auch in unseren OBX Mäusen finden wir eine synergistische Erhöhung für BDNF und NGF im Hippocampus, jedoch nicht im Frontalcortex.

Durch einen gestörten retrograden Transport von NGF kann es in verschiedenen Hirnregionen zu einem Anstieg an NGF kommen. Der Hippocampus ist ein Ort, an dem NGF in größeren Mengen produziert wird (Übersicht [311]). Danach wird das Protein retrograd in den cholinergen Neuronen vom Ort der Produktion weg transportiert. Die cholinergen Neurone des basalen Vorderhirns projizieren zum Hippocampus, zum cerebralen Cortex und zum Bulbus olfactorius [304] (siehe Abbildung 4). NGF wird retrograd zum basalen Vorderhirn transportiert. Wird dort eine Verbindung unterbrochen, kann NGF nicht mehr abtransportiert werden und häuft sich in der Zielregion der cholinergen Neurone an. Eine dieser Zielregionen ist der Hippocampus.

Weiterhin muss diskutiert werden, ob eine Dysregulation der HHN-Achse durch Stress zu einer Erhöhung der NGF Konzentrationen im Hippocampus führen kann. Die Dysregulation der HHN-Achse und die damit verbundene Erhöhung der Stresshormone werden als ein Faktor für die Genese einer Depression diskutiert (siehe 1.1.4.3.). Im OBX Modell der Depression konnten eine Dysregulation der HHN-Achse und eine Hypercortisolämie beschrieben werden [247], (Übersicht [213]). Auch die Untersuchung der Sekretion von Glucocorticoiden an OBX Tieren ergibt jedoch widersprüchliche Ergebnisse [250], (Übersicht [213]). An Mäusen nach Ektomie des Bulbus olfactorius ist die HHN-Achse noch nicht charakterisiert worden.

Nach postnataler Steriodeinwirkung wurden erhöhte NGF Konzentrationen im Hippocampus von Rattenbabies beobachtet [312]. Bei Pflegekräften, die auf Grund ihrer Tätigkeit chronischem Stress ausgesetzt waren und an Depressionen litten, wurden ebenfalls erhöhte NGF Konzentrationen im Blut gemessen [127].

Erzwungene motorische Aktivität ist auch eine Form von Stress. In Ratten, die akut der erzwungenen motorischen Aktivität ausgesetzt waren, wurde ein reduzierter NGF Gehalt im Frontalcortex und im Hippocampus gemessen [313]. Eine Differenzierung von erhöhter Lokomotion und erhöhter Stresseinwirkung ist mit diesem Versuchsansatz nicht möglich.

Wie bei BDNF muss auch für NGF diskutiert werden, ob eine erhöhte lokomotorische Aktivität zu einer Erhöhung der NGF Konzentrationen führen kann. Physische Aktivität bei freiem Zugang zum Laufrad erhöht in Rattenhirnen die Expression der mRNA von NGF vor allem in Hippocampus und Cortex [290]. Zusätzlich konnten eine gesteigerte Neurogenese und –plastizität im Gyrus dentatus des Hippocampus von Mäusen nach erhöhter physischer Aktivität beobachtet werden [291]. 14 Tage nach der Ektomie des Bulbus olfactorius zeigen die Tiere normalerweise neben einer erhöhten Lokomotion im hell erleuchteten *Open Field Test* auch die erhöhte nächtliche Aktivität (siehe 1.3.2 und [217]). Diese gesteigerte Aktivität könnte zur Folge haben, dass neben BDNF auch die NGF Konzentration im Hippocampus erhöht ist. Dies könnte unsere Beobachtungen erklären.

Pham und Söderström [260] konnten in ihren Ratten, die einem chronisch milden Stress ausgesetzt waren, neben einer erhöhten NGF Produktion im Hippocampus auch eine Verbesserung des räumlichen Lernens beobachten. Wenn die Verbesserung des räumlichen Lernens mit einer erhöhten NGF Konzentrationen im Gehirn verbunden ist, könnten die erhöhten NGF Konzentrationen im Hippocampus der OBX Mäuse auf eine kompensatorische Leistung des Gehirnes nach Eintreten der Anosmie zurückgeführt werden. Sie müssen wieder erlernen, sich ohne die Hilfe des olfaktorischen Systems durch den Raum zu bewegen.

Mit der Zeit sind in der Depressionsforschung unterschiedliche Tiermodelle etabliert worden, die versuchen einzelne Aspekte der Depression abzubilden. Die Ektomie des Bulbus olfactorius in Nagetieren wird als ein Modell für die chronisch psychomotorisch agitierte Depression eingesetzt. Mit dem Konzept der Endophenotypen der Depression, das sowohl in der Psychiatrie als auch bei den Tiermodellen der Depression Anwendung findet, wird versucht, biologische und klinische Untergruppen der Depression zu definieren. Damit könnte es einfacher werden die zugrundeliegende Pathophysiologie der Depression und somit auch spezifisch Behandlungsstrategien aufzudecken.

In Bezug auf BDNF und die Tiermodelle der Depression kann dies bedeuten, dass BDNF in einigen Modellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Depression spielt und in anderen Tiermodellen, wie zum Beispiel dem Tiermodell der OBX Maus, weniger bedeutend ist.

5. Zusammenfassung

Die bilaterale Ektomie des Bulbus Olfactorius bei Ratten und Mäusen ist ein anerkanntes Tiermodell der Depression, das aufgrund seiner prädiktiven Validität zur Prüfung der Wirksamkeit und der Entwicklung von neuen Antidepressiva eingesetzt wird. Nach einer Bulbektomie zeigen die Tiere ein bestimmtes Muster an Änderungen im Verhalten und von neurochemischen, neuroendokrinen und neuroimmunologischen Parametern. Leitparameter für die Verhaltensänderungen beim Tier ist die lokomotorische Hyperaktivität in hellerleuchteter Umgebung.

Die sogenannte Neurotrophin-Hypothese der Depression postuliert, dass die Signalkaskade der neurotrophen Faktoren gestört ist. Insbesondere dem *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) wird dieser Hypothese folgend eine grosse Bedeutung beigemessen. Von BDNF ist bekannt, dass es weit verteilt im Gehirn vorkommt und für die Differenzierung und das Überleben von Neuronen von Bedeutung ist. Verschiedene Befunde weisen darauf hin, dass die

Depressive Episode von einer Herabregulierung des BDNF Signalsystems und Störungen in der Neuroplastizität bis hin zu einer objektivierbaren Volumenreduktionen des Hippocampus begleitet ist. Der Zusammenhang zwischen Depression und dem Neurotrophinsignalsystem ist versucht worden, tierexperimentell zu prüfen. Die Ergebnisse bisheriger Untersuchungen sind widersprüchlich und erlauben es nicht, Rückschlüsse zu ziehen.

Aufgabe dieser Arbeit war es, erstmalig im Depressionsmodell der Ektomie des Bulbus olfactorius bei Mäusen die Konzentrationen der Neurotrophine BDNF und NGF im Gehirn zu untersuchen. Der Erfolg der Läsion ist durch die Untersuchung der Lokomotion geprüft worden. In fünf Hirnregionen, die für eine Depression als relevant angesehen werden, Hippocampus, Frontalcortex, Hypothalamus, Striatum und Parietalcortex, wurden in bulbektomierten und in scheinoperierten Mäusen die Konzentrationen an BDNF und NGF bestimmt. Dazu wurde ein hochsensitiver fluorometrischer, zweiseitiger *Enzyme-linked-Immunosorbent Assay* (ELISA) eingesetzt. In den Gehirnen der bulbektomierten Mäuse waren im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren 16 Tage nach der Operation die Konzentration an BDNF im Hippocampus und Frontalcortex und die Konzentration an NGF im Hippocampus erhöht. Das Ergebnis der tierexperimentellen Untersuchung liefert keine Bestätigung für die Neurotrophin-Hypothese. Gründe für den Anstieg der Neurotrophinkonzentrationen können zelluläre Reparaturvorgänge nach der Läsion, die nächtliche Hyperaktivität der bulbektomierten Tiere, der verminderte Abbau und Abtransport der Neurotrophine und der Verlust des Geruchssinnes, der eine Lernleistung zur Neuorientierung erfordert, sein.

Die Maus mit ektomiertem Bulbus olfactorius gilt als ein Modell für die chronisch psychomotorisch agitierte Depression. Im Hinblick auf das Konzept der unterschiedlichen Endophänotypen der Depression spielt BDNF in diesem Tiermodell der Depression keine entscheidene Rolle bei der Pathogenese der Depression.

Abstract

The bilateral ectomy of the olfactory bulb in rats and mice is an accepted animal model of depression. Because of its good predictive validity it is used to develop new antidepressants and to prove their effectiveness. After the olfactory bulbectomy, the animals show a certain pattern of changes in behaviour and in neurochemical, neuroendocrinological and neuroimmunological parameters. The leading parameter for the changes of behaviour in these animals is the locomotoric hyperactivity in the brightly illuminated open field test.

The neurotrophin hypothesis of depression postulates that the signal cascade of neurotrophic factors is disturbed. Particularly BDNF is given a prominent role in the following. It is known

that BDNF appears broadly distributed in the brain and that it is of importance for the differentiation and survival of neurons. Several studies show that the Depressive Episode is accompanied by a down regulation of the BDNF levels, by disturbances in the plasticity and by reductions in the hippocampus volume.

Animal experiments have been used to attempt to prove the connection between depression and the neurotrophin signal cascade. The results of previous investigations are conflicting and do not allow any certain conclusions to be drawn. The purpose of this work has been to analyse the concentrations of the neurotrophins BDNF and NGF in the brains of olfactory bulbectomized mice used as an animal model of depression for the first time. The success of the bulbectomy is verified by the examination of the locomotion. In five different brain regions that are seen as relevant for depression - hippocampus, frontal cortex, hypothalamus, striatum and parietal cortex - we investigated the levels of the two neurotrophins - BDNF and NGF - in mice with bilateral ectomy of the olfactory bulb and in control animals. For the determination of the protein concentrations we used a highly sensitive two site ELISA. 16 days after the olfactory bulbectomy, we measured higher BDNF levels in the hippocampus and frontal cortex and higher NGF levels in the hippocampus in bulbectomized mice compared to sham mice. Thereby, the BDNF concentrations were augmented in two of the brain regions in the bulbectomized mice, in contrast to the initial assumption. The results in this animal experiment do not give any support for the neurotrophin hypothesis. Reasons for this increase in neurotrophin levels could be, among other things, reparation processes after lesions, hyperactivity during night, reduced breakdown and transport of the protein or the loss of the smelling sense and the associated learning process to reorientate itself.

The olfactory bulbectomy in mice has been proposed as an animal model of chronic psychomotoric agitated depression. With respect to the endophenotype concept of depression BDNF does not play a significant role in the pathophysiology of depression in this animal model of depression.

6. Literaturverzeichnis

1. Weber A, Hörmann G, Köllner V. Die Epidemie des 21. Jahrhunderts? Deutsches Ärzteblatt, 2006. 103(13): 712 -15.
2. <http://www.who.int/classifications/apps/icd/icd10online/>.
3. <http://www.behavenet.com/capsules/disorders/dsm4TRclassification.htm>. 2008.
4. <http://www.dimdi.de/static/de/klassi/diagnosen/icd10/htmlgm2008/fr-icd.htm>.
5. Möller H-J, Laux G, Deister A, Psychiatrie und Psychotherapie. 2nd ed. Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag, 2001.
6. Jacobi F, Klose M, Wittchen HU. Psychische Störungen in der deutschen Allgemeinbevölkerung: Inanspruchnahme von Gesundheitsleistungen und Ausfalltage. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2004. 47(8): 736-44.
7. Wittchen HU, Pittrow D. Prevalence, recognition and management of depression in primary care in Germany: The Depression 2000 study. Hum Psychopharmacol, 2002. 17 Suppl 1: 1-11.
8. Fryers T, Brugha T, Morgan Z, et al. Prevalence of psychiatric disorder in Europe: the potential and reality of meta-analysis. Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol, 2004. 39(11): 899-905.
9. Noble RE. Depression in women. Metabolism, 2005. 54(5 Suppl 1): 49-52.
10. Ustun TB, Ayuso-Mateos JL, Chatterji S, Mathers C, Murray CJ. Global burden of depressive disorders in the year 2000. Br J Psychiatry, 2004. 184: 386-92.
11. Spijker J, de Graaf R, Bijl RV, et al. Duration of major depressive episodes in the general population: results from The Netherlands Mental Health Survey and Incidence Study (NEMESIS). Br J Psychiatry, 2002. 181: 208-13.
12. Ustun TB, Kessler RC. Global burden of depressive disorders: the issue of duration. Br J Psychiatry, 2002. 181: 181-3.
13. Keller MB, Lavori PW, Mueller TI, et al. Time to recovery, chronicity, and levels of psychopathology in major depression. A 5-year prospective follow-up of 431 subjects. Arch Gen Psychiatry, 1992. 49(10): 809-16.
14. Kampf-Sherf O, Zlotogorski Z, Gilboa A, et al. Neuropsychological functioning in major depression and responsiveness to selective serotonin reuptake inhibitors antidepressants. J Affect Disord, 2004. 82(3): 453-9.
15. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer H, Schäfer-Korting M, Mutschler Arzneimittelwirkungen. 8th ed. Stuttgart, Deutschland: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2001.
16. Pacher P, Kecskemeti V. Trends in the development of new antidepressants. Is there a light at the end of the tunnel? Curr Med Chem, 2004. 11(7): 925-43.
17. Wong ML, Licinio J. Research and treatment approaches to depression. Nat Rev Neurosci, 2001. 2(5): 343-51.
18. Weissman MM, Gershon ES, Kidd KK, et al. Psychiatric disorders in the relatives of probands with affective disorders. The Yale University--National Institute of Mental Health Collaborative Study. Arch Gen Psychiatry, 1984. 41(1): 13-21.
19. Sullivan PF, Neale MC, Kendler KS. Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. Am J Psychiatry, 2000. 157(10): 1552-62.
20. Binder EB, Holsboer F. Pharmacogenomics and antidepressant drugs. Ann Med, 2006. 38(2): 82-94.
21. Pezawas L, Meyer-Lindenberg A, Drabant EM, et al. 5-HTTLPR polymorphism impacts human cingulate-amygdala interactions: a genetic susceptibility mechanism for depression. Nat Neurosci, 2005. 8(6): 828-34.

22. Lang UE, Hellweg R, Kalus P, et al. Association of a functional BDNF polymorphism and anxiety-related personality traits. *Psychopharmacology (Berl)*, 2005. 180(1): 95-9.
23. Lurie SJ, Gawinski B, Pierce D, Rousseau SJ. Seasonal affective disorder. *Am Fam Physician*, 2006. 74(9): 1521-4.
24. Brasic JR. Monitoring people treated with isotretinoin for depression. *Psychol Rep*, 2007. 100(3 Pt 2): 1312-4.
25. Patten SB, Love EJ. Drug-induced depression. Incidence, avoidance and management. *Drug Saf*, 1994. 10(3): 203-19.
26. McDonald WM, Richard IH, DeLong MR. Prevalence, etiology, and treatment of depression in Parkinson's disease. *Biol Psychiatry*, 2003. 54(3): 363-75.
27. Potter GG, Steffens DC. Contribution of depression to cognitive impairment and dementia in older adults. *Neurologist*, 2007. 13(3): 105-17.
28. Schüle C, BTC, Rupprecht R. Neure Erkenntnisse zur Pathogenese und Pythophysiologie der Depression. *Der Nervenarzt*, 2007: 1-18.
29. Wilhelm K, Siegel JE, Finch AW, et al. The long and the short of it: associations between 5-HTT genotypes and coping with stress. *Psychosom Med*, 2007. 69(7): 614-20.
30. Asberg M, Traskman L, Thoren P. 5-HIAA in the cerebrospinal fluid. A biochemical suicide predictor? *Arch Gen Psychiatry*, 1976. 33(10): 1193-7.
31. Owens MJ, Nemeroff CB. Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter. *Clin Chem*, 1994. 40(2): 288-95.
32. Asberg M, Thoren P, Traskman L, Bertilsson L, Ringberger V. "Serotonin depression"--a biochemical subgroup within the affective disorders? *Science*, 1976. 191(4226): 478-80.
33. Garlow SJ, Musselman DL, Nemeroff CB, The Neurochemistry of mood disorders: Clinical Studies. In: D.S. Charney, E.J. Nestler, and B.S. Bunney, eds. *Neurobiology of mental illness*. Oxford, England: Oxford University Press, 1999: 348-364.
34. Cuijpers P. Depressive disorders in caregivers of dementia patients: a systematic review. *Aging Ment Health*, 2005. 9(4): 325-30.
35. Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)*, 1997. 134(4): 319-29.
36. Henn FA, Vollmayr B. Stress models of depression: forming genetically vulnerable strains. *Neurosci Biobehav Rev*, 2005. 29(4-5): 799-804.
37. Seligman ME. Learned helplessness as a model of depression. Comment and integration. *J Abnorm Psychol*, 1978. 87(1): 165-79.
38. Klemm L, Rolle, Paschke. Chronische Depression und Diabetes mellitus. *Ärzteblatt Sachsen*, 2002. 9.
39. Weitzner MA. Neuropsychiatry and pituitary disease: an overview. *Psychother Psychosom*, 1998. 67(3): 125-32.
40. Poland RE, Rubin RT, Lesser IM, Lane LA, Hart PJ. Neuroendocrine aspects of primary endogenous depression. II. Serum dexamethasone concentrations and hypothalamic-pituitary-adrenal cortical activity as determinants of the dexamethasone suppression test response. *Arch Gen Psychiatry*, 1987. 44(9): 790-5.
41. Rubin RT, Poland RE, Lesser IM, Martin DJ. Neuroendocrine aspects of primary endogenous depression--IV. Pituitary-thyroid axis activity in patients and matched control subjects. *Psychoneuroendocrinology*, 1987. 12(5): 333-47.
42. Rubin RT, Poland RE, Lesser IM, et al. Neuroendocrine aspects of primary endogenous depression. III. Cortisol secretion in relation to diagnosis and symptom patterns. *Psychol Med*, 1987. 17(3): 609-19.
43. Rubin RT, Poland RE, Lesser IM, Winston RA, Blodgett AL. Neuroendocrine aspects of primary endogenous depression. I. Cortisol secretory dynamics in patients and matched controls. *Arch Gen Psychiatry*, 1987. 44(4): 328-36.

44. Nemeroff CB, Widerlov E, Bissette G, et al. Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science*, 1984. 226(4680): 1342-4.
45. Raadsheer FC, Hoogendijk WJ, Stam FC, Tilders FJ, Swaab DF. Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. *Neuroendocrinology*, 1994. 60(4): 436-44.
46. Nemeroff CB, Owens MJ, Bissette G, Andorn AC, Stanley M. Reduced corticotropin releasing factor binding sites in the frontal cortex of suicide victims. *Arch Gen Psychiatry*, 1988. 45(6): 577-9.
47. Bridges PK, Jones MT. The diurnal rhythm of plasma cortisol concentration in depression. *Br J Psychiatry*, 1966. 112(493): 1257-61.
48. Heuser I, Yassouridis A, Holsboer F. The combined dexamethasone/CRH test: a refined laboratory test for psychiatric disorders. *J Psychiatr Res*, 1994. 28(4): 341-56.
49. Modell S, Yassouridis A, Huber J, Holsboer F. Corticosteroid receptor function is decreased in depressed patients. *Neuroendocrinology*, 1997. 65(3): 216-22.
50. Holsboer F, Gerken A, Stalla GK, Muller OA. Blunted aldosterone and ACTH release after human CRH administration in depressed patients. *Am J Psychiatry*, 1987. 144(2): 229-31.
51. Holsboer F, von Bardeleben U, Wiedemann K, Muller OA, Stalla GK. Serial assessment of corticotropin-releasing hormone response after dexamethasone in depression. Implications for pathophysiology of DST nonsuppression. *Biol Psychiatry*, 1987. 22(2): 228-34.
52. De Bellis MD, Gold PW, Geraciotti TD, Jr., Listwak SJ, Kling MA. Association of fluoxetine treatment with reductions in CSF concentrations of corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin in patients with major depression. *Am J Psychiatry*, 1993. 150(4): 656-7.
53. Holsboer F, Liebl R, Hofschuster E. Repeated dexamethasone suppression test during depressive illness. Normalisation of test result compared with clinical improvement. *J Affect Disord*, 1982. 4(2): 93-101.
54. Magarinos AM, McEwen BS. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. *Neuroscience*, 1995. 69(1): 83-8.
55. Murray F, Smith DW, Hutson PH. Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice. *Eur J Pharmacol*, 2008. 583(1): 115-27.
56. Watanabe Y, Gould E, McEwen BS. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res*, 1992. 588(2): 341-5.
57. Pinnock SB, Herbert J. Brain-derived neurotrophic factor and neurogenesis in the adult rat dentate gyrus: interactions with corticosterone. *Eur J Neurosci*, 2008. 27(10): 2493-500.
58. Starkman MN, Giordani B, Gebarski SS, et al. Decrease in cortisol reverses human hippocampal atrophy following treatment of Cushing's disease. *Biol Psychiatry*, 1999. 46(12): 1595-602.
59. Patil CG, Lad SP, Katznelson L, Laws ER, Jr. Brain atrophy and cognitive deficits in Cushing's disease. *Neurosurg Focus*, 2007. 23(3): E11.
60. Sheline YI. Hippocampal atrophy in major depression: a result of depression-induced neurotoxicity? *Mol Psychiatry*, 1996. 1(4): 298-9.
61. Sheline YI, Wang PW, Gado MH, Csernansky JG, Vannier MW. Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(9): 3908-13.
62. Duman RS, Charney DS. Cell atrophy and loss in major depression. *Biol Psychiatry*, 1999. 45(9): 1083-4.

63. Sheline YI, Sanghavi M, Mintun MA, Gado MH. Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression. *J Neurosci*, 1999. 19(12): 5034-43.
64. Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, et al. Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry*, 2000. 157(1): 115-8.
65. Sheline YI, Gado MH, Kraemer HC. Untreated depression and hippocampal volume loss. *Am J Psychiatry*, 2003. 160(8): 1516-8.
66. Rajkowska G. Postmortem studies in mood disorders indicate altered numbers of neurons and glial cells. *Biol Psychiatry*, 2000. 48(8): 766-77.
67. Cotter D, Mackay D, Landau S, Kerwin R, Everall I. Reduced glial cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 2001. 58(6): 545-53.
68. Smith ME. Bilateral hippocampal volume reduction in adults with post-traumatic stress disorder: a meta-analysis of structural MRI studies. *Hippocampus*, 2005. 15(6): 798-807.
69. Detoledo-Morrell L, Stoub TR, Wang C. Hippocampal atrophy and disconnection in incipient and mild Alzheimer's disease. *Prog Brain Res*, 2007. 163: 741-823.
70. Horinek D, Varjassyova A, Hort J. Magnetic resonance analysis of amygdalar volume in Alzheimer's disease. *Curr Opin Psychiatry*, 2007. 20(3): 273-7.
71. Nagano-Saito A, Washimi Y, Arahata Y, et al. Cerebral atrophy and its relation to cognitive impairment in Parkinson disease. *Neurology*, 2005. 64(2): 224-9.
72. Donohue HS, Gabbott PL, Davies HA, et al. Chronic restraint stress induces changes in synapse morphology in stratum lacunosum-moleculare CA1 rat hippocampus: a stereological and three-dimensional ultrastructural study. *Neuroscience*, 2006. 140(2): 597-606.
73. Warner-Schmidt JL, Duman RS. Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus*, 2006. 16(3): 239-49.
74. Stockmeier CA, Mahajan GJ, Konick LC, et al. Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression. *Biol Psychiatry*, 2004. 56(9): 640-50.
75. Magarinos AM, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E. Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *J Neurosci*, 1996. 16(10): 3534-40.
76. Sapolsky RM, Uno H, Rebert CS, Finch CE. Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. *J Neurosci*, 1990. 10(9): 2897-902.
77. Czeh B, Simon M, Schmelting B, Hiemke C, Fuchs E. Astroglial plasticity in the hippocampus is affected by chronic psychosocial stress and concomitant fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology*, 2006. 31(8): 1616-26.
78. Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ. Gliogenesis and glial pathology in depression. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2007. 6(3): 219-33.
79. Lucassen PJ, Heine VM, Muller MB, et al. Stress, depression and hippocampal apoptosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2006. 5(5): 531-46.
80. Lucassen PJ, Vollmann-Honsdorf GK, Gleisberg M, et al. Chronic psychosocial stress differentially affects apoptosis in hippocampal subregions and cortex of the adult tree shrew. *Eur J Neurosci*, 2001. 14(1): 161-6.
81. Lucassen PJ, Muller MB, Holsboer F, et al. Hippocampal apoptosis in major depression is a minor event and absent from subareas at risk for glucocorticoid overexposure. *Am J Pathol*, 2001. 158(2): 453-68.
82. Muller MB, Lucassen PJ, Yassouridis A, et al. Neither major depression nor glucocorticoid treatment affects the cellular integrity of the human hippocampus. *Eur J Neurosci*, 2001. 14(10): 1603-12.

83. Henn FA, Vollmayr B. Neurogenesis and depression: etiology or epiphenomenon? *Biol Psychiatry*, 2004. 56(3): 146-50.
84. Czeh B, Lucassen PJ. What causes the hippocampal volume decrease in depression? : Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2007. 257(5): 250-60.
85. Sapolsky RM. Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. *Exp Gerontol*, 1999. 34(6): 721-32.
86. Jacobs BL, Praag H, Gage FH. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol Psychiatry*, 2000. 5(3): 262-9.
87. Kempermann, Adult Neurogenesis- Stem Cells and Neuronal Development in the Adult Brain. Oxford University Press, 2006.
88. Duman RS. Depression: a case of neuronal life and death? *Biol Psychiatry*, 2004. 56(3): 140-5.
89. D'Sa C, Duman RS. Antidepressants and neuroplasticity. *Bipolar Disord*, 2002. 4(3): 183-94.
90. Santarelli L, Saxe M, Gross C, et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*, 2003. 301(5634): 805-9.
91. Czeh B, Welt T, Fischer AK, et al. Chronic psychosocial stress and concomitant repetitive transcranial magnetic stimulation: effects on stress hormone levels and adult hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry*, 2002. 52(11): 1057-65.
92. Hamburger V. The history of the discovery of the nerve growth factor. *J Neurobiol*, 1993. 24(7): 893-7.
93. Altar CA, Cai N, Bliven T, et al. Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature*, 1997. 389(6653): 856-60.
94. Altar CA, DiStefano PS. Neurotrophin trafficking by anterograde transport. *Trends Neurosci*, 1998. 21(10): 433-7.
95. Wright EM, Vogel KS, Davies AM. Neurotrophic factors promote the maturation of developing sensory neurons before they become dependent on these factors for survival. *Neuron*, 1992. 9(1): 139-50.
96. Thoenen H. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science*, 1995. 270(5236): 593-8.
97. Castren E, Berninger B, Leingartner A, Lindholm D. Regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA levels in hippocampus by neuronal activity. *Prog Brain Res*, 1998. 117: 57-64.
98. Lindholm D, Castren E, Berzaghi M, Blochl A, Thoenen H. Activity-dependent and hormonal regulation of neurotrophin mRNA levels in the brain--implications for neuronal plasticity. *J Neurobiol*, 1994. 25(11): 1362-72.
99. Barbacid M. The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol*, 1994. 25(11): 1386-403.
100. Klein R, Nanduri V, Jing SA, et al. The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell*, 1991. 66(2): 395-403.
101. Lamballe F, Klein R, Barbacid M. trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell*, 1991. 66(5): 967-79.
102. Segal RA, Greenberg ME. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci*, 1996. 19: 463-89.
103. Riccio A, Ahn S, Davenport CM, Blendy JA, Ginty DD. Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science*, 1999. 286(5448): 2358-61.
104. Bonni A, Brunet A, West AE, et al. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science*, 1999. 286(5443): 1358-62.

105. www.neuro.wustl.edu/NEUROMUSCULAR/lab/trophic.htm.
106. Teng HK, Teng KK, Lee R, et al. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci*, 2005. 25(22): 5455-63.
107. Maisonpierre PC, Belluscio L, Friedman B, et al. NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron*, 1990. 5(4): 501-9.
108. Farmer J, Zhao X, van Praag H, et al. Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo. *Neuroscience*, 2004. 124(1): 71-9.
109. Fahnstock M, Garzon D, Holsinger RM, Michalski B. Neurotrophic factors and Alzheimer's disease: are we focusing on the wrong molecule? *J Neural Transm Suppl*, 2002(62): 241-52.
110. Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci*, 2001. 21(17): 6706-17.
111. Lee J, Duan W, Mattson MP. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem*, 2002. 82(6): 1367-75.
112. Benraiss A, Chmielnicki E, Lerner K, Roh D, Goldman SA. Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *J Neurosci*, 2001. 21(17): 6718-31.
113. Larsson E, Mandel RJ, Klein RL, et al. Suppression of insult-induced neurogenesis in adult rat brain by brain-derived neurotrophic factor. *Exp Neurol*, 2002. 177(1): 1-8.
114. Liu QR, Lu L, Zhu XG, et al. Rodent BDNF genes, novel promoters, novel splice variants, and regulation by cocaine. *Brain Res*, 2006. 1067(1): 1-12.
115. Hellweg R, von Richthofen S, Anders D, et al. The time course of nerve growth factor content in different neuropsychiatric diseases--a unifying hypothesis. *J Neural Transm*, 1998. 105(8-9): 871-903.
116. Hartikka J, Hefti F. Comparison of nerve growth factor's effects on development of septum, striatum, and nucleus basalis cholinergic neurons in vitro. *J Neurosci Res*, 1988. 21(2-4): 352-64.
117. Garofalo L, Ribeiro-da-Silva A, Cuello AC. Nerve growth factor-induced synaptogenesis and hypertrophy of cortical cholinergic terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89(7): 2639-43.
118. Ruit KG, Osborne PA, Schmidt RE, Johnson EM, Jr., Snider WD. Nerve growth factor regulates sympathetic ganglion cell morphology and survival in the adult mouse. *J Neurosci*, 1990. 10(7): 2412-9.
119. Pham TM, Winblad B, Granholm AC, Mohammed AH. Environmental influences on brain neurotrophins in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 2002. 73(1): 167-75.
120. Frielingsdorf H, Simpson DR, Thal LJ, Pizzo DP. Nerve growth factor promotes survival of new neurons in the adult hippocampus. *Neurobiol Dis*, 2007. 26(1): 47-55.
121. Hefti F. Nerve growth factor promotes survival of septal cholinergic neurons after fimbrial transections. *J Neurosci*, 1986. 6(8): 2155-62.
122. Fischer W, Wictorin K, Bjorklund A, et al. Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor. *Nature*, 1987. 329(6134): 65-8.
123. Yasuno H, Fukazawa K, Fukuoka T, et al. Nerve growth factor applied onto the olfactory epithelium alleviates degenerative changes of the olfactory receptor neurons following axotomy. *Brain Res*, 2000. 887(1): 53-62.

124. Shetty AK, Rao MS, Hattiangady B, Zaman V, Shetty GA. Hippocampal neurotrophin levels after injury: Relationship to the age of the hippocampus at the time of injury. *J Neurosci Res*, 2004. 78(4): 520-32.
125. Murakami S, Imbe H, Morikawa Y, Kubo C, Senba E. Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly. *Neurosci Res*, 2005. 53(2): 129-39.
126. Mossner R, Mikova O, Koutsilieri E, et al. Consensus paper of the WFSBP Task Force on Biological Markers: biological markers in depression. *World J Biol Psychiatry*, 2007. 8(3): 141-74.
127. Hadjiconstantinou M, McGuire L, Duchemin AM, et al. Changes in plasma nerve growth factor levels in older adults associated with chronic stress. *J Neuroimmunol*, 2001. 116(1): 102-6.
128. Aloe L, Bracci-Laudiero L, Alleva E, et al. Emotional stress induced by parachute jumping enhances blood nerve growth factor levels and the distribution of nerve growth factor receptors in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(22): 10440-4.
129. Lang UE, Anders D, Danker-Hopfe H, Hellweg R. Measurement of nerve growth factor serum concentration in a psychologically stressful situation in men. *Stress*, 2004. 7(1): 39-42.
130. Sheridan JF, Stark JL, Avitsur R, Padgett DA. Social disruption, immunity, and susceptibility to viral infection. Role of glucocorticoid insensitivity and NGF. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. 917: 894-905.
131. Marmigere F, Givalois L, Rage F, Arancibia S, Tapia-Arancibia L. Rapid induction of BDNF expression in the hippocampus during immobilization stress challenge in adult rats. *Hippocampus*, 2003. 13(5): 646-55.
132. Jeanneteau F, Garabedian MJ, Chao MV. Activation of Trk neurotrophin receptors by glucocorticoids provides a neuroprotective effect. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(12): 4862-7.
133. Karege F, Vaudan G, Schwald M, Perroud N, La Harpe R. Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Brain Res Mol Brain Res*, 2005. 136(1-2): 29-37.
134. Dwivedi Y, Rao JS, Rizavi HS, et al. Abnormal expression and functional characteristics of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in postmortem brain of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry*, 2003. 60(3): 273-82.
135. Dwivedi Y, Rizavi HS, Conley RR, et al. Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry*, 2003. 60(8): 804-15.
136. Karege F, Perret G, Bondolfi G, et al. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res*, 2002. 109(2): 143-8.
137. Fujimura H, Altar CA, Chen R, et al. Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thromb Haemost*, 2002. 87(4): 728-34.
138. Nakahashi T, Fujimura H, Altar CA, et al. Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Lett*, 2000. 470(2): 113-7.
139. Karege F, Bondolfi G, Gervasoni N, et al. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. *Biol Psychiatry*, 2005. 57(9): 1068-72.
140. Lee BH, Kim H, Park SH, Kim YK. Decreased plasma BDNF level in depressive patients. *J Affect Disord*, 2007. 101(1-3): 239-44.
141. Kim YK, Lee HP, Won SD, et al. Low plasma BDNF is associated with suicidal behavior in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2007. 31(1): 78-85.

142. Ziegenhorn AA, Schulte-Herbruggen O, Danker-Hopfe H, et al. Serum neurotrophins--a study on the time course and influencing factors in a large old age sample. *Neurobiol Aging*, 2007. 28(9): 1436-45.
143. Dwivedi Y, Mondal AC, Rizavi HS, Conley RR. Suicide brain is associated with decreased expression of neurotrophins. *Biol Psychiatry*, 2005. 58(4): 315-24.
144. Breyer-Pfaff G, Baumann, Antidepressiva. 2 ed. Medizinisch-pharmakologisches Kompendium, ed. H.P.T.A.u.C. Werning. Vol. 5. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2005 159.
145. Saarelainen T, Hendolin P, Lucas G, et al. Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. *J Neurosci*, 2003. 23(1): 349-57.
146. Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci*, 2002. 22(8): 3251-61.
147. Siuciak JA, Altar CA, Wiegand SJ, Lindsay RM. Antinociceptive effect of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Brain Res*, 1994. 633(1-2): 326-30.
148. Siuciak JA, Lewis DR, Wiegand SJ, Lindsay RM. Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmacol Biochem Behav*, 1997. 56(1): 131-7.
149. Chen B, Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry*, 2001. 50(4): 260-5.
150. Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, et al. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry*, 2003. 54(1): 70-5.
151. Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci*, 1995. 15(11): 7539-47.
152. Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J Neurosci*, 1996. 16(7): 2365-72.
153. Coppell AL, Pei Q, Zetterstrom TS. Bi-phasic change in BDNF gene expression following antidepressant drug treatment. *Neuropharmacology*, 2003. 44(7): 903-10.
154. Russo-Neustadt A, Beard RC, Cotman CW. Exercise, antidepressant medications, and enhanced brain derived neurotrophic factor expression. *Neuropsychopharmacology*, 1999. 21(5): 679-82.
155. Marvanova M, Lakso M, Pirhonen J, et al. The neuroprotective agent memantine induces brain-derived neurotrophic factor and trkB receptor expression in rat brain. *Mol Cell Neurosci*, 2001. 18(3): 247-58.
156. Muller MB, Toschi N, Kresse AE, Post A, Keck ME. Long-term repetitive transcranial magnetic stimulation increases the expression of brain-derived neurotrophic factor and cholecystinin mRNA, but not neuropeptide tyrosine mRNA in specific areas of rat brain. *Neuropsychopharmacology*, 2000. 23(2): 205-15.
157. Russo-Neustadt A, Ha T, Ramirez R, Kessler JP. Physical activity-antidepressant treatment combination: impact on brain-derived neurotrophic factor and behavior in an animal model. *Behav Brain Res*, 2001. 120(1): 87-95.
158. Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci*, 2000. 20(24): 9104-10.
159. Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry*, 1997. 54(7): 597-606.

160. Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, et al. Neurobiology of depression. *Neuron*, 2002. 34(1): 13-25.
161. Altar CA, Whitehead RE, Chen R, Wortwein G, Madsen TM. Effects of electroconvulsive seizures and antidepressant drugs on brain-derived neurotrophic factor protein in rat brain. *Biol Psychiatry*, 2003. 54(7): 703-9.
162. Dias BG, Banerjee SB, Duman RS, Vaidya VA. Differential regulation of brain derived neurotrophic factor transcripts by antidepressant treatments in the adult rat brain. *Neuropharmacology*, 2003. 45(4): 553-63.
163. Miro X, Perez-Torres S, Artigas F, et al. Regulation of cAMP phosphodiesterase mRNAs expression in rat brain by acute and chronic fluoxetine treatment. An in situ hybridization study. *Neuropharmacology*, 2002. 43(7): 1148-57.
164. Kuroda Y, McEwen BS. Effect of chronic restraint stress and tianeptine on growth factors, growth-associated protein-43 and microtubule-associated protein 2 mRNA expression in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*, 1998. 59(1): 35-9.
165. Conti AC, Cryan JF, Dalvi A, Lucki I, Blendy JA. cAMP response element-binding protein is essential for the upregulation of brain-derived neurotrophic factor transcription, but not the behavioral or endocrine responses to antidepressant drugs. *J Neurosci*, 2002. 22(8): 3262-8.
166. Willner P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)*, 1984. 83(1): 1-16.
167. McKinney WT, Jr., Bunney WE, Jr. Animal model of depression. I. Review of evidence: implications for research. *Arch Gen Psychiatry*, 1969. 21(2): 240-8.
168. Willner P. Animal models as simulations of depression. *Trends Pharmacol Sci*, 1991. 12(4): 131-6.
169. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 1977. 229(2): 327-36.
170. Jacobsen JP, Mork A. Chronic corticosterone decreases brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA and protein in the hippocampus, but not in the frontal cortex, of the rat. *Brain Res*, 2006. 1110(1): 221-5.
171. Kitamura Y, Gomita Y. [Development of animal models of treatment-resistant depression in rats]. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*, 2008. 28(2): 93-100.
172. Overmier JB, Seligman ME. Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance responding. *J Comp Physiol Psychol*, 1967. 63(1): 28-33.
173. Katz RJ. Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. *Pharmacol Biochem Behav*, 1982. 16(6): 965-8.
174. Greisen MH, Altar CA, Bolwig TG, Whitehead R, Wortwein G. Increased adult hippocampal brain-derived neurotrophic factor and normal levels of neurogenesis in maternal separation rats. *J Neurosci Res*, 2005. 79(6): 772-8.
175. Alfonso J, Pollevick GD, Van Der Hart MG, et al. Identification of genes regulated by chronic psychosocial stress and antidepressant treatment in the hippocampus. *Eur J Neurosci*, 2004. 19(3): 659-66.
176. Vollmayr B, Faust H, Lewicka S, Henn FA. Brain-derived-neurotrophic-factor (BDNF) stress response in rats bred for learned helplessness. *Mol Psychiatry*, 2001. 6(4): 471-4, 358.
177. Overstreet DH. The Flinders sensitive line rats: a genetic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*, 1993. 17(1): 51-68.
178. Ridder S, Chourbaji S, Hellweg R, et al. Mice with genetically altered glucocorticoid receptor expression show altered sensitivity for stress-induced depressive reactions. *J Neurosci*, 2005. 25(26): 6243-50.

179. Aso E, Ozaita A, Valdizan EM, et al. BDNF impairment in the hippocampus is related to enhanced despair behavior in CB1 knockout mice. *J Neurochem*, 2008. 105(2): 565-72.
180. Cairncross KD, Cox B, Forster C, Wren AF. The olfactory bulbectomized rat: a simple model for detecting drugs with antidepressant potential [proceedings]. *Br J Pharmacol*, 1977. 61(3): 497P.
181. Freis ED. Mental depression in hypertensive patients treated for long periods with large doses of reserpine. *N Engl J Med*, 1954. 251(25): 1006-8.
182. Schildkraut JJ. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry*, 1965. 122(5): 509-22.
183. Hammen C. Stress and depression. *Annu Rev Clin Psychol*, 2005. 1: 293-319.
184. de Kloet ER. Hormones, brain and stress. *Endocr Regul*, 2003. 37(2): 51-68.
185. Itoh T, Tokumura M, Abe K. Effects of rolipram, a phosphodiesterase 4 inhibitor, in combination with imipramine on depressive behavior, CRE-binding activity and BDNF level in learned helplessness rats. *Eur J Pharmacol*, 2004. 498(1-3): 135-42.
186. Adrien J, Dugovic C, Martin P. Sleep-wakefulness patterns in the helpless rat. *Physiol Behav*, 1991. 49(2): 257-62.
187. Hellhammer DH, Rea MA, Bell M, Belkien L, Ludwig M. Learned helplessness: effects on brain monoamines and the pituitary-gonadal axis. *Pharmacol Biochem Behav*, 1984. 21(4): 481-5.
188. Nemeroff CB. Recent advances in the neurobiology of depression. *Psychopharmacol Bull*, 2002. 36 Suppl 2: 6-23.
189. Martin P, Soubrie P, Puech AJ. Reversal of helpless behavior by serotonin uptake blockers in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 1990. 101(3): 403-7.
190. Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*, 1981. 5(2): 247-51.
191. Porsolt RD. Animal models of depression: utility for transgenic research. *Rev Neurosci*, 2000. 11(1): 53-8.
192. Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl)*, 1987. 93(3): 358-64.
193. Vollmayr B, Henn FA. Learned helplessness in the rat: improvements in validity and reliability. *Brain Res Brain Res Protoc*, 2001. 8(1): 1-7.
194. Vollmayr B, Bachteler D, Vengeliene V, et al. Rats with congenital learned helplessness respond less to sucrose but show no deficits in activity or learning. *Behav Brain Res*, 2004. 150(1-2): 217-21.
195. Chourbaji S, Vogt MA, Gass P. Mice that under- or overexpress glucocorticoid receptors as models for depression or posttraumatic stress disorder. *Prog Brain Res*, 2008. 167: 65-77.
196. Borsini F, Meli A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology (Berl)*, 1988. 94(2): 147-60.
197. Borsini F, Bendotti C, Velkov V, Rech R, Samanin R. Immobility test: effects of 5-hydroxytryptaminergic drugs and role of catecholamines in the activity of some antidepressants. *J Pharm Pharmacol*, 1981. 33(1): 33-7.
198. Detke MJ, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)*, 1995. 121(1): 66-72.
199. Paul IA, Duncan GE, Kuhn C, et al. Neural adaptation in imipramine-treated rats processed in forced swim test: assessment of time course, handling, rat strain and amine uptake. *J Pharmacol Exp Ther*, 1990. 252(3): 997-1005.

200. Maj J, Rogoz Z, Skuza G. The effects of combined treatment with MK-801 and antidepressant drugs in the forced swimming test in rats. *Pol J Pharmacol Pharm*, 1992. 44(3): 217-26.
201. Lucki I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol*, 1997. 8(6-7): 523-32.
202. Reneric JP, Lucki I. Antidepressant behavioral effects by dual inhibition of monoamine reuptake in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl)*, 1998. 136(2): 190-7.
203. Detke MJ, Johnson J, Lucki I. Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. *Exp Clin Psychopharmacol*, 1997. 5(2): 107-12.
204. Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 1985. 85(3): 367-70.
205. Perrault G, Morel E, Zivkovic B, Sanger DJ. Activity of litoxetine and other serotonin uptake inhibitors in the tail suspension test in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 1992. 42(1): 45-7.
206. Steru L, Chermat R, Thierry B, et al. The automated Tail Suspension Test: a computerized device which differentiates psychotropic drugs. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 1987. 11(6): 659-71.
207. Song C, Leonard BE. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*, 2005. 29(4-5): 627-47.
208. Leonard BE, Tuite M. Anatomical, physiological, and behavioral aspects of olfactory bulbectomy in the rat. *Int Rev Neurobiol*, 1981. 22: 251-86.
209. Mucignat-Caretta C, Bondi M, Caretta A. Time course of alterations after olfactory bulbectomy in mice. *Physiol Behav*, 2006. 89(5): 637-43.
210. Benninghoff A, *Anatomie: makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen/ Benninghoff*. 15. ed, ed. D.Z. Drenckhahn, W. Vol. 2. Münschen; Wien; Baltimore: Urban und Schwarzenberg, 1994.
211. van Riezen H, Schnieden H, Wren AF. Olfactory bulb ablation in the rat: behavioural changes and their reversal by antidepressant drugs. *Br J Pharmacol*, 1977. 60(4): 521-8.
212. van Riezen H, Schnieden H, Wren A. Behavioural changes following olfactory bulbectomy in rats: a possible model for the detection of antidepressant drugs [proceedings]. *Br J Pharmacol*, 1976. 57(3): 426P-427P.
213. Kelly JP, Wrynn AS, Leonard BE. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: an update. *Pharmacol Ther*, 1997. 74(3): 299-316.
214. Lumia AR, Teicher MH, Salchli F, Ayers E, Possidente B. Olfactory bulbectomy as a model for agitated hyposerotonergic depression. *Brain Res*, 1992. 587(2): 181-5.
215. Stockert M, Serra J, De Robertis E. Effect of olfactory bulbectomy and chronic amitriptyline treatment in rats. 3H-imipramine binding and behavioral analysis by swimming and open field tests. *Pharmacol Biochem Behav*, 1988. 29(4): 681-6.
216. Mar A, Sprekmeester E, Rochford J. Antidepressants preferentially enhance habituation to novelty in the olfactory bulbectomized rat. *Psychopharmacology (Berl)*, 2000. 150(1): 52-60.
217. Giardina WJ, Radek RJ. Effects of imipramine on the nocturnal behavior of bilateral olfactory bulbectomized rats. *Biol Psychiatry*, 1991. 29(12): 1200-8.
218. Thorne BM, Aaron M, Latham EE. Effects of olfactory bulb ablation upon emotionality and muricidal behavior in four rat strains. *J Comp Physiol Psychol*, 1973. 84(2): 339-44.
219. Joly D, Sanger DJ. The effects of fluoxetine and zimeldine on the behavior of olfactory bulbectomized rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 1986. 24(2): 199-204.

220. Hall RD, Macrides F. Olfactory bulbectomy impairs the rat's radial-maze behavior. *Physiol Behav*, 1983. 30(5): 797-803.
221. Jancsar SM, Leonard BE. The effects of antidepressant drugs on conditioned taste aversion learning of the olfactory bulbectomized rat. *Neuropharmacology*, 1981. 20(12B): 1341-5.
222. McGrath C, Norman TR. The effect of venlafaxine treatment on the behavioural and neurochemical changes in the olfactory bulbectomised rat. *Psychopharmacology (Berl)*, 1998. 136(4): 394-401.
223. Klein D, Brown TS. Exploratory behavior and spontaneous alternation in blind and anosmic rats. *J Comp Physiol Psychol*, 1969. 68(1): 107-10.
224. Sieck MH, Gordon BL. Selective olfactory bulb lesions: reactivity changes and avoidance learning in rats. *Physiol Behav*, 1972. 9(4): 545-52.
225. Fleming AS, Rosenblatt JS. Olfactory regulation of maternal behavior in rats. I. Effects of olfactory bulb removal in experienced and inexperienced lactating and cycling females. *J Comp Physiol Psychol*, 1974. 86(2): 221-32.
226. Carlsen J, De Olmos J, Heimer L. Tracing of two-neuron pathways in the olfactory system by the aid of transneuronal degeneration: projections to the amygdaloid body and hippocampal formation. *J Comp Neurol*, 1982. 208(2): 196-208.
227. Nesterova IV, Gurevich EV, Nesterov VI, Otmakhova NA, Bobkova NV. Bulbectomy-induced loss of raphe neurons is counteracted by antidepressant treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 1997. 21(1): 127-40.
228. Jancsar SM, Leonard BE. Behavioural and neurochemical interactions between chronic reserpine and chronic antidepressants. A possible model for the detection of atypical antidepressants. *Biochem Pharmacol*, 1983. 32(10): 1569-71.
229. Wrynn AS, Mac Sweeney CP, Franconi F, et al. An in-vivo magnetic resonance imaging study of the olfactory bulbectomized rat model of depression. *Brain Res*, 2000. 879(1-2): 193-9.
230. Wrynn AS, Sebens JB, Koch T, Leonard BE, Korf J. Prolonged c-Jun expression in the basolateral amygdala following bulbectomy: possible implications for antidepressant activity and time of onset. *Brain Res Mol Brain Res*, 2000. 76(1): 7-17.
231. Jancsar SM, Leonard BE. Changes in neurotransmitter metabolism following olfactory bulbectomy in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 1984. 8(2): 263-9.
232. van Riezen H, Leonard BE. Effects of psychotropic drugs on the behavior and neurochemistry of olfactory bulbectomized rats. *Pharmacol Ther*, 1990. 47(1): 21-34.
233. King MG, Cairncross KD. Effects of olfactory bulb section on brain noradrenaline, corticosterone and conditioning in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 1974. 2(3): 347-53.
234. Masini CV, Holmes PV, Freeman KG, Maki AC, Edwards GL. Dopamine overflow is increased in olfactory bulbectomized rats: an in vivo microdialysis study. *Physiol Behav*, 2004. 81(1): 111-9.
235. Holmes PV, Masini CV, Primeaux SD, et al. Intravenous self-administration of amphetamine is increased in a rat model of depression. *Synapse*, 2002. 46(1): 4-10.
236. Van Hooymissen JD, Chambliss HO, Holmes PV, Dishman RK. Effects of chronic exercise and imipramine on mRNA for BDNF after olfactory bulbectomy in rat. *Brain Res*, 2003. 974(1-2): 228-35.
237. Winans SS, Powers JB. Olfactory and vomeronasal deafferentation of male hamsters: histological and behavioral analyses. *Brain Res*, 1977. 126(2): 325-44.
238. Rigter H, Van Riezen H, Wren A, Schnieden H. Pharmacological validation of a new test for the detection of antidepressant activity of drugs [proceedings]. *Br J Pharmacol*, 1977. 59(3): 451P-452P.

239. Cairncross KD, King MG, Schofield SP. Effect of amitriptyline on avoidance learning in rats following olfactory bulb ablation. *Pharmacol Biochem Behav*, 1975. 3(6): 1063-7.
240. Leonard BE, O'Connor WT. The effect of chronically administered mianserin, 8-hydroxymianserin and desmethylmianserin on the 'open field' behaviour and brain noradrenaline metabolism in the olfactory bulbectomized rat. *Neuropsychobiology*, 1987. 18(3): 118-21.
241. Connor TJ, Harkin A, Kelly JP, Leonard BE. Olfactory bulbectomy provokes a suppression of interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha production in response to an in vivo challenge with lipopolysaccharide: effect of chronic desipramine treatment. *Neuroimmunomodulation*, 2000. 7(1): 27-35.
242. Redmond AM, Kelly JP, Leonard BE. The determination of the optimal dose of milnacipran in the olfactory bulbectomized rat model of depression. *Pharmacol Biochem Behav*, 1999. 62(4): 619-23.
243. Butler J, Leonard BE. Clinical and experimental studies on fluoxetine: effects on serotonin uptake. *Int Clin Psychopharmacol*, 1990. 5(1): 41-8.
244. Cryan JF, McGrath C, Leonard BE, Norman TR. Combining pindolol and paroxetine in an animal model of chronic antidepressant action--can early onset of action be detected? *Eur J Pharmacol*, 1998. 352(1): 23-8.
245. Harkin A, Kelly JP, McNamara M, et al. Activity and onset of action of reboxetine and effect of combination with sertraline in an animal model of depression. *Eur J Pharmacol*, 1999. 364(2-3): 123-32.
246. Healy DG, Harkin A, Cryan JF, Kelly JP, Leonard BE. Metyrapone displays antidepressant-like properties in preclinical paradigms. *Psychopharmacology (Berl)*, 1999. 145(3): 303-8.
247. Cairncross KD, Wren A, Cox B, Schnieden H. Effects of olfactory bulbectomy and domicile on stress-induced corticosterone release in the rat. *Physiol Behav*, 1977. 19(4): 485-7.
248. Cattarelli M, Demael A. Basal plasma corticosterone level after bilateral selective lesions of the olfactory pathways in the rat. *Experientia*, 1986. 42(2): 169-71.
249. Cairncross KD, Cox B, Forster C, Wren AF. Olfactory projection systems, drugs and behaviour: a review. *Psychoneuroendocrinology*, 1979. 4(3): 253-72.
250. Broekkamp CL, O'Connor WT, Tonnaer JA, Rijk HW, Van Delft AM. Corticosterone, choline acetyltransferase and noradrenaline levels in olfactory bulbectomized rats in relation to changes in passive avoidance acquisition and open field activity. *Physiol Behav*, 1986. 37(3): 429-34.
251. Schulte-Herbruggen O, Chourbaji S, Muller H, et al. Differential regulation of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in a mouse model of learned helplessness. *Exp Neurol*, 2006. 202(2): 404-9.
252. Song L, Che W, Min-Wei W, Murakami Y, Matsumoto K. Impairment of the spatial learning and memory induced by learned helplessness and chronic mild stress. *Pharmacol Biochem Behav*, 2006. 83(2): 186-93.
253. Greenwood BN, Strong PV, Foley TE, Thompson RS, Fleshner M. Learned helplessness is independent of levels of brain-derived neurotrophic factor in the hippocampus. *Neuroscience*, 2007. 144(4): 1193-208.
254. Gronli J, Bramham C, Murison R, et al. Chronic mild stress inhibits BDNF protein expression and CREB activation in the dentate gyrus but not in the hippocampus proper. *Pharmacol Biochem Behav*, 2006. 85(4): 842-9.
255. Lee KJ, Kim SJ, Kim SW, et al. Chronic mild stress decreases survival, but not proliferation, of new-born cells in adult rat hippocampus. *Exp Mol Med*, 2006. 38(1): 44-54.

256. Angelucci F, Mathe AA, Aloe L. Neurotrophic factors and CNS disorders: findings in rodent models of depression and schizophrenia. *Prog Brain Res*, 2004. 146: 151-65.
257. Schulte-Herbruggen O, Hellweg R, Chourbaji S, et al. Differential regulation of neurotrophins and serotonergic function in mice with genetically reduced glucocorticoid receptor expression. *Exp Neurol*, 2007. 204(1): 307-16.
258. Cirulli F, Alleva E, Antonelli A, Aloe L. NGF expression in the developing rat brain: effects of maternal separation. *Brain Res Dev Brain Res*, 2000. 123(2): 129-34.
259. Cirulli F, Micera A, Alleva E, Aloe L. Early maternal separation increases NGF expression in the developing rat hippocampus. *Pharmacol Biochem Behav*, 1998. 59(4): 853-8.
260. Pham TM, Soderstrom S, Henriksson BG, Mohammed AH. Effects of neonatal stimulation on later cognitive function and hippocampal nerve growth factor. *Behav Brain Res*, 1997. 86(1): 113-20.
261. Song C, Zhang XY, Manku M. Increased phospholipase A2 activity and inflammatory response but decreased nerve growth factor expression in the olfactory bulbectomized rat model of depression: effects of chronic ethyl-eicosapentaenoate treatment. *J Neurosci*, 2009. 29(1): 14-22.
262. Zueger M, Urani A, Chourbaji S, et al. Olfactory bulbectomy in mice induces alterations in exploratory behavior. *Neurosci Lett*, 2005. 374(2): 142-6.
263. Rohrer H, Hofer M, Hellweg R, et al. Antibodies against mouse nerve growth factor interfere in vivo with the development of avian sensory and sympathetic neurones. *Development*, 1988. 103(3): 545-52.
264. Hellweg R, Hock C., Hartung H-D. An Improved Rapid and Highly Sensitive Enzyme Immunoassay for Nerve Growth Factor. *A Journal of Methods in Cell and Molecular Biology*, 1989. 1(1): 43-48.
265. Korsching S, Thoenen H. Two-site enzyme immunoassay for nerve growth factor. *Methods Enzymol*, 1987. 147: 167-85.
266. Thoenen H, Korsching S, Barde YA, Edgar D. Quantitation and purification of neurotrophic molecules. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1983. 48 Pt 2: 679-84.
267. Angelucci F, Aloe L, Vasquez PJ, Mathe AA. Mapping the differences in the brain concentration of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in an animal model of depression. *Neuroreport*, 2000. 11(6): 1369-73.
268. Kolbeck R, Bartke I, Eberle W, Barde YA. Brain-derived neurotrophic factor levels in the nervous system of wild-type and neurotrophin gene mutant mice. *J Neurochem*, 1999. 72(5): 1930-8.
269. Kheirvari S, Uezu K, Sakai T, et al. Increased nerve growth factor by zinc supplementation with concurrent vitamin A deficiency does not improve memory performance in mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 2006. 52(6): 421-7.
270. Dalvi A, Lucki I. Murine models of depression. *Psychopharmacology (Berl)*, 1999. 147(1): 14-6.
271. Shanks N, Anisman H. Stressor-provoked behavioral changes in six strains of mice. *Behav Neurosci*, 1988. 102(6): 894-905.
272. Shanks N, Anisman H. Strain-specific effects of antidepressants on escape deficits induced by inescapable shock. *Psychopharmacology (Berl)*, 1989. 99(1): 122-8.
273. David DJ, Renard CE, Jolliet P, Hascoet M, Bourin M. Antidepressant-like effects in various mice strains in the forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl)*, 2003. 166(4): 373-82.
274. Ripoll N, David DJ, Dailly E, Hascoet M, Bourin M. Antidepressant-like effects in various mice strains in the tail suspension test. *Behav Brain Res*, 2003. 143(2): 193-200.

275. Otmakhova NA, Gurevich EV, Katkov YA, Nesterova IV, Bobkova NV. Dissociation of multiple behavioral effects between olfactory bulbectomized C57Bl/6J and DBA/2J mice. *Physiol Behav*, 1992. 52(3): 441-8.
276. Pencea V, Bingaman KD, Freedman LJ, Luskin MB. Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. *Exp Neurol*, 2001. 172(1): 1-16.
277. Branchi I, D'Andrea I, Sietzema J, et al. Early social enrichment augments adult hippocampal BDNF levels and survival of BrdU-positive cells while increasing anxiety- and "depression"-like behavior. *J Neurosci Res*, 2006. 83(6): 965-73.
278. Eisch AJ, Bolanos CA, de Wit J, et al. Brain-derived neurotrophic factor in the ventral midbrain-nucleus accumbens pathway: a role in depression. *Biol Psychiatry*, 2003. 54(10): 994-1005.
279. Berton O, McClung CA, Dileone RJ, et al. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science*, 2006. 311(5762): 864-8.
280. Adachi M, Barrot M, Autry AE, Theobald D, Monteggia LM. Selective loss of brain-derived neurotrophic factor in the dentate gyrus attenuates antidepressant efficacy. *Biol Psychiatry*, 2008. 63(7): 642-9.
281. Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J Neurosci*, 1995. 15(3 Pt 1): 1768-77.
282. Kumamaru E, Numakawa T, Adachi N, et al. Glucocorticoid prevents brain-derived neurotrophic factor-mediated maturation of synaptic function in developing hippocampal neurons through reduction in the activity of mitogen-activated protein kinase. *Mol Endocrinol*, 2008. 22(3): 546-58.
283. Angelucci F, Brene S, Mathe AA. BDNF in schizophrenia, depression and corresponding animal models. *Mol Psychiatry*, 2005. 10(4): 345-52.
284. Chourbaji S, Hellweg R, Brandis D, et al. Mice with reduced brain-derived neurotrophic factor expression show decreased choline acetyltransferase activity, but regular brain monoamine levels and unaltered emotional behavior. *Brain Res Mol Brain Res*, 2004. 121(1-2): 28-36.
285. Hellweg R, Zueger M, Fink K, Hortnagl H, Gass P. Olfactory bulbectomy in mice leads to increased BDNF levels and decreased serotonin turnover in depression-related brain areas. *Neurobiol Dis*, 2007. 25(1): 1-7.
286. Schaaf MJ, De Kloet ER, Vreugdenhil E. Corticosterone effects on BDNF expression in the hippocampus. Implications for memory formation. *Stress*, 2000. 3(3): 201-8.
287. Sharma HS. Neurotrophic factors in combination: a possible new therapeutic strategy to influence pathophysiology of spinal cord injury and repair mechanisms. *Curr Pharm Des*, 2007. 13(18): 1841-74.
288. Sharma HS. Neuroprotective effects of neurotrophins and melanocortins in spinal cord injury: an experimental study in the rat using pharmacological and morphological approaches. *Ann N Y Acad Sci*, 2005. 1053: 407-21.
289. Johnson RA, Mitchell GS. Exercise-induced changes in hippocampal brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: effects of rat strain. *Brain Res*, 2003. 983(1-2): 108-14.
290. Neeper SA, Gomez-Pinilla F, Choi J, Cotman CW. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res*, 1996. 726(1-2): 49-56.
291. van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(23): 13427-31.

292. van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*, 1999. 2(3): 266-70.
293. Babyak M, Blumenthal JA, Herman S, et al. Exercise treatment for major depression: maintenance of therapeutic benefit at 10 months. *Psychosom Med*, 2000. 62(5): 633-8.
294. Martinsen EW, Hoffart A, Solberg O. Comparing aerobic with nonaerobic forms of exercise in the treatment of clinical depression: a randomized trial. *Compr Psychiatry*, 1989. 30(4): 324-31.
295. Gold SM, Schulz KH, Hartmann S, et al. Basal serum levels and reactivity of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor to standardized acute exercise in multiple sclerosis and controls. *J Neuroimmunol*, 2003. 138(1-2): 99-105.
296. Zorner B, Wolfer DP, Brandis D, et al. Forebrain-specific trkB-receptor knockout mice: behaviorally more hyperactive than "depressive". *Biol Psychiatry*, 2003. 54(10): 972-82.
297. Fossati P, Radtchenko A, Boyer P. Neuroplasticity: from MRI to depressive symptoms. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2004. 14 Suppl 5: S503-10.
298. Maguire EA, Gadian DG, Johnsrude IS, et al. Navigation-related structural change in the hippocampi of taxi drivers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(8): 4398-403.
299. Kempermann G, Gast D, Gage FH. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann Neurol*, 2002. 52(2): 135-43.
300. Kempermann G, Gage FH. Genetic determinants of adult hippocampal neurogenesis correlate with acquisition, but not probe trial performance, in the water maze task. *Eur J Neurosci*, 2002. 16(1): 129-36.
301. Kempermann G. The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for? *Trends Neurosci*, 2008. 31(4): 163-9.
302. Minichiello L, Calella AM, Medina DL, et al. Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron*, 2002. 36(1): 121-37.
303. Faure J, Uys JD, Marais L, Stein DJ, Daniels WM. Early maternal separation followed by later stressors leads to dysregulation of the HPA-axis and increases in hippocampal NGF and NT-3 levels in a rat model. *Metab Brain Dis*, 2006. 21(2-3): 181-88.
304. Sohrabji F, Peeples KW, Marroquin OA. Local and cortical effects of olfactory bulb lesions on trophic support and cholinergic function and their modulation by estrogen. *J Neurobiol*, 2000. 45(2): 61-74.
305. Rylett RJ, Williams LR. Role of neurotrophins in cholinergic-neurone function in the adult and aged CNS. *Trends Neurosci*, 1994. 17(11): 486-90.
306. Thoenen H, Barde YA, Davies AM, Johnson JE. Neurotrophic factors and neuronal death. *Ciba Found Symp*, 1987. 126: 82-95.
307. Hellweg R, Humpel C, Lowe A, Hortnagl H. Moderate lesion of the rat cholinergic septohippocampal pathway increases hippocampal nerve growth factor synthesis: evidence for long-term compensatory changes? *Brain Res Mol Brain Res*, 1997. 45(1): 177-81.
308. Hellweg R, Gericke CA, Jendroska K, Hartung HD, Cervos-Navarro J. NGF content in the cerebral cortex of non-demented patients with amyloid-plaques and in symptomatic Alzheimer's disease. *Int J Dev Neurosci*, 1998. 16(7-8): 787-94.
309. Chiaretti A, Antonelli A, Riccardi R, et al. Nerve growth factor expression correlates with severity and outcome of traumatic brain injury in children. *Eur J Paediatr Neurol*, 2008. 12(3): 195-204.
310. Karchewski LA, Gratto KA, Wetmore C, Verge VM. Dynamic patterns of BDNF expression in injured sensory neurons: differential modulation by NGF and NT-3. *Eur J Neurosci*, 2002. 16(8): 1449-62.

311. Lang UE, Jockers-Scherubl MC, Hellweg R. State of the art of the neurotrophin hypothesis in psychiatric disorders: implications and limitations. *J Neural Transm*, 2004. 111(3): 387-411.
312. Roskoden T, Otten U, Schwegler H. Early postnatal corticosterone administration regulates neurotrophins and their receptors in septum and hippocampus of the rat. *Exp Brain Res*, 2004. 154(2): 183-91.
313. von Richthofen S, Lang UE, Hellweg R. Effects of different kinds of acute stress on nerve growth factor content in rat brain. *Brain Res*, 2003. 987(2): 207-13.

I Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

II Selbständigkeitserklärung

„Ich, Katharina Fink, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Veränderungen der Neurotrophinkonzentrationen in dem Tiermodell der Depression - die Bulbus olfactorius ektomierte Maus“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

III Publikationsliste

Teile der Promotion sind in folgender Originalarbeit veröffentlicht:

“Olfactory bulbectomy in mice leads to increased BDNF levels and decreased serotonin turnover in depression-related brain areas”

Rainer Hellweg, Maha Zueger, Katharina Fink, Heide Hörtnagel und Peter Gass

Neurobiology of Disease 25 (2007) 1-7

IV Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Hellweg für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Anleitung bei der Durchführung der Versuche, die Betreuung und Begutachtung dieser Doktorarbeit.

Weiterhin danke ich Herrn PD Dr. P. Schlattmann für die Beratung zur statistischen Auswertung.

Frau Bunge gilt für die Einarbeitung in die Versuche und für ihr stets offenes Ohr großer Dank.

V Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adreno-Corticotropes-Hormon
Bad	B-cell lymphoma 2 Antagonist of Cell Death
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
C	Coating-Puffer
CA	Cornu Ammonis
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CB-Rezeptor	Cannabinoid-Rezeptor
c-jun	immediate early gene c-jun
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
CREB	cAMP-response element binding protein
CRH	Corticotropin-releasing-Hormon
DRL72	Differential Reinforcement of Low Rate-72 seconds
DSM-IV-TR	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition, Text Revision 2000
D2-Rezeptor	Dopaminrezeptor
E	Equilibrierpuffer
EC	Environmental Conditions
ECT	Elektrokonvulsionstherapie
ELISA	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay
FC	Frontalcortex
GABA	γ -Aminobuttersäure
GDNF	Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor

GM	German Modification
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
H	Homogenisierungspuffer
HGF	Hepatic Growth Factor
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
Hippo	Hippocampus
Hypo	Hypothalamus
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th Revision
Ig	Immunglobulin
MAO-Hemmer	Monoaminoxidasehemmer
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MUG	4-Methylumbelliferyl-beta-D-Galaktoside
NaN ₃	Natrium-Azid
NF-κ-B	nukleärer Faktor- κ-B
NGF	Nerve Growth Factor
NMDA	n-Methyl-D-Aspartat
NP-40	Nonylphenylpolyethylenglykol P-40
NT	Neurotrophin
N(0)	Nullhypothese
N(1)	Alternativhypothese

OBX	Ektomie des Bulbus olfactorius/ Bulbus olfactorius ektomiert
PC	Parietalcortex
Pi	Protease-Inhibitoren-Cocktail
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PLC- γ	Phospholipase C- γ
p75-Rezeptor	75kD Nerve Growth Factor-Rezeptor
S/C	Standard-Conjugatpuffer
SNARI	Selektiver Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer
SP	Substratpuffer
SSRI	Selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer
Str	Striatum
STOP	Stop-Puffer
TCA	Trizyklische Antidepressiva
Tris-HCl	Trishydroxymethylaminomethan-hydrochlorid
Trk	Tropomyosin Rezeptor Kinase
W	Waschpuffer
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentrales Nervensystem
5-HTTLPR	Serotonin-Transporter-Length-Polymorphic-Region
5-HT ₂ -Rezeptor	Serotonin-2-Rezeptor