

Aus der Klinik und Poliklinik für
Kinder- und Jugendpsychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Marcel Romanos

Periphere Expression von Brain Derived Neurotrophic Factor
bei Kindern und Jugendlichen mit
Autismus-Spektrum-Störungen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Laura Irena Teresa Albantakis
aus Ingolstadt

Würzburg, August 2013

Referent: Prof. Dr. Marcel Romanos

Korreferent/in: Prof. Dr. Dr. med. Katharina Domschke, M.A. (USA)

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.09.2014

Die Promovendin ist Ärztin.

Meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Einführung	1
1.2	Autismus-Spektrum-Störungen (ASS) und Komorbidität.....	3
1.2.1	ASS in den aktuellen Klassifikationssystemen	3
1.2.2	Komorbidite Störungen bei ASS	6
2.	Forschungsstand	8
2.1	Neurobiologische Forschung bei ASS.....	8
2.1.1	Ätiopathophysiologische Faktoren der ASS	8
2.1.2	Neurotrophe Faktoren als pathophysiologische Kandidaten der ASS	9
2.2	Methodischer Forschungsstand	11
2.2.1	Diagnostik der ASS	11
2.2.2	Messung der Expression von Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF).....	12
2.3	Zusammenfassung	13
2.4	Fragestellung und Hypothesen	14
3.	Material und Methodik.....	15
3.1	Material.....	15
3.1.1	Stichproben.....	15
3.1.1.1	Ein- und Ausschlusskriterien.....	15
3.1.1.2	Ablauf des Einschlussverfahrens zur Studienteilnahme.....	16
3.1.1.3	Stichprobe 1: Patienten mit ASS und gesunde Kontrollen.....	16
3.1.1.4	Stichprobe 2: Patienten mit ASS, Patienten mit Aufmerksamkeits- defizit-/ Hyperaktivitätsstörung (ADHS) und gesunde Kontrollen....	18
3.1.1.5	Messinstrumente zur Stichprobencharakterisierung.....	21
3.1.1.5.1	Diagnostisches Interview für Autismus-Revidiert (ADI-R).....	21
3.1.1.5.2	Diagnostische Beobachtungsskala für Autistische Störungen (ADOS).....	22
3.1.1.5.3	Fragebogen zur sozialen Kommunikation (FSK)	22

3.1.1.5.4	Marburger Beurteilungsskala zum Asperger-Syndrom (MBAS) .	23
3.1.1.5.5	Fremdbeurteilungsbogen für Aufmerksamkeitsdefizit- / Hyperaktivitätsstörungen (FBB-ADHS).....	24
3.1.1.5.6	Child Behavior Checklist (CBCL).....	24
3.1.1.5.7	Depressions-Inventar für Kinder und Jugendliche (DIKJ)	25
3.1.1.5.8	Intelligenz- und Leistungsdiagnostik.....	25
3.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	25
3.1.2.1	Blutabnahmesystem.....	25
3.1.2.2	Material für Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA).....	26
3.1.2.2.1	Serumröhrchen.....	26
3.1.2.2.2	ELISA-Kit.....	26
3.1.2.3	Material für Quantitative Real Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	26
3.1.2.3.1	Reaktionsgefäße zur Isolation und Aufreinigung von mRNA.....	26
3.1.2.3.2	Kit zur Reversen Transkription.....	26
3.1.2.3.3	Fluoreszenzfarbstoff	26
3.1.2.3.4	Primer.....	26
3.1.3	Geräte.....	26
3.1.4	Software.....	27
3.2	Methodik.....	27
3.2.1	Serumgewinnung	27
3.2.2	mRNA-Gewinnung und -Isolation aus Vollblut.....	27
3.2.3	ELISA.....	28
3.2.4	Reverse Transkription.....	28
3.2.5	qRT-PCR	28
3.2.6	Statistik	30
3.3	Untersuchungsplan	31
4.	Ergebnisse	32
4.1	Hypothese 1	32

4.1.1	Stichprobe 1: BDNF-Serumkonzentration	32
4.1.2	Stichprobe 2: BDNF-mRNA-Expression im Blut.....	33
4.2	Hypothese 2	34
4.2.1	BDNF-Expression und Alter	34
4.2.2	BDNF-Expression und Intelligenzquotient (IQ)	34
4.2.3	BDNF-Expression und autistischer Phänotyp	35
4.2.4	BDNF-Expression und Komorbidität.....	35
4.2.4.1	Komorbidität ADHS.....	35
4.2.4.2	Weitere psychiatrische Komorbidität	35
4.2.5	BDNF-Expression und Medikation.....	36
4.2.6	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	36
5.	Diskussion	37
5.1	Periphere BDNF-mRNA- und -Proteinexpression.....	37
5.2	Einfluss des autistischen Phänotyps, von komorbiden Störungen und weiteren Kofaktoren auf die BDNF-Expression	40
5.2.1	Einfluss von Alter und hormonellen Veränderungen.....	40
5.2.2	Einfluss des Geschlechts	44
5.2.3	Einfluss von Komorbidität	45
5.2.4	Einfluss des Autismusschweregrades.....	45
5.2.5	Einfluss des IQ	46
5.2.6	Einfluss des Materials.....	47
5.2.6.1	Zirkadiane Rhythmik der BDNF-Expression.....	47
5.2.6.2	Medikamenteneinnahme.....	47
5.2.6.3	ASS-Diagnostik.....	48
5.2.7	Aussagekraft und Gültigkeit der Ergebnisse	49
6.	Ausblick	50
7.	Zusammenfassung.....	51
8.	Literaturverzeichnis.....	53

9. Anhang.....	64
----------------	----

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Autistisches Spektrum nach Baron-Cohen.....	3
Abbildung 2: Interpretation und Erweiterung des autistischen Spektrums	4
Abbildung 3: Klassifikation verschiedener Autismus-Formen	5
Abbildung 4: Stichprobe 1 - BDNF-Serumkonzentration.....	32
Abbildung 5: Stichprobe 2 - BDNF-mRNA-Expression.....	33
Tabelle 1: Stichprobe 1 - Charakterisierung des autistischen Patientenkollektivs.....	17
Tabelle 2: Stichprobe 1 - Charakterisierung der gesunden Kontrollprobanden	18
Tabelle 3: Stichprobe 2 - Charakterisierung des autistischen Patientenkollektivs.....	19
Tabelle 4: Stichprobe 2 - Charakterisierung des ADHS-Patientenkollektivs.....	20
Tabelle 5: Stichprobe 2 - Charakterisierung der gesunden Kontrollprobanden	20
Tabelle 6: Cut-Off Werte für ADOS Module.....	22
Tabelle 7: MBAS Cut-Off Werte	23
Tabelle 8: Internationale Studienlage - Periphere BDNF-Expression bei ASS	39
Tabelle 9: Testosteronreferenzbereich nach Roche Diagnostics	42

Daten der vorliegenden Promotion wurden im Februar 2014 im Journal of Neural Transmission publiziert, wobei die Doktorandin als Co-Autorin fungierte (Taurines, Segura, Schecklmann, Albantakis et al. „Altered peripheral BDNF expression in children and adolescents with autism spectrum disorders“, s. Anhang). Aus diesem Grund ergeben sich in der Diskussion der vorliegenden Arbeit inhaltliche Überschneidungen mit der Diskussion der o.g. Publikation.

Die wissenschaftliche Eigenleistung der Doktorandin besteht zusammenfassend in der Rekrutierung und klinischen Charakterisierung der Patienten, der Rekrutierung der Kontrollprobanden, der Durchführung der experimentellen Versuche auf Proteinebene, sowie der Diskussion und Aufbereitung der Ergebnisse.

1. Einleitung

1.1 Einführung

„Ich heiße Christopher John Francis Boone. Ich kenne alle Länder der Welt und ihre Hauptstädte und sämtliche Primzahlen bis 7507.“ So stellt sich Christopher, der Protagonist von Mark Haddons Buch „Supergute Tage oder Die sonderbare Welt des Christopher Boone“ seinen Lesern vor. Der Leser erfährt relativ schnell, dass Christopher ein sehr besonderer Junge ist, der beispielsweise die „[...] Farbe Rot [liebt], Gelb und Braun dagegen hasst. Unordnung, Überraschungen und fremde Menschen versetzen ihn in Panik. Christopher leidet an einer leichten Form von Autismus“ (Haddon 2005). Doch was ist Autismus? Eine „Krankheit“ oder nur ein Anderssein?

Autismus-Spektrum-Störungen (ASS) umfassen nach der „International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems - 10. Revision“ (ICD-10) den sogenannten frühkindlichen Autismus (F84.0), den atypischen Autismus (F84.1), das Asperger-Syndrom (F84.5) und mildere, abgeschwächte Varianten dieser Störungen. Leitsymptome stellen Beeinträchtigungen der Kommunikation, sozialen Interaktion sowie repetitive, stereotype Verhaltensweisen dar (Bölte 2009). Unterschiedliche Schweregrade der jeweiligen Störung trugen zu der Entstehung des Begriffs „Spektrum-Störung“ bei (Remschmidt und Kamp-Becker 2007), der aktuell erstmalig in der im Mai 2013 eingeführten DSM-V (www.dsm5.org) aufgeführt wird.

Autismus-Diagnostik basiert überwiegend auf einer standardisierten Verhaltensbeobachtung und detaillierten Erfassung der Entwicklungsgeschichte durch einen Kinder- und Jugendpsychiater oder auch durch einen Arzt für Kinder- und Jugendmedizin in Zusammenarbeit mit klinischen Psychologen unter Anwendung von leitlinienorientierten, autismspezifischen Manualen (Remschmidt und Kamp-Becker 2007; Bölte 2009).

Die tiopathophysiologie der ASS ist bisher nicht vollständig geklärt. Nach dem aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstand handelt es sich bei ASS um eine prä-, peri- oder postnatale neuronale Entwicklungsstörung, die wesentlich genetisch beeinflusst ist (Veenstra-Vanderweele, Cook et al. 2003; Veenstra-Vanderweele und Cook 2004; Remschmidt und Kamp-Becker 2007; Schmitz und Rezaie 2008; Nickl-Jockschat und Michel 2011). Bisherige Studienergebnisse deuten u.a. auf eine zentrale und periphere

Dysregulation des Neurotrophins „Brain Derived Neurotrophic Factor“, BDNF, bei ASS hin (Perry, Lee et al. 2001; Connolly, Chez et al. 2006; Hashimoto, Iwata et al. 2006; Nelson, Kuddo et al. 2006; Katoh-Semba, Wakako et al. 2007; Nishimura, Nakamura et al. 2007; Sheikh, Malik et al. 2010). Allerdings sind bisherige Befunde uneinheitlich und das Design einiger Studien optimierbar.

BDNF selbst ist für die neuronale Entwicklung im menschlichen Gehirn entscheidend, indem es die synaptische Plastizität z.B. durch Einflussnahme auf die neuronale Migration moduliert (Binder und Scharfman 2004; Mansour, Mohamed et al. 2010).

Die vorgelegte Arbeit zielt auf die weitere Klärung der Rolle von BDNF als potenziellen Kandidaten für die Ätiopathophysiologie bei ASS durch die Analyse der Expression im Blut. Insbesondere standen mögliche Einflussfaktoren (Alter, IQ, autismspezifische Symptomatik, Komorbidität und Medikation) auf die BDNF-Expression im Blut bei Kindern und Jugendlichen mit ASS und Kontrollprobanden im Fokus der Studie. Zu diesem Zweck wurden zwei unabhängige ASS-Stichproben und -neben gesunden Kontrollen - ein klinisches Kontrollsample von Patienten mit Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS) untersucht, mit dem Hauptergebnis, dass die periphere BDNF-Expression bei Kindern und Jugendlichen mit ASS erniedrigt war.

In einer ersten Stichprobe (ASS-Patienten versus gesunde Kontrollen) wurde eine signifikant erniedrigte BDNF-Proteinserumkonzentration in der Patientengruppe mittels Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) nachgewiesen ($p = 0,040$).

In einer zweiten unabhängigen Stichprobe (Patienten mit ASS, Patienten mit ADHS und gesunde Kontrollen) wurde auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) in Vollblut ebenfalls eine signifikant erniedrigte BDNF-Expression in der ASS-Gruppe im Vergleich zu klinischer und gesunder Kontrollgruppe ermittelt ($p = 0,011$), sowie ein Trend zu erniedrigten BDNF-Werten bei ADHS-Patienten ($p = 0,097$) im Vergleich zu gesunden Probanden.

Des Weiteren wurden signifikante negative Korrelationen zwischen BDNF-Expression und Alter innerhalb des ASS-Patientenkollektivs sowie in der gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen. Ebenfalls signifikante negative Korrelationen wurden zwischen autistischem Phänotyp und BDNF-Expression festgestellt. In der Subgruppe

der ADHS-Patienten wurde kein Einfluss von Psychostimulanzien auf die BDNF-mRNA-Expression gemessen. Eine klare Einordnung einer etwaigen Korrelation zwischen BDNF-Expression und IQ ist derzeit noch nicht möglich.

Größere Stichproben sowie zusätzliche Informationen zu dem Entwicklungsstand der Probanden (beispielsweise durch Bestimmung der peripheren Hormonspiegel) könnten in zukünftigen Studien zu einer weiteren pathophysiologischen Klärung der Rolle von BDNF bei Kindern und Jugendlichen mit ASS beitragen.

1.2 Autismus-Spektrum-Störungen (ASS) und Komorbidität

1.2.1 ASS in den aktuellen Klassifikationssystemen

Autistische Störungen sind tiefgreifende Entwicklungsstörungen, die phänotypisch ein breites Spektrum an neuropsychiatrischen Symptomen und Ausprägungen aufweisen (Schmitz und Rezaie 2008).

Die Kernsymptomatik autistischer Störungen stellen qualitative Beeinträchtigungen der wechselseitigen sozialen Interaktion und Kommunikation dar, welche mit einem restriktiven, stereotypen und repetitiven Verhalten einhergehen (siehe Abbildung 1) (Bölte 2009).

Der Schweregrad der jeweiligen Merkmale kann dabei unterschiedlich stark

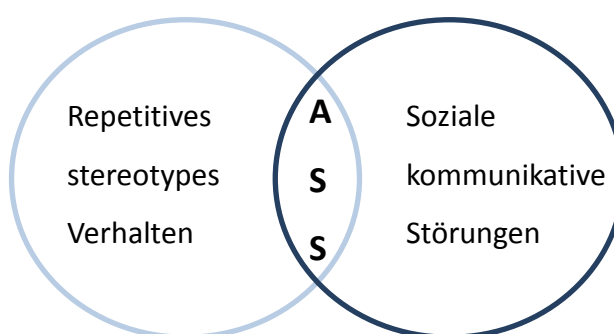
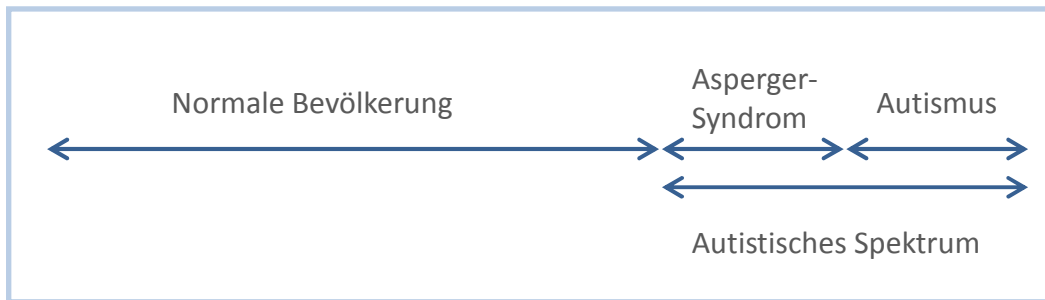


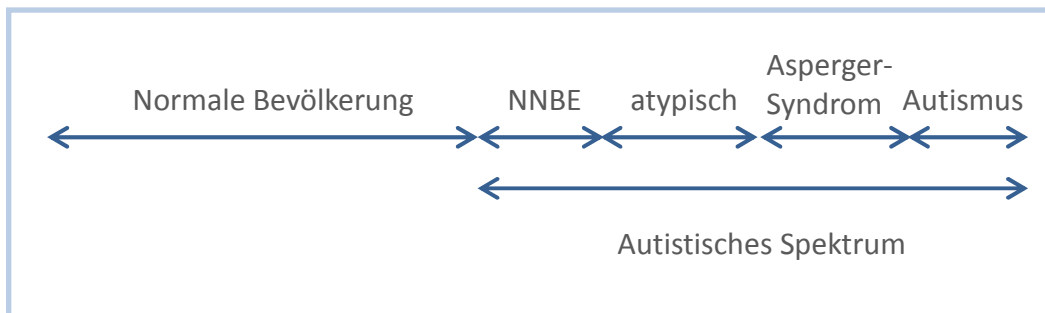
Abbildung 1: Autistisches Spektrum nach Baron-Cohen

ausgeprägt sein, was zur Vielfalt und zum Facettenreichtum autistischer Störungen führt (Remschmidt und Kamp-Becker 2007). Der Begriff „Autismus-Spektrum-Störungen“ (ASS) beinhaltet dabei auch mildere Varianten und nicht näher bezeichnete Entwicklungsstörungen mit autistischen Symptomen (siehe Abbildung 2).

A Interpretation des Begriffs „autistisches Spektrum“ 1990
nach Baron-Cohen



B Erweiterung des autistischen Spektrums Mitter der 1990er
nach Baron-Cohen



NNBE = nicht näher bezeichnete Entwicklungsstörung

Abbildung 2: Interpretation und Erweiterung des autistischen Spektrums

Eine Einteilung der ASS innerhalb der tiefgreifenden Entwicklungsstörungen wird in den Klassifikationssystemen „Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th Edition“ (DSM-IV) der American Psychiatric Association und ICD-10 der Weltgesundheitsorganisation (WHO) vorgenommen (Schmitz und Rezaie 2008). Die Klassifikationen orientieren sich dabei neben den Kernsymptomen in den Bereichen „Kommunikation“, „soziale Interaktion“ und „restriktive, stereotype Verhaltensweisen“ zusätzlich an weiteren Faktoren wie beispielsweise dem Manifestationsalter. So gilt in der ICD-10 für die Diagnosestellung des frühkindlichen Autismus (F84.0), dass eine Entwicklungsstörung vor dem dritten Lebensjahr beobachtet worden sein muss (Bölte 2009). Charakteristischerweise liegt eine Sprachentwicklungsstörung oder ein Ausbleiben der Sprache vor. Zusätzlich werden in der ICD-10 eine Vielzahl unspezifischer Probleme wie Phobien, Schlaf- und Essstörungen, Wutausbrüche und

(autodestruktive) Aggression als Begleitsymptome genannt. Beim atypischen Autismus (F84.1) tritt eine Entwicklungsstörung nach dem dritten Lebensjahr auf und/oder es werden die diagnostischen Kriterien des frühkindlichen Autismus nicht in allen o. g. Kernbereichen erfüllt (Bölte 2009). Autistische Verhaltensweisen in der sozialen Interaktion sowie restriktive und stereotype Verhaltensweisen, häufig in Form von Sonderinteressen, treten beim Asperger-Syndrom (F84.5) auf. Die kognitive und sprachliche Entwicklung verläuft dagegen unauffällig (Bölte 2009). Nach der ICD-10 werden noch das Rett-Syndrom (F84.2), andere desintegrative Störungen des Kindesalters (F84.3) und die überaktive Störung mit Intelligenzminderung und Bewegungsstereotypien (F84.4) zu den tiefgreifenden Entwicklungsstörungen gezählt. Allgemein gilt, dass die Diagnose einer ASS nur vergeben werden darf, wenn das klinische Erscheinungsbild keiner anderen tiefgreifenden Entwicklungsstörung oder psychischen Störung zugeordnet werden kann (Bölte 2009).

In der DSM-IV wurden noch die „autistische Störung“, das „Asperger-Syndrom“, die „desintegrative Störung im Kindesalter“ und die „nicht näher bezeichnete

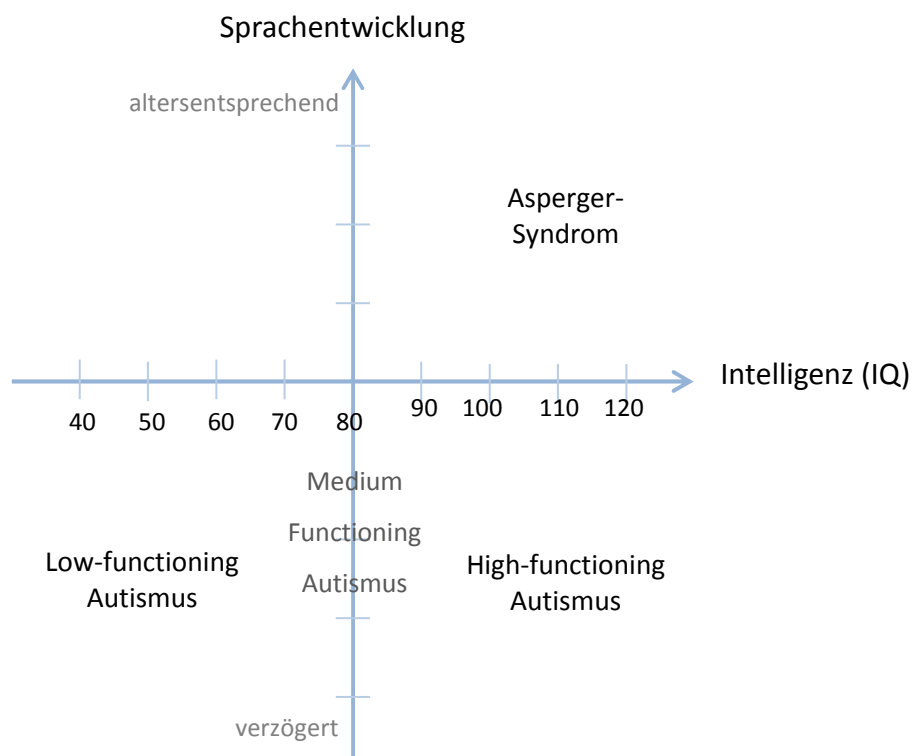


Abbildung 3: Klassifikation verschiedener Autismus-Formen

nach Baron-Cohen (2008)

tiefgreifende Entwicklungsstörung“ unterschieden (American Psychiatric Association 2000) (Bölte 2009). Als Neuerung in den DSM-V werden die unterschiedlichen Kategorien tiefgreifender Entwicklungsstörungen durch den Begriff „Autismus-Spektrum-Störungen“ ersetzt und somit dem Spektrumcharakter autistischer Störungen Rechnung getragen (www.dsm5.org). Die DSM-V berücksichtigt auch eine mögliche Komorbidität von ASS und ADHS.

Ergänzt wird die Einteilung der ASS durch eine Kategorisierung anhand von Intelligenzquotient und Sprachverzögerung (siehe Abbildung 3). Entsprechend des Intelligenzniveaus spricht man entweder von „High-versus-Low-functioning-Autismus“ oder von „High-, Medium- und Low-Functioning Autismus“, wobei der High-Functioning Autismus durch einen Intelligenzquotienten (IQ) > 85 in Kombination mit einer sprachlichen Entwicklungsverzögerung definiert wird. Bei IQ-Werten zwischen 71 und 84 mit oder ohne sprachlicher Entwicklungsverzögerung besteht ein „Medium-Functioning Autismus“ (MFA). Dasselbe gilt bei dem „Low-Functioning Autismus“ (LFA) für Intelligenzwerte < 70 (Baron-Cohen 2008).

1.2.2 Komorbide Störungen bei ASS

Neben einer autistischen Störung können häufig komorbide neuropathologische oder psychische Störungen beobachtet werden. Bei schätzungsweise 10% der autistischen Patienten besteht ein Zusammenhang mit anderen genetischen Neuropathologien, wie z.B. dem „Fragilen X-Syndrom“ (Polleux und Lauder 2004). Außerdem sind Intelligenzminderung, epileptische Anfälle sowie Makrozephalie und Enzephalomegalie mit Autismus assoziiert (Tuchman 2003).

Eine der häufigsten psychiatrischen Komorbiditäten bei autistischen Kindern im Vorschul- und Grundschulalter ist die ADHS (Ghaziuddin, Weidmer-Mikhail et al. 1998; Goldstein und Schwebach 2004; Lee und Ousley 2006; Bölte 2009). Autistische Patienten, die an einer klinisch relevanten Aufmerksamkeitsstörung litten, zeigten in einer Studie von Holtmann et al. höhere Werte im autismusspezifischen Diagnoseverfahren „Diagnostisches Interview für Autismus, revidiert“ (Autism Diagnostic Interview-Revised, ADI-R; Lord, Rutter et al. 1994). Dies könnte für eine stärkere Ausprägung der ASS bei komorbider ADHS sprechen (Holtmann, Bölte et al. 2005; Holtmann, Bölte et al. 2007; Bölte 2009).

Weitere Begleitsymptome im Vorschulalter können eine Verzögerung der Sauberkeitsentwicklung, Schlaf-, Ess- und Regulationsstörungen sowie auto- und fremdaggressives Verhalten sein. Im Schulalter spielen komorbides oppositionelles Verhalten sowie Lernstörungen und Tic-Symptomatiken eine entscheidende Rolle. Im späteren Jugend- oder Erwachsenenalter entwickeln Menschen mit ASS häufig Ängste, Zwänge oder Essstörungen. Durch eine kognitive und soziale Überforderung können akute Belastungssituationen auftreten (Deutsche Gesellschaft für Kinder- und Jugendpsychiatrie 2007; Bölte 2009).

2. Forschungsstand

2.1 Neurobiologische Forschung bei ASS

2.1.1 Ätiopathophysiologische Faktoren der ASS

Bisherige Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei Autismus um eine neuronale Entwicklungsstörung handelt mit prä-, peri- bzw. postnatalem Ursprung (Remschmidt und Kamp-Becker 2007). Es lassen sich bei autistischen Patienten anhand unterschiedlichster Verfahren hirnstrukturelle, neurochemische und hirnfunktionelle Abweichungen im Vergleich zu gesunden Kontrollen feststellen (Schmitz und Rezaie 2008).

Zwillings- und Familienstudien belegen einen starken genetischen Einfluss auf die Entstehung autistischer Störungen. Unter monozygoten Zwillingen wird die Konkordanzrate für Autismus auf 70 - 90% geschätzt, wohingegen sie unter dizygoten Zwillingen zwischen 0 - 10% liegt (Veenstra-Vanderweele, Cook et al. 2003; Veenstra-Vanderweele und Cook 2004; Nickl-Jockschat und Michel 2011). Dabei scheint nicht nur eine einzelne Genvariante die Entstehung autistischer Störungen zu begünstigen, sondern beim sog. „idiopathischen Autismus“ eine Vielzahl von Genen und deren Interaktionen mit Umweltfaktoren (Schmitz und Rezaie 2008). Letztere umfassen beispielsweise die pränatale Exposition mit Noxen wie Thalidomid oder Natriumvalproat, Schwangerschaftskomplikationen wie Infektionen oder Hypoxie, sowie prä- und postnatale Gehirnschädigung (Tierney, Nwokoro et al. 2001; Bandim, Ventura et al. 2003; Kolevzon, Gross et al. 2007; Nickl-Jockschat und Michel 2011).

Ein vielfach bestätigter klinischer Untersuchungsbefund bei autistischen Patienten stellt die Makrozephalie dar (Nickl-Jockschat und Michel 2011). In der Regel fällt der vergrößerte Kopfumfang im Alter von 18 Monaten auf. Dabei können in etwa zeitgleich erste autistische Verhaltensweisen beobachtet werden (Kemper und Bauman 2002). Besonders im Frontallappen scheint der Anteil grauer wie auch weißer Hirnsubstanz im frühen Kindesalter erhöht zu sein (Baron-Cohen 2008). Grund hierfür könnte ein unzureichender Abbau von Neuronen („Pruning“) sein, der üblicherweise zu dieser Zeit erfolgt (Bölte und Poustka 2006). Auch die veränderten Minikolumnen im Großhirn, die sich durch eine erhöhte Zellzahl bei abnormer Synapsenbildung auszeichnen, könnten für das vergrößerte Hirnvolumen mitverantwortlich sein (Casanova, van Kooten et al.

2006; Bölte 2009). Im weiteren Entwicklungsverlauf zeigen autistische Kinder typischerweise eine Verlangsamung des Kopfwachstums (Courchesne 2004).

Weitere strukturelle und funktionelle Abweichungen finden sich im limbischen System, im Kleinhirn sowie im Hirnstamm (Polleux und Lauder 2004; Schmitz und Rezaie 2008).

Im limbischen System, welches für die Verarbeitung von Emotions- und Gedächtnisabläufen essentiell ist, wurde von verkleinerten Neuronen bei erhöhter Nervenzelldichte berichtet (Kemper und Baumann 2002); ein Bild, das so normalerweise in einem frühen Stadium der Hirnentwicklung zu beobachten ist. Für die Pathophysiologie des Autismus könnte diese anatomische Veränderung insofern relevant sein, als dass ein klinisches Korrelat einer emotionalen Beeinträchtigung bei autistischen Patienten besteht (Kemper und Bauman 2002).

Des Weiteren ist eine verminderte Anzahl von Purkinje-Zellen im Kleinhirn ein wiederholt beschriebener Befund bei autistischen Patienten jeden Alters (Kemper und Bauman 2002). Purkinje-Zellen haben aufgrund ihrer GABAergen Wirkung eine inhibitorische Funktion, die zur Feinabstimmung und Koordination von Bewegungsabläufen dient (Baron-Cohen 2008). Ein direktes klinisches Korrelat lässt sich von diesen Befunden nicht ableiten, wobei viele autistische Patienten jedoch in ihrer Motorik und Koordination auffällig sind (Kemper und Bauman 2002; Dewey, Cantell et al. 2007; Dziuk, Gidley Larson et al. 2007; Bölte 2009). Eine Hypoplasie von Hirnstammkernen sowie anderer Hirnstammstrukturen wurde in einigen Studien zu ASS beschrieben (Hashimoto, Tayama et al. 1995; Rodier, Ingram et al. 1996).

Auf neurochemischer Ebene ließ sich bei jüngeren autistischen Patienten ein erhöhter Plasma-GABA-Spiegel nachweisen (Dhossche, Applegate et al. 2002). Außerdem wurde in einer Reihe von Studien eine Hyperserotoninämie als auffälliger Befund in peripherem Gewebe bei autistischen Patienten bestätigt (Hanley, Stahl et al. 1977; Ciaranello 1982).

2.1.2 Neurotrophe Faktoren als pathophysiologische Kandidaten der ASS

„Neurotrophine“ oder „neurotrophe Faktoren“ leisten einen erheblichen Beitrag zur Entwicklung sowie Aufrechterhaltung der Plastizität des zentralen Nervensystems (ZNS). Es handelt sich dabei um Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 13

und 27 kDa (Seidah, Benjannet et al. 1996; Seidah, Benjannet et al. 1996), welche mit niedriger Affinität an den p75-Rezeptor und mit höherer Affinität an Tyrosinkinase-Rezeptoren binden (Nickl-Jockschat und Michel 2011).

In einer Vielzahl von Studien sind sie als potenzielle Kandidaten für die Ätiopathophysiologie der ASS diskutiert worden (Maisonpierre, Belluscio et al. 1990; Airaksinen, Titievsky et al. 1999; Riikonen und Vanhala 1999; Nelson, Grether et al. 2001; Miyazaki, Narita et al. 2004; Connolly, Chez et al. 2006; Hashimoto, Iwata et al. 2006; Nelson, Kuddo et al. 2006; Nishimura, Nakamura et al. 2007; Nickl-Jockschat und Michel 2011). Insbesondere die sogenannte „Neurotrophin-Familie“, zu welcher der „Nerve Growth Factor“ (NGF), BDNF und die Neurotrophine 3 bis 6 gehören, reguliert die Zellproliferation, -migration und Apoptose während der ZNS-Entwicklung. Sie moduliert außerdem das Aussprossen axonaler und dendritischer Verbindungen, die Synapsenbildung sowie weitere neuroplastische Prozesse (Avital, Goshen et al. 2003; Nickl-Jockschat und Michel 2011). Folglich besteht die Möglichkeit, dass oben beschriebene hirnstrukturelle und neurochemische Auffälligkeiten bei Menschen mit ASS durch eine Dysregulation neurotropher Faktoren während der frühen Gehirnentwicklung mitbedingt sein könnten.

Diese Studie widmet sich speziell der Bedeutung von BDNF hinsichtlich ASS. BDNF wird in kortikalen und hippocampalen Strukturen hoch exprimiert und mit dem Erhalt und der Funktion neuronaler Verbände in Zusammenhang gebracht (Bekinschtein, Cammarota et al. 2008; Mansour, Mohamed et al. 2010). Dieser neurotrophe Faktor ist auch in peripherem Gewebe nachzuweisen (Fujimura, Altar et al. 2002). BDNF koordiniert das Überleben und die Differenzierung dopaminerger und serotonerger Neurone während der Hirnentwicklung und wirkt bei der Bildung und Plastizität von Synapsen mit (Anderson 2002; Binder und Scharfman 2004; Lang, Stein et al. 2007; Mansour, Mohamed et al. 2010). In Ergänzung zu der in 2.1.1 genannten vielfach bestätigten Hyperserotoninämie bei autistischen Patienten ist zu erwähnen, dass die Infusion bzw. Applikation von BDNF im Tiermodell bzw. *in vitro* das Überleben und die Reifung serotonerger Neurone moduliert. Zudem steigert es die Synthese von Serotonin *in vivo* (Altar, Boylan et al. 1994; Martin-Iverson, Todd et al. 1994; Siuciak, Boylan et al. 1996).

Tierexperimentell zeigten heterozygote *BDNF*-Knock-out Mäuse, deren BDNF-Gehalt um die Hälfte reduziert war, diverse Auffälligkeiten. Der Mangel an BDNF führte zu einer gesteigerten Aggressivität und Ängstlichkeit. Außerdem konnten eine Hyperaktivität sowie eine Lern- und Gedächtnisschwäche beobachtet werden (Chao 2003). BDNF bewirkt eine Langzeitpotenzierung in hippocampalen Neuronen, welche für Lern- und Gedächtnisprozesse essentiell ist und die bei einer BDNF-Dysregulation gestört ist (Korte, Carroll et al. 1995; Xie, Sayah et al. 2000; Nickl-Jockschat und Michel 2011). Auch Assoziationsstudien lassen einen Einfluss von BDNF-Genvarianten auf die Aktivierung des Hippocampus und die Gedächtnisleistung annehmen (Egan, Kojima et al. 2003; Richter-Schmidinger, Alexopoulos et al. 2011). Unter wiederholter Stressexposition und Einnahme von Antidepressiva ließ sich ein modulatorischer Effekt von BDNF auf die Neurogenese beobachten (Chen, Dowlatshahi et al. 2001; D'Sa und Duman 2002).

Eine Dysregulation und etwaige pathophysiologische Bedeutung von BDNF wurde bisher bei einigen neurologischen und psychiatrischen Korrelaten und Störungen wie dem fragilen X-Syndrom, Epilepsie, Parkinson, Alzheimer, Schizophrenie, Depression und Persönlichkeitsmerkmalen diskutiert (Binder und Scharfman 2004; Hashimoto, Shimizu et al. 2004; Pezet und Malcangio 2004; Angelucci, Brene et al. 2005; Hunnerkopf, Strobel et al. 2007; Pandey, Dwivedi et al. 2010).

2.2 Methodischer Forschungsstand

2.2.1 Diagnostik der ASS

Die Standarddiagnostik von autistischen Störungen sollte generell eine körperlich-neurologische (inkl. EEG und einmalig cMRT), ggf. eine genetische/ Stoffwechsel- sowie eine psychodiagnostische Untersuchung umfassen (Bölte 2009). Psychodiagnostisch bedarf es neben einer Erfassung des Entwicklungs- und Intelligenzniveaus einer symptomorientierten Befragung der Eltern bzw. Bezugspersonen sowie einer strukturierten Verhaltensbeobachtung (Deutsche Gesellschaft für Kinder- und Jugendpsychiatrie 2007). Als Screening-Verfahren kann der „Fragebogen zur sozialen Kommunikation (FSK)“ (Rutter, Bailey et al. 2003; Bölte und Poustka 2006) oder die „Marburger Beurteilungsskala zum Asperger-Syndrom (MBAS)“ (Kamp-Becker, Matthejat et al. 2005; Remschmidt und Kamp-Becker 2006)

genutzt werden. Als Goldstandard zur Diagnosesicherung werden das o.g. ADI-R (Lord, Rutter et al. 1994; Bölte, Rühl et al. 2006) sowie die „Diagnostische Beobachtungsskala für autistische Störungen“ (Autism Diagnostic Observation Schedule, ADOS; Lord, Rutter et al. 1989; Rühl, Bölte et al. 2004) herangezogen (Deutsche Gesellschaft für Kinder- und Jugendpsychiatrie 2007).

In der vorliegenden Untersuchung wurden alle autistischen Patienten von einem erfahrenen Kinder- und Jugendpsychiater nach ICD-10-Kriterien und unter Einbezug der Ergebnisse aus o.g. leitlinienbasierten Untersuchungen diagnostiziert. Die ASS-Diagnose wurde durch ADI-R und ADOS erhärtet.

2.2.2 Messung der Expression von Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)

Eine direkte Messung der BDNF-Wirkung auf die Gehirnentwicklung ist derzeit nicht möglich (Sullivan, Fan et al. 2006). Anhand von Assoziationsstudien, Tiermodellen und der Messung des peripheren BDNF-Gehaltes in Serum bzw. Lymphozyten gelingt es jedoch, sich einer möglichen zentralen BDNF-Dysregulation indirekt zu nähern (Nishimura, Nakamura et al. 2007; Nickl-Jockschat und Michel 2011). Der Befund einer im Durchschnitt 50%-igen Korrelation zwischen der Expression relevanter Genklassen in ZNS und Blut lässt auch eine periphere Messung des zentral wirkenden neurotrophen Faktors - zur Annäherung an zentralnervöse Prozesse - sinnvoll erscheinen (Sullivan, Fan et al. 2006). Auch konnte tierexperimentell eine positive Korrelation zwischen BDNF-Konzentrationen in Serum und Kortex bei Ratten nachgewiesen werden (Karege, Schwald et al. 2002). Bei menschlichen Versuchsteilnehmern ähnelte der Verlauf der BDNF-Serumkonzentration während der Entwicklung demjenigen von Neurotrophen im Neokortex bei Ratten (Nelson, Kuddo et al. 2006; Katoh-Semba, Wakako et al. 2007).

Für die Quantifizierung der BDNF-Serumkonzentration wurde in dieser Forschungsarbeit ein ELISA verwendet, das als einfaches, sehr sensitives und relativ kostengünstiges Verfahren zur Bestimmung eines zu untersuchenden Antigens bzw. Antikörpers etabliert ist (Rosenqvist, Kayhty et al. 2001). Für die schnelle und vollautomatisierte Quantifizierung der Genexpression auf mRNA-Ebene wurde qRT-PCR eingesetzt, welche die Schritte der klassischen PCR direkt mit der PCR-Produkt-

Detektion und -Quantifizierung verbindet (Huggett, Dheda et al. 2005; Nolan, Hands et al. 2006; Bustin, Benes et al. 2009).

Bisherige Studienergebnisse zu einer möglichen BDNF-Dysregulation bei ASS sind uneinheitlich. So zeigen einige Untersuchungen eine signifikante Erhöhung der peripheren BDNF-Expression autistischer Patienten (Nelson, Grether et al. 2001; Miyazaki, Narita et al. 2004; Connolly, Chez et al. 2006; Nishimura, Nakamura et al. 2007), andere berichten von einem signifikant erniedrigten Wert (Hashimoto, Iwata et al. 2006; Al-Ayadhi 2011) und dritte von keinem signifikanten Unterschied (Croen, Goines et al. 2008) im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Unzureichend altersangepasste Kontrollen (Miyazaki, Narita et al. 2004) sind beispielsweise ein Grund, bisherige Studienergebnisse durch die vorliegende Arbeit zu ergänzen. Uneinheitlich sind auch die angewandten diagnostischen Methoden. So werden zum großen Teil die o. g. autismspezifischen Goldstandards ADOS und ADI-R, die entscheidend zur Validität der ASS-Diagnosestellung beitragen, nicht eingesetzt.

Weitere Studien zur peripheren Expression von BDNF sind deshalb notwendig, um unter Berücksichtigung eines geeigneten Studiendesigns und einer Leitlinienorientierten Diagnostik Aufschluss über eine etwaige BDNF-Dysregulation bei ASS zu gewinnen.

2.3 Zusammenfassung

ASS sind nach heutigem Wissensstand auf eine neuronale Entwicklungsstörung zurückzuführen, die ihren Ursprung prä-, peri- bzw. postnatal nimmt und wesentlich genetisch beeinflusst ist (Veenstra-Vanderweele, Cook et al. 2003; Veenstra-Vanderweele und Cook 2004; Remschmidt und Kamp-Becker 2007; Schmitz und Rezaie 2008; Nickl-Jockschat und Michel 2011). Klinisch zeichnen sie sich durch qualitative Störungen der Kommunikation, der wechselseitigen sozialen Interaktion sowie durch repetitive Verhaltensweisen aus (Bölte 2009). Anhand einer Vielzahl von Studien konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Hirnregionen (Kortex, Amygdala, Zerebellum und Hirnstamm) bei Menschen mit ASS morphologische bzw. zytoarchitektonische und funktionelle Auffälligkeiten zeigen (Kemper und Bauman 2002; Polleux und Lauder 2004; Baron-Cohen 2008; Schmitz und Rezaie 2008).

BDNF als wichtiger Vertreter der neurotrophen Faktoren wird sowohl im ZNS als auch im peripheren Blut exprimiert und beeinflusst die neuronale Entwicklung und Plastizität (Anderson 2002; Fujimura, Altar et al. 2002; Binder und Scharfman 2004; Bekinschtein, Cammarota et al. 2008; Mansour, Mohamed et al. 2010). Für Genvarianten von BDNF wurden in molekulargenetischen Studien bereits Assoziationen mit ASS beschrieben und abnorm exprimierte Proteinkonzentrationen im Blut von Patienten gemessen (Nelson, Grether et al. 2001; Miyazaki, Narita et al. 2004; Nishimura, Nakamura et al. 2007). Um sich einer etwaigen zentralen BDNF-Dysregulation bei ASS anzunähern, wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit die periphere BDNF-Expression auf mRNA- und Proteinebene gemessen und der Einfluss möglicher Faktoren (wie Alter, Komorbidität, Medikation) auf die periphere BDNF-Konzentration erhoben. Eine Messung der Expression im Blut scheint u.a. sinnvoll und zulässig, da bereits eine durchschnittlich 50%-ige Korrelation der Expression relevanter Genklassen zwischen ZNS und Blut nachgewiesen werden konnte (Sullivan, Fan et al. 2006). Aufgrund einer ätiologischen und phänotypischen Überlappung der Störungsbilder ASS und ADHS (Rommelse, Franke et al. 2012, Taurines, Schwenck et al. 2012), wurden auch Patienten mit einer ADHS als klinische Kontrollgruppe eingeschlossen, um die Spezifität der Befunde zu untersuchen.

2.4 Fragestellung und Hypothesen

Fragestellung:

Zeigt die Expression von BDNF in peripherem Gewebe bei Kindern und Jugendlichen mit ASS eine Dysregulation und/oder eine Modulation durch komorbide Störungen sowie weitere Kovariaten, wie beispielsweise das Alter der Probanden?

Hypothese 1: Kinder und Jugendliche mit ASS zeigen im Vergleich zu abgestimmten Kontrollpersonen eine modulierte BDNF-Expression im Blut.

Hypothese 2: Die Ausprägung des autistischen Phänotyps, komorbide Störungen sowie weitere Kofaktoren beeinflussen die BDNF-Expression im Blut.

3. Material und Methodik

3.1 Material

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen von unterschiedlichen Studien zu ASS an der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie der Universität Würzburg in der Zeit von 2005 bis 2011. In weiteren Teilprojekten erfolgten neuropsychologische sowie psycho- und elektrophysiologische Untersuchungen wie beispielsweise eine Riechstudie. Unterstützt wurde die vorliegende Arbeit von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG HU-1536).

3.1.1 Stichproben

Mit Genehmigung der lokalen Ethikkommission Würzburg (Studiennummern 8/06 und 227/09) wurden insgesamt 40 Kinder und Jugendliche mit einer nach ICD-10 Kriterien diagnostizierten ASS, sowie 15 Kinder und Jugendliche mit einer ADHS und zusätzlich 35 gesunde Kontrollen an der Kinder- und Jugendpsychiatrie des Universitätsklinikums in Würzburg im Zeitraum von 2005 bis 2011 für die vorliegende Arbeit eingeschlossen. Zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie befanden sich die Patienten in ambulanter oder in (teil-)stationärer Behandlung. Eltern und Kinder gaben nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung über Zielsetzung und Ablauf der Studie ihr schriftliches Einverständnis ab. Das Altersspektrum erstreckte sich von 6 bis 18 Jahren.

3.1.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Die Diagnose einer ASS bzw. ADHS wurde anhand der ICD-10 Kriterien durch eine/n erfahrene/n Kinder- und Jugendpsychiater/in der Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie des Universitätsklinikums in Würzburg erhoben. Bestätigt wurde die Diagnose einer ASS durch FSK (Rutter, Bailey et al. 2003; Bölte und Poustka 2006), ADOS (Lord, Rutter et al. 1989; Rühl, Bölte et al. 2004) und ADI-R (Lord, Rutter et al. 1994; Bölte, Rühl et al. 2006). Die Diagnose einer ADHS wurde durch elterliche Beurteilung mittels des FBB-ADHS erhärtet (Döpfner 2008). Von der Studie ausgeschlossen wurden Kinder und Jugendliche mit schweren somatischen oder neurologischen Störungen oder Schizophrenie oder wenn kein schriftliches Einverständnis zur Studienteilnahme vorlag.

Als gesunde Kontrollen wurden Kinder und Jugendliche mit abgestimmtem Alter und Geschlecht rekrutiert. Als „Autismus-unauffällig“ galten all diejenigen, die unauffällige Werte in der Child Behavior Check List (CBCL) (Achenbach und Edelbrock 1981) hatten. Ausgeschlossen wurden sie im Falle somatischer oder neurologischer Erkrankungen, Medikamenteneinnahme sowie Werten oberhalb der Cut-Offs in den verwendeten Fragebögen.

3.1.1.2 Ablauf des Einschlussverfahrens zur Studienteilnahme

Nach Diagnosestellung einer ASS bzw. ADHS inkl. einer Intelligenzdiagnostik und bei den Patienten mit ASS der Anwendung o.g. autismspezifischer Verfahren, wurden die Eltern bzw. Sorgeberechtigten der Kinder und Jugendlichen sowie die Patienten selbst nach ihrem Interesse zur Studienteilnahme gefragt. Bei Interesse wurden Eltern und Kind die Einverständniserklärungen zur Studienteilnahme ausgehändigt und erklärt und das schriftliche Einverständnis eingeholt. Anschließend wurden die studienrelevanten Testfragebögen zum Ausfüllen ausgehändigt und ein Termin für eine Nüchternblutentnahme mit dem Kind bzw. Jugendlichen vereinbart.

3.1.1.3 Stichprobe 1: Patienten mit ASS und gesunde Kontrollen

Die erste Stichprobe umfasst 24 autistische Patienten mit einem Durchschnittsalter von $13,9 \pm 3,0$ Jahren (Altersspektrum 8,2 - 18,0) und 20 gesunde Kontrollprobanden mit einem Durchschnittsalter von $14,4 \pm 2,1$ (Altersspektrum 8,7 - 17,2). Es bestand kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Alters ($T = -0,65$, $df = 42$, $p = 0,522$). 14 der 24 (58,3%) autistischen Kinder waren klinisch mit einer ADHS diagnostiziert. 21 der 24 Patienten (87,5%) wurden medikamentös behandelt, hauptsächlich mit Psychostimulanzien. 58,3% der autistischen Kinder zeigten in der Begabungsdiagnostik eine durchschnittliche Intelligenz, 16,7% eine überdurchschnittliche und 25% eine niedrige bzw. unterdurchschnittliche Intelligenz. Genauere demographische Daten wie ASS-Subtypen, Komorbidität sowie Ergebnisse eingesetzter Testverfahren sind Tabelle 1 zu entnehmen. Einzelheiten zu den gesunden Kontrollen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 1: Stichprobe 1 - Charakterisierung des autistischen Patientenkollektivs

Autistische Patienten		
Geschlecht männlich		24
(Durchschnitts-)Alter in Jahren \pm S.D.		13,9 \pm 3,0
ASS ICD-10 Diagnosen (n, %)		
F84.0	Frühkindlicher Autismus	3 (12,5%)
F84.1	Atypischer Autismus	8 (33,3%)
F84.5	Asperger Syndrom	13 (54,2%)
Komorbidität ICD-10 Diagnosen (n, %)		18 (75%)
F31.3	Bipolare affektive Störung, gegenwärtig leichte oder mittelgradige depressive Episode	1 (4,2%)
F42.2	Zwangsgedanken und -handlungen, gemischt	1 (4,2%)
F80.0/ F81.1	Artikulationsstörung/ Isolierte Rechtschreibstörung	2 (8,3%)
F82/ F83	Umschriebene Entwicklungsstörung der motorischen Funktionen/ Kombinierte umschriebene Entwicklungsstörungen	2 (8,3%)
F90.0/ 90.1	Einfache Aktivitäts- und Aufmerksamkeitsstörung/ Hyperkinetische Störung des Sozialverhaltens	14 (58,3%)
F93	Emotionale Störungen des Kindesalters	1 (4,2%)
F94.0	Elektiver Mutismus	1 (4,2%)
F95	Ticstörungen	2 (8,3%)
F98.0/F98.1	Nichtorganische Enuresis/ Enkopresis	2 (8,3%)
Psychopharmakologische Komedikation (Patienten, n, %)		21 (87,5%)
	Psychostimulanzien	13 (54,2%)
	Neuroleptika	3 (12,5%)
	Antidepressiva	2 (8,3%)
	Andere	1 (4,2%)
Autistischer Phänotyp (Score \pm S.D.)		
	FSK (Untergruppe von n = 15)	19,7 \pm 6,3
	ADOS Summe der Items aus Kommunikation und Sozialer Interaktion (Autismus Cut-Off = 10, ASS = 7)	12,1 \pm 4,3
	ADI-R	
	ADI-R Soziale Interaktion (Cut-Off = 10)	19,9 \pm 7,5
	ADI-R Kommunikation und Sprache (Cut-Off für sprechende Kinder = 8)	15,0 \pm 4,5
	ADI-R Repetitive und stereotype Verhaltensweisen (Cut-Off = 3)	6,1 \pm 3,1
	ADI-R abnormes Verhalten vor 3. Lebensjahr (Cut-Off = 1)	2,9 \pm 1,5
IQ (Score \pm S.D.) (n, %)		95,1 \pm 14,7
	115 – 129	4 (16,7%)
	85 – 114	14 (58,3%)
	70 – 84	6 (25%)

Tabelle 2: Stichprobe 1 - Charakterisierung der gesunden Kontrollprobanden

Gesunde Kontrollen	
Geschlecht männlich	20
(Durchschnitts-)Alter in Jahren \pm S.D.	14,4 \pm 2,1
Verhaltensspezifischer Elternfragebogen	
CBCL gesamt-T-Wert, Mittelwert \pm S.D.	50,7 \pm 6,9
CBCL T-Wert internalisierend, Mittelwert \pm S.D.	49,6 \pm 7,6
CBCL T-Wert externalisierend, Mittelwert \pm S.D.	51,9 \pm 6,2

3.1.1.4 Stichprobe 2: Patienten mit ASS, Patienten mit Aufmerksamkeitsdefizit-/ Hyperaktivitätsstörung (ADHS) und gesunde Kontrollen

Für Stichprobe 2 wurden 16 Kinder und Jugendliche mit einer ASS rekrutiert, die ein Durchschnittsalter von $10,8 \pm 2,2$ Jahren und ein Altersspektrum von 6,7 bis 14,3 Jahren aufwiesen. Als klinische Kontrollgruppe wurden 15 Kinder und Jugendliche mit einer ADHS eingeschlossen mit einem Durchschnittsalter von $11,8 \pm 2,2$ Jahren und einem Altersspektrum von 8,2 bis 14,9 Jahren. Die gesunde Kontrollgruppe bestand aus 15 Kindern und Jugendlichen mit einem Durchschnittsalter von $12,1 \pm 2,2$ und einem Altersspektrum von 7,2 bis 14,9 Jahren.

Bei den ADHS-Patienten wurde noch eine Untergruppe gebildet aus Kindern und Jugendlichen bei denen zweimal eine Nüchternblutentnahme erfolgte (einmal ohne und einmal mit Stimulanzienmedikation). Für Einzelheiten bezüglich Diagnosen, Komorbidität, Medikation, Intelligenzwerte und Testergebnisse siehe Tabelle 3, 4 und 5.

Tabelle 3: Stichprobe 2 - Charakterisierung des autistischen Patientenkollektivs

Autistische Patienten		
Geschlecht männlich		16
Alter in Jahren (Mittelwert \pm S.D.)		10,8 \pm 2,2
ASS ICD-10 Diagnosen (n, %)		
F84.0	Frühkindlicher Autismus	5 (31,3%)
F84.1	Atypischer Autismus	6 (37,5%)
F84.5	Asperger Syndrom	5 (31,3%)
Komorbidität - ICD-10 Diagnosen (n, %)		14 (87,5%)
F40.2	Spezifische (isolierte) Phobien	1 (6,3%)
F42	Zwangsstörung	1 (6,3%)
F81/ 82/ 83	Umschriebene Entwicklungsstörungen	4 (25%)
F90.0/ 90.1	Einfache Aktivitäts- und Aufmerksamkeitsstörung/ Hyperkinetische Störung des Sozialverhaltens	12 (75%)
F93	Emotionale Störungen des Kindesalters	1 (6,3%)
F95	Ticstörungen	1 (6,3%)
F98.1	Nichtorganische Enkopresis	1 (6,3%)
F98.5	Stottern	1 (6,3%)
Psychopharmakologische Komedikation (Patienten: n, %)		13 (81,3%)
Psychostimulanzien		12 (75%)
Antidepressiva		3 (18,8%)
Neuroleptika		1 (6,3%)
Autistischer Phänotyp (Score \pm S.D.)		
FSK		19,0 \pm 5,1
ADOS Summe der Items aus Kommunikation und Sozialer Interaktion (Autismus Cut-Off = 10, ASS = 7)		13,7 \pm 4,0
ADI-R		
ADI-R Soziale Interaktion (Cut-Off = 10)		15,9 \pm 4,7
ADI-R Kommunikation und Sprache (Cut-Off für sprechende Kinder = 8)		11,5 \pm 4,0
ADI-R Repetitive und stereotype Verhaltensweisen (Cut-Off = 3)		4,9 \pm 2,6
ADI-R Abnorme Entwicklung vor dem 3. Lebensjahr (Cut-Off = 1)		3,0 \pm 0,6
MBAS Summe (Cut-Off = 103)		100,5 \pm 18,3
Komorbidie Symptomatik		
FBB ADHS Gesamtsumme, Mittelwert \pm S.D.		1,6 \pm 0,5
CBCL gesamt-T-Wert, Mittelwert \pm S.D.		68,6 \pm 7,7
CBCL T-Wert internalisierend, Mittelwert \pm S.D.		66,2 \pm 9,4
CBCL T-Wert externalisierend, Mittelwert \pm S.D.		64,3 \pm 8,9
IQ (Mittelwert \pm S.D.) (n, %)		94,0 \pm 15,0
115 – 129		3 (18,8%)
85 – 114		8 (50%)
70 – 84		5 (31,2%)

Tabelle 4: Stichprobe 2 - Charakterisierung des ADHS-Patientenkollektivs

ADHS Patienten		
Geschlecht männlich		15
Alter in Jahren (Mittelwert \pm S.D.)		11,8 \pm 2,2
ADHS ICD-10 Diagnosen (n, %)		
F90.0	Einfache Aktivitäts- und Aufmerksamkeitsstörung	13 (86,7%)
F98.8	Aufmerksamkeitsstörung ohne Hyperaktivität	2 (13,3%)
Komorbidität - ICD-10 Diagnosen (n, %)		
F43.2	Anpassungsstörungen	3 (20%)
F91	Störungen des Sozialverhaltens	10 (66,7%)
F93	Emotionale Störungen des Kindesalters	1 (6,7%)
F98.0/ 98.1	Nichtorganische Enuresis/ Enkopresis	7 (46,7%)
ADHS Phänotyp und komorbide Symptomatik		
FBB ADHS Gesamtsumme (Mittelwert \pm S.D.)		1,5 \pm 0,5
DIKJ Gesamt T-Wert (Mittelwert \pm S.D.)		48,1 \pm 9,8
CBCL Gesamt T-Wert (Mittelwert \pm S.D.)		65,5 \pm 5,6
CBCL T-Wert internalisierend (Mittelwert \pm S.D.)		61,8 \pm 10,8
CBCL T-Wert externalisierend (Mittelwert \pm S.D.)		63,0 \pm 4,1
IQ (Mittelwert \pm S.D.) (n, %)		
≥ 130		1 (6,7%)
115 – 129		2 (13,3%)
85 – 114		11 (73,3%)
70 – 84		1 (6,7%)

Tabelle 5: Stichprobe 2 - Charakterisierung der gesunden Kontrollprobanden

Gesunde Kontrollen		
Geschlecht männlich		15
Alter in Jahren (Mittelwert \pm S.D.)		12,1 \pm 2,2
Verhaltensspezifischer Elternfragebogen		
CBCL gesamt-T-Wert (Mittelwert \pm S.D.)		47,5 \pm 7,0
CBCL T-Wert internalisierend (Mittelwert \pm S.D.)		48,5 \pm 8,2
CBCL T-Wert externalisierend (Mittelwert \pm S.D.)		47,7 \pm 6,1
IQ (Mittelwert \pm S.D.)		
≥ 130		1 (6,7%)
115 – 129		4 (26,7%)
85 – 114		9 (60%)
70 – 84		1 (6,7%)

3.1.1.5 Messinstrumente zur Stichprobencharakterisierung

Folgende Testverfahren wurden im Rahmen der Autismus-Diagnostik und zur Abklärung etwaiger Komorbiditäten eingesetzt.

3.1.1.5.1 Diagnostisches Interview für Autismus-Revidiert (ADI-R)

Als Standardverfahren zur Erfassung und zur Differenzialdiagnostik von ASS in Klinik und Forschung gilt das diagnostische „Interview für Autismus – Revidiert (ADI-R)“. Dabei handelt es sich um eine standardisierte, umfassende Befragung der Eltern oder engsten Bezugspersonen des Patienten. Geeignet ist das ADI-R für Kinder ab einem Entwicklungsalter von zwei Jahren und für Erwachsene bei Verdacht auf Vorliegen einer ASS.

Mittels 93 Items und einleitenden Fragen bzgl. frühkindlicher Entwicklung (bis 36. Lebensmonat), Spracherwerb und möglichem Verlust von sprachlichen Fertigkeiten, verbalen und non-verbalen kommunikativen Fähigkeiten, Spiel- und sozialem Interaktionsverhalten, stereotypen Interessen und Aktivitäten sowie komorbiden Symptomen (Aggression, Selbstverletzung, Epilepsie) erlangt der Untersucher Informationen über eine etwaige ASS. Eine Differenzierung zwischen ASS und anderen psychiatrischen Störungen wird mit dem ADI-R ermöglicht. Außerdem kann zwischen den tiefgreifenden Entwicklungsstörungen untereinander unterschieden werden. Der Cut-Off Wert für Teil A „Qualitative Auffälligkeiten der reziproken sozialen Interaktion“ ergibt sich aus der Summe der Items zu A1 „Unfähigkeit, nichtverbales Verhalten zur Regulation sozialer Interaktionen zu verwenden“, A2 „Unfähigkeit, Beziehungen zu Gleichaltrigen aufzunehmen“, A3 „Mangel an geteilter Freude“ und A4 „Mangel an sozio-emotionaler Reziprozität“. Für die Sparte B „Qualitative Auffälligkeit der Kommunikation“ wird zwischen verbalen und nonverbalen Patienten unterschieden, was die Cut-Off-Werte für nonverbale Kinder bei 7 und für verbale bei 8 erklärt. Repetitives, restriktives und stereotypes Verhalten wird bei einem Cut-Off > 3 als gegeben interpretiert. Für eine abnorme Entwicklung bis einschließlich 36. Lebensmonat spricht ein Cut-Off > 1 (Kamp-Becker, Duketis et al. 2010; Autismus-Hamburg 2011; Hogrefe-Verlag 2011).

3.1.1.5.2 Diagnostische Beobachtungsskala für Autistische Störungen (ADOS)

Bei Verdacht auf eine autistische Störung oder auf andere tiefgreifende Entwicklungsstörungen dient die „Diagnostische Beobachtungsskala für Autistische Störungen“ (ADOS) als zuverlässige und valide Methode zur Beurteilung von Kommunikation, sozialer Interaktion sowie des Spielverhaltens oder des Fantasienspiels im Rahmen einer standardisierten Verhaltensbeobachtung. Unter Berücksichtigung von Alter und expressivem Sprachniveau bietet sie vier unterschiedliche Untersuchungsstrategien (Module) für Patienten ab dem zweiten Lebensjahr. Die Cut-Off-Werte variieren dabei für die Bereiche Kommunikation und soziale Interaktion (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Cut-Off Werte für ADOS Module

	Modul 1	Modul 2	Modul 3	Modul 4
Kommunikation	4 ; 2	5 ; 3	3 ; 2	3 ; 2
Soziale Interaktion	7 ; 4	6 ; 4	6 ; 4	7 ; 4
Summe Kommunikation und soz. Interaktion	12 ; 7	12 ; 8	10 ; 7	12 ; 7
	Autismus-Cut-Off-Wert; ASS-Cut-Off-Wert			

Als internationaler Goldstandard der Autismus-Diagnostik stimmt die durch die ADOS erhobene Diagnose zu 79% mit der des ADI-R überein. Die Konvergenz von ADOS und klinischer Konsensusdiagnose liegt bei 77%, bei einer Sensitivität des Verfahrens von 90,4% und einer Spezifität von 48,1% für die Diskrimination von Autismus und anderen autistischen Störungen (Rühl, Bölte et al. 2004; Autismus-Hamburg 2011; Hogrefe-Verlag 2011).

3.1.1.5.3 Fragebogen zur sozialen Kommunikation (FSK)

Der „Fragebogen zur sozialen Kommunikation“ (FSK) stellt ein Screeningverfahren im Rahmen der Autismus-Diagnostik dar. Er ist ein aus dem ADI-R abgeleiteter Elternfragebogen, der soziale Interaktion, Kommunikation und stereotypes Verhalten prüft (Duketis 2010). Gewählt wird in Abhängigkeit vom Alter des Patienten zwischen der „Lebenszeitfassung“, welche die gesamte Entwicklung berücksichtigt,

und der „Aktualfassung“, welche sich auf die vergangenen drei Monate bezieht. Der FSK dient der Ermittlung einer autistischen Störung im Allgemeinen. Eine Differenzierung der ASS-Subtypen ist nicht möglich (Mroczek 2011). Eine gute Stabilität, interne Konsistenz und eine konvergente Validität mit ADI-R, ADOS und MBAS werden gewährleistet (Bölte und Poustka 2006; Duketis 2010).

Ein für ASS sprechendes Ergebnis im FSK liegt bei einem Cut-Off Wert von 15 vor. Senkt man diesen Wert auf 12, erhöht sich die Sensitivität des Tests gerade für jüngere Patienten unter vier Jahren (Corsello, Hus et al. 2007; Snow und Lecavalier 2008; Kamp-Becker, Duketis et al. 2010).

3.1.1.5.4 Marburger Beurteilungsskala zum Asperger-Syndrom (MBAS)

Der Screening-Fragebogen „Marburger Beurteilungsskala zum Asperger-Syndrom“ (MBAS) für Kinder ab sechs Jahren und Erwachsene bis zum 24. Lebensjahr mit durchschnittlichen kognitiven Fähigkeiten gilt als ein zuverlässiges und diagnostisch stichhaltiges Verfahren zur Testung autistischer Störungen auf hohem Funktionsniveau. Anhand von 37 Fragen zur Beschreibung des aktuellen Verhaltens sowie 14 Fragen mit Bezug auf das Verhalten innerhalb des vierten bis fünften Lebensjahres erfolgt eine Einschätzung möglicher autistischer Merkmale. Dabei wird überwiegend die „Theory of Mind“ sowie das Kontakt- und Spielverhalten des Kindes beurteilt. Freude, Gestik und Mimik sind ebenfalls relevant genauso wie stereotypes und situationsinadäquates Verhalten. Außerdem wird auf die Motorik, den Sprachstil und Sonderinteressen des Kindes eingegangen. Für die Auswertung des Fragebogens werden die einzelnen Skalensummenwerte sowie eine Gesamtsumme der angegebenen Items gebildet (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: MBAS Cut-Off Werte

Theory of Mind, Kontakt und Spielverhalten	geteilte Aufmerksamkeit und Freude, Mimik, Gestik	stereotypes und situationsinadäquates Verhalten	auffälliger Sprachstil, Sonderinteressen, Motorik	Sprachentwicklungsverzögerung	Gesamt
38	21	20	16	ja/ nein	103

Die Verdachtsdiagnose Asperger-Syndrom ist angezeigt, wenn das ermittelte Gesamtergebnis über dem Cut-Off von 103 liegt und keine Sprachentwicklungsverzögerung vorliegt. Bei Sprachentwicklungsverzögerung und einem Wert über dem Cut-Off würde man einen HFA in Betracht ziehen (Kamp-Becker, Matthejat et al. 2005; Kamp-Becker und Remschmidt 2005).

3.1.1.5.5 Fremdbeurteilungsbogen für Aufmerksamkeitsdefizit- / Hyperaktivitätsstörungen (FBB-ADHS)

Der „Fremdbeurteilungsbogen für Aufmerksamkeitsdefizit-/ Hyperaktivitätsstörungen“ (FBB-ADHS; Döpfner 2008) wird als Screening-Verfahren zur Diagnostik einer ADHS eingesetzt. Aufgrund der hohen Komorbidität von ADHS und ASS und der ätiologischen und phänotypischen Überlappung der beiden Störungsbilder ist eine Testung bezüglich Aufmerksamkeitsfähigkeit und Hyperkinetik ggf. auch im Rahmen der Autismus-Diagnostik sinnvoll. Der FBB-ADHS besteht aus 20 Items, welche die 18 Symptomkriterien einer ADHS nach DSM-IV und einer hyperkinetischen Störung nach ICD-10 für das Kindes- und Jugendalter erfassen. Zusätzlich werden der Generalisierungsgrad der Symptomatik in unterschiedlichen Lebensbereichen, der Störungsbeginn sowie die Dauer der Symptomatik untersucht. Anhand sechs neuer Items werden in der aktuellsten Version des FBB-ADHS Ausdauer, Aufmerksamkeit und Reflexivität geprüft. Ausgefüllt wird der Fragebogen von Eltern, Lehrern oder Erziehern (ADHS-Infoportal 2011).

3.1.1.5.6 Child Behavior Checklist (CBCL)

Die deutsche Version des Elternfragebogens „Child Behavior Checklist“ (CBCL) soll auf Kompetenzen und Probleme der Kinder aus Sicht der Eltern hinweisen. So gibt der erste Teil der CBCL Aufschluss über psychosoziale Fähigkeiten, während der zweite Teil auf Verhaltensauffälligkeiten, somatische Beschwerden sowie emotionale Auffälligkeiten eingeht. Dabei basieren die Items des ersten Abschnitts auf drei Kompetenzsäulen, die sich auf Schule, soziale Kompetenz und Aktivitäten beziehen. Die Items des zweiten Teils lassen sich in acht beurteilungsübergreifende Syndrome gliedern, wovon sozialer Rückzug, körperliche Beschwerden und Angst/Depressivität die sogenannte internalisierende Skala bilden und delinquentes und aggressives Verhalten die externalisierende Skala. Soziale Probleme, schizoide/zwanghafte

Verhaltensweisen sowie Aufmerksamkeitsstörung werden nicht weiter zugeordnet. Der Fragebogen ist geschlechts- und altersspezifisch angepasst und kann ergänzend vom Patienten selbst sowie von Lehrern/ Erziehern bearbeitet werden (ADHS-Infoportal 2011; Hogrefe-Verlag 2011).

3.1.1.5.7 Depressions-Inventar für Kinder und Jugendliche (DIKJ)

Bei Verdacht auf das Vorliegen einer depressiven Störung, zur Bestätigung der Diagnose und zur Abklärung depressiver Symptome bei therapeutischen Interventionen wird das „Depressions-Inventar für Kinder und Jugendliche“ (DIKJ) bei einem Alter zwischen acht und 16 Jahren angewendet. Bei jedem der 26 Items wählt der Patient zwischen drei Antwortmöglichkeiten, die unterschiedliche Schweregrade eines Symptomzustandes wiedergeben. Inhaltlich werden im DIKJ die Hauptsymptome einer depressiven Störung nach DSM-IV Kriterien mit typischen Begleiterscheinungen und Folgen geprüft. Es besteht eine gute konvergente und diskriminative Validität (Stiensmeier-Pelster, Schürmann et al. 2000; ZTD 2012).

3.1.1.5.8 Intelligenz- und Leistungsdiagnostik

Eingesetzt wurden je nach individueller klinischer Notwendigkeit der „Kulturell faire Intelligenztest“ (CFT1 oder CFT20-R) von Cattell und Weiß (Cattell, Weiß et al. 1997; Weiß 2006), der „Hamburg-Wechsler-Intelligenztest für Kinder IV“ (HAWIK-IV) (Petermann und Petermann 2008) oder die deutsche Version der „Kaufman Assessment Battery for Children“ (K-ABC) (Melchers und Preuß 2009).

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

3.1.2.1 Blutabnahmesystem

Kanüle:

Safety-Multifly®-Set (SARSTEDT, Nümbrecht)

Adapter:

BD Vacutainer™ multiple sample luer adapter (BECTON, DICKINSON COMPANY, Franklin Lakes, USA)

BD Vacutainer® One Use Holder (BECTON, DICKINSON COMPANY, Franklin Lakes, USA)

Membran-Adapter (SARSTEDT, Nümbrecht)

3.1.2.2 Material für Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

3.1.2.2.1 Serumröhrchen

S-Monovette 7,5 ml Z (REF. 01.1601) (SARSTEDT, Nümbrecht)

3.1.2.2.2 ELISA-Kit

Human BDNF Quantikine ELISA Set der Firma R&D Systems Minneapolis, USA

3.1.2.3 Material für Quantitative Real Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

3.1.2.3.1 Reaktionsgefäße zur Isolation und Aufreinigung von mRNA

PAXgene Blood RNA Tubes (PREANALYTIX, Hombrechtikon, CH)

3.1.2.3.2 Kit zur Reversen Transkription

iScriptTM cDNA Synthesis Kit der Firma BioRad Co., Hercules, CA, USA

3.1.2.3.3 Fluoreszenzfarbstoff

Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Germany GMBH)

3.1.2.3.4 Primer

Primer von Qiagen N.V. (QuantiTec Primer Assays, Netherlands)

3.1.3 Geräte

Kühlschrank

Model 983 -86 ULT Double Door Freezer (FORMA SCIENTIFIC INC., Marietta, USA)

Nofrost -20 (SIEMENS, München)

Zentrifugen

ROTANTA 460R (HETTICH, Tuttlingen)

MIKRO 200 R (HETTICH, Tuttlingen)

Zentrifuge 5430 (EPPENDORF, Hamburg)

Pipetten (EPPENDORF, Hamburg)

Pipettenspitzen

Biosphere® Filterspitzen 10-100µl (SARSTEDT, Nümbrecht)

Schüttelgerät

Vortex Genius 2 (VWR INTERNATIONAL, Darmstadt)

Schüttelinkubator

Thermomixer comfort (EPPENDORF, Hamburg)

Spektrophotometer

NanoDrop ND-1000 (PEQLAB, Erlangen)

CFX384 Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD, Philadelphia, USA)

PCR-Platten:

Hard-Shell® 384-Well PCR Plates (BIO-RAD, Philadelphia, USA)

Thermocycler

BioRad CFX 384 RT-System (C1000 Thermal-Cycler; BioRad Co., Hercules, CA, USA)

3.1.4 Software

„4-Parameter Logistic-non-linear-regression-model“ der MasterPlex® ReaderFit: Curve-Fitting Software for ELISA Analysis der Mirai Bio Group von Hitachi Solutions America, Ltd.

BioRad CFX Manager 2.0 Software

SPSS 18.0.0 (SPSS Inc., USA)

3.2 Methodik

3.2.1 Serumgewinnung

Die venöse Blutentnahme erfolgte peripher und im Nüchternzustand der Patienten morgens zwischen 7 Uhr und 10 Uhr. Das Serum durfte bei Raumtemperatur für exakt 30 Minuten gerinnen, bevor es 5 Minuten bei 1912 x g zentrifugiert wurde. Anschließend wurde es bei -80°C in 500 µl Teilproben bis zur Analyse gelagert.

3.2.2 mRNA-Gewinnung und -Isolation aus Vollblut

Zur mRNA-Gewinnung und gleichzeitigen RNA-Stabilisierung wurden „PAXgene™ Blood“ RNA-Röhrchen (PreAnalytiX, Hombrechtikon, Schweiz) gemäß

den Anweisungen des Herstellers verwendet. Die Reinigung von RNA aus humanem Vollblut erfolgte mit Hilfe des „PAXgene Blood RNA Kits“ (PreAnalytiX, Hombrechtikon, Schweiz) nach Firmenanleitung. Der RNA-Reinheitsgrad sowie der RNA-Gehalt wurden mittels UV-Spektrophotometrie bestimmt.

3.2.3 ELISA

Der für diese Forschungsarbeit verwendete Sandwich-ELISA (Human BDNF Quantikine ELISA Sets der Firma R&D Systems) basiert auf der Interaktion zwischen einem ersten, sogenannten Coating-Antikörper, der an eine Mikrotiterplatte befestigt ist, einem zu untersuchenden Antigen und einem zweiten, beweglichen Antikörper. An letzterem ist ein Indikatorenzym (hier: Meerrettichperoxidase) gebunden, das mit Hilfe eines passend zum Enzym eingesetzten chromogenen Substrats (hier: Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) ein nachweisbares Reaktionsprodukt bzw. einen Farbumschlag bewirkt.

Für die Quantifizierung von humanem BDNF wurde das Serum in dieser Arbeit zunächst zwanzigfach verdünnt. Patienten- und Kontrollproben wurden in Duplikaten auf eine gemeinsame 96-well-Platte pipettiert.

Die quantitative Messung des Reaktionsproduktes erfolgte durch die Messung der optischen Dichte mittels des „4-Parameter Logistic-non-linear-regression-model“ (siehe 3.1.4). Im Anschluss wurde die BDNF-Konzentration berechnet (Rosenqvist, Kayhty et al. 2001; Rassow, Hauser et al. 2006).

3.2.4 Reverse Transkription

Für die quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) wird die zu untersuchende mRNA zunächst in cDNA transkribiert. Für die Herstellung der doppelsträngigen DNA wurde das iScript™cDNA Synthesis Kit der Firma Bio-Rad, Hercules, USA nach firmeneigener Anleitung verwendet.

3.2.5 qRT-PCR

Die qRT-PCR dient der schnellen und vollautomatisierten Quantifizierung der Genexpression auf mRNA-Ebene. Hierbei wird die klassische PCR (mit der Amplifikation als Ergebnis) direkt mit der PCR-Produkt-Detektion und -Quantifizierung verbunden

(Huggett, Dheda et al. 2005; Nolan, Hands et al. 2006; Bustin, Benes et al. 2009). Das Prinzip der qRT-PCR berücksichtigt die üblichen Abläufe der PCR: die Denaturierung, Hybridisierung/Annealing und DNA-Synthese/Elongation. Ein Farbstoff bindet während der qRT-PCR-Zyklen an die durch reverse Transkription aus mRNA entstandene cDNA. Durch eine Lichtquelle angeregt, wird ein Signal emittiert, welches quantitativ mit der Menge an PCR-Produkt korreliert und gleichzeitig (in Echtzeit - „Real time“) gemessen werden kann.

Die für diese Arbeit verwendeten Primer wurden von Qiagen N.V. (QuantiTec Primer Assays, Netherlands) entwickelt und hergestellt. Die qRT-PCR am CFX384 Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD, Philadelphia, USA) wurde für BDNF und sechs interne Referenzgene, sog. Housekeeping-Gene (Beta Aktin, ACTB; ribosomales Protein L13a, RPL13a; Delta-Aminolävulinsäure Synthase 1, ALAS; 18S ribosomale RNA, 18S; Peptidylprolyl-Isomerase A, PPIA; Glycerinaldehyd-3-Phosphate Dehydrogenase, GAPDH) im Duplikat durchgeführt. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde SYBR Green (Applied Biosystems, Germany GMBH) verwendet. Standardkurven für jedes Amplikon wurden aus 10-fachen Verdünnungsreihen gewonnen, die Primer-Effektivität wurde kontrolliert.

Die qRT-PCR-Bedingungen waren wie folgt: initiale Enzymaktivierung bei 95°C (5 min), Denaturierung bei 94°C (10 s), Annealing bei 60°C (30 s), Elongation bei 72°C (30 s). Insgesamt fanden 39 Zyklen statt. Die Konzentration der Amplifikate wurde mittels der DDCT Methode berechnet (CFX Manager 2.0 Software) (Huggett, Dheda et al. 2005; Nolan, Hands et al. 2006; Bustin, Benes et al. 2009). Da SYBR Green unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet, erfolgt anschließend eine Schmelzkurvenanalyse zur Bestimmung der Spezifität (Huggett, Dheda et al. 2005; Nolan, Hands et al. 2006; Bustin, Benes et al. 2009).

Um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten mRNA auszugleichen, wurden für eine relative Quantifizierung mittels des Programms GeNorm die stabilsten Referenzgene bestimmt und es fand eine Normalisierung der Expression von BDNF im Vergleich zu den folgenden fünf stabilsten Housekeeping-Genen statt: ACTB, RPL13a, ALAS, GAPDH und R18S.

3.2.6 Statistik

Statistische Analysen wurden mit Hilfe der SPSS 18.0.0 Software (SPSS Inc., USA) ausgeführt. BDNF-Gruppenunterschiede wurden mit T-Tests untersucht, nachdem eine Normalverteilung mit Hilfe des Kolgomoroff-Smirnoff-Tests nachgewiesen worden war, und mit Varianzanalysen (ANOVA) und Post-Hoc-Tests mit den Zwischenfaktoren „Gruppe“ (ASS, ADHS und gesunde Kontrollkinder). Nachdem sich die Gruppen zum Teil in diesen Variablen unterschieden, wurden Alter und IQ als Kovarianten eingeschlossen, um mögliche Störfaktoren zu prüfen (ANCOVA). Zur Analyse von möglichen Unterschieden zwischen BDNF mRNA-Expression in der Subgruppe von ADHS-Patienten mit zwei unterschiedlichen Messzeitpunkten (mit und ohne Medikation) wurde ein zweiseitiger T-Test paarweise durchgeführt. Der Pearson-Korrelationskoeffizient wurde für normal verteilte Werte berechnet. Statische Signifikanz wurde festgelegt als $p < 0,05$ und ein Trend als $p < 0,10$. Die Daten werden in Mittelwerten \pm Standardabweichung (S.D.) angegeben.

3.3 Untersuchungsplan

Rekrutierung

- Identifizierung von Kindern mit ASS oder ADHS (ambulant, (teil-)stationär)
- Kontaktaufnahme mit Eltern bzw. Sorgeberechtigten und Kindern → Interesse an Studie?
- Einholen der schriftlichen Einverständniserklärungen (Eltern und Kind)
- Ausgabe von Fragebögen
- Terminvereinbarung für Blutentnahme

Untersuchungen

- psychologische Diagnostik: Allgemeinbegabung, Phänotypisierung
- Einsammeln der Fragebögen
- Nüchternblutentnahme
- ggf. Riechtestung für assoziierte Riechstudie

Labor

- Aufbereitung der Serum-Proben und
- mRNA-Extraktion aus PaxGene-Röhrchen (Einzelheiten siehe Methodik)
- mRNA- und Proteinexpressionsanalysen: ELISA und qRT-PCR

4. Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse in den Abschnitten 4.1 bis 4.2 erfolgt hypothesengeleitet.

4.1 Hypothese 1

„Kinder und Jugendliche mit ASS zeigen im Vergleich zu abgestimmten Kontrollpersonen eine modulierte BDNF-Expression im Blut.“

4.1.1 Stichprobe 1: BDNF-Serumkonzentration

Die mittlere BDNF-Serumkonzentration des ASS-Patientenkollektivs (\pm S.D.) betrug 20612 ± 6037 pg/ml, während die Konzentration der gesunden Kontrollgruppe bei 24043 ± 4340 pg/ml lag. Unter Verwendung des T-Tests wurde ein signifikant erniedrigter BDNF-Proteingehalt im Serum der autistischen Patienten gemessen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($T = -2,123$, $df = 42$, $p = 0,040$; siehe Abbildung 4).

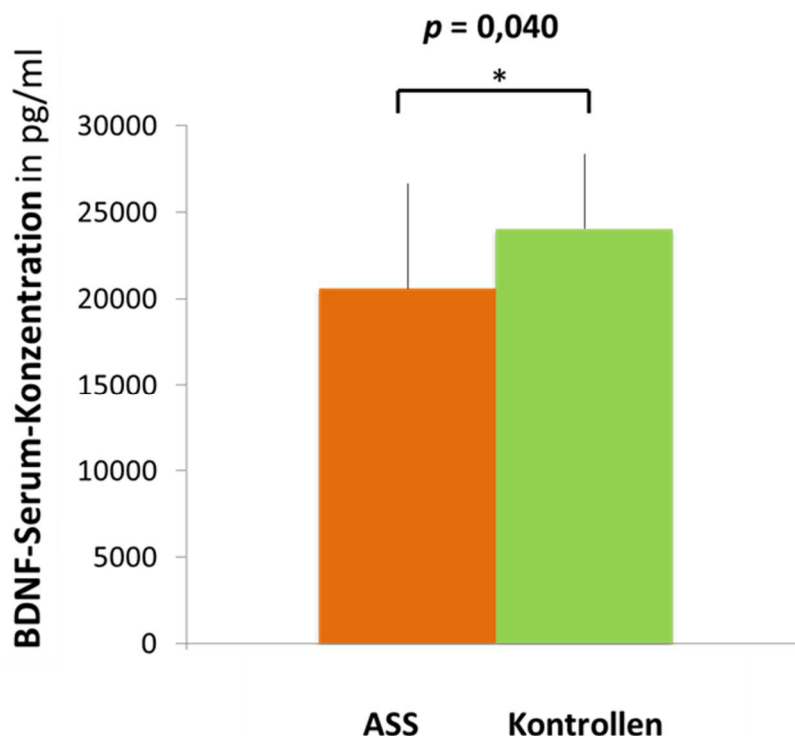


Abbildung 4: Stichprobe 1 - BDNF-Serumkonzentration

in Anlehnung an die Abbildung von Taurines et al. (2014)

4.1.2 Stichprobe 2: BDNF-mRNA-Expression im Blut

Die durchschnittliche BDNF-mRNA-Expression (\pm S.D.) in Vollblut lag im Vergleich zu fünf Referenzgenen bei $0,0225 \pm 0,0058$ in der ASS-Gruppe, $0,0255 \pm 0,0056$ in der ADHS-Gruppe zum Zeitpunkt ohne Stimulanzengabe und bei $0,0284 \pm 0,0066$ in der Kontrollgruppe. Einfaktorielle ANOVA ergab einen signifikanten Gruppenunterschied der BDNF-mRNA-Expression ($F = 3,65$; $df = 2,43$; $p = 0,034$). Posthoc-Analysen mit dem LSD-Test ergaben signifikant erniedrigte BDNF-mRNA-Konzentrationen bei autistischen Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen ($p = 0,011$) und einen Trend zu erniedrigten BDNF-Werten bei ADHS ($p = 0,097$) im Vergleich zu gesunden Probanden (siehe Abbildung 5). Die BDNF-Expression in der Gruppe der Patienten mit ASS und der klinischen ADHS-Kontrollgruppe zeigte keinen

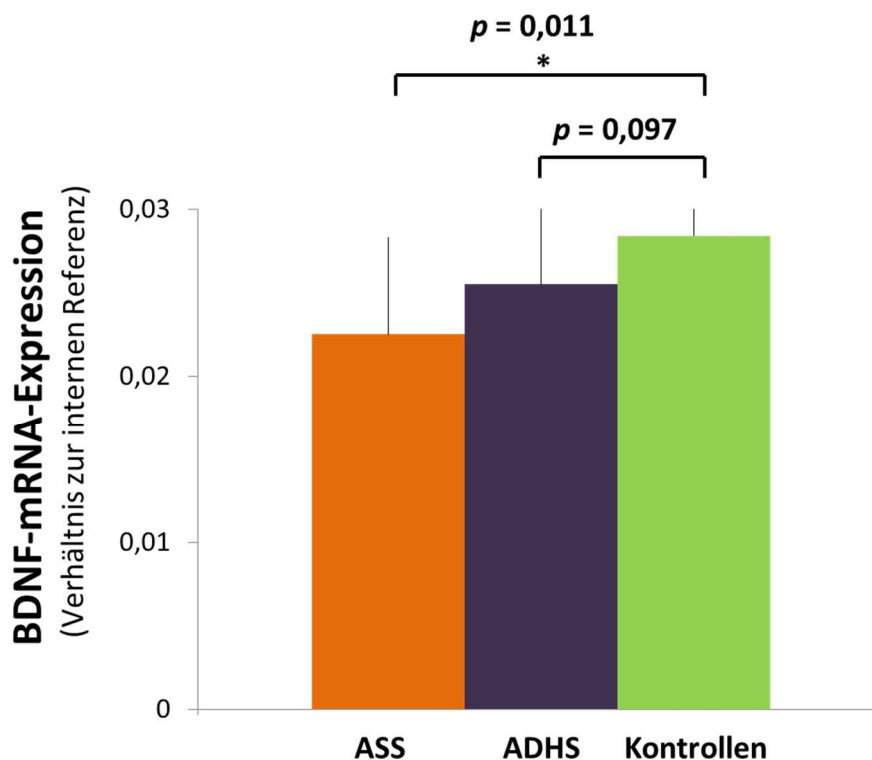


Abbildung 5: Stichprobe 2 - BDNF-mRNA-Expression

in Anlehnung an die Abbildung von Taurines et al. (2014)

signifikanten Unterschied ($p = 0,347$). Diese Ergebnisse waren nicht durch Alter oder IQ konfundiert.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann Hypothese 1 als verifiziert gelten: Kinder und Jugendliche mit ASS zeigen eine modulierte BDNF-Expressionen in Form erniedrigter peripherer BDNF-mRNA- und Protein-Konzentrationen im Vergleich zu gesunden, abgestimmten Kontrollprobanden.

4.2 Hypothese 2

„Die Ausprägung des autistischen Phänotyps, komorbide Störungen sowie weitere Kofaktoren beeinflussen die BDNF-Expression im Blut.“

4.2.1 BDNF-Expression und Alter

In Stichprobe 1 zur BDNF-Serumproteinbestimmung zeigte sich zwischen autistischen Patienten und gesunden Kontrollen kein signifikanter Altersunterschied ($T = -0,65$, $df = 42$, $p = 0,522$). In der Gruppe der gesunden Probanden fiel eine mittlere positive Korrelation des Alters mit der BDNF-Serumkonzentration auf ($n = 20$, $p = 0,017$; $r = 0,527$). In der Gruppe der Autisten ergab sich keine solche Korrelation ($n = 24$, $p = 0,941$; $r = 0,016$).

In Stichprobe 2 zur BDNF-mRNA-Expression war ebenfalls kein signifikanter Altersunterschied zwischen den drei Gruppen vorliegend ($F = 1,64$; $df = 2,43$; $p = 0,207$). Auf mRNA-Ebene fiel in der ASS-Gruppe eine mittlere negative Korrelation zwischen Alter und BDNF-mRNA-Konzentration auf ($n = 16$, $p = 0,037$, $r = -0,525$), in der gesunden und der klinischen Kontrollgruppe zeigte sich keine Assoziation zwischen Alter und BDNF-Expression (ADHS: $n = 15$, $p = 0,588$, $r = -0,152$; gesunde Kontrollen: $n = 15$, $p = 0,380$, $r = -0,244$).

4.2.2 BDNF-Expression und Intelligenzquotient (IQ)

In Stichprobe 1 lagen nur IQ-Daten für die autistische Patientengruppe vor. BDNF-Serumkonzentration und IQ korrelierten dabei nicht ($n = 24$, $p = 0,869$, $r = -0,036$).

Die drei Gruppen der Stichprobe 2 unterschieden sich signifikant bzgl. der IQ-Werte ($F = 4,80$; $df = 2,43$; $p = 0,013$) mit signifikant höheren Werten in der Kontrollgruppe im Vergleich zu ASS-Patienten ($p = 0,004$) und einem Trend zu erhöhten Werten der gesunden Probanden im Vergleich mit der ADHS-Gruppe

($p = 0,087$). Eine mittlere positive Korrelation zwischen BDNF-Expression und IQ wurde in dieser Stichprobe bei dem autistischen Patientenkollektiv beobachtet ($n = 16$, $p = 0,025$, $r = 0,558$), nicht jedoch bei der ADHS- und gesunden Kontrollgruppe.

4.2.3 BDNF-Expression und autistischer Phänotyp

In Stichprobe 1 zeigte sich zwischen BDNF-Serumkonzentration und autistischen Symptomen eine signifikant positive Korrelation in den Testergebnissen des ADI-A ($n = 24$, $p = 0,014$, $r = 0,495$) und des ADI-B ($n = 24$, $p = 0,022$, $r = 0,464$), sowie ein positiver Trend in der ADOS-Gesamtsumme von Interaktion und Kommunikation ($n = 24$, $p = 0,068$, $r = 0,378$) und dem FSK-Gesamtwert ($n = 15$, $p = 0,058$, $r = 0,499$). Auf mRNA-Ebene wurde eine negative Korrelation zwischen BDNF-Expression und den FSK-Gesamtwerten berechnet ($n = 15$, $p = 0,038$, $r = -0,538$).

4.2.4 BDNF-Expression und Komorbidität

4.2.4.1 Komorbidität ADHS

Auf Serumprotein-Ebene ergab sich in der Gruppe der ASS-Patienten kein signifikanter BDNF-Expressionsunterschied zwischen Patienten mit komorbider ADHS ($n = 14$) versus Probanden ohne komorbide ADHS ($n = 10$) ($T = 1,060$, $df = 22$, $p = 0,301$).

Aufgrund der ungleichen Verteilung von ASS-Patienten mit und ohne komorbide ADHS in Stichprobe 2 (12 vs. 4 Probanden) war keine statistische Auswertung zu einem potenziell modulierenden Effekt der ADHS auf die BDNF-mRNA-Expression sinnvoll.

4.2.4.2 Weitere psychiatrische Komorbidität

In den Kollektiven der Stichprobe 2, von denen von den ADHS- und gesunden Kontrollpatienten Daten zum DIKJ vorlagen, war keine signifikante Korrelation zwischen BDNF-mRNA-Konzentration und DIKJ-Gesamtwert messbar (ADHS $p = 0,878$, Kontrollen $p = 0,734$).

Die periphere BDNF-Serumkonzentration und internalisierende psychiatrische Symptome (nach dem CBCL-Wert „internalisierend“) korrelierten in der Kontrollgruppe aus Stichprobe 1 ($p = 0,036$, $r = 0,472$). In Stichprobe 2 auf mRNA-

Ebene ergab sich in keiner der drei Gruppen – ASS, ADHS oder gesunde Kontrollen – eine signifikante Korrelation zwischen BDNF-Expression und CBCL-Gesamtwerten ($p = 0,424$), ebenso wenig mit internalisierenden ($p = 0,827$) oder externalisierenden Symptomen ($p = 0,729$).

4.2.5 BDNF-Expression und Medikation

In der kleinen Untergruppe von neun ADHS-Patienten, von denen zwei Blutproben gewonnen wurden (einmal mit Stimulanzienmedikation und einmal ohne Medikation) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der BDNF-mRNA-Expression an den zwei Messzeitpunkten mit Hilfe des abhängigen T-Tests bei gepaarten Stichproben festgestellt werden ($T = -0,075$; $df = 8$; $p = 0,941$).

4.2.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend gilt, dass signifikante Korrelationen zwischen BDNF-Expression und Alter innerhalb eines ASS-Patientenkollektivs sowie in einer gesunden Kontrollgruppe berechnet wurden, die in den Kollektiven gegensätzlich gerichtet waren. Zusätzlich zeigte sich in mehreren autismusspezifischen Verfahren auf Protein-Ebene eine signifikante Korrelation zwischen der Ausprägung des autistischen Phänotyps und peripherer BDNF-Expression, die sich in einer unabhängigen, kleineren Patientengruppe auf mRNA-Ebene jedoch nicht abbilden ließ. In der Subgruppe der ADHS-Patienten wurde kein Einfluss von Psychostimulanzien auf die BDNF-mRNA-Expression gemessen. Die vorliegenden Ergebnisse erlauben keine eindeutige Aussage zu einer möglichen Korrelation zwischen BDNF-Expression und IQ sowie weiterer komorbider psychiatrischer Symptomatik.

Folglich ergeben sich aus der vorliegenden Arbeit Hinweise, dass im Rahmen von Hypothese 2 die Ausprägung des autistischen Phänotyps und der Kofaktor Alter die periphere BDNF-Expression beeinflussen.

5. Diskussion

Die vorliegende Studie hatte zum Ziel, eine mögliche periphere Dysregulation der BDNF-Expression bei Kindern und Jugendlichen mit ASS zu beschreiben. Bisherige Untersuchungen zu diesem Thema kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich der ersten Hypothese der vorliegenden Arbeit, dass die periphere BDNF-Expression bei Kindern und Jugendlichen mit ASS moduliert ist. In Abschnitt 5.1 der Diskussion werden zunächst die eigenen Ergebnisse einer erniedrigten peripheren BDNF-mRNA- und Serumprotein-Expression mit denen vorhergehender Studien verglichen. Weiter wird versucht, mögliche Gründe diskrepanter Resultate aus den verschiedenen Studien zu beleuchten mit der Schlussfolgerung, dass es wahrscheinlich einen Umschlagpunkt für BDNF-Konzentrationen in der Entwicklung/Pubertät gibt. In Punkt 5.2 wird auf den möglichen Einfluss des autistischen Phänotyps, von Komorbidität und weiteren Kofaktoren auf die BDNF-Expression im Blut eingegangen, die im Rahmen von Hypothese 2 untersucht wurden.

5.1 Periphere BDNF-mRNA- und -Proteinexpression

Hypothese 1 der vorliegenden Forschungsarbeit bestand in der Annahme, dass Kinder und Jugendliche mit ASS im Vergleich zu abgestimmten Kontrollpersonen modulierte BDNF-Konzentrationen im Blut zeigen. Sowohl in Stichprobe 1 auf Serumprotein- als auch in der unabhängigen Stichprobe 2 auf mRNA-Ebene ließ sich eine signifikant erniedrigte BDNF-Expression im Blut bei Kindern und Jugendlichen mit ASS im Vergleich zu gesunden Kontrollkindern nachweisen. Ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen Patienten mit ASS und der klinischen ADHS-Kontrollgruppe ließ sich nicht nachweisen. Hypothese 1 wurde somit für den Vergleich von ASS mit unauffällig entwickelten, altersabgestimmten Probanden angenommen. Eine mögliche Erklärung für ähnlich gerichtete BDNF-Expressionswerte bei Probanden mit ASS und ADHS mag in der hohen Komorbidität der eingeschlossenen ASS-Patienten mit ADHS, sowie einer ätiologischen wie phänotypischen Überlappung - zumindest in Subgruppen der Patienten - liegen (Rommelse, Franke et al. 2012, Taurines, Schwenck et al. 2012).

Unsere Ergebnisse einer erniedrigten BDNF-Expression bei Kindern und Jugendlichen mit ASS im Vergleich zu normal entwickelten Kontrollkindern sind in

Übereinstimmung mit Beobachtungen von Hashimoto, Iwata et al. (2006) und Al-Ayadhi (2011), die ebenfalls signifikant erniedrigte BDNF-Serumkonzentrationen in Gruppen autistischer Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen fanden. Im Gegensatz dazu ergaben die Untersuchungen von Miyazaki, Narita et al. (2004), Connolly, Chez et al. (2006) und Correia, Coutinho et al. (2010) signifikant erhöhte BDNF-Serum- bzw. -Plasmakonzentration bei Menschen mit ASS im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Auch auf mRNA-Ebene ließ sich bei Nishimura, Nakamura et al. (Nishimura, Nakamura et al. 2007) eine signifikant erhöhte BDNF-Expression in Lymphozyten nachweisen. Katoh-Semba, Wakako et al. (2007) und Mansour, Mohamed et al. (2010) beobachteten bei einer Unterteilung eines autistischen Patientenkollektivs anhand des Alters altersabhängig signifikant erhöhte als auch signifikant erniedrigte BDNF-Serumkonzentrationen in den autistischen Gruppen im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden. Croen und Goines et al. (2008) hingegen fanden keinen Unterschied bzgl. der peripheren BDNF-Konzentration zwischen autistischen und gesunden Kindern (Studienergebnisse zusammengefasst in Tabelle 8).

Eine Analyse der einzelnen Studien erfolgt im weiteren Verlauf der Diskussion unter Berücksichtigung der hypothesenrelevanten Kofaktoren.

Ein Vergleich der Charakteristika der eigenen Stichproben zeigt, dass das ASS-Patientenkollektiv von Stichprobe 2 ein um drei Jahre jüngeres Durchschnittsalter im Vergleich zu dem in Stichprobe 1 aufweist (10,8 vs. 13,9 Jahre). Die Punktwerte des ADI-R fielen in der ersten Stichprobe höher aus, was auf ausgeprägtere autistische Züge zumindest im Alter von vier bis fünf Jahren in dieser Gruppe schließen lassen könnte.

Im Vergleich der international vorliegenden Untersuchungen zur peripheren Neurotrophin-Expression bei ASS lassen sich Abweichungen im Hinblick auf die eingeschlossenen Patientenkollektive, das untersuchte Material sowie die angewendete Diagnostik feststellen (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Internationale Studienlage - Periphere BDNF-Expression bei ASS

	Connolly 2006	Mansour 2010	Correia 2010	Al-Ayadhi 2011	Miyazaki 2004	Katoh- Semba 2007	Mansour 2010	Stichprobe 2 2009-2011	Stichprobe 1 2005-2007	Katoh- Semba 2007	Nishimura 2007	Hashimoto 2006
Alter	5,9 ± 3,9	< 6	7,1	7,4 ± 0,9	7,6 ± 6,1	< 10	6 - 12	10,8 ± 2,2	13,9 ± 3,0	10 -19	21,4 ± 2,31	21,2 ± 2,1
Zahl (n)	37	7	146	46	18	?	13	16	24	?	11	18
Männlich	18	?	?	41	17	?	?	16	24	?	11	18
F84.0/1/5	?/??/?	?/??/?	?/??/?	?/??/?	12/5/1	?/??/?	?/??/?	5/6/5	3/8/13	?/??/?	?/??/?	?/??/?
DSM-IV	+	+	+	+	+	?	+	+	+	?	+	+
ADOS	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
ADI-R	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+
Medikation	?	-	+	-	?	?	-	+	+	?	-	-
Nüchtern	?	-	?	?	-	?	-	+	+	?	?	-
Material	Serum	Serum	Plasma	Serum	Serum	Serum	Serum	mRNA (Vollblut)	Serum	Serum	mRNA (Lymphozyten)	Serum
BDNF	↑	↑	↑	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↓

*= Validität der Diagnose „ASS“ nach Einhalten der in den Leitlinien empfohlenen Methoden (ADOS, ADI-R etc.) : von unzureichend (rot) bis sehr gut (grün)

5.2 Einfluss des autistischen Phänotyps, von komorbiden Störungen und weiteren Kofaktoren auf die BDNF-Expression

Hypothese 2 der vorliegenden Arbeit bestand in der Annahme, dass die Ausprägung des autistischen Phänotyps, komorbide Störungen (ADHS- und depressive Symptomatik) sowie weiteren Kofaktoren (Alter, IQ, Medikation) die BDNF-Expression im Blut beeinflussen.

Die Ergebnisse zeigen in jeweils einer von zwei Stichproben von ASS-Patienten und gesunden Kontrollen gegensätzlich gerichtete, signifikante Korrelationen der peripheren BDNF-Expression mit dem Kofaktor Alter. Zudem ergaben sich Hinweise auf eine mögliche Korrelation der autistischen Symptomatik mit der BDNF-Expression. Ergebnisse einer etwaigen Korrelation zwischen BDNF-Expression und IQ sowie depressiver Symptomatik sind noch nicht abschließend einzuordnen. In einer Subgruppe der Patienten mit ADHS wurde kein Einfluss von Psychostimulanzien auf die BDNF-mRNA-Expression im Blut beobachtet.

5.2.1 Einfluss von Alter und hormonellen Veränderungen

Die eigenen peripheren BDNF-Expressionsuntersuchungen zeigen gegensätzlich gerichtete, signifikante Korrelationen zwischen BDNF-Expression und Alter in einem gesunden Kontrollkollektiv bzw. in einer Gruppe von Patienten mit ASS, welche jeweils mit verschiedenen vorherigen Untersuchungen in Einklang stehen. Ein möglicher Einfluss des Alters auf die BDNF-Expression konnte somit jedoch nicht konstant in allen untersuchten Kollektiven autistischer und gesunder Kinder beobachtet werden. In Zusammenschau der Ergebnisse der in der Literatur vorliegenden Studien (siehe Tabelle 8) ergeben sich Anhalte für einen „Umschlagpunkt“ in der peripheren BDNF-Expression während der Pubertät, der zumindest beim männlichen Geschlecht in Zusammenhang mit dem Einfluss von Testosteron stehen könnte. Die BDNF-Expression autistischer Patienten scheint im Durchschnitt bis zum/ im Grundschulalter erhöht zu sein im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden, wohingegen sie in der Pubertät und spätestens im Erwachsenenalter absinkt. Hinweise auf altersabhängige Einflüsse auf die periphere BDNF-Konzentration werden durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergänzt. Zu den eben genannten möglicherweise erniedrigten BDNF-Werten bei autistischen Personen in Pubertät und Erwachsenenalter im

Vergleich zu Gesunden passt die negative Korrelation der BDNF-mRNA-Expression mit dem Alter in der vorliegenden Untersuchung in Stichprobe 2.

In einer Studie von Iughetti und Casarosa et al. (2011) wurde eine negative Korrelation des BDNF-Plasmagehalts und des Alters bei gesunden Kindern und Jugendlichen festgestellt. Je jünger die Probanden waren, desto höhere BDNF-Konzentrationen wurden im Plasma gemessen. Des Weiteren wurde untersucht, inwieweit sich die BDNF-Konzentration in den verschiedenen Stadien der Pubertät bei gesunden Jungen und Mädchen verändert. Dabei zeigten Jungen im Tannerstadium 2-3 (G 2-3, PH 2-3 und testikuläres Volumen 4-12 ml) signifikant erniedrigte Plasma-BDNF Werte im Vergleich zu gleichaltrigen Mädchen (Tannerstadium B 2-3, PH 2-3) sowie Mädchen und Jungen in einem präpubertären Entwicklungszustand (Tannerstadium für Mädchen B1, PH 1, für Jungen G1, PH 1 und testikuläres Volumen < 4ml). Bei weiterer Unterteilung des Entwicklungsstandes der männlichen Probanden in präpubertär ($5,73 \pm 2,93$ Jahre), pubertär ($11,4 \pm 1,75$ Jahre) und spätpubertär ($18,4 \pm 4,50$ Jahre) konnte im Vergleich dieser Gruppen ein signifikant erniedrigter BDNF-Gehalt in der pubertären Gruppe gefunden werden einhergehend mit einem signifikant erhöhten Testosteronspiegel. Insgesamt konnte bei Mädchen und Jungen eine negative Korrelation zwischen dem peripheren BDNF-Gehalt und den Faktoren Alter, Testosteronspiegel sowie Körpergröße festgestellt werden (Iughetti, Casarosa et al. 2011).

Die Ergebnisse aus Stichprobe 2 der vorliegenden Arbeit einer signifikanten negativen Korrelation zwischen BDNF-Expression und Alter, allerdings in einer ASS-Stichprobe, unterstützten die Beobachtungen von Iughetti, Casarosa und Kollegen. Das Durchschnittsalter der Patienten mit ASS aus Stichprobe 2 betrug $10,8 \pm 2,2$ – ähnlich dem Durchschnittsalter der pubertären Gruppe aus genannter Studie von Iughetti, Casarosa et al. (2011). Im Gegensatz dazu und nicht eindeutig einzuordnen stehen die Ergebnisse der gesunden Kontrollgruppe aus Stichprobe 1 der vorliegenden Arbeit mit einer mittleren positiven Korrelation zwischen Alter und BDNF-Expression.

Die Untersuchung von Iughetti, Casarosa et al. (2011) macht auf eine weitere möglicherweise wichtige Einflussgröße bzgl. der peripheren BDNF-Expression aufmerksam: den Testosteronspiegel. In unseren Stichproben, in denen sich nur männliche präpubertäre bzw. pubertäre Probanden befanden, könnten hormonelle

Veränderungen im Sinne entwicklungsbedingt unterschiedlicher Testosteronspiegel die periphere BDNF-Konzentration moduliert haben. Bei Betrachtung von Tabelle 9 fällt auf, dass Referenzwerte für Testosteron bei gesunden Jungen zwischen 7 und 17 Jahren

Tabelle 9: Testosteronreferenzbereich nach Roche Diagnostics

entnommen aus der Multicenter Studie "Fertility Hormaones", März 1997

Alter	50. Perzentile	ng/mL
< 1	0,12	0,12 – 0,21
1 – 6	0,12	0,03 – 0,32
7 – 12	0,18	0,03 – 0,68
13 – 17	3,6	0,28 – 11,1

sehr weit streuen. Folglich könnten hohe inter-individuelle Schwankungen des Testosteronspiegels in dieser Altersgruppe einen Vergleich der womöglich hormonell mitbeeinflussten peripheren BDNF-Konzentrationen von Kindern und Jugendlichen in der Pubertät erschweren.

Die Zusammenhänge werden noch komplexer, wenn man berücksichtigt, dass autistische Kinder und Erwachsene in einer Vielzahl von Studien mit signifikant erhöhten peripheren Testosteronkonzentrationen im Vergleich zu Gesunden auffielen (Geier und Geier 2006; Geier und Geier 2007; Takagishi, Takahashi et al. 2010; Ruta, Ingudomnukul et al. 2011; Schwarz, Guest et al. 2011). Vor Eintritt in die Pubertät zeigte beispielsweise jedes dritte Kind mit ASS in einer Studie von Tordjman und Kollegen einen signifikant erhöhten Plasmatestosteronspiegel (Tordjman, Ferrari et al. 1997).

Der Studie von Iughetti, Casarosa et al. (2011) widersprechen z. T. Ergebnisse von Golden und Emiliano et al. (2010), die zwar ebenfalls eine negative Korrelation zwischen Alter und Plasma-BDNF-Werten bei beiden Geschlechtern ermittelte, aber eine positive Korrelation zwischen bioverfügbarem Testosteron und Plasma-BDNF-Konzentrationen bei den männlichen Probanden fand (Golden, Emiliano et al. 2010). Es

handelte sich hierbei jedoch um eine Studie an Alterspatienten mit einem Durchschnittsalter von ca. 70 Jahren.

Untersuchungen am Tiermodell belegen einen möglichen Zusammenhang zwischen Entwicklungsstadium, Testosteron-Konzentration und BDNF-Expression. In einer Studie mit pubertären Mäusen (Hill, Wu et al. 2012) zeichnete sich ein linearer Zusammenhang zwischen Testosteronserumkonzentration und BDNF-Expression in Striatum und frontalem Kortex der Mäuse ab (Hill, Wu et al. 2012). Die BDNF-Expression bei männlichen Tieren stieg in Striatum und frontalem Kortex bis zur 7. bis 10. Woche an, um mit zunehmendem Alter abzusinken (Hill, Wu et al. 2012). Hill, Wu und Kollegennahmen anhand ihres Tiermodells an, dass es in der pubertären Entwicklung zu einer geschlechtsspezifischen signifikanten Modulation der BDNF- und TrkB-Signalwege im Gehirn durch Androgen-Rezeptor-Aktivierung kommt; ein Befund, der zur Erklärung der Geschlechterwendigkeit bestimmter psychiatrischer Erkrankungen beitragen könnte, so auch von ASS.

Ein komplexer Zusammenhang zwischen Alter bzw. Entwicklungsstand, Testosteron-Konzentrationen und BDNF-Expression könnte dafür verantwortlich sein, dass bei Betrachtung der Tabelle 8 die BDNF-Expression autistischer Patienten im Durchschnitt bis zum/ im Grundschulalter erhöht scheint im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden, wohingegen sie in der Pubertät und spätestens im Erwachsenenalter abzusinken scheint.

Zusammenfassend lässt sich in den Stichproben 1 und 2 eine signifikant erniedrigte periphere BDNF-Expression in den Gruppen von Patienten mit ASS im Vergleich zu gesunden Kontrollkindern beschreiben. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Studie von Hashimoto et al. (2006), deren Probanden Erwachsene waren und sich somit in einem postpubertären Stadium befanden.

Eine Herausforderung wird es für zukünftige Studien sein, detailliertere Informationen zum genauen zeitlichen Umschlagspunkt für Veränderungen der peripheren BDNF-Konzentration zu erhalten. Aufgrund dieser sich abzeichnenden Beeinflussung der peripheren BDNF-Expression durch hormonelle Veränderungen in der Pubertät wäre es für zukünftige Forschungsarbeiten sinnvoll, den Testosteronspiegel zumindest bei männlichen Probanden im präpubertären und pubertären Stadium der Entwicklung mitzubestimmen.

Der oben genannten Hypothese erniedrigter BDNF-Konzentrationen im Blut autistischer Menschen ab dem Zeitpunkt der Pubertät und im Erwachsenenalter widersprechen Studienergebnisse von Katoh-Semba und Kollegen (Katoh-Semba, Wakako et al. 2007). Hier wurde eine signifikant erniedrigte Serumkonzentration bei autistischen Patienten im Alter von 0 bis 9 Jahren im Vergleich zu gesunden Kontrollen gefunden, während in der Altersklasse von 10 bis 19 Jahren die peripheren BDNF-Werte der autistischen Gruppe signifikant erhöht waren. Es muss jedoch erwähnt werden, dass in dieser Untersuchung weder detaillierte Informationen über die autistischen Patienten noch über die gesunden Kontrollen gegeben werden. Ein- bzw. Ausschlusskriterien werden nicht aufgeführt. Genauso wenig werden weder die verwendeten diagnostischen Verfahren noch die Diagnosekriterien für ASS ausreichend geklärt. Dennoch weist diese Studie auf alters- bzw. entwicklungsbedingte Schwankungen der peripheren BDNF-Konzentration hin.

Gegen die Hypothese, dass das Alter Einfluss auf die periphere BDNF-Expression nimmt, und gegen eine erniedrigte BDNF-Expression bei postpubertären Personen mit ASS spricht die Studie von Nishimura, Nakamura et al. (Nishimura, Nakamura et al. 2007). In dieser Untersuchung wurde die periphere BDNF-Expression aus Lymphozyten bestimmt, nicht aus Vollblut wie in der vorliegenden Arbeit.

Die vorliegende Arbeit liefert Ergebnisse zur BDNF-Expression auf mRNA- und Proteinebene im Blut. Aussagen zu einer Korrelation der Expression auf den beiden Ebenen können nicht getroffen werden, da in Stichprobe 1 nur Serum, in Stichprobe 2 nur mRNA zur Untersuchung vorhanden war. Grundsätzlich sind bisherige Forschungsergebnisse bzgl. einer Korrelation zwischen mRNA-Konzentrationen und korrespondierenden Proteinen inkonsistent. In einigen Studien konnten relativ gute Korrelationen beobachtet werden (Greenbaum, Colangelo et al. 2003), in anderen nicht (Gygi, Rochon et al. 1999; Chen, Gharib et al. 2002; Guo, Xiao et al. 2008). So variierte beispielweise die mRNA- und Proteinkonzentration für einige Gene in einer Korrelationsstudie mit Hefe um das 20- bis 30-fache (Gygi, Rochon et al. 1999).

5.2.2 Einfluss des Geschlechts

Ein modulierender Einfluss des Geschlechts auf die periphere BDNF-Expression konnte in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden, da nur männliche Probanden

eingeschlossen wurden, um möglichst homogene Gruppen zu untersuchen. Bisherige Studien zur peripheren BDNF-Expression bei autistischen Menschen konnten keine generellen Unterschiede beim männlichen bzw. weiblichen Geschlecht belegen (Katoh-Semba, Wakako et al. 2007; Correia, Coutinho et al. 2010; Al-Ayadhi 2011). Oben aufgeführte Befunde zum Einfluss pubertärer Faktoren auf die BDNF-Expression im Menschen und am Tiermodell weisen jedoch auf einen möglichen Geschlechtereffekt hin (Iughetti, Casarosa et al. 2011; Hill, Wu et al. 2012).

5.2.3 Einfluss von Komorbidität

In der vorliegenden Arbeit wurde weder auf Serum- noch auf mRNA-Ebene ein signifikanter Unterschied der BDNF-Expression von Patienten mit ASS mit und ohne Komorbidität ADHS beschrieben.

In einer Studie von Pandey, Dwivedi et al. (2010) wurde eine erniedrigte BDNF-Gen- und Proteinexpression bei depressiven Patienten ohne Medikation gefunden. Aus unserer Untersuchung ergaben sich - gemessen anhand der Werte des CBCL internalisierend - keine Hinweise auf eine Assoziation depressiver Symptome mit der BDNF-Expression bei Patienten mit ASS, wobei die für die vorliegende Arbeit eingeschlossenen Patienten z.T. eine antidepressive Medikation erhielten (18,8% Stichprobe 1, 8,3% Stichprobe 2). Laut Studienlage lässt sich unter Einnahme von Antidepressiva ein Anstieg der peripheren BDNF-Expression in mehreren Tiermodellen beobachten (Nibuya, Morinobu et al. 1995; Hashimoto, Takei et al. 2002; Altar, Whitehead et al. 2003). Auch wurde bei depressiven Patienten ein modulierender Effekt bestimmter Antidepressiva auf den BDNF-Serumgehalt beobachtet (siehe 5.2.6.2) (Shimizu, Hashimoto et al. 2003). Dieser Einfluss einer antidepressiven Medikation könnte mitbedingen, dass in unseren Stichproben autistische Kinder kein Zusammenhang zwischen peripherer BDNF-Expression und depressiver Symptomatik mittels des DIKJ gemessen wurde.

5.2.4 Einfluss des Autismusschweregrades

Im Gegensatz zu anderen Studienergebnissen (Nishimura, Nakamura et al. 2007; Correia, Coutinho et al. 2010; Mansour, Mohamed et al. 2010; Al-Ayadhi 2011) ergaben sich aus der vorliegenden Arbeit Hinweise auf einen möglichen

Zusammenhang zwischen peripherer BDNF-Expression und dem Schweregrad der autistischen Störung. Eine positive Korrelation wurde in der größeren Stichprobe 1 mit Ergebnissen von ADI-A und ADI-B berechnet sowie ein positiver Trend aus der Summe von Interaktion und Kommunikation des ADOS und der Gesamtsumme des FSK ermittelt. Eine negative Korrelation in der kleineren Stichprobe 2 wurde mit der Gesamtsumme des FSK beobachtet. Aufgrund der gegensätzlich gerichteten Ergebnisse in den beiden ASS-Kollektiven muss dieses Ergebnis vorsichtig interpretiert und in zukünftigen Studien validiert werden. In den oben genannten bisher publizierten Studien wurden ADOS und ADI-R als Goldstandard der Autismus-Diagnostik nur vereinzelt angewendet. Folglich ist die Aussagekraft der Studienergebnisse aus der Literatur zu einer Korrelation zwischen BDNF-Expression und Autismusschweregrad zum Teil unzureichend. In der Studie von Correia, Coutinho et al. wurden ADI-R und ADOS als diagnostische Verfahren eingesetzt, bei Nishimura, Nakamura et al. der ADI-R. In der Studie von Al-Ayadhi wurde das computergestützte Interview „3DI“ (Dimensional, Developmental and Diagnostic Interview) und bei Mansour, Mohamed et al. ein semi-strukturiertes Interview der Ain Shams Universität verwendet. Correia, Coutinho et al. und Mansour, Mohamed et al. benutzten zusätzlich die „CARS“-Beurteilungsskala (Childhood Autism Rating Scale). Der ADOS berücksichtigt eine abnorme Entwicklung bzw. stereotypes Verhalten bei der Berechnung eines kritischen Trennwertes nicht, weshalb er zur Diagnosestellung allein als nicht ausreichend gewertet wird (Duketis 2010).

5.2.5 Einfluss des IQ

Daten zum IQ lagen in der vorliegenden Arbeit nicht für alle Probandengruppen vor. Eine positive Korrelation zwischen peripherer BDNF-Expression und Intelligenzquotienten (IQ) fiel in Stichprobe 2 in der ASS-Gruppe auf. In den übrigen Gruppen mit Daten zum IQ wurde in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Studien kein Zusammenhang dieser beiden Variablen beschrieben (Hashimoto, Iwata et al. 2006; Mansour, Mohamed et al. 2010).

5.2.6 Einfluss des Materials

5.2.6.1 Zirkadiane Rhythmik der BDNF-Expression

In den aufgeführten Studien (Tabelle 8) wurde fast einheitlich Serum für die periphere BDNF-Bestimmung gewonnen (Ausnahmen: Correia und Coutinho et al. (2010) - Plasma; Nishimura, Nakamura et al. (2007) - mRNA). Der Zeitpunkt der Blutentnahme variierte dabei unterschiedlich stark. Viele der Patienten waren vermutlich zum Zeitpunkt der Blutentnahme nicht nüchtern, was sich anhand der angegebenen Uhrzeiten der Blutentnahmen ableiten lässt (beispielsweise zwischen 12 und 18 Uhr). Welche Auswirkungen unterschiedliche Abnahmezeitpunkte auf den gemessenen BDNF-Serumgehalt haben, ist bisher nicht erforscht. Die BDNF-Serumkonzentration scheint einer zirkadianen Rhythmik zu unterliegen, welche nachmittags zu höheren BDNF-Messungen führt (Katoh-Semba, Wakako et al. 2007). Dieser Aspekt wurde in den meisten Studien nicht berücksichtigt. Durch das hier angewendete standardisierte Studienprotokoll einer Nüchternblutentnahme zwischen 7 Uhr und 10 Uhr morgens in allen Stichproben wurden mögliche zirkadiane Einflüsse minimiert.

5.2.6.2 Medikamenteneinnahme

Ein möglicher Effekt von Psychostimulanzien auf die periphere BDNF-Expression ließ sich in der klinischen Kontrollgruppe der Patienten mit ADHS nicht beobachten, wobei die Stichprobe aus nur neun Kindern bestand, was die Aussagekraft dieses Ergebnisses limitiert. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass diverse Psychopharmaka, welche häufig bei Patienten mit ASS oder ADHS eingesetzt werden, die zentrale BDNF-Konzentration beeinflussen können (Meredith, Callen et al. 2002). Ein Zusammenhang zwischen peripherer BDNF-Expression und Medikation wurde in der Studie von Correia und Coutinho et al. (2010) festgestellt, in der 30 von 146 Probanden mit ASS mit mindestens einem Wirkstoff aus den Medikamentenklassen der Antiepileptika, Neuroleptika, SSRI, Anxiolytika und Psychostimulanzien behandelt wurden (Correia, Coutinho et al. 2010). Sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen konnte in weiteren Untersuchungen eine Wirkung von bei ASS häufig eingesetzten Medikamenten (wie Antiepileptika, Antidepressiva und Antipsychotika) auf die BDNF-Expression in mehreren Hirnregionen bestätigt werden (Duman 1998; Biagini, Avoli et

al. 2001; Fumagalli, Molteni et al. 2003; Correia, Coutinho et al. 2010). Laut Shimizu und Hashimoto et al. (2003) beeinflussen besonders Antidepressiva den BDNF-Serumgehalt (Shimizu, Hashimoto et al. 2003).

Die Wirkung von Antipsychotika auf die BDNF-Expression wurde in Studien als uneinheitlich berichtet. Olanzapin und Aripiprazol steigerten die zentrale BDNF-Expression *in vivo* und *in vitro* (Lu, Bradley et al. 2004; Hammonds und Shim 2009; Lee und Kim 2009; Park, Lee et al. 2009; Park, Phuong et al. 2011). Olanzapin führte zu einer Hochregulierung der BDNF-mRNA-Expression, wohingegen Haloperidol sie entweder senkte (Bai, Chlan-Fourney et al. 2003; Fumagalli, Molteni et al. 2003) oder keinen Einfluss auf die zentrale BDNF-Expression zu haben schien (Park, Phuong et al. 2011). Folglich muss Medikation in zukünftigen Studien auch weiterhin als mögliche Einflussgröße auf die BDNF-Expression berücksichtigt werden.

5.2.6.3 ASS-Diagnostik

Im Rahmen der Autismus-Diagnostik wurde in fast allen in der Literatur vorliegenden Studien eine Diagnose gemäß der DSM-IV-Kriterien erhoben. Neben unseren Untersuchungen wurde in drei weiteren Studien die Diagnostik mit einem ADI-R (Hashimoto, Iwata et al. 2006; Nishimura, Nakamura et al. 2007; Correia, Coutinho et al. 2010) und nur in einer weiteren mit einem ADOS (Correia, Coutinho et al. 2010) erhärtet, obwohl beide Verfahren international zum Goldstandard in der Autismus-Diagnostik gehören und die höchste Validität aus der Kombination beider Verfahren und dem klinischen Eindruck erzielt werden kann (Mildenberger, Sitter et al. 2001). In einer Studie wurde ein *Theory of Mind* Test durchgeführt (Hashimoto, Iwata et al. 2006) und in beiden Studien aus Saudi-Arabien (Mansour, Mohamed et al. 2010; Al-Ayadhi 2011) andere bzw. landeseigene Autismus-Fragebögen angewendet (siehe 5.2.4). Der insgesamt zurückhaltende Einsatz diagnostischer Standardverfahren mindert die Verlässlichkeit der jeweiligen ASS-Diagnosestellung. Anzumerken ist auch, dass die in der ICD-10 und DSM-IV verwendeten autistischen Subdiagnosen in den meisten Studien nicht aufgeführt sind. Somit lässt sich kaum eruieren, inwieweit sich unterschiedliche Ausprägungsformen und Schweregrade autistischer Störungsbilder in der peripheren BDNF-Expression widerspiegeln könnten.

5.2.7 Aussagekraft und Gültigkeit der Ergebnisse

In der vorliegenden Forschungsarbeit wurden Ein- bzw. Ausschlusskriterien, eine Diagnosestellung gemäß ICD-10-Kriterien und die Anwendung autismspezifischer Manuale, die international als Goldstandard gelten, berücksichtigt. Die Probengewinnung und weitere Aufbereitung wurden standardisiert und nach Anleitung der Hersteller durchgeführt. Es wurde auf eine Homogenität der Gruppen bzgl. Alter und Geschlecht geachtet. Zudem sind ASS-Subdiagnosen erhoben und mögliche Einflussfaktoren der peripheren BDNF-Expression wie Alter, Intelligenzquotient, Medikation und Komorbidität berücksichtigt worden, was die Aussagekraft und Gültigkeit der Ergebnisse stärkt.

Kritisch muss die kleine Stichprobengröße im Vergleich zu den getesteten Variablen betrachtet werden. Insbesondere bei der Untersuchung „Einfluss einer Medikation auf die BDNF-Expression im Blut“ innerhalb des Kollektivs von Patienten mit ADHS wird mit einer Stichprobengröße von neun Personen die Aussagekraft deutlich geschmälert. Für zukünftige ergänzende Studien zu einem möglichen Medikamenteneinfluss soll die Zahl einzuschließender Probanden gesteigert werden. Die teils inkonsistenten Ergebnisse zu möglichen Zusammenhängen zwischen Phänotyp bzw. Kofaktoren und der peripheren BDNF-Expression in den Studienprojekten müssen durch weitere Untersuchungen an größeren Kollektiven ergänzt werden.

6. Ausblick

Für zukünftige Arbeiten wäre es, wie bereits bei Punkt 5.2.7 erwähnt, aufgrund der zahlreichen möglichen Einflussfaktoren auf die periphere BDNF-Expression sehr hilfreich, größere Stichproben zu untersuchen, um eine bessere Aussagekraft der Ergebnisse zu erzielen. Des Weiteren wäre es sinnvoll, den Entwicklungsstand der Probanden bzgl. präpubertär, pubertär und postpubertär nicht nur anhand der Tannerstadien, sondern auch durch eine gezielte Untersuchung der peripheren Hormonkonzentrationen zu erfassen. Da durch zahlreiche Studien ein Zusammenhang zwischen autistischer Symptomatik, BDNF-Expression und Testosteron-Konzentrationen immer wahrscheinlicher wird, sollte speziell eine Bestimmung der peripheren Testosteronwerte bei zukünftigen Studien nicht fehlen. Dieser Schritt könnte dazu beitragen, komplexe Zusammenhänge bezüglich Alter bzw. Entwicklungsstand, Geschlecht und BDNF-Expression aufzudecken. Außerdem wäre es aufgrund der derzeitigen Studienlage weiterhin notwendig, Psychopharmaka als BDNF-Expressions-modulierende Kofaktoren zu berücksichtigen und – falls möglich – medikamentennaive Patienten einzuschließen.

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Fragestellung nachgegangen, ob die Expression von BDNF im Blut bei Kindern und Jugendlichen mit ASS eine Dysregulation und/ oder eine Modulation durch komorbide Störungen sowie weitere Kovariaten zeigt. Ziel war es dabei, die Rolle von BDNF als potenziellem Kandidaten für die Ätiopathophysiologie bei ASS weiter zu klären und mögliche Einflussfaktoren (Komorbidität bei ASS, Alter der Patienten, Medikation etc.) auf die BDNF-Konzentration im Blut bei Kindern und Jugendlichen mit ASS zu untersuchen.

Die erste Hypothese lautete, dass Kinder und Jugendliche mit ASS im Vergleich zu abgestimmten Kontrollpersonen modulierte BDNF-Konzentrationen im Blut zeigen. Die zweite Hypothese bestand darin, dass die Ausprägung des autistischen Phänotyps, komorbide Störungen sowie weitere Kofaktoren die BDNF-Expression beeinflussen. Die erste Hypothese konnte zum Teil verifiziert werden: Kinder und Jugendliche mit ASS in den untersuchten Kollektiven zeigten auf mRNA- und Serumebene eine erniedrigte BDNF-Expression im Vergleich zu gesunden, abgestimmten Kontrollprobanden, jedoch nicht im Vergleich mit einer klinischen Kontrollgruppe von Patienten mit ADHS, einer sich ätiologisch und phänotypisch teils überlappenden Störung. Auch ergaben sich im Rahmen der zweiten Hypothese Hinweise auf eine mögliche Beeinflussung der peripheren BDNF-Expression durch die Kofaktoren „Alter“ und „autistischer Phänotyp“.

Es ergeben sich aus der vorliegenden Arbeit und aus Studien am Menschen und Tiermodell in der Literatur Hinweise auf ein komplexes Zusammenspiel von Alter bzw. Entwicklungsstand (und hierbei besonders der Konzentration von Testosteron) und der Expression von BDNF. Folglich sollte der Entwicklungsstand der Probanden inkl. des Geschlechtshormon-Status in zukünftigen Untersuchungen Berücksichtigung finden. Für ergänzende Studien wären auch größere Stichproben zur Validierung der Ergebnisse sinnvoll.

Abschließend soll die zu anfangs gestellte Frage aufgegriffen werden: Ist Autismus nun „eine Krankheit oder ein Anderssein“? Nach aktuellem Wissenstand sind ASS, wie oben erwähnt, neuronale Entwicklungsstörungen, welche mit qualitativen Beeinträchtigungen der sozialen Interaktion und Kommunikation sowie stereotypen Verhaltensweisen einhergehen. Die vorliegende Arbeit ergänzt bisherige Befunde zu

möglichen ätiopathophysiologischen Kandidaten, die für die Besonderheiten der neuronalen Entwicklung bei Menschen mit ASS verantwortlich sein könnten.

Dennoch - so Hans Asperger - „[...] scheint [es] uns, als wäre für gewisse wissenschaftliche oder künstlerische Höchstleistungen ein Schuss ´Autismus´ geradezu notwendig.“ Oder um es noch klarer zu formulieren: „Autism is both a disability and a difference. We need to find ways of alleviating the disability while respecting and valuing the difference.“ (Simon Baron-Cohen, 2001 in New Scientist). Zu Deutsch: Autismus ist beides – eine Behinderung und ein Anderssein. Wir müssen Wege finden, um die Behinderung zu mildern, während wir gleichzeitig versuchen müssen, das Anderssein zu respektieren und wertzuschätzen.

8. Literaturverzeichnis

Achenbach, T. M. et C. S. Edelbrock (1981). "Behavioral problems and competencies reported by parents of normal and disturbed children aged four through sixteen." *Monographs of the Society for Research in Child Development* 46(1): 1-82.

ADHS-Infoportal. (2011). "Elternfragebogen über das Verhalten von Kindern und Jugendlichen (CBCL/ 4-18)." Stand 10.09.2011. <http://www.adhs.info/fuer-paedagogen/fuer-den-arbeitsbereich-mit-jugendlichen/diagnostik/cbcl-4-18.html>.

ADHS-Infoportal. (2011). "Fremdbeurteilungsbogen für Aufmerksamkeitsdefizit- / Hyperaktivitätsstörungen (FBB-ADHS)." Stand 10.09.2011. <http://www.adhs.info/fuer-paedagogen/fuer-den-arbeitsbereich-mit-jugendlichen/diagnostik/fbb-adhs.html>.

Airaksinen, M. S., A. Titievsky, et al. (1999). "GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant?" *Molecular and cellular neurosciences* 13(5): 313-325.

Al-Ayadhi, L. (2011). "Serum Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in Autistic Children In Central Saudi Arabia." *The Open Conference Proceedings Journal* 2: 36-40.

Altar, C. A., C. B. Boylan, et al. (1994). "The neurotrophins NT-4/5 and BDNF augment serotonin, dopamine, and GABAergic systems during behaviorally effective infusions to the substantia nigra." *Experimental neurology* 130(1): 31-40.

Altar, C. A., R. E. Whitehead, et al. (2003). "Effects of electroconvulsive seizures and antidepressant drugs on brain-derived neurotrophic factor protein in rat brain." *Biological psychiatry* 54(7): 703-709.

American Psychiatric Association (2013). "Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM-5)" Stand 26.06.2013. www.dsm5.org.

Anderson, G. M. (2002). "Genetics of childhood disorders: XLV. Autism, part 4: serotonin in autism." *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 41(12): 1513-1516.

Angelucci, F., S. Brene, et al. (2005). "BDNF in schizophrenia, depression and corresponding animal models." *Molecular psychiatry* 10(4): 345-352.

Autismus-Hamburg. (2011). "Diagnostische Beobachtungsskala für Autistische Störungen (ADOS)." Stand 10.09.2011. <http://www.autismushamburg.de/ados.html>.

Autismus-Hamburg. (2011). "Diagnostisches Interview für Autismus - Revidiert (ADI-R)." Stand 10.09.2011. <http://www.autismushamburg.de/adi-r.html>.

- Avital, A., I. Goshen, et al. (2003). "Impaired interleukin-1 signaling is associated with deficits in hippocampal memory processes and neural plasticity." *Hippocampus* 13(7): 826-834.
- Bai, O., J. Chlan-Fourney, et al. (2003). "Expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus after treatment with antipsychotic drugs." *Journal of neuroscience research* 71(1): 127-131.
- Bandim, J. M., L. O. Ventura, et al. (2003). "Autism and Mobius sequence: an exploratory study of children in northeastern Brazil." *Arquivos de neuro-psiquiatria* 61(2A): 181-185.
- Baron-Cohen, S. (2008). *Autism and Asperger Syndrome (The Facts)*, OUP Oxford.
- Bekinschtein, P., M. Cammarota, et al. (2008). "BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(7): 2711-2716.
- Biagini, G., M. Avoli, et al. (2001). "Brain-derived neurotrophic factor superinduction parallels anti-epileptic--neuroprotective treatment in the pilocarpine epilepsy model." *Journal of neurochemistry* 76(6): 1814-1822.
- Binder, D. K. et H. E. Scharfman (2004). "Brain-derived neurotrophic factor." *Growth factors* 22(3): 123-131.
- Bölte, S. (2009). *Autismus. Spektrum, Ursachen, Diagnostik, Intervention, Perspektiven.* (1.Aufl.) Huber-Verlag, Bern.
- Bölte, S. et F. Poustka (2006). *Fragebogen zur Sozialen Kommunikation (FSK).* Huber-Verlag, Bern.
- Bölte, S., D. Rühl, et al., Eds. (2006). *ADI-R Diagnostisches Interview für Autismus Revidiert.* Huber-Verlag, Bern.
- Bustin, S. A., V. Benes, et al. (2009). "The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments." *Clinical chemistry* 55(4): 611-622.
- Casanova, M. F., I. A. van Kooten, et al. (2006). "Minicolumnar abnormalities in autism." *Acta neuropathologica* 112(3): 287-303.
- Cattell, R.B., R.H. Weiß, et al. (1997). *Grundintelligenztest Skala (CFT).* (5., revid. Aufl.) Hogrefe-Verlag, Göttingen.
- Chao, M. V. (2003). "Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways." *Nature reviews. Neuroscience* 4(4): 299-309.

- Chen, B., D. Dowlatshahi, et al. (2001). "Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication." *Biological psychiatry* 50(4): 260-265.
- Chen, G., T. G. Gharib, et al. (2002). "Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas." *Molecular & cellular proteomics: MCP* 1(4): 304-313.
- Ciaranello, R. D. (1982). "Hyperserotonemia and early infantile autism." *The New England journal of medicine* 307(3): 181-183.
- Connolly, A. M., M. Chez, et al. (2006). "Brain-derived neurotrophic factor and autoantibodies to neural antigens in sera of children with autistic spectrum disorders, Landau-Kleffner syndrome, and epilepsy." *Biological psychiatry* 59(4): 354-363.
- Correia, C. T., A. M. Coutinho, et al. (2010). "Increased BDNF levels and NTRK2 gene association suggest a disruption of BDNF/TrkB signaling in autism." *Genes, brain, and behavior* 9(7): 841-848.
- Corsello, C., V. Hus, et al. (2007). "Between a ROC and a hard place: decision making and making decisions about using the SCQ." *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines* 48(9): 932-940.
- Courchesne, E. (2004). "Brain development in autism: early overgrowth followed by premature arrest of growth." *Mental retardation and developmental disabilities research reviews* 10(2): 106-111.
- Croen, L. A., P. Goines, et al. (2008). "Brain-derived neurotrophic factor and autism: maternal and infant peripheral blood levels in the Early Markers for Autism (EMA) Study." *Autism research: official journal of the International Society for Autism Research* 1(2): 130-137.
- D'Sa, C. et R. S. Duman (2002). "Antidepressants and neuroplasticity." *Bipolar disorders* 4(3): 183-194.
- Deutsche Gesellschaft für Kinder- und Jugendpsychiatrie, P. u. P. D. (2007). *Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendpsychiatrie.*
- Dewey, D., M. Cantell, et al. (2007). "Motor and gestural performance in children with autism spectrum disorders, developmental coordination disorder, and/or attention deficit hyperactivity disorder." *Journal of the International Neuropsychological Society: JINS* 13(2): 246-256.
- Dhossche, D., H. Applegate, et al. (2002). "Elevated plasma gamma-aminobutyric acid (GABA) levels in autistic youngsters: stimulus for a GABA hypothesis of autism." *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research* 8(8): PR1-6.

- Döpfner, M., Görtz-Dorten, A. & Lehmkuhl, G., Ed. (2008). Diagnostik-System für Psychische Störungen im Kindes- und Jugendalter nach ICD-10 und DSM-IV, DISYPS-II. Huber-Verlag, Bern.
- Duketis, E. (2010) "Vom Verdacht zur Diagnose: Früherkennung von Autismus-Spektrum-Störungen." (PDF-Datei) 4. Fachtag Autismus, Ravensburg, 23.01.2010.
- Duman, R. S. (1998). "Novel therapeutic approaches beyond the serotonin receptor." *Biological psychiatry* 44(5): 324-335.
- Dziuk, M. A., J. C. Gidley Larson, et al. (2007). "Dyspraxia in autism: association with motor, social, and communicative deficits." *Developmental medicine and child neurology* 49(10): 734-739.
- Egan, M. F., M. Kojima, et al. (2003). "The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function." *Cell* 112(2): 257-269.
- Fujimura, H., C. A. Altar, et al. (2002). "Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation." *Thrombosis and haemostasis* 87(4): 728-734.
- Fumagalli, F., R. Molteni, et al. (2003). "Effect of antipsychotic drugs on brain-derived neurotrophic factor expression under reduced N-methyl-D-aspartate receptor activity." *Journal of neuroscience research* 72(5): 622-628.
- Geier, D. A. et M. R. Geier (2006). "A clinical and laboratory evaluation of methionine cycle-transsulfuration and androgen pathway markers in children with autistic disorders." *Hormone research* 66(4): 182-188.
- Geier, D. A. et M. R. Geier (2007). "A prospective assessment of androgen levels in patients with autistic spectrum disorders: biochemical underpinnings and suggested therapies." *Neuroendocrinology letters* 28(5): 565-573.
- Ghaziuddin, M., E. Weidmer-Mikhail, et al. (1998). "Comorbidity of Asperger syndrome: a preliminary report." *Journal of intellectual disability research : JIDR* 42 (Pt 4): 279-283.
- Golden, E., A. Emiliano, et al. (2010). "Circulating brain-derived neurotrophic factor and indices of metabolic and cardiovascular health: data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging." *PloS one* 5(4): e10099.
- Goldstein, S. et A. J. Schwebach (2004). "The comorbidity of Pervasive Developmental Disorder and Attention Deficit Hyperactivity Disorder: results of a retrospective chart review." *Journal of autism and developmental disorders* 34(3): 329-339.

- Greenbaum, D., C. Colangelo, et al. (2003). "Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale." *Genome biology* 4(9): 117.
- Guo, Y., P. Xiao, et al. (2008). "How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes." *Acta biochimica et biophysica Sinica* 40(5): 426-436.
- Gygi, S. P., Y. Rochon, et al. (1999). "Correlation between protein and mRNA abundance in yeast." *Molecular and cellular biology* 19(3): 1720-1730.
- Haddon, M. (2005). *Supergute Tage oder Die sonderbare Welt des Christopher Boone*, Goldmann-Verlag, München.
- Hammonds, M. D. et S. S. Shim (2009). "Effects of 4-week treatment with lithium and olanzapine on levels of brain-derived neurotrophic factor, B-cell CLL/lymphoma 2 and phosphorylated cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein in the sub-regions of the hippocampus." *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 105(2): 113-119.
- Hanley, H. G., S. M. Stahl, et al. (1977). "Hyperserotonemia and amine metabolites in autistic and retarded children." *Archives of general psychiatry* 34(5): 521-531.
- Hashimoto, K., Y. Iwata, et al. (2006). "Reduced serum levels of brain-derived neurotrophic factor in adult male patients with autism." *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 30(8): 1529-1531.
- Hashimoto, K., E. Shimizu, et al. (2004). "Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders." *Brain research. Brain research reviews* 45(2): 104-114.
- Hashimoto, R., N. Takei, et al. (2002). "Lithium induces brain-derived neurotrophic factor and activates TrkB in rodent cortical neurons: an essential step for neuroprotection against glutamate excitotoxicity." *Neuropharmacology* 43(7): 1173-1179.
- Hashimoto, T., M. Tayama, et al. (1995). "Development of the brainstem and cerebellum in autistic patients." *Journal of autism and developmental disorders* 25(1): 1-18.
- Hill, R. A., Y. W. Wu, et al. (2012). "Modulatory Effects of Sex Steroid Hormones on Brain-Derived Neurotrophic Factor-Tyrosine Kinase B Expression during Adolescent Development in C57Bl/6 Mice." *Journal of neuroendocrinology* 24(5): 774-788.
- Hogrefe-Verlag. (2011). "ADI-R Diagnostisches Interview für Autismus-Revidiert. Deutsche Fassung des Autism Diagnostic Interview-Revised." Stand 10.09.2011. <http://www.testzentrale.de/programm/diagnostisches-interview-fur-autismus-revidiert.html#details>.

- Hogrefe-Verlag. (2011). "ADOS Diagnostische Beobachtungsskala für Autistische Störungen. Deutsche Fassung der Autism Diagnostic Observation Schedule." Stand 10.09.2011 <http://www.testzentrale.de/programm/diagnostische-beobachtungsskala-fur-autistische-storungen.html>.
- Hogrefe-Verlag. (2011). "CBCL/ 4-18 Elternfragebogen über das Verhalten von Kindern und Jugendlichen." Stand 10.09.2011. <http://www.testzentrale.de/programm/elternfragebogen-uber-das-verhalten-von-kindern-und-jugendlichen.html>.
- Holtmann, M., S. Bölte, et al. (2005). "ADHD, Asperger syndrome, and high-functioning autism." *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 44(11): 1101.
- Holtmann, M., S. Bölte, et al. (2007). "Attention deficit hyperactivity disorder symptoms in pervasive developmental disorders: association with autistic behavior domains and coexisting psychopathology." *Psychopathology* 40(3): 172-177.
- Huggett, J., K. Dheda, et al. (2005). "Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations." *Genes and immunity* 6(4): 279-284.
- Hunnerkopf, R., A. Strobel, et al. (2007). "Interaction between BDNF Val66Met and dopamine transporter gene variation influences anxiety-related traits." *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 32(12): 2552-2560.
- Iughetti, L., E. Casarosa, et al. (2011). "Plasma brain-derived neurotrophic factor concentrations in children and adolescents." *Neuropeptides* 45(3): 205-211.
- Kamp-Becker, I., E. Duketis, et al. (2010). "Diagnostik und Therapie von Autismus-Spektrum-Störungen im Kindesalter " *Kindheit und Entwicklung* 19, Number 3 / 2010: 144-157.
- Kamp-Becker, I., F. Mattejat, et al. (2005). "[The Marburg Rating Scale for Asperger's Syndrome (MBAS)--a screening instrument for high-functioning autistic disorders]." *Zeitschrift für Kinder- und Jugendpsychiatrie und Psychotherapie* 33(1): 15-26.
- Kamp-Becker, I. et H. Remschmidt. (2005). "MBAS (Marburger Beurteilungsskala zum Asperger-Syndrom)." Stand 10.09.2011. http://www.schulberatung.bayern.de/imperia/md/content/schulberatung/pdfobwst/dienstbesprechungen/db09_10/1_anleitung.pdf.
- Karege, F., M. Schwald, et al. (2002). "Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets." *Neuroscience letters* 328(3): 261-264.

- Katoh-Semba, R., R. Wakako, et al. (2007). "Age-related changes in BDNF protein levels in human serum: differences between autism cases and normal controls." *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 25(6): 367-372.
- Kemper, T. L. et M. L. Bauman (2002). "Neuropathology of infantile autism." *Molecular psychiatry* 7 Suppl 2: S12-13.
- Kolevzon, A., R. Gross, et al. (2007). "Prenatal and perinatal risk factors for autism: a review and integration of findings." *Archives of pediatrics & adolescent medicine* 161(4): 326-333.
- Korte, M., P. Carroll, et al. (1995). "Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(19): 8856-8860.
- Lang, S. B., V. Stein, et al. (2007). "Endogenous brain-derived neurotrophic factor triggers fast calcium transients at synapses in developing dendrites." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27(5): 1097-1105.
- Lee, B. H. et Y. K. Kim (2009). "Increased plasma brain-derived neurotrophic factor, not nerve growth factor-Beta, in schizophrenia patients with better response to risperidone treatment." *Neuropsychobiology* 59(1): 51-58.
- Lee, D. O. et O. Y. Ousley (2006). "Attention-deficit hyperactivity disorder symptoms in a clinic sample of children and adolescents with pervasive developmental disorders." *Journal of child and adolescent psychopharmacology* 16(6): 737-746.
- Lord, C., M. Rutter, et al. (1989). "Autism diagnostic observation schedule: a standardized observation of communicative and social behavior." *Journal of autism and developmental disorders* 19(2): 185-212.
- Lord, C., M. Rutter, et al. (1994). "Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders." *Journal of autism and developmental disorders* 24(5): 659-685.
- Lu, X. H., R. J. Bradley, et al. (2004). "Olanzapine produces trophic effects in vitro and stimulates phosphorylation of Akt/PKB, ERK1/2, and the mitogen-activated protein kinase p38." *Brain research* 1011(1): 58-68.
- Maisonpierre, P. C., L. Belluscio, et al. (1990). "Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF." *Science* 247(4949 Pt 1): 1446-1451.
- Mansour, M., A. Mohamed, et al. (2010). "Brain Derived Neurotrophic Factor in Autism." *Current Psychiatry. Ain Shams University* 17: 23-29.

- Martin-Iverson, M. T., K. G. Todd, et al. (1994). "Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 activate striatal dopamine and serotonin metabolism and related behaviors: interactions with amphetamine." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14(3 Pt 1): 1262-1270.
- Melchers, P. et U. Preuß (2009). Kaufman Assessment Battery for Children. Dt. Version (K-ABC) (8. unveränd. Aufl.) Pearson Assessment, Frankfurt/ M.
- Meredith, G. E., S. Callen, et al. (2002). "Brain-derived neurotrophic factor expression is increased in the rat amygdala, piriform cortex and hypothalamus following repeated amphetamine administration." *Brain research* 949(1-2): 218-227.
- Mildenberger, K., S. Sitter, et al. (2001). "The use of the ADI-R as a diagnostic tool in the differential diagnosis of children with infantile autism and children with a receptive language disorder." *European child & adolescent psychiatry* 10(4): 248-255.
- Miyazaki, K., N. Narita, et al. (2004). "Serum neurotrophin concentrations in autism and mental retardation: a pilot study." *Brain & development* 26(5): 292-295.
- Mroczek, N. (2011). "Diagnostik bei Autismus-Spektrum-Störungen (ASS): Vorstellung der klinischen Diagnosekriterien und -verfahren." (PDF-Datei) Interdisziplinäre Fachtagung für den Landkreis Harburg 22.01.2011.
- Nelson, K. B., J. K. Grether, et al. (2001). "Neuropeptides and neurotrophins in neonatal blood of children with autism or mental retardation." *Annals of neurology* 49(5): 597-606.
- Nelson, P. G., T. Kuddo, et al. (2006). "Selected neurotrophins, neuropeptides, and cytokines: developmental trajectory and concentrations in neonatal blood of children with autism or Down syndrome." *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 24(1): 73-80.
- Nibuya, M., S. Morinobu, et al. (1995). "Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15(11): 7539-7547.
- Nickl-Jockschat, T. et T. M. Michel (2011). "The role of neurotrophic factors in autism." *Molecular psychiatry* 16(5): 478-490.
- Nishimura, K., K. Nakamura, et al. (2007). "Genetic analyses of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene in autism." *Biochemical and biophysical research communications* 356(1): 200-206.
- Nolan, T., R. E. Hands, et al. (2006). "Quantification of mRNA using real-time RT-PCR." *Nature protocols* 1(3): 1559-1582.

- Pandey, G. N., Y. Dwivedi, et al. (2010). "Brain-derived neurotrophic factor gene and protein expression in pediatric and adult depressed subjects." *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 34(4): 645-651.
- Park, S. W., J. G. Lee, et al. (2009). "Differential effects of aripiprazole and haloperidol on BDNF-mediated signal changes in SH-SY5Y cells." *European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 19(5): 356-362.
- Park, S. W., V. T. Phuong, et al. (2011). "Effects of antipsychotic drugs on BDNF, GSK-3beta, and beta-catenin expression in rats subjected to immobilization stress." *Neuroscience research* 71(4): 335-340.
- Perry, E. K., M. L. Lee, et al. (2001). "Cholinergic activity in autism: abnormalities in the cerebral cortex and basal forebrain." *The American journal of psychiatry* 158(7): 1058-1066.
- Petermann, F. et U. Petermann (2008). *Hamburg-Wechsler-Intelligenztest für Kinder IV (HAWIK-IV)*. Huber-Verlag, Bern
- Pezet, S. et M. Malcangio (2004). "Brain-derived neurotrophic factor as a drug target for CNS disorders." *Expert opinion on therapeutic targets* 8(5): 391-399.
- Polleux, F. et J. M. Lauder (2004). "Toward a developmental neurobiology of autism." *Mental retardation and developmental disabilities research reviews* 10(4): 303-317.
- Rassow, J., K. Hauser, et al. (2006). *Biochemie*. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.
- Remschmidt, H. et I. Kamp-Becker (2006). *Marburger Beurteilungsskala zum Asperger-Syndrom*.
- Remschmidt, H. et I. Kamp-Becker (2007). "Das Asperger-Syndrom – eine Autismus-Spektrum-Störung." *Deutsches Ärzteblatt* 104(13): 873-882.
- Richter-Schmidinger, T., P. Alexopoulos, et al. (2011). "Influence of brain-derived neurotrophic-factor and apolipoprotein E genetic variants on hippocampal volume and memory performance in healthy young adults." *Journal of neural transmission* 118(2): 249-257.
- Riikonen, R. et R. Vanhala (1999). "Levels of cerebrospinal fluid nerve-growth factor differ in infantile autism and Rett syndrome." *Developmental medicine and child neurology* 41(3): 148-152.
- Rodier, P. M., J. L. Ingram, et al. (1996). "Embryological origin for autism: developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei." *The Journal of comparative neurology* 370(2): 247-261.

- Rommelse, N.N., B. Franke, et al. (2010). "Shared heritability of attention-deficit/hyperactivity disorder and autism spectrum disorder." *Eur Child Adolesc Psychiatry* 19: 281–295.
- Rosenqvist, E., H. Kayhty, et al. (2001). "Determination of antibody responses to meningococcal antigens by ELISA." *Methods in molecular medicine* 66: 255-273.
- Rühl, D., S. Bölte, et al. (2004). *ADOS - Diagnostische Beobachtungsskala für Autistische Störungen*. Huber-Verlag, Bern.
- Ruta, L., E. Ingudomnukul, et al. (2011). "Increased serum androstenedione in adults with autism spectrum conditions." *Psychoneuroendocrinology* 36(8): 1154-1163.
- Rutter, M., A. Bailey, et al., Eds. (2003). *Social communication questionnaire (SCQ)*. Los Angeles (CA).
- Schmitz, C. et P. Rezaie (2008). "The neuropathology of autism: where do we stand?" *Neuropathology and applied neurobiology* 34(1): 4-11.
- Schwarz, E., P. C. Guest, et al. (2011). "Sex-specific serum biomarker patterns in adults with Asperger's syndrome." *Molecular psychiatry* 16(12): 1213-1220.
- Seidah, N. G., S. Benjannet, et al. (1996). "Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases." *FEBS letters* 379(3): 247-250.
- Seidah, N. G., S. Benjannet, et al. (1996). "Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases." *The Biochemical journal* 314 (Pt 3): 951-960.
- Sheikh, A. M., M. Malik, et al. (2010). "BDNF-Akt-Bcl2 antiapoptotic signaling pathway is compromised in the brain of autistic subjects." *Journal of neuroscience research* 88(12): 2641-2647.
- Shimizu, E., K. Hashimoto, et al. (2003). "Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants." *Biological psychiatry* 54(1): 70-75.
- Siuciak, J. A., C. Boylan, et al. (1996). "BDNF increases monoaminergic activity in rat brain following intracerebroventricular or intraparenchymal administration." *Brain research* 710(1-2): 11-20.
- Snow, A. V. et L. Lecavalier (2008). "Sensitivity and specificity of the Modified Checklist for Autism in Toddlers and the Social Communication Questionnaire in preschoolers suspected of having pervasive developmental disorders." *Autism: the international journal of research and practice* 12(6): 627-644.

- Stiensmeier-Pelster, J., M. Schürmann, et al., Eds. (2000). *Depressions-Inventar für Kinder und Jugendliche (DIKJ)*. Göttingen.
- Sullivan, P. F., C. Fan, et al. (2006). "Evaluating the comparability of gene expression in blood and brain." *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 141B(3): 261-268.
- Takagishi, H., T. Takahashi, et al. (2010). "Salivary testosterone levels and autism-spectrum quotient in adults." *Neuro endocrinology letters* 31(6): 837-841.
- Taurines R, Schwenck C, Westerwald E, Sachse M, Siniatchkin M et al. (2012). "ADHD and autism: differential diagnosis or overlapping traits? A selective review." *Atten Defic Hyperact Disord* 4: 115-139.
- Taurines R, Segura M, Schecklmann M, Albantakis L et al. (2014). "Altered peripheral BDNF expression in children and adolescents with autism spectrum disorders." *Journal of Neural Transmission* Feb 6. [Epub ahead of print]
- Tierney, E., N. A. Nwokoro, et al. (2001). "Behavior phenotype in the RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome." *American journal of medical genetics* 98(2): 191-200.
- Tordjman, S., P. Ferrari, et al. (1997). "Androgenic activity in autism." *The American journal of psychiatry* 154(11): 1626-1627.
- Tuchman, R. (2003). "Autism." *Neurologic clinics* 21(4): 915-932, viii.
- Veenstra-Vanderweele, J., E. Cook, Jr., et al. (2003). "Genetics of childhood disorders: XLVI. Autism, part 5: genetics of autism." *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 42(1): 116-118.
- Veenstra-Vanderweele, J. et E. H. Cook, Jr. (2004). "Molecular genetics of autism spectrum disorder." *Molecular psychiatry* 9(9): 819-832.
- Weiß, R. H. (2006). "CFT 20-R - Grundintelligenztest Skala 2 - Revision". Hogrefe-Verlag, Göttingen.
- Xie, C. W., D. Sayah, et al. (2000). "Deficient long-term memory and long-lasting long-term potentiation in mice with a targeted deletion of neurotrophin-4 gene." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(14): 8116-8121.
- ZTD, U. F. (2012). "DIKJ - Depressions-Inventar für Kinder und Jugendliche ". Stand 10.09.2011. <http://www.unifr.ch/ztd/HTS/infest/WEB-Informationssystem/de/4de001/5b77cac3720411d4af890000e87f89ec/hb.htm>.

9. Anhang

Altered peripheral *BDNF* mRNA expression and BDNF protein concentrations in blood of children and adolescents with autism spectrum disorders

Regina Taurines^{1*}, Monica Segura^{2*}, Martin Schecklmann³, Laura Albantakis¹, Edna Grünblatt⁴, Susanne Walitza⁴, Thomas Jans¹, Benjamin Lyttwin¹, Michael Haberhausen⁵, Frank M. Theisen⁶, Berthold Martin¹, Wolfgang Briegel⁷, Johannes Thome^{8,9}, Christina Schwenck¹⁰, Marcel Romanos¹, Manfred Gerlach¹

¹ Department of Child and Adolescent Psychiatry, Psychosomatics and Psychotherapy, University of Würzburg, Germany

² Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitat Internacional de Catalunya, Spain

³ Department of Psychiatry and Psychotherapy, University of Regensburg, Germany

⁴ Department of Child and Adolescent Psychiatry, University of Zurich, Switzerland

⁵ Department of Child and Adolescent Psychiatry and Psychotherapy, Philipps-University Marburg, Germany

⁶ Department of Child and Adolescent Psychiatry, Herz-Jesu-Krankenhaus, Fulda, Germany

⁷ Department of Child and Adolescent Psychiatry and Psychotherapy, Leopoldina Hospital, Schweinfurt, Germany

⁸ Department of Psychiatry and Psychotherapy, University of Rostock, Germany

⁹ College of Medicine, Swansea University, U.K.

¹⁰ Department of Child and Adolescent Psychiatry, Psychosomatics and Psychotherapy, Goethe-University, Frankfurt/M., Germany

*These authors contributed equally to this work.

Correspondence:

Dr. Regina Taurines (née Hünnerkopf)

Department of Child and Adolescent Psychiatry and Psychotherapy

University of Würzburg

Füchsleinstraße 15

97080 Würzburg

Germany

Phone: + 49 210 78600

Fax: + 49 201 78040

Email: taurines@kjp.uni-wuerzburg.de

Abstract

Findings from molecular genetic studies and analyses of postmortem and peripheral tissue led to the hypothesis that neurotrophins - as crucial moderators of neuroplasticity - impact on the pathophysiology of autism spectrum disorder (ASD). The study projects aimed to complement former results on the role of brain derived neurotrophic factor (BDNF), a member of the neurotrophin family with fundamental impact on brain development and function. The purpose of this work was to investigate peripheral *BDNF* mRNA expression and BDNF protein concentrations in ASD as potential surrogates for the effects observed in the central nervous system (CNS).

In a BDNF protein quantification study, serum concentrations were analyzed using Enzyme-Linked Immunosorbent-Assays (ELISA) in 24 male patients with ASD, all with an IQ > 70 (age 13.9 ± 3.0 years) and 20 age and gender matched healthy control subjects (age 14.4 ± 2.1 years; $p = 0.522$). In a further independent project, a *BDNF* mRNA expression analysis, mRNA levels from total blood were assessed by quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) in a sample of 16 male ASD patients (age 10.8 ± 2.2), 15 age and gender matched healthy controls (age 12.1 ± 2.2) and 15 patients with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) as a clinical control group (age 11.8 ± 2.2 ; $p = 0.207$).

In the protein quantification project, significantly decreased BDNF serum concentrations were found in ASD cases compared to healthy control children ($t = -2.123$, $df = 42$, $p < 0.05$). Analysis of covariance (ANCOVA) revealed this result in accordance with significant reductions in *BDNF* mRNA expression in ASD, observed in the mRNA expression study ($F = 3.65$; $df = 2.43$; $p < 0.05$); neither age nor IQ confounded the result, as indicated by ANCOVA ($F = 3.961$; $df = 2.41$; $p < 0.05$, $\eta^2 = 0.162$).

Our study projects supported the notion that neurotrophins are involved in the pathophysiology of ASD. Further studies may eventually contribute to the identification of distinct peripheral mRNA expression and protein concentration patterns possibly supporting diagnostic and therapeutic processes.

Key words: autism spectrum disorder (ASD), brain derived neurotrophic factor (BDNF), ADHD, neurodevelopmental disorders, peripheral expression

Introduction

Autism spectrum disorder (ASD) is a complex and heterogeneous disorder with a high genetic susceptibility and persistence throughout life (Freitag et al. 2010, Taurines et al. 2012). It has been suggested that the core symptoms of deficits in social communication and interaction as well as stereotypical behavior patterns are related to neurodevelopmental abnormalities of pre-, peri- and early postnatal origin in the white and grey matter of various brain regions (Brambilla et al. 2004, Polleux and Lauder 2004, Amaral et al. 2008, Schmitz and Rezaie 2008).

From pre-natal to adult age, neuronal plasticity requires the specific, modulated and functional expression of neurotrophic factors. Neurotrophins impact on cell phenotypes, cell migration, axonal and dendritic growth, synaptic plasticity and neurotransmitter release.

A prominent and widely studied member of the neurotrophin family is brain-derived neurotrophic factor (BDNF). BDNF is highly expressed in cortical and hippocampal brain areas and impacts on neuronal differentiation and survival, activity-dependent dendritic and axonal out-growth, synapse formation and neuronal plasticity underlying processes of learning and memory (Poo 2001, Yamada et al. 2002, Egan et al. 2003, Polleux and Lauder 2004, Bekinschtein et al. 2008, Pardon 2010, Richter-Schmidinger et al. 2011). It was suggested that the replicated finding of transient, early increase of brain growth observed in toddlers with ASD might be caused by dysfunction of the neurotrophin system with an early elevated *BDNF* expression causing increased dendritic branching (Polleux and Lauder 2004). Findings in *BDNF* knockout mice of impaired cognitive functions, increased aggression, anxiety and motor activity resemble behavioral features, seen in patients with neurodevelopmental disorders, such as ASD (Kernie et al. 2000, Ito et al. 2011). BDNF is discussed in the context of several psychiatric conditions, e.g. of stress related disorders, anxiety,

depression and suicide (Chen et al. 2001, D'Sa and Duman 2002, Hünnerkopf et al. 2007, Martinowich et al. 2007, Tsai et al. 2008, Alleva and Francia 2009, Dwivedi 2009, Pandey et al. 2010, Pardon 2010, Terracciano et al. 2010), conditions frequently comorbid with autistic symptomatology, especially in individuals with high functioning ASD (Lai et al. 2013). BDNF also modulates serotonergic pathways, a neurotransmitter system believed to be crucially involved in ASD pathophysiology (Altar et al. 1994, Siuciak et al. 1996).

Molecular genetic studies support a possible role of BDNF in ASD pathophysiology by the association of *BDNF* SNP haplotype combinations with this disorder in a trios-based study (Nishimura et al. 2007) as well as in a case control design (Cheng et al. 2009a, Cheng et al. 2009b). However, no association was found for 15 analyzed *BDNF* SNPs and ASD by Correia and co-workers (2010).

A potential involvement of BDNF in ASD is also derived from studies on altered *BDNF* mRNA expression and BDNF protein concentrations in the blood (e.g. Nelson et al. 2001, Miyazaki et al. 2004, Nishimura et al. 2007, Correia et al. 2010). Although the origin of BDNF in this peripheral tissue is still unclear in detail, platelets are thought of as storage compartments and as a major source of BDNF in the blood (Fujimura et al. 2002, Karege et al. 2005, Lommatzsch et al. 2005). In addition to a presumed BDNF production in white blood cells (Braun et al. 1999, Kerschensteiner et al. 1999, Gielen et al. 2003), a bidirectional movement of BDNF through brain and blood has been suggested (Pan et al. 1998). Therefore, altered *BDNF* expression in the periphery might reflect altered expression in the CNS with impact on neuroplastic abnormalities observed in ASD.

ASD is highly comorbid with attention deficit hyperactivity disorder, ADHD (Noterdaeme and Wriedt 2010). Although both disorders to some extent share genetic factors and phenotypic features (Rommelse et al. 2010, Williams et al. 2010, Taurines et al. 2012), they are also characterized by distinct neuropsychological impairments in the field of attention, reward processing and social cognition (Taurines et al. 2012). Therefore, we investigated boys with

ADHD as a clinical control group in order to estimate the categorical specificity of our results.

In conclusion, evidence from molecular genetic studies and analyses of postmortem and peripheral tissue led to the hypothesis that neurotrophins impact on ASD pathophysiology.

Assessing *BDNF* mRNA expression and BDNF protein serum concentrations in blood of well-characterized boys with ASD, our study projects aimed to complement former research in this field, to identify potential surrogates of primary changes in the CNS. Hitherto existing studies on *BDNF* mRNA expression and BDNF protein concentrations in blood often included heterogeneous and insufficiently characterized patient samples, not confirming ASD diagnosis by the internationally valid diagnostic instruments (Lord et al. 1989, Lord et al. 1994).

Material and Methods:

Subjects

The BDNF protein quantification study and the *BDNF* mRNA expression project were approved by the local ethics committees (Wuerzburg study numbers 8/06 and 227/09, Marburg study number 118/06) and performed in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki.

Due to the low availability of female patients, only male subjects were included, thus increasing homogeneity of our samples.

BDNF serum protein quantification study:

Patients with ASD and ADHD were recruited at the Departments for Child and Adolescent Psychiatry and Psychotherapy of the University Hospitals of Wuerzburg and Marburg after gaining written informed consent. They were diagnosed by an experienced child psychiatrist according to ICD-10 criteria and excluded in case of a known severe somatic or neurological disorder, schizophrenia or an intelligence level below IQ 70. Subjects were excluded from the healthy control group if they suffered from a somatic or neurological

disease, were taking medication or exhibited T-scores of > 64 in the internal, external or total score of the *Child Behavior Check List*, CBCL (Achenbach and Edelbrock 1981, Döpfner et al. 1994).

Diagnostic in ASD was performed with German versions of the following tools: the *Social Communication Questionnaire* (SCQ), the *Autism Diagnostic Observation Schedule* (ADOS) as well as the *Autism Diagnostic Interview-Revised* (ADI-R) (Lord et al. 1989, 1994; Rutter and Bailey 2003, Ruehl et al. 2004, Boelte and Poustka 2006a, Boelte et al. 2006b). Patients with ASD were included, if the clinical diagnosis was confirmed by at least one of the “gold standard” measures for ASD, the ADI-R or the ADOS.

Healthy controls were screened for behavioral problems by the CBCL (Achenbach and Edelbrock 1981, Döpfner et al. 1994).

IQ in the ASD group was assessed with German assessment tools based on the following intelligence tests: *Wechsler Intelligence Scale for Children* (Wechsler 1949, Tewes et al. 1999, Petermann and Petermann 2007), *Kaufman Assessment Battery for Children* (Kaufman and Kaufman 2004, Melchers and Preuß 2009) or *Culture Fair Intelligence Test* (Cattell 1949, Cattell et al. 1997, Weiß 1998). The choice of different measures was due to individual clinical necessities.

The ASD group consisted of 24 male patients with diagnoses of high functioning autism, atypical autism or Asperger Syndrome (mean age 13.9 ± 3.0 years; range 8.2 - 18.0 years; for demographic details see **Table 1**). 88% of patients ($n = 21$) were above the cut-offs for both, ADI-R and ADOS, 12% ($n = 3$) over the cut-off of one of these measures. Autistic patients were highly comorbid with ADHD (58.3%). The ASD group was compared to a control sample of 20 healthy developing male participants (mean age 14.4 ± 2.1 ; range 8.7-17.2 years; for demographic details see **Table 1**). There was no significant age difference between ASD patients and control subjects ($t = -0.65$, $df = 42$, $p = 0.522$).

***BDNF* mRNA expression study:**

Diagnostic procedures, inclusion and exclusion criteria for autistic patients and healthy control children of the *BDNF* mRNA expression study were similar to the project on BDNF serum quantification.

Patients with ADHD were diagnosed by an experienced child psychiatrist according to ICD-10 criteria and excluded in case of a known severe somatic or neurological disorder, schizophrenia or an intelligence level below IQ 70. ADHD diagnosis was confirmed by the *Parent Rating Scale for Attention Deficit Hyperactivity Disorder*, FBB-ADHD (Döpfner et al. 2008). ADHD patients with predominantly inattentive, predominantly impulsive as well as combined symptomatology were included (> 90th percentile in the FBB-ADHD).

IQ of patients with ASD, ADHD and healthy controls was assessed with German assessment tools based on the above mentioned intelligence tests, the choice of instrument depending on individual clinical necessities.

In the *BDNF* mRNA expression study, mRNA samples, derived from full blood, were analyzed in independent groups of male patients with ASD, age- and gender-matched normally developing children and adolescents, as well as boys with ADHD as a clinical control group (for demographic details see **Table 2**).

The ASD group consisted of 16 male children and adolescents with high functioning autism, atypical autism and Asperger Syndrome (mean age 10.8 ± 2.2 ; range 6.7 - 14.3 years). 75% of patients ($n = 12$) were above the cut-offs for both, ADI-R and ADOS, 25% ($n = 4$) were over the cut-off of one of these measures. ASD patients were highly comorbid with ADHD (75%). Samples of autistic patients were compared against samples of 15 gender and age-matched healthy developing controls (mean age 12.1 ± 2.2 ; range 7.2 – 14.9 years; for demographic details see **Table 2**). Furthermore 15 male children and adolescents with ADHD were included (mean age 11.8 ± 2.2 ; range 8.2-14.9 years). In a small subgroup of 9 ADHD patients, we analyzed mRNA samples from two time points, one under stimulant medication and one medication-free for at least 24 hours (equaling a wash-out period of more than 10 half-lives of

methylphenidate) to rule out major effects of psychostimulants on *BDNF* mRNA expression.

One-way ANOVA revealed no significant age difference between the three groups ($F = 1.64$; $df = 2,43$; $p = 0.207$), however significant group differences of IQ ($F = 4.80$; $df = 2,43$; $p < 0.05$) with higher IQ scores in healthy controls compared to ASD patients ($p < 0.01$).

Serum sample collection

Fasting blood samples were collected between 7.30 and 10.00 a.m. by standard phlebotomy and allowed to clot for 30 min at room temperature. The samples were then centrifuged at 1912 g for 5 min and 500 μ l aliquots were immediately stored at -80°C until analysis.

Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay (ELISA)

BDNF levels were measured in duplicates using the Human BDNF Quantikine ELISA kit (R & D-Systems) with a sensitivity of 20pg/ml according to the manufacturer's instructions.

Isolation of total blood RNA

PAXgene blood RNA kit (PreAnalytiX, Hombrechtikon, Switzerland) was used according to the manufacturer's instructions to isolate total RNA from blood followed by DNase treatment (RNase-free DNase Set, Qiagen, Hilden, Germany 79254). RNA purity and yield was evaluated by UV-spectroscopy.

Quantitative Real-time PCR (qRT PCR)

QuantiTec Primer assays were used for the amplification via PCR (QuantiTec Primer Assays, Qiagen, Hilden, Germany). QRT-PCR for *BDNF* and six reference genes (beta-actin, *ACTB*; ribosomal protein L13a, *RPL13A*; aminolevulinate delta-synthase 1, *ALAS1*; 18S ribosomal RNA, *18S*; peptidylprolyl isomerase A, *PPIA*; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*) was conducted for each sample in duplicate. After reverse transcription using the iScript kit (BioRad Co., Hercules, CA, USA), qRT-PCR

was performed in the BioRad CFX 384 RT-System (C1000 Thermal-Cycler; BioRad Co., Hercules, CA, USA) using Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Germany GMBH). For the quantification of the amplified transcripts with the comparative Ct method the BioRad CFX Manager 2.0 software was utilized. Standard curves for each amplification product were generated from 10-fold dilutions of pooled PCR-amplicons and primer efficiency was determined to be within a suitable range. The PCR conditions were the following: initial Taq-polymerase enzyme activation cycle 95°C (5 min), denaturation 94°C (10 s), annealing 60°C (30 s), elongation 72°C (30 s). 39 cycles were used. Melt curve analysis was performed for the optimization of the assay conditions and specificity. With GeNorm, the most stable reference genes were determined and all candidate genes were normalized to the following five most stable reference genes: *ACTB*, *RPL13A*, *ALAS1*, *GAPDH*, and *R18S*.

Data analysis and Statistics

Statistical analyses were performed with the software SPSS 18.0.0 (SPSS Inc., USA). Group differences in the BDNF protein quantification study were analyzed by Student's t-test (after normal distribution was confirmed by Kolmogoroff-Smirnoff-test); *BDNF* mRNA levels in the mRNA expression project by analyses of variance (ANOVA) and post hoc tests with the between-subjects factor group (ASD, ADHD, control children). Since groups differed to some extent in these variables, age and IQ were included as covariates to control for possible confounding effects (ANCOVA) in separate analyses. Considering comorbid ADHD in patients with ASD, subgroup analysis was performed using Student's t-test (after normal distribution was confirmed by Kolmogoroff-Smirnoff-test). To analyze *BDNF* mRNA expression differences in the subgroup of ADHD patients with two measuring time points (with and without medication), two-tailed Student's t-tests for paired samples were used. The Pearson rank correlation coefficient was computed for normally distributed data to assess potential associations between BDNF protein concentrations/ *BDNF* mRNA expression, age and IQ. The Fisher r-to-z transformation test was used to

calculate the significance of the difference between two correlation coefficients. Statistical significance was predefined as $p < 0.05$, two-sided.

Results

BDNF serum protein quantification study: ASD versus a healthy age- and gender-matched control group

In the combined group of autistic patients plus healthy controls, there was no general correlation of BDNF protein concentrations and age ($p = 0.226$; $r = 0.186$). A significant correlation between BDNF values and age was observed in the healthy control group ($p < 0.05$; $r = 0.527$). No such correlation was found in the ASD group ($p = 0.941$; $r = 0.016$). Comparing the correlation coefficients, using the Fisher r -to- z transformation test, the coefficient in the healthy control group was higher compared to the one in the ASD group on a trend level ($p = 0.081$, $z = 1.75$). Data on IQ was available just from ASD patients, not from control subjects. In the ASD group, no modulating effect of IQ was seen on BDNF protein concentrations ($p = 0.869$; $r = -0.036$).

Mean BDNF serum concentrations of 20.612 ± 6.037 pg/ml in the ASD group and 24.043 ± 4.340 pg/ml in healthy developing control subjects were measured. Student's t -test revealed significantly lower BDNF protein concentrations in the ASD group compared to controls ($t = -2.123$, $df = 42$, $p < 0.05$, $d = 0.653$, see **Figure 1a**). Including age as covariate into analysis, lead to borderline significant results ($F = 4.043$; $df = 1.41$; $p = 0.051$). Considering comorbid ADHD in patients with ASD, subgroup analysis revealed a trend to higher BDNF concentrations in autistic patients with comorbid ADHD ($n = 13$) compared to autistic patients without comorbid ADHD ($n = 8$) ($t = 1.748$; $df = 19$; $p = 0.098$).

BDNF mRNA expression study: ASD versus different control groups

In the combined group of autistic patients, patients with ADHD and healthy controls, there was no general correlation of BDNF mRNA expression and age ($p = 0.229$; $r = -0.181$). A significant negative correlation was observed between

BDNF mRNA levels and age in the ASD sample, ($p < 0.05$; $r = -0.525$), while no correlation with age was observed in the ADHD ($p = 0.588$, $r = -0.152$) and healthy control ($p = 0.380$, $r = -0.244$) group. However, the correlation coefficient in patients with ASD was not significantly different from that in the healthy control group ($p = 0.407$, $z = -0.83$) and the group with ADHD patients ($p = 0.285$, $z = -1.07$), assessed by the Fisher r-to-z transformation test.

In the combined group of autistic patients, patients with ADHD and healthy controls no correlation of *BDNF* mRNA expression and IQ was observed ($p = 0.239$; $r = 0.177$). In the ASD sample, a significant positive correlation was seen between *BDNF* mRNA levels and IQ ($p < 0.05$, $r = 0.558$). For patients with ADHD ($p = 0.442$, $r = -0.215$) and healthy control subjects ($p = 0.269$, $r = -0.305$) no such correlations were found. The correlation coefficient concerning IQ in the autistic collective was significantly higher than that in the healthy control group ($p = 0.018$, $z = 2.36$) and the group of patients with ADHD ($p = 0.034$, $z = 2.12$).

In patients with ADHD, *BDNF* mRNA expression correlated on a trend level with the FBB-ADHD total score ($p = 0.066$; $r = 0.505$).

In the small group of patients with ADHD ($n = 9$), where we disposed of two mRNA samples (one under stimulant medication and one without medication), no significant changes in *BDNF* mRNA expression between the two time points were found with a mean expression (in relation to the internal reference) of 0.0263 ± 0.0060 in the medication-free blood withdrawal and a mean expression of 0.0265 ± 0.0079 under stimulant medication ($t = -0.075$; $df = 8$; $p = 0.941$).

In the ASD group, mean *BDNF* mRNA expression (\pm SD, in relation to the internal reference) in whole blood was 0.0225 ± 0.0058 , in the whole ADHD group at the time point without stimulant medication 0.0255 ± 0.0056 and 0.0284 ± 0.0066 in the healthy control group.

One-factorial ANOVA showed a significant group difference of mRNA expression ($F = 3.651$; $df = 2.43$; $p < 0.05$, $\eta^2 = 0.145$) and post-hoc LSD-test

revealed significantly decreased *BDNF* mRNA expression in ASD patients ($p < 0.05$) and a trend to reduced *BDNF* mRNA levels also in ADHD patients ($p = 0.097$) compared to age- and gender-matched healthy controls (see **Figure 1b**). Considering comorbid ADHD in patients with ASD, subgroup analysis revealed higher *BDNF* mRNA expression in autistic patients with comorbid ADHD ($n = 12$) compared to autistic patients without comorbid ADHD ($n = 4$) ($t = -2.573$; $df = 14$; $p = < 0.05$).

Neither age nor IQ confounded group differences in *BDNF* mRNA expression between patients with ASD, ADHD and healthy controls, as indicated by ANCOVA ($F = 3.961$; $df = 2.41$; $p < 0.05$, $\eta^2 = 0.162$). In the remaining analyses, ANCOVA led to the same results, too, excluding effects of age and IQ on group differences (results not presented).

Discussion

Findings from molecular genetic studies and analyses of postmortem and peripheral tissue led to the hypothesis that neurotrophins impact on ASD pathophysiology. Our study projects were designed to complement former research in peripheral tissue to identify potential surrogates of central dysregulation of this neurotrophin. This was done through the assessment of *BDNF* mRNA expression and BDNF protein serum concentrations of blood samples from well-characterized autistic boys. In the *BDNF* mRNA expression study, significantly decreased mRNA levels were found in autistic patients with high level of intellectual functioning compared to healthy age- and gender-matched control children. This finding was in accordance with decreased BDNF serum concentrations in autistic boys compared to normally developing controls in an independent BDNF serum protein quantification project. In patients with ADHD a trend of decreased *BDNF* mRNA levels compared to healthy controls was seen; the ASD and ADHD groups did not show significant expression differences.

In our study projects, we analyzed *BDNF* mRNA expression and BDNF serum concentrations in blood to identify potential surrogates of central neurotrophic

dysregulation. The validity of this approach was supported by a bidirectional movement of BDNF through brain and blood (Pan et al. 1998) as well as significant positive correlations of BDNF serum concentrations and *BDNF* expression in cortical brain regions (Karege et al. 2002) and between whole-blood and hippocampus BDNF concentrations (Klein et al. 2011) in rats. Therefore, altered BDNF values in the periphery might reflect altered expression in the CNS with an impact on neuroplastic abnormalities found in disorders, such as ASD.

Limitations of our study projects are the relatively small number of included subjects and possibly the high comorbidity rate of autistic patients with ADHD. However, comorbid conditions in ASD are very common; our samples therefore reflecting naturalistic patient groups (Taurines et al. 2010, Freitag 2012). Another important limitation is that mRNA expression data and results of protein concentrations were observed in two different sample sets, and therefore no correlations between the two pathophysiological levels could be calculated. Our findings might also be confounded by co-medication. Although we did not observe an effect of psychostimulant medication on *BDNF* mRNA concentrations in a control condition, there are actually reports of a potentially increased *BDNF* expression under psychostimulants (Meredith et al. 2002). Antidepressants and perhaps also antipsychotics that are often used in treating comorbid conditions of ASD in general and also in our ASD samples are especially found to modify *BDNF* expression and BDNF protein concentrations (e.g. Fumagalli et al. 2003, Shimizu et al. 2003, Hammonds and Shim 2009, Park et al. 2009).

Existing studies on *BDNF* mRNA expression and BDNF protein concentrations in blood of autistic persons often included heterogeneous and insufficiently characterized patient samples. In some studies, e.g. no detailed information on medication, comorbidity and level of intellectual functioning of autistic individuals was given. In several published studies, ASD diagnosis was given according to DSM-IV criteria but diagnosis was not confirmed by the current

“gold standard”, which is the internationally valid diagnostic instruments ADOS and ADI-R (Lord et al. 1989, Lord et al. 1994). Exceptions are the following studies: from Hashimoto and colleagues (Hashimoto et al. 2006) and Nishimura and colleagues (Nishimura et al. 2007) who applied the ADI-R, while Correia and colleagues (Correia et al. 2010) used the ADI and ADOS. Strengths of our study projects can be seen in ASD diagnostics that included the “gold standard” measures ADOS and ADI-R.

In previous literature, data on time of blood withdrawal and whether it was fasting were occasionally missing. Further strengths of our projects include a standardized protocol with time of blood withdrawal, fasting in the morning and samples of pure male subjects to rule out potential circadian and gender effects on peripheral BDNF levels, as suggested in the literature (Lommatzsch et al. 2005, Katoh-Semba et al. 2007).

There are several reports of peripherally modulated *BDNF* mRNA expression and BDNF protein concentrations in ASD. In very diverse samples, partly decreased (Hashimoto et al. 2006, Al-Ayadhi 2012), partly elevated *BDNF* mRNA expression or protein levels have been observed (Miyazaki et al. 2004, Connolly et al. 2006, Nishimura et al. 2007, Correia et al. 2010). In maternal mid-pregnancy and neonatal specimens of ASD children, no modulation of BDNF protein concentrations at all was seen in a case-control-design (Croen et al. 2008). Differences in study designs (such as diagnostic process, level of intellectual functioning, age and gender of patients, comorbid diagnoses and co-medication) and analyzed material (serum, plasma, lymphocytes; mRNA and protein) might partially account for the variety of results. Sub-categorization into more homogenous age groups within some studies resulted in partly elevated, partly decreased *BDNF* mRNA expression or BDNF protein levels in ASD patients: Increased BDNF protein concentrations were reported in ASD groups aged 0 to 9 years (Katoh-Semba et al. 2007) and 6 to 12 years (Mansour et al. 2010) compared to healthy controls. In line with former reports, we found evidence of age effects on *BDNF* mRNA expression and BDNF serum protein concentrations; however, only in one of two groups of patients with ASD and

one of two control groups. Our finding of a positive correlation of BDNF serum protein levels and age in normally developing control subjects supports former reports on rising BDNF blood concentrations from childhood to adulthood in some cohorts of healthy controls (Nelson et al. 2001, Kato-Semba et al. 2007). Despite conflicting results, in synopses of most studies on ASD, autistic children seem to present with elevated BDNF protein concentrations in comparison to normally developing controls until the time of beginning puberty (Connolly et al. 2006, Correia et al. 2010, Mansour et al. 2010), followed by mostly decreased BDNF protein levels in puberty, adolescence and adulthood (Hashimoto et al. 2006, Mansour et al. 2010). Thus, our results of a negative correlation of age and *BDNF* mRNA expression in ASD patients and the overall reduced BDNF values in ASD in the mRNA and protein measurements support those previous findings in older ASD subjects. While our first ASD sample was largely in puberty (mean age 13.9 years), the second sample was somewhat younger (mean age 10.8 years). Iughetti et al.'s study supports a possible influence of puberty stages on BDNF plasma concentrations - probably mediated by changes in testosterone levels (Iughetti et al. 2011). The interpretation of these results is further complicated by reports of a possible relationship between dysregulated testosterone pathways and autistic traits (Geier and Geier 2006, 2007; Takagishi et al. 2010, Ruta et al. 2011, Schwarz et al. 2011) as well as an association between serum testosterone levels and *BDNF* expression in forebrain and hippocampal regions in a mouse model (Hill et al. 2012). Considerable inter-individual differences in testosterone levels in the age group 7-17 years (Roche Diagnostics) might therefore also contribute to the high variability of former results on *BDNF* mRNA expression and BDNF protein concentrations. Based on these observations, future studies on peripheral BDNF should comprise information on developmental status of patients and perhaps even concentrations of sex hormones.

We included children and adolescents with ADHD diagnosis as a clinical control group in the *BDNF* mRNA expression study and considered comorbid ADHD in autistic patients in both study projects. A trend to decreased *BDNF* mRNA

expression in ADHD patients compared to healthy controls was found and there were no significant expression differences between patients with ASD and ADHD. Autistic patients without comorbid ADHD symptomatology showed significantly lower *BDNF* mRNA levels and reduced BDNF protein concentrations at a trend level compared to autistic patients with comorbidity of ASD and ADHD.

Results from molecular genetic studies (Gadow et al. 2009) including fronto-cortical *BDNF* gene expression patterns in ADHD animal models (Fumagalli et al. 2003) as well as behavioral features of *BDNF* knockout mice also point to a possible role of this neurotrophin in ADHD pathophysiology (Kernie et al. 2000, Yamada et al. 2002, Ito et al. 2011). Assessing BDNF concentrations in peripheral blood of patients with ADHD, elevated BDNF plasma concentrations were reported in drug-naïve children with ADHD (mean age 8.8 ± 2.3 years) compared to age-matched healthy controls (Shim et al. 2008). As methodological investigations indicated that plasma BDNF measurements might be affected by the handling of the blood sample while the measure of BDNF in serum is more stable (Elfving et al. 2010), analyses on BDNF in serum followed. Scassellati et al. reported unchanged BDNF levels in drug-naïve children with ADHD (mean age 10.7 ± 2.5 years) in comparison to age- and gender-matched healthy controls (Scassellati et al. 2013). BDNF serum levels in adults with remaining ADHD symptomatology (mean age 33.4 ± 9.0 years) were significantly lower compared to gender- and age-matched healthy controls (Corominas-Roso et al. 2013), a result in accordance with our finding in boys with ADHD in (beginning) puberty (mean age 11.8 ± 2.2 years).

In our collective of children with ADHD, a trend to correlation of *BDNF* mRNA expression and total scores of the FBB-ADHD was observed. Shim and coworkers reported an association of BDNF plasma concentrations with the severity of inattention symptoms, assessed as omission errors in a continuous performance test, in children with ADHD (Shim et al. 2008). In adult ADHD, no association of BDNF serum concentrations and scores on the Conners' Adult ADHD Rating Subscales were seen (Corominas-Roso et al. 2013).

Summarizing these findings on peripheral BDNF in ADHD, differences in methodologies (analysis of plasma, serum and mRNA from full blood) and the dimensional assessment of ADHD symptomatology may contribute to varying results. Potential effects of age- and development on BDNF values - as suggested for ASD - are affirmed: In current literature, with increasing age of ADHD cohorts, decreasing BDNF values were reported in comparison to healthy controls.

Our results of decreased *BDNF* mRNA levels in ASD and on a trend level in ADHD may suggest decreased BDNF synthesis in peripheral cells. Whether there is a direct link between a reduced *BDNF* expression in the periphery and the decreased BDNF serum protein concentrations - observed in an independent sample of autistic patients in the protein quantification study - or whether the lowered peripheral protein levels are attributed to alterations in a bidirectional movement of BDNF between blood and brain (Pan et al. 1998), remains unclear. Recent studies suggest that the intricate function of BDNF on brain development and neuroplasticity depends on a complex regulation of gene transcription and translation (Wong et al. 2010, Zheng et al. 2012, Allen et al. 2013). Given its crucial role on synaptic plasticity and learning, low *BDNF* mRNA expression and BDNF serum concentrations might be associated with certain clinical characteristics of patients with neurodevelopmental disorders (Corominas-Roso et al. 2013), such as cognitive impairments and difficulties in memory in ASD (Hill 2004, Barendse et al. 2013) and ADHD (Castellanos et al. 2006, Rohlf et al. 2012). Concurrent findings of decreased BDNF levels in older subjects with ASD and ADHD might be based on shared genetic factors and common underlying endophenotypes (Rommelse et al. 2010, Williams et al. 2010, Taurines et al. 2012). They might also be influenced by behavioral features that are common to both neurodevelopmental disorders and are associated with dysregulation of the BDNF system (Sen et al. 2008, Bachmann et al. 2012), such as increased depressive symptomatology (Matson et al. 2007, Taurines et al. 2010) or disruption of sleep (Lecendreux and Cortese 2007, Kotagal and Broomall 2012).

The observed increased BDNF levels in younger children with neurodevelopmental disorders might be interpreted to possibly reflect a compensatory mechanism in the response of abnormal and late brain maturation (Shim et al. 2008).

In summary, findings of a dysregulated, probably age- and developmentally-dependent, peripheral *BDNF* mRNA expression and altered BDNF protein serum concentrations in ASD support former reports in the literature, indicating a possible pathophysiological role of neurotrophic factors in neurodevelopmental disorders. Considering the etiological and phenotypic overlap of ASD with ADHD, the absence of a difference in mRNA expression between ADHD and ASD samples may indicate that BDNF dysregulation may not be restricted to autism. Studies in larger groups of patients as well as further comparative investigations are warranted including the analyses of additional neurotrophins and the assessment of developmental and hormonal status of patients, in order to corroborate and confirm our data. Notwithstanding, elucidating the pathophysiological role of neurotrophins in neurodevelopmental disorders could contribute to the identification of distinct peripheral expression patterns that might be clinically useful for diagnostics as well as therapeutic interventions.

Acknowledgements

We wish to thank the patients and families who participated in this study, Miryame Hofmann and Thomas Elpel for their help with sample analyses as well as Dr. Alex C. Conner for his support with manuscript preparation.

Conflict of Interest

J.T. has obtained financial support (e.g. lecture honoraria, grants for research projects and scientific meetings, advisory-board membership) from Actelion, AstraZeneca, Bristol-Meyers Squibb, Ever Neuro Pharma, Janssen-Cilag, Lilly, Lundbeck, Medice Arzneimittel Pütter, Merz Pharmaceuticals, Novartis Pharma,

Pfizer Pharma, Roche, Servier, Shire. Some of these companies manufacture drugs used in the treatment of ADHD and ASD.

S.W. has received lecture honoraria from Janssen Cilag, AstraZeneca and Eli Lilly in the last 5 years. Her work was partially supported in the last 5 years by the Swiss National Science Foundation (SNF), Deutsche Forschungsgemeinschaft, EU FP7, HSM Hochspezialisierte Medizin of the Kanton Zurich, Switzerland.

All other authors have no competing interests.

References

Achenbach TM, Edelbrock CS (1981) Behavioral problems and competencies reported by parents of normal and disturbed children aged four through sixteen. *Monogr Soc Res Child Dev* 46:1–82

Al-Ayadhi LY (2012) Relationship between Sonic hedgehog protein, brain-derived neurotrophic factor and oxidative stress in autism spectrum disorders. *Neurochem Res* 37:394–400

Allen M, Bird C, Feng W, Liu G, Li W, Perrone-Bizzozero NI, Feng Y (2013) HuD promotes BDNF expression in brain neurons via selective stabilization of the BDNF long 3'UTR mRNA. *PLoS ONE* 8:e55718

Alleva E, Francia N (2009) Psychiatric vulnerability: suggestions from animal models and role of neurotrophins. *Neurosci Biobehav Rev* 33:525–536

Altar CA, Boylan CB, Fritsche M, Jackson C, Hyman C, Lindsay RM (1994) The neurotrophins NT-4/5 and BDNF augment serotonin, dopamine, and GABAergic systems during behaviorally effective infusions to the substantia nigra. *Exp Neurol* 130:31–40

Amaral DG, Schumann CM, Nordahl CW (2008) Neuroanatomy of autism. *Trends Neurosci* 31:137–145

Bachmann V, Klein C, Bodenmann S, Schäfer N, Berger W, Brugger P, Landolt HP (2012) The BDNF Val66Met polymorphism modulates sleep intensity: EEG frequency- and state-specificity. *Sleep* 35:335–344

Barendse EM, Hendriks MP, Jansen JF, Backes WH, Hofman PA, Thoonen G, Kessels RP, Aldenkamp AP (2013) Working memory deficits in high-functioning adolescents with autism spectrum disorders: neuropsychological and neuroimaging correlates. *J Neurodev Disord* 5:14

Bekinschtein P, Cammarota M, Katche C, Slipczuk L, Rossato JI, Goldin A, Izquierdo I, Medina JH (2008) BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:2711–2716

Boelte S, Poustka F (2006a) FSK - Fragebogen zur Sozialen Kommunikation. Verlag Hans Huber, Bern

Boelte S, Rühl D, Schmoetzer G, Poustka F (2006b) Diagnostisches Interview fuer Autismus – Revidiert. Verlag Hans Huber, Bern

Brambilla P, Hardan AY, Di Nemi SU, Caverzasi E, Soares JC, Perez J, Barale F (2004) The functional neuroanatomy of autism. *Funct Neurol* 19:9–17

Braun A, Lommatzsch M, Mannsfeldt A, Neuhaus-Steinmetz U, Fischer A, Schnoy N, Lewin GR, Renz H (1999) Cellular sources of enhanced brain-derived neurotrophic factor production in a mouse model of allergic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21:537–546

Castellanos FX, Sonuga-Barke EJ, Milham MP, Tannock R (2006) Characterizing cognition in ADHD: beyond executive dysfunction. *Trends Cogn Sci* 10:117-23. Review

Cattell RB (1949) Culture Free Intelligence Test, Scale 1, Handbook. Institute of Personality and Ability Testing, Inc., Champaign, Illinois

Cattell RB, Weiß RH, Osterland J (1997) Grundintelligenztest Skala 1, CFT 1, 5. revidierte Auflage. Hogrefe, Göttingen

Chen B, Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT (2001) Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry* 50:260–265

Cheng L, Ge Q, Sun B, Yu P, Ke X, Lu Z (2009a) Polyacrylamide gel-based microarray: a novel method applied to the association Study between the polymorphisms of BDNF gene and autism. *J Biomed Nanotechnol* 5:542–550

Cheng L, Ge Q, Xiao P, Sun B, Ke X, Bai Y, Lu Z (2009b) Association study between BDNF gene polymorphisms and autism by three-dimensional gel-based microarray. *Int J Mol Sci* 10:2487–2500

Connolly AM, Chez M, Streif EM, Keeling RM, Golumbek PT, Kwon JM, Riviello JJ, Robinson RG, Neuman RJ, Deuel RMK (2006) Brain-derived neurotrophic factor and autoantibodies to neural antigens in sera of children with autistic

spectrum disorders, Landau-Kleffner syndrome, and epilepsy. *Biol Psychiatry* 59:354–363

Corominas-Roso M, Ramos-Quiroga JA, Ribases M, Sanchez-Mora C, Palomar G, Valero S, Bosch R, Casas M (2013) Decreased serum levels of brain-derived neurotrophic factor in adults with attention-deficit hyperactivity disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 30:1-9

Correia CT, Coutinho AM, Sequeira AF, Sousa IG, Lourenço Venda L, Almeida JP, Abreu RL, Lobo C, Miguel TS, Conroy J, Cochrane L, Gallagher L, Gill M, Ennis S, Oliveira GG, Vicente AM (2010) Increased BDNF levels and NTRK2 gene association suggest a disruption of BDNF/TrkB signaling in autism. *Genes Brain Behav* 9:841–848

Croen LA, Goines P, Braunschweig D, Yolken R, Yoshida CK, Grether JK, Fireman B, Kharrazi M, Hansen RL, van de Water J (2008) Brain-derived neurotrophic factor and autism: maternal and infant peripheral blood levels in the Early Markers for Autism (EMA) Study. *Autism Res* 1:130–137

Döpfner M, Görtz-Dorten A, Lehmkuhl G, Breuer D, Goletz H (2008) DISYPS II Diagnostik-System für psychische Störungen nach ICD-10 und DSM-IV für Kinder und Jugendliche II. Verlag Hans Huber, Bern

Döpfner M, Melchers P, Fegert J, Lehmkuhl G, Lehmkuhl U, Schmeck K, Steinhausen H, Poustka F (1994) Deutschsprachige Konsensus-Versionen der Child Behavior Checklist (CBCL/4-18), der Teacher Report Form (TRF), und der Youth Self-Report Form (YSR). *Kindheit und Entwicklung* 7:54–59

D'Sa C, Duman RS (2002) Antidepressants and neuroplasticity. *Bipolar Disord* 4:183–194

Dwivedi Y (2009) Brain-derived neurotrophic factor: role in depression and suicide. *Neuropsychiatr Dis Treat* 5:433–449

Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR (2003) The

BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112:257–269

Elfving B, Plougmann PH, Wegener G (2010) Detection of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat blood and brain preparations using ELISA: pitfalls and solutions. *J Neurosci Methods* 187:73-77

Forero DA, Arboleda GH, Vasquez R, Arboleda H (2009) Candidate genes involved in neural plasticity and the risk for attention-deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis of 8 common variants. *J Psychiatry Neurosci* 34:361–366

Freitag CM, Staal W, Klauck SM, Duketis E, Waltes R (2010) Genetics of autistic disorders: review and clinical implications. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 19:169–178

Freitag CM (2012) Autistische Störungen - State-of-the-Art und neuere Entwicklungen (Autistic disorders - the state of the art and recent findings: epidemiology, aetiology, diagnostic criteria, and therapeutic interventions). *Z Kinder Jugendpsychiatr Psychother* 40:139-148; quiz 148-149

Fujimura H, Altar CA, Chen R, Nakamura T, Nakahashi T, Kambayashi J, Sun B, Tandon NN (2002) Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thromb Haemost* 87:728–734

Fumagalli F, Molteni R, Roceri M, Bedogni F, Santero R, Fossati C, Gennarelli M, Racagni G, Riva MA (2003) Effect of antipsychotic drugs on brain-derived neurotrophic factor expression under reduced N-methyl-D-aspartate receptor activity. *J Neurosci Res* 72:622–628

Gadow KD, Roohi J, DeVincent CJ, Kirsch S, Hatchwell E (2009) Association of COMT (Val158Met) and BDNF (Val66Met) gene polymorphisms with anxiety, ADHD and tics in children with autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord* 39:1542–1551

Geier DA, Geier MR (2006) A clinical and laboratory evaluation of methionine cycle-transsulfuration and androgen pathway markers in children with autistic disorders. *Horm Res* 66:182–188

Geier DA, Geier MR (2007) A prospective assessment of androgen levels in patients with autistic spectrum disorders: biochemical underpinnings and suggested therapies. *Neuro Endocrinol Lett* 28:565–573

Ghaziuddin M, Weidmer-Mikhail E, Ghaziuddin N (1998) Comorbidity of Asperger syndrome: a preliminary report. *J Intellect Disabil Res* 42:279–283

Gielen A, Khademi M, Muhallab S, Olsson T, Piehl F (2003) Increased brain-derived neurotrophic factor expression in white blood cells of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Scand J Immunol* 57:493–497

Goldstein S, Schwebach AJ (2004) The comorbidity of Pervasive Developmental Disorder and Attention Deficit Hyperactivity Disorder: results of a retrospective chart review. *J Autism Dev Disord* 34:329–339

Hammonds MD, Shim SS (2009) Effects of 4-week treatment with lithium and olanzapine on levels of brain-derived neurotrophic factor, B-cell CLL/lymphoma 2 and phosphorylated cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein in the sub-regions of the hippocampus. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 105:113–119

Hashimoto K, Iwata Y, Nakamura K, Tsujii M, Tsuchiya KJ, Sekine Y, Suzuki K, Minabe Y, Takei N, Iyo M, Mori N (2006) Reduced serum levels of brain-derived neurotrophic factor in adult male patients with autism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30:1529–1531

Hill EL (2004) Executive Dysfunction in autism. *Trends Cogn Sci* 8:26-32.
Review

Hill RA, Wu YWC, Kwek P, van den Buuse M (2012) Modulatory effects of sex steroid hormones on brain-derived neurotrophic factor-tyrosine kinase B expression during adolescent development in C57Bl/6 mice. *J Neuroendocrinol* 24:774–788

Hünnerkopf R, Strobel A, Gutknecht L, Brocke B, Lesch KP (2007) Interaction between BDNF Val66Met and dopamine transporter gene variation influences anxiety-related traits. *Neuropsychopharmacology* 32:2552–2560

Ito W, Chehab M, Thakur S, Li J, Morozov A (2011) BDNF-restricted knockout mice as an animal model for aggression. *Genes Brain Behav* 10:365-374

Iughetti L, Casarosa E, Predieri B, Patianna V, Luisi S (2011) Plasma brain-derived neurotrophic factor concentrations in children and adolescents. *Neuropeptides* 45:205–211

Karege F, Schwald M, Cisse M (2002) Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. *Neurosci Lett* 328:261-264

Karege F, Bondolfi G, Gervasoni N, Schwald M, Aubry J, Bertschy G (2005) 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* 57:1068–1072

Katoh-Semba R, Wakako R, Komori T, Shigemi H, Miyazaki N, Ito H, Kumagai T, Tsuzuki M, Shigemi K, Yoshida F, Nakayama A (2007) Age-related changes in BDNF protein levels in human serum: differences between autism cases and normal controls. *Int J Dev Neurosci* 25:367–372

Kaufman AS, Kaufman NL (2004) Kaufman Assessment Battery for Children Second Edition. Bloomington, MN: Pearson, Inc., Bloomington, MN

Kernie SG, Liebl DJ, Parada LF (2000) BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. *EMBO J* 19:1290–1300

Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WE, Kolbeck R, Hoppe E, Oropeza-Wekerle RL, Bartke I, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H, Hohlfeld R (1999) Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med* 189:865–870

Klein AB, Williamson R, Santini MA, Clemmensen C, Ettrup A, Rios M, Knudsen GM, Aznar S (2011) Blood BDNF concentrations reflect brain-tissue BDNF levels across species. *Int J Neuropsychopharmacol* 14:347-353

Kotagal S, Broomall E (2012) Sleep in children with autism spectrum disorder. *Pediatr Neurol* 47:242-251. Review

Lecendreux M, Cortese S (2007) Sleep problems associated with ADHD: a review of current therapeutic options and recommendations for the future. *Expert Rev Neurother* 7:1799-806. Review

Lommatzsch M, Zingler D, Schuhbaeck K, Schloetcke K, Zingler C, Schuff-Werner P, Virchow JC (2005) The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. *Neurobiol Aging* 26:115–123

Lord C, Rutter M, Goode S, Heemsbergen J, Jordan H, Mawhood L, Schopler E (1989) Autism diagnostic observation schedule: a standardized observation of communicative and social behavior. *J Autism Dev Disord* 19:185–212

Lord C, Rutter M, Le Couteur A (1994) Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *J Autism Dev Disord* 24:659–685

Mansour M, Mohamed A, Azam H, Henedy M (2010) Brain Derived Neurotrophic Factor in Autism. *Current Psychiatry* 17:23–29

Martinowich K, Manji H, Lu B (2007) New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat Neurosci* 10:1089–1093

Matson JL, Nebel-Schwalm MS (2007) Comorbid psychopathology with autism spectrum disorder in children: an overview. *Res Dev Disabil.* 28:341-352. Review

McCaffery P, Deutsch CK (2005) Macrocephaly and the control of brain growth in autistic disorders. *Prog Neurobiol* 77:38–56

Melchers P, Preuß U (2009) Kaufmann Assessment Battery for Children, 8. unveränderte Auflage. Pearson Assessment, Frankfurt/Main

Meredith GE, Callen S, Scheuer DA (2002) Brain-derived neurotrophic factor expression is increased in the rat amygdala, piriform cortex and hypothalamus following repeated amphetamine administration. *Brain Res* 949:218–227

Miyazaki K, Narita N, Sakuta R, Miyahara T, Naruse H, Okado N, Narita M (2004) Serum neurotrophin concentrations in autism and mental retardation: a pilot study. *Brain Dev* 26:292–295

Nelson KB, Grether JK, Croen LA, Dambrosia JM, Dickens BF, Jelliffe LL, Hansen RL, Phillips TM (2001) Neuropeptides and neurotrophins in neonatal blood of children with autism or mental retardation. *Ann Neurol* 49:597–606

Nishimura K, Nakamura K, Anitha A, Yamada K, Tsujii M, Iwayama Y, Hattori E, Toyota T, Takei N, Miyachi T, Iwata Y, Suzuki K, Matsuzaki H, Kawai M, Sekine Y, Tsuchiya K, Sugihara G, Suda S, Ouchi Y, Sugiyama T, Yoshikawa T, Mori N (2007) Genetic analyses of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene in autism. *Biochem Biophys Res Commun* 356:200–206

Noterdaeme MA, Wriedt E (2010) Begleitsymptomatik bei tief greifenden Entwicklungsstörungen (Comorbidity in autism spectrum disorders - I. Mental retardation and psychiatric comorbidity). *Z Kinder Jugendpsychiatr Psychother* 38:257–266

Pan W, Banks WA, Fasold MB, Bluth J, Kastin AJ (1998) Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology* 37:1553–1561

Pandey GN, Dwivedi Y, Rizavi HS, Ren X, Zhang H, Pavuluri MN (2010) Brain-derived neurotrophic factor gene and protein expression in pediatric and adult depressed subjects. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34:645–651

Pardon M (2010) Role of neurotrophic factors in behavioral processes: implications for the treatment of psychiatric and neurodegenerative disorders. *Vitam Horm* 82:185–200

Park SW, Lee JG, Ha EK, Choi SM, Cho HY, Seo MK, Kim YH (2009) Differential effects of aripiprazole and haloperidol on BDNF-mediated signal changes in SH-SY5Y cells. *Eur Neuropsychopharmacol* 19:356–362

Petermann F, Petermann U (2007) Hamburg Wechsel Intelligenz Test für Kinder, IV: HAWIK-IV (3. ergänzte Aufl.), 3. ergänzte Aufl. Verlag Hans Huber, Bern

Polleux F, Lauder JM (2004) Toward a developmental neurobiology of autism. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 10:303–317

Poo MM (2001) Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* 2:24–32

Rapin I, Tuchman RF (2008) Autism: definition, neurobiology, screening, diagnosis. *Pediatr Clin North Am* 55:1129-1146, viii

Richter-Schmidinger T, Alexopoulos P, Horn M, Maus S, Reichel M, Rhein C, Lewczuk P, Sidiropoulos C, Kneib T, Pernecky R, Doerfler A, Kornhuber J (2011) Influence of brain-derived neurotrophic-factor and apolipoprotein E genetic variants on hippocampal volume and memory performance in healthy young adults. *J Neural Transm* 118:249–257

Roche Diagnostics CIM Study No: RD000669. Leipzig

Rohlf H, Jucksch V, Gawrilow C, Huss M, Hein J, Lehmkuhl U, Salbach-Andrae H (2012) Set shifting and working memory in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Neural Transm* 119:95-106

Rommelse NNJ, Franke B, Geurts HM, Hartman CA, Buitelaar JK (2010) Shared heritability of attention-deficit/hyperactivity disorder and autism spectrum disorder. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 19:281–295

Ruehl D, Boelte S, Feineis-Matthews S, Poustka F (2004) ADOS - Diagnostische Beobachtungsskala fuer Autistische Stoerungen. Verlag Hans Huber, Bern

Ruta L, Ingudomnukul E, Taylor K, Chakrabarti B, Baron-Cohen S (2011) Increased serum androstenedione in adults with autism spectrum conditions. *Psychoneuroendocrinology* 36:1154–1163

Rutter M, Bailey A C (2003) Social communication questionnaire (SCQ). Western Psychological Services, Los Angeles, CA

Sánchez-Mora C, Ribasés M, Ramos-Quiroga JA, Casas M, Bosch R, Boreatti-Hümmer A, Heine M, Jacob CP, Lesch K, Fasmer OB, Knappskog PM, Kooij JJS, Kan C, Buitelaar JK, Mick E, Asherson P, Faraone SV, Franke B,

- Johansson S, Haavik J, Reif A, Bayés M, Cormand B (2010) Meta-analysis of brain-derived neurotrophic factor p.Val66Met in adult ADHD in four European populations. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 153:512–523
- Scassellati C, Zanardini R, Tiberti A, Pezzani M, Valenti V, Effedri P, Filippini E, Conte S, Ottolini A, Gennarelli M, Bocchio-Chiavetto L (2013) Serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in attention deficit-hyperactivity disorder (ADHD). *Eur Child Adolesc Psychiatry* Jun 28 [Epub ahead of print]
- Schmitz C, Rezaie P (2008) The neuropathology of autism: where do we stand? *Neuropathol Appl Neurobiol* 34:4–11
- Schwarz E, Guest PC, Rahmoune H, Wang L, Levin Y, Ingudomnukul E, Ruta L, Kent L, Spain M, Baron-Cohen S, Bahn S (2011) Sex-specific serum biomarker patterns in adults with Asperger's syndrome. *Mol Psychiatry* 16:1213–1220
- Sen S, Duman R, Sanacora G (2008) Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications. *Biol Psychiatry* 64:527-532
- Shim SH, Hwangbo Y, Kwon YJ, Jeong HY, Lee BH, Lee HJ, Kim YK (2008) Increased levels of plasma brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in children with attention deficit-hyperactivity disorder (ADHD). *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32:1824-1828
- Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, Koike K, Komatsu N, Kumakiri C, Nakazato M, Watanabe H, Shinoda N, Okada S, Iyo M (2003) Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry* 54:70–75
- Siuciak JA, Boylan C, Fritsche M, Altar CA, Lindsay RM (1996) BDNF increases monoaminergic activity in rat brain following intracerebroventricular or intraparenchymal administration. *Brain Res* 710:11–20
- Takagishi H, Takahashi T, Yamagishi T, Shinada M, Inukai K, Tanida S, Mifune N, Horita Y, Hashimoto H, Yang Y, Kameda T (2010) Salivary testosterone

levels and autism-spectrum quotient in adults. *Neuro Endocrinol Lett* 31:837–841

Taurines R, Schmitt J, Renner T, Conner AC, Warnke A, Romanos M (2010) Developmental comorbidity in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Atten Defic Hyperact Disord* 2:267–289

Taurines R, Schwenck C, Westerwald E, Sachse M, Siniatchkin M et al. (2012) ADHD and autism: differential diagnosis or overlapping traits? A selective review. *Atten Defic Hyperact Disord* 4:115-139

Terracciano A, Tanaka T, Sutin AR, Deiana B, Balaci L, Sanna S, Olla N, Maschio A, Uda M, Ferrucci L, Schlessinger D, Costa PT (2010) BDNF Val66Met is associated with introversion and interacts with 5-HTTLPR to influence neuroticism. *Neuropsychopharmacology* 35:1083–1089

Tewes U, Rossmann P, Schallberger U (1999) Hamburg-Wechsler-Intelligenztest für Kinder (HAWIK-III). Verlag Hans Huber, Bern

Tsai S, Hong C, Liou Y (2008) Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant action: another piece of evidence from pharmacogenetics. *Pharmacogenomics* 9:1353–1358

Wechsler D (1949) Wechsler Intelligence Scale for Children. The Psychological Corporation, New York

Weiß R (1998) Grundintelligenztest Skala 2 (CFT 20) mit Wortschatztest (WS) und Zahlenfolgentest (ZF). Handanweisung, 4. überarbeitete Auflage. Hogrefe, Göttingen

Williams NM, Zaharieva I, Martin A, Langley K, Mantripragada K et al. (2010) Rare chromosomal deletions and duplications in attention-deficit hyperactivity disorder: a genome-wide analysis. *Lancet* 376:1401–1408

Wong J, Hyde TM, Cassano HL, Deep-Soboslay A, Kleinman JE, Weickert CS (2010) Promoter specific alterations of brain-derived neurotrophic factor mRNA in schizophrenia. *Neuroscience* 169:1071–1084

Yamada K, Mizuno M, Nabeshima T (2002) Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. *Life Sci* 70:735–744

Zheng F, Zhou X, Moon C, Wang H (2012) Regulation of brain-derived neurotrophic factor expression in neurons. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 4:188–200

Tables

Table 1 BDNF serum protein expression: Demographic statistics

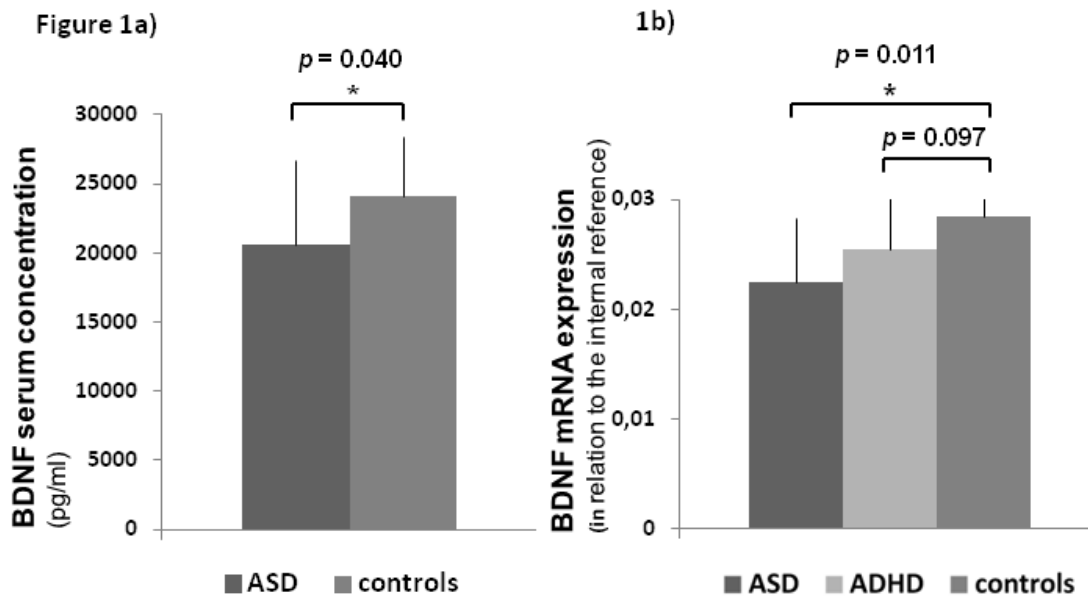
ASD PATIENTS	
Gender male	24
Age (years), mean \pm S.D.	13.9 \pm 3.0
ASD ICD 10-diagnoses (n, %)	
F84.0 Childhood autism	3 (12.5 %)
F84.1 Atypical autism	8 (33.3 %)
F84.5 Asperger's Syndrome	13 (54.2 %)
Most common comorbid ICD 10-diagnoses (n, %)	18 (75.0 %)
F90.0/90.1 Disturbance of activity and attention/hyperkinetic conduct disorder	14 (58.3 %)
F80.0/ F81.1 Specific speech articulation disorder/ expressive language disorder	2 (8.3 %)
F82/ 83 Specific developmental disorder of motor function, mixed specific developmental disorder	2 (8.3 %)
F95 Tic disorders	2 (8.3 %)
F98.0/ F98.1 Non-organic enuresis/encopresis	2 (8.3 %)
Most common psychiatric co-medication (patients, n, %)	21 (87.5 %)
psychostimulants	13 (54.2 %)
neuroleptics	3 (12.5 %)
antidepressants	2 (8.3 %)
Autistic phenotype (score \pm S.D.)	
SCQ (subsample of n = 15)	19.7 \pm 6.3
ADOS sum of communication and social interaction (autism cut-off = 10, autistic spectrum disorder = 7)	12.1 \pm 4.3
ADI-R social interaction (cut-off 10)	19.9 \pm 7.5
communication and language (cut-off for speaking children = 8)	15.0 \pm 4.5
repetitive behaviours and stereotyped pattern (cut-off = 3)	6.1 \pm 3.1
abnormal development before the age of 3 years (cut-off = 1)	2.9 \pm 1.5
IQ (score \pm S.D.)	95.1 \pm 14.7
70-84 (n, %)	6 (25.0 %)
85-115	14 (58.3 %)
115-129	4 (16.7 %)
CONTROL SUBJECTS	
Gender male	20
Age (years), mean \pm S.D.	14.4 \pm 2.1
CBCL total T-score , mean \pm S.D.	50.7 \pm 6.9
CBCL internalizing, mean \pm S.D.	49.6 \pm 7.6
CBCL externalizing, mean \pm S.D.	51.9 \pm 6.2

ADI-R = Autism Diagnostic Interview, revised; ADOS = Autism Diagnostic Observation Schedule; ASD = Autism Spectrum Disorder; CBCL = Child Behavior Check List; IQ = Intelligence Quotient; Social Communication Questionnaire = SCQ

Table 2 BDNF mRNA-expression: Demographic statistics

ASD PATIENTS	
Gender male	16
Age (years), mean ± S.D.	10.8 ± 2.2
ASD ICD 10-diagnoses (n, %)	
F84.0 Childhood autism	5 (31.3%)
F84.1 Atypical autism	6 (37.5%)
F84.5 Asperger's Syndrome	5 (31.3%)
Most common comorbid ICD 10-diagnoses (n, %)	14 (87.5%)
F90.0/90.1 Disturbance of activity and attention/hyperkinetic conduct disorder	12 (75.0%)
F81/ 82/ 83 Specific developmental disorders	4 (25.0%)
Most common psychiatric co-medication (patients: n, %)	13 (81.3%)
psychostimulants	12 (75.0%)
neuroleptics	3 (18.8%)
Autistic phenotype (score ± S.D.)	
SCQ	19.0 ± 5.1
ADOS sum of communication and social interaction (autism cut-off = 10, autistic spectrum disorder = 7)	13.7 ± 4.0
ADI-R social interaction (cut-off 10)	15.9 ± 4.7
communication and language (cut-off for speaking children = 8)	11.5 ± 4.0
repetitive behaviours and stereotyped pattern (cut-off = 3)	4.9 ± 2.6
abnormal development before the age of 3 years (cut-off = 1)	3.0 ± 0.6
IQ (score ± S.D.)	94.0 ± 15.0
70-84 (n, %)	5 (31.2%)
85-115	8 (50.0%)
116-129	3 (18.8%)
ADHD PATIENTS	
Gender male	15
Age (years), mean ± S.D.	11.8 ± 2.2
ADHD ICD 10-diagnoses (n, %)	
F90.0 Attention deficit hyperactivity disorder	13 (86.7%)
F98.8 Attention deficit disorder without hyperactivity	2 (13.3%)
Most common comorbid ICD 10-diagnoses (n, %)	10 (66.7%)
F91 Conduct disorders	10 (66.7%)
F98.0/98.1 Non-organic enuresis/ encopresis	7 (46.7%)
F43.2 Adjustment disorders	3 (20.0%)
ADHD phenotype	
FBB ADHS total score, mean ± S.D	1.5 ± 0.5
IQ (score ± S.D.)	101.0 ± 15.9
70-84	1 (6.7%)
85-115	11 (73.3%)
116-129	2 (13.3%)
> 130	1 (6.7%)
Control subjects	
Gender male	15
Age (years), mean ± S.D.	12.1 ± 2.2
CBCL total T-score, mean ± S.D.	47.5 ± 7.0
CBCL internalizing, mean ± S.D.	48.5 ± 8.2
CBCL externalizing, mean ± S.D.	47.7 ± 6.1
IQ (score ± S.D.)	110.3 ± 13.0
70-84	1 (6.7%)
85-115	9 (60.0%)
116-129	4 (26.7%)
≥130	1 (6.7%)

ADHD = Attention Deficit Hyperactivity Disorder; ADI-R = Autism Diagnostic Interview, revised; ADOS = Autism Diagnostic Observation Schedule; ASD = Autism Spectrum Disorder; CBCL = Child Behavior Check List; IQ = Intelligence Quotient; SCQ = Social Communication Questionnaire



10. Fig. 1 Peripheral BDNF values

- Brain derived neurotrophic factor (BDNF) protein serum concentrations in 24 patients with autism spectrum disorders (ASD) and 20 age- and gender-matched control subjects (mean concentration \pm standard deviation)
- BDNF* mRNA expression in the whole blood of 16 ASD children and adolescents, 15 patients with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and 15 age- and gender-matched healthy developing controls in relation to the internal reference (mean expression \pm standard deviation)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Warnke, der mich sowohl bei meiner Doktorarbeit unterstützt hat, als auch mein Interesse für das Fach Kinder- und Jugendpsychiatrie weiter verstärkt hat.

Außerdem möchte ich Herrn Professor Romanos danken, der mich zu seiner Zeit als Oberarzt an diese Arbeit herangeführt hat und gemeinsam mit Herrn Dr. Schecklmann eine gute Zusammenarbeit unter allen Doktoranden in der Kinder- und Jugendpsychiatrie geschaffen hat.

Mein vollster Respekt und größter Dank gelten Frau Dr. Taurines für ihre exzellente und vorbildliche Betreuung während meiner ganzen Promotionszeit. Ihr Einsatz hat einen großen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet und mein Interesse für das wissenschaftliche Arbeiten geweckt.

Weiter möchte ich Thomas Elpel für seine tatkräftige Unterstützung im Labor danken sowie Annette Nowak als Ansprechpartnerin bei der Rekrutierung von Patienten.

Meinen Eltern, meiner Schwester und Miriam Triebel danke ich vor allem für ihre Geduld sowie für ihre Unterstützung bei stilistischen Fragen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- und Zuname: Laura Irena Teresa Albantakis
Geburtsdatum: 09.05.1987
Geburtsort: Ingolstadt
Familienstand: ledig

Ausbildung

1993 - 1997 Grundschule Münchener Straße, Ingolstadt
1997 - 2006 Katharinen-Gymnasium, Ingolstadt
10/2006 – 11/2012 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians
Universität Würzburg
Seit Mai 2013 Assistenzärztin an der Klinik und Poliklinik für Kinder- u.
Jugendpsychiatrie, Psychosomatik u. Psychotherapie des
Universitätsklinikums Würzburg

Praktisches Jahr

08/ 2011 – 10/ 2011 Nephrologie - Queen Elizabeth Hospital, Birmingham,
U.K. (University Hospital Birmingham)
10/ 2011 – 12/ 2011 Hämato-Onkologie – St. Bartholomew’s Hospital,
London, U.K. (Barts and the London School of Medicine
and Dentistry/ Queen Mary University)
12/ 2011 – 03/ 2012 Chirurgie (Kinder-, Abdominal-, Allgemein-,
Unfallchirurgie) Hue Central Hospital, Hue, Vietnam
(Hue Medical School)
03/ 2012 – 06/ 2012 Kinder- und Jugendpsychiatrie, Psychosomatik und
Psychotherapie, Universitätsklinikum Würzburg

Würzburg, 26.08.2013

Laura Albantakis