

Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. J. Deckert

**Expression von Monoamintransportern, NO-Synthase-III und Neurotrophin
BDNF in Antidepressiva-stimulierten Astrozyten**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Julia Kuhlemann

aus Bielefeld

Würzburg, Januar 2009

Referent: Prof. Dr. med. K. P. Lesch

Koreferent: Prof. Dr. med. P. Kugler

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 31.07.2009

Die Promovendin ist Ärztin.

Meinen Eltern und meiner Schwester gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Depressive Erkrankungen: Phänomenologie und klinische Symptomatik	1
1.1	Klinik der depressiven Störung	1
1.2	Ätiologie	4
1.3	Pathophysiologie	4
1.3.1	Die Monoaminhypothese	5
1.3.2	Die Hypophysen-Hypothalamus-Nebennierenrinden-Achsen-Hypothese	5
1.3.3	Die Neurotrophinhypothese	6
1.4	Therapieoptionen depressiver Episoden	8
1.4.1	Anpassungseffekte bei chronischer Antidepressivatherapie	10
1.4.2	Grundlagen der Wirkungsmechanismen	11
1.4.3	Charakteristika des serotonergen Systems	11
1.4.4	Antidepressiva und deren molekulare Effekte	13
1.4.5	Nebenwirkungsprofil trizyklischer Antidepressiva	14
1.4.6	Nebenwirkungsprofil selektiver Serotonin-Rückaufnahme-Inhibitoren	14
1.4.7	Klinisch relevante Sedierung	15
1.4.8	Lebensbedrohliche Nebenwirkungen	15
1.4.9	Für die vorliegende Arbeit verwendete Medikamente	16
1.4.9.1	Escitalopram	16
1.4.9.2	Imipramin	17
1.5	Die Rolle der Astrozyten im zentralen Nervensystem	18
1.5.1	Astrozyten im Zusammenhang mit antidepressiver Therapie	20
1.5.2	Astrozyten synthetisieren NO	21
2	Zusammenfassung der Einleitung und Herleitung der Hypothesen	22
3	Material und Methoden	23
3.1	Material	23
3.1.1	mRNA-Proben der Astrozytenkulturen	23
3.1.2	Primer	26
3.1.3	Chemikalien und Kits	27
3.1.4	Geräte und Software	28

3.2 Methoden	29
3.2.1 Herstellung von RNase freien Gegenständen	29
3.2.2 cDNA Erststrangsynthese	29
3.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion	30
3.2.4 Quantitative Real-time PCR	31
3.2.4.1 Haushaltsgene	33
3.2.4.2 Kandidatengene	34
3.2.5 Agarose-Gelelektrophorese	35
3.2.6 DNA Gel-Extraktion	37
3.2.7 DNA-Fällung	38
4 Ergebnisse	39
4.1 Auswertungsgrundlagen	39
4.2 Quantitative Real-Time PCR: BDNF	40
4.2.1 Grafische Darstellung der Ergebnisse	40
4.2.2 BDNF: Ergebnisse der ersten mRNA-Charge	44
4.2.2.1 BDNF-Ergebnisse der 1. cDNA	44
4.2.2.2 BDNF-Ergebnisse der 2. cDNA	46
4.2.2.3 Gemittelte BDNF-Ergebnisse der 1. und 2. cDNA	47
4.2.3 BDNF-Ergebnisse der zweiten Astrozyten RNA-Charge	48
4.2.3.1 BDNF-Ergebnisse der 3. cDNA	48
4.2.4 BDNF-Ergebnisse der dritten Astrozyten RNA-Charge	49
4.2.4.1 BDNF-Ergebnisse der 5. cDNA	49
4.2.4.2 BDNF-Ergebnisse der 6. cDNA	50
4.2.4.3 Gemittelte BDNF-Ergebnisse der 5. und 6. cDNA	51
4.2.5 Prozentualer Anstieg der BDNF Konzentration	56
4.3 Quantitative Real-Time PCR: 5-HTT	58
4.3.1 5-HTT: Ergebnisse der ersten mRNA Charge	58
4.3.1.1 5-HTT-Ergebnisse der 1.cDNA	58
4.3.1.2 5-HTT-Ergebnisse der 2. cDNA	59
4.3.2 5-HTT: Ergebnisse der zweiten mRNA-Charge	60
4.3.2.1 5-HTT-Ergebnisse der 3. cDNA	60
4.4 Quantitative Real-Time PCR: DAT und eNOS	61
4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse	61
5 Diskussion	62
5.1 Einflüsse von depressiven Episoden und Stress auf das adulte Gehirn	62

5.1.1 Auswirkung von depressiven Episoden auf den Hippokampus	63
5.2 BDNF und Neurogenese im adulten Gehirn	64
5.2.1 Neurotrophine und die adulte Neurogenese	64
5.3 Astrozyten und ihre Aufgaben im zentralen Nervensystem	65
5.3.1 Astrozyten und Neurogenese	68
5.4 Die Wirkung von Antidepressiva in Bezug auf Neurogenese	68
5.4.1 Antidepressive Therapie und BDNF	70
5.4.2 Effekte Antidepressiva-behandelter Astrozyten auf Neurogenese	72
5.5 Konsequenzen in Hinblick auf zukünftige Forschung	73
6 Zusammenfassung	74
7 Literaturverzeichnis	76

Danksagung

Curriculum vitae

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Citalopram	17
Abbildung 2:	Imipramin	18
Abbildung 3:	Procedere bezüglich der 1. Astrozyten mRNA	24
Abbildung 4:	Procedere bezüglich der 2. Astrozyten mRNA	25
Abbildung 5:	Procedere bezüglich der 3. Astrozyten mRNA	26
Abbildung 6:	Schematische Darstellung eines PCR-Zyklus	31
Abbildung 7:	Schematische Darstellung der Elektrophorese	37
Abbildung 8:	Grafische Darstellung der Kontroll-Proben	40
Abbildung 9:	Grafische Darstellung der Imipramin-behandelten Proben	41
Abbildung 10:	Grafische Darstellung der Escitalopram-behandelten Proben	42
Abbildung 11:	Graphische Darstellung der Standard-cDNAs	43
Abbildung 12:	Schmelzkurve einer qRT-PCR	44
Abbildung 13:	Relative normalisierte BDNF mRNA Konzentration der 5. und 6. cDNA (Serie 50µM Imipramin)	53
Abbildung 14:	Relative normalisierte BDNF mRNA Konzentration der 5. und 6. cDNA (Serie 100µM Imipramin)	54
Abbildung 15:	Relative normalisierte BDNF mRNA Konzentration der 5. und 6. cDNA (Serie 50µM und 100µM Imipramin)	55
Abbildung 16:	Prozentualer Anstieg der BDNF Konzentration in behandelten Astrozyten gegenüber den jeweiligen Kontrollen	57
Abbildung 17:	Einwirkungen von Stress und antidepressiver Therapie im Hippokampus	63
Abbildung 18:	cAMP-CREB-Kaskade	69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Diagnostische Kriterien der Depression nach ICD-10	2
Tabelle 2:	Normalisierte relative Ergebnisse der BDNF mRNA und errechnete Signifikanzniveaus der 1. cDNA	45
Tabelle 3:	Normalisierte relative Ergebnisse der BDNF mRNA und errechnete Signifikanzniveaus der 2. cDNA	46
Tabelle 4:	Normalisierte relative Ergebnisse der BDNF mRNA und errechnete Signifikanzniveaus für die Imipramin-behandelten Proben der gemittelten 1. und 2. cDNA	47
Tabelle 5:	Normalisierte relative Ergebnisse der BDNF mRNA und errechnete Signifikanzniveaus der 3. cDNA	48
Tabelle 6:	Normalisierte relative Ergebnisse der BDNF mRNA und errechnete Signifikanzniveaus der 5. cDNA	49
Tabelle 7:	Normalisierte relative Ergebnisse der BDNF mRNA und errechnete Signifikanzniveaus der 6. cDNA	50
Tabelle 8:	Normalisierte relative Ergebnisse und errechnete Signifikanzniveaus der BDNF mRNA der gemittelten 5. und 6. cDNA	51
Tabelle 9:	Prozentualer Anstieg der BDNF Konzentration der 4 Stunden inkubierten Proben	56
Tabelle 10:	Normalisierte relative Ergebnisse der 5-HTT mRNA und errechnete Signifikanzniveaus der 1. cDNA	58
Tabelle 11:	Normalisierte relative Ergebnisse der 5-HTT mRNA und errechnete Signifikanzniveaus der 2. cDNA	59
Tabelle 12:	Normalisierte relative Ergebnisse der 5-HTT mRNA und errechnete Signifikanzniveaus der 3. cDNA	60

Abkürzungsverzeichnis

20-HETE	20-Hydroxyeikosatetraenoidsäure
5-HT	5-Hydroxytryptamin; Serotonin
5-HTT	5-HT-Transporter; Serotonin-Transporter
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ARP	acidic ribosomal phosphoprotein
ATP	Adenosintriphosphat
BDI	Beck-Depressionsinventar
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
C	Control; Kontrolle
cAMP	cyclisches Adenosin-Monophosphat
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
CREB	cAMP response element binding protein
CRH	corticotropin-releasing hormon
Ct	Schwellenwert-Zyklus, engl. threshold cycle
CYP	Cytochromoxidase P450
DA	Dopamin
DAG	Diacylglycerin
DAT	Dopamin-Transporter
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Escitalopram
EGF	epidermal growth factor
EKT	Elektrokrampftherapie
eNOS, NOS III	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EPS	extrapyramidalmotorische Störungen
FGF	fibroblast growth factor
bFGF	basic fibroblast growth factor
GABA	Gammaaminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyddehydrogenase
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
HAMD	Hamilton-Depressionsskala
I	Imipramin
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases and Related

	Health Problems
IDS	Inventar depressiver Symptome
IGF	Insulin-like growth factor
IL- β	Interleukin 1 β
iNOS	induzierte Stickstoffmonoxid-Synthase
IP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
MADRS	Montgomery-Asperg Depression Rating Scale
MAO-Hemmer	Monoaminoxidase-Hemmer
MAPK	mitogen-activated protein kinase - Signalweg
MMLV	Moloney Mäuse Leukämie Virus
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NA	Noradrenalin
NARI	selektiver Noradrenalin-Rückaufnahme-Inhibitor
NET	Noradrenalin-Transporter
NF	Normalisierungsfaktor
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
nNOS, NOS-I	Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NPC	neuronale Progenitorzellen
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
qRT-PCR	Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion
REM-Phase	rapid eye movements - Phase
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SEM	Standard Error of the Mean
SNRI	selektive Serotonin- und Noradrenalin-Rückaufnahme-Inhibitor
SSRI	selektiver Serotonin-Rückaufnahme-Inhibitor
SYBr Green	2-[2-[(3-Dimethylaminopropyl)-propylamino]-1-phenyl-1H-chinolin-4-ylidenmethyl]-3-methylbenzothiazol-3-ium-Kation
t _{1/2}	Halbwertszeit

Taq	Thermus aquaticus
T _M , Temp	Temperatur
TrkB	Tyrosinrezeptorkinase B
TZA	trizyklische Antidepressiva
VEGF	vascular endothelial growth factor
W _R	relative Expressionswerte
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Depressive Erkrankungen: Phänomenologie und klinische Symptomatik

"Wer nicht an sich selbst gespürt hat, was Schwermut ist, versteht das nicht, ich hatte das Gefühl einer schauerlichen Einsamkeit. Zwischen mir und den Menschen und dem Leben der Stadt, der Plätze, Häuser und Straßen war fortwährend eine breite Kluft. Es geschah ein Unglück, es standen wichtige Dinge in den Zeitungen - mich ging es nichts an." (Hermann Hesse)

1.1 Klinik der depressiven Störung

Schwermut, Einsamkeit, Desinteresse: 2-7% der Weltbevölkerung werden von diesen Gefühlen bestimmt, sie sind an einer Depression erkrankt. In Deutschland leiden aktuell bis zu 4 Mio. Menschen an einer Depression (Wittchen 2000). Zwei Drittel dieser Kollektivs befinden sich in hausärztlicher Behandlung, aber nur etwa die Hälfte von diesen Patienten wird korrekt diagnostiziert und behandelt (Jacobi et al. 2002; Bermejo et al. 2003). Die Gründe hierfür sind auf der einen Seite die schwierige Diagnosefindung, auf der anderen die bisher nicht vollständig geklärte Ätiologie und die komplexen Wirkmechanismen der medikamentösen antidepressiven Therapieoptionen.

Unter dem Krankheitsbild der klinischen Depression versteht man eine Störung der Affektivität, bei der ein depressives Syndrom im Vordergrund steht (Tölle R. 2006). Die Diagnose „Depression“ ist nicht einfach zu stellen, da die betroffenen Patienten initial oft mit somatischen, als denn mit psychischen Symptomen eine Arztpraxis aufsuchen (Kratz et al. 2003). Bei der Diagnosefindung stehen drei Kernsymptome im Vordergrund: Depressive Stimmung, Verlust von Interesse und Freude sowie erhöhte Ermüdbarkeit. Nach ICD-10 (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems) müssen mindestens zwei dieser Kernkriterien und zwei Nebenkriterien für die Diagnose erfüllt sein (siehe Tabelle 1).

1. Einleitung

Tabelle 1: Diagnostische Kriterien der Depression nach ICD-10 (mind. zwei Kernkriterien und zwei Nebenkriterien müssen für die Diagnose erfüllt sein).

Kernkriterien	Nebenkriterien
Depressive Stimmung	Verminderte Konzentration und Aufmerksamkeit
Verlust von Interesse oder Freude	Vermindertem Selbstwertgefühl und Selbstvertrauen
Erhöhte Ermüdbarkeit	Schuldgefühle und Gefühle von Wertlosigkeit
	Negative und pessimistische Zukunftsgedanken
	Gedanken oder erfolgte Selbstverletzung oder Suizidhandlungen
	Schlafstörungen
	Verminderter Appetit

Dabei wird verlangt, dass die genannten Symptome nicht durch organische Erkrankungen begründbar sein dürfen und mindestens zwei Wochen bestehen müssen (Dilling H 1999).

Die aufgeführten Beschwerden können dabei einer zirkadianen Rhythmik unterliegen. Eine anhaltende Symptomfreiheit ist nur bei etwa einem Drittel der Patienten zu beobachten (Geddes and Butler 2002). Die schwerwiegendste Komplikation dieser Erkrankung ist der Suizid, die Angaben zur Häufigkeit des vollzogenen Suizides schwanken zwischen 10 und 15% (Blair-West et al. 1997; Wulsin et al. 1999). Die Vielfalt von Symptommustern, die bei depressiven Störungen auftreten können, führt zu Unterteilungen, die jeweils deskriptiv bestimmte Aspekte der depressiven Episode hervorheben, zum Beispiel den Längsschnitt, die aktuelle klinische Symptomatik (gehemmt, ängstlich-agitiert, atypisch, melancholischer Subtyp) oder den Schweregrad (leichte, mittelschwere, schwere depressive Episode, mit oder ohne psychotische Merkmale). Die depressiven Episoden bei geriatrischen Patienten sind oft mit körperlichen Erkrankungen assoziiert, so können sie den Beginn einer Demenz

anzeigen oder als „depressive Pseudodemenz“ durch kognitive Defizite imponieren.

Von der depressiven Episode ist die bipolare Störung (manisch-depressive Erkrankung) abzugrenzen. Bei diesem Krankheitsbild wechseln sich depressive Episoden mit manischen Episoden ab, in der Zeit zwischen diesen Phasen sind die meisten Patienten symptomfrei (Hyman SE 2000).

Unipolar depressive Erkrankungen werden in der ICD-10-Klassifikation unter dem Begriff „Depressive Episode“ geführt (Ustun et al. 1995). Diese werden wie folgt weiter unterteilt:

- F32.0 Leichte depressive Episode
- F32.00 ohne somatische Symptome
- F32.01 mit somatischen Symptomen
- F32.1 Mittelgradige depressive Episode
- F32.10 ohne somatische Symptome
- F32.11 mit somatischen Symptomen
- F32.2 Schwere depressive Episode ohne psychotische Symptome
- F32.3 Schwere depressive Episode mit psychotischen Symptomen
- F32.8 Sonstige depressive Episoden
- F32.9 Depressive Episode, nicht näher bezeichnet

Treten im Laufe des Lebens mehrere depressive Episoden auf, so wird die Erkrankung als rezidivierende depressive Störung (F33, mit analogen Subtypen) klassifiziert. Die Erkrankungsgipfel depressiver Episoden liegen zum einen zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr, zum anderen jenseits des 45. Lebensjahres, wo sie als Involutions- oder Spätdepression bezeichnet werden. Frauen sind deutlich häufiger von der Krankheit betroffen als Männer, das Verhältnis beträgt 3:2 (Jacobi et al. 2004), sie sterben jedoch seltener an depressionsbedingten Suizidversuchen. Die 12-Monatsprävalenz für eine unipolare Depression wird in Deutschland mit 8,3% angegeben (Spiessl et al.

2006). Die einzelnen depressiven Episoden sind intra- und interindividuell stark unterschiedlich; dauert eine Episode länger als 2 Jahre, spricht man von einer chronischen Depression. Zur Quantifizierung der Symptome können u. a. die Hamilton-Depressionsskala (HAMD) (Hamilton 1960), die Montgomery-Asperg Depression Rating Scale (MADRS), das Beck-Depressionsinventar (BDI) (Beck et al. 1961) und das Inventar depressiver Symptome (IDS) hinzugezogen werden.

1.2 Ätiologie

Die Entstehung einer depressiven Episode ist multifaktoriell bedingt. Eine Beteiligung genetischer Komponenten gilt als weitestgehend gesichert: In Familien affektiv erkrankter Patienten sind mehr gleichartig erkrankte Verwandte als in der Durchschnittsbevölkerung zu finden. Zwillingsuntersuchungen ergaben für endogene Depression 50% Konkordanz bei eineiigen gegenüber 20% bei zweieiigen Zwillingen (Kendler 2001). Nach der sogenannten „Galtonschen Regel“ spielt der genetische Faktor also eine wichtige Rolle in der Pathogenese depressiver Erkrankungen im Sinne einer erhöhten Vulnerabilität.

1.3 Pathophysiologie

Neurobiologische Untersuchungen befassen sich zurzeit insbesondere mit drei Hypothesen bezüglich der molekularen und biochemischen Hintergründe von Depressionen. Diese sind die

- Neurotransmitter-Dysbalance-Hypothese (Monoaminhypothese)
- Stressachsen-Hypothese (Hypothalamus-Hypophysen-Achse) (Holsboer 1988) und die
- Neurotrophin-Hypothese (Duman et al. 1997).

1.3.1 Die Monoaminhypothese

Die Monoaminhypothese der Depression stützt sich auf pharmakologische Befunde. Trizyklische Präparate, die eigentlich als antihistaminerge Agenzien hergestellt und verwendet wurden, verbesserten erstaunlicherweise depressive Symptome und wurden daher als Antidepressiva weiter entwickelt. Diese Medikamente nehmen Einfluss auf das monoaminerge System, indem sie die Rückaufnahme der Monoamine Noradrenalin (NA), Serotonin (5-Hydroxytryptamin; 5-HT) und Dopamin (DA) im synaptischen Spalt hemmen (Karow T. 2006). Aufgrund dieser pharmakologischen Befunde wird eine Dysfunktion serotonerger, noradrenerger und dopaminerger Systeme bei depressiven Erkrankungen postuliert. Eine mögliche Störung des Neurotransmitter-Gleichgewichts kann sowohl von einer reduzierten Synthese oder einem verfrühten Abbau der Monoamine, als auch von veränderten Neurotransmitter-Rezeptoren, als auch von Defekten in der Signaltransduktion postsynaptischer Rezeptoren herrühren.

1.3.2 Die Hypophysen-Hypothalamus-Nebennierenrinden-Achsen-Hypothese

Die Hypophysen-Hypothalamus-Nebennierenrinden-Achse ist für Depressionen über den folgenden Zusammenhang von Bedeutung: Der Hypothalamus produziert das corticotropin-releasing Hormon (CRH), welches seinerseits die Produktion des adrenokortikotropen Hormons (ACTH) in der Hypophyse stimuliert (Murphy 1991). Konsekutiv wird hierdurch die Synthese und Freisetzung von Glukokortikoiden in der Nebennierenrinde gesteigert. Das freigesetzte Kortisol übt ein negatives Feedback auf den Hypothalamus aus, um eine Hypersekretion zu verhindern (Urani et al. 2005). Viele Patienten, die an einer schweren depressiven Episode erkranken, weisen eine dysregulierte zirkadiane Rhythmik der Kortisolsekretion mit einem signifikant höheren Plasmaspiegel auf als gesunde Kontrollen (Gibbons 1964; Dolan et al. 1985; Rubin et al. 1987; Deakin et al. 1990; Wong et al. 2000; Gold et al. 2002; Strickland et al. 2002). Diese Kortisolspiegel-Erhöhung normalisiert sich unter

antidepressiver Therapie (Bhagwagar et al. 2002) oder bei spontaner Remission (Steckler and Holsboer 1999; Steckler and Holsboer 1999; Steckler et al. 1999). Zudem zeigen auch Kortisol-Synthese-Inhibitoren wie Ketoconazol positive Effekte bei der Behandlung von depressiven Episoden (Wolkowitz et al. 1993; Wolkowitz et al. 1999). Zusammengenommen lassen diese Ergebnisse eine Überaktivität des Hypothalamus-Hypophysen-Systems bei der Entstehung von depressiven Episoden vermuten (Stokes 1995), obwohl es bisher nicht gelungen ist, alle Einzelheiten dieses Zusammenhangs aufzuklären. Mögliche Ursachen für den erhöhten Kortisolspiegel sind genetisch bedingte Defekte im Kortikosteroid-Rezeptor und eine primäre Hochregulation des corticotropin-releasing Hormon, welche konsekutiv eine sekundäre Herunterregulation des Kortikosteroid-Rezeptors nach sich zieht (Urani et al. 2005). Gleichermäßen können genetische Varianten des Kortikosteroid-Rezeptors nicht nur zu einem Anstieg des Kortisolspiegels beitragen, sondern auch interindividuelle Unterschiede bei der Stressbewältigung bedingen (Derijk et al. 2008). De Kloet et al. ergänzten die Hypophysen-Hypothalamus-Nebennierenrinden-Achse-Hypothese um den Einfluss des Mineralkortikoid-Rezeptors, für den eine noch höhere Affinität für Kortikosteroide nachgewiesen werden konnte, als für den Glukokortikoid-Rezeptor (Reul and de Kloet 1985). Ist die Balance dieser beiden Rezeptorklassen und somit die Hypophysen-Hypothalamus-Nebennierenrinden-Achse gestört, kann dies in einem Verlust der Selbstregulation des Organismus resultieren und ihn anfälliger für depressive Episoden machen (De Kloet and Joels 2005; De Kloet and Derijk 2007). Es wird ebenso vermutet, dass der erhöhte Glukokortikoid-Spiegel auch für die verminderte Neuronen- und Gliazellenanzahl mit verantwortlich sein könnte, da insbesondere Kortisol neurotoxisch ist (Sapolsky 2004).

1.3.3 Die Neurotrophinhypothese

Die Neurotrophinhypothese bezieht sich auf das *Second Messenger*-System des durch Antidepressiva aktivierten cyclischen Adenosin-Monophosphat (cAMP) Signalwegs (Vaidya and Duman 2001). Cyclisches Adenosin-Monophosphat aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), die

wiederum den Transkriptionsfaktor *cAMP response element binding protein* (CREB) phosphoryliert und ihn somit aktiviert. Aktiviertes CREB verstärkt die Transkription zahlreicher Zielgene, inklusive die des *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), welcher unter anderem als Regulator von Neurotransmittern dient. BDNF gehört zur Familie der Neurotrophine (Bothwell 1995); diese Polypeptide regulieren sowohl Überleben (Ghosh et al. 1994), als auch Differenzierung und Plastizität von Neuronen (Thoenen 1995). BDNF übt seine Effekte über die Tyrosinrezeptorkinase B (TrkB), dem mitogen-activated Proteinkinase-Signalweg (MAPK) und der Aktivierung der bcl-2-Expression (Fossati et al. 2004) aus. Bcl-2 ist ein anti-apoptotisches Protein, welches die Anzahl von Neuronen und Gliazellen im zentralen und peripheren Nervensystem reguliert (Yuan and Yankner 2000). Klinische und experimentelle Beobachtungen haben zu der Hypothese geführt, dass ein Defizit an BDNF zu der Entstehung einer depressiven Episode beiträgt (Duman et al. 1997; Altar 1999). So konnten reduzierte BDNF-Plasmaspiegel sowohl bei Patienten mit einer schweren depressiven Episode, als auch mit rekurrenten depressiven Episoden oder Suizidversuchen nachgewiesen werden (Lee et al. 2007). Shimizu et al. postulierten, dass ein herabgesetzter BDNF-Spiegel den neuroprotektiven Effekt des Proteins mindert und somit insbesondere hippocampale Neurone (CA3- und CA1-Pyramidenzellen und Granulazellen des Gyrus dentatus) anfälliger für neuronale Schäden machen, was wiederum die Suszeptibilität für depressive Störungen erhöht (Shimizu et al. 2003). In einer Studie von 2007 untersuchten Frodl et al. die Verbindung zwischen dem BDNF Val66Met Polymorphismus und einem reduzierten Volumen des Hippokampus bei Patienten, die an einer depressiven Episode erkrankt waren. Es wurde gezeigt, dass Träger des Met-BDNF-Allels im Zuge einer wahrscheinlich reduzierten BDNF-Sekretion signifikant niedrigere hippocampale Volumina aufwiesen als Patienten, die homozygot für das Val-BDNF waren (Frodl et al. 2007). Ein möglicher Grund für die dauerhafte Erniedrigung des BDNF-Spiegels ist chronischer Stress (Duman et al. 1997). Die dauerhafte BDNF-Reduktion im Zuge von Stress und depressiven Episoden wird nicht nur mit einer herabgesetzten neuronalen Funktion, sondern auch mit der Atrophie der

Hippokampusregion (Nibuya et al. 1995; Smith et al. 1995) in Verbindung gebracht. So konnten Kronmüller et al. zeigen, dass bei Männern ein Zusammenhang besteht zwischen *life events*, die sich drei Monate vor Beginn einer Depression ereigneten und einer linksseitigen hippokampalen Volumenminderung (Kronmüller et al. 2008). Sheline et al. analysierten mittels Magnetresonanztomographie, dass auch bei Frauen, deren letzte depressive Episode mehr als sechs Monate vergangen war, signifikant kleinere Volumina für die graue Substanz der Hippokampusregion nachzuweisen sind. Die Dauer der jeweiligen depressiven Episode scheint dabei kennzeichnend für das Ausmaß der Reduktion zu sein (Sheline et al. 1996). Zudem korrelieren reduzierte BDNF-Level und zerebrale Volumenverluste (Sheline et al. 1996) mit dem depressiven Status der Patienten (Karege et al. 2002). Bei unbehandelten depressiven Patienten zeigen postmortem Studien niedrigere CREB Spiegel und weniger phosphoryliertes CREB im Kortex im Vergleich zu Kontrollen (Dowlatshahi et al. 1998; Chen et al. 2001). Der Grund hierfür könnte sein, dass über einen aktivierten Kortikosteroid-Rezeptor (Schaaf et al. 2000) die Transkription des BDNF-Promotors unterdrückt wird und somit eine BDNF-Erniedrigung erfolgt. Werden depressive Patienten mit Antidepressiva behandelt, konnte für zahlreiche Antidepressiva ein Anstieg der BDNF mRNA in Hirnregionen wie dem Kortex und dem Hippokampus nachgewiesen werden (Duman 2004), wobei jedoch die zugrundeliegenden zellulären Strukturen noch nicht identifiziert sind. Neben der verstärkten Transkription von BDNF wurde auch ein Anstieg des anti-apoptotisch wirkenden Proteins Bcl-2 nachgewiesen (Manji et al. 2001).

1.4 Therapieoptionen depressiver Episoden

Bei der Behandlung von depressiven Episoden werden sowohl Medikamente als auch psychotherapeutische Verfahren eingesetzt, wobei die beiden Therapiekonzepte häufig kombiniert werden. Zu den weiteren biologischen Behandlungsmaßnahmen zählen Wachtherapie und die Elektrokrampftherapie

(EKT), die insbesondere bei medikamentöser Therapieresistenz endogener Depressionen eingesetzt wird (Ashcroft 1975).

Die große Gruppe der medikamentösen Antidepressiva ist heterogen und weist erhebliche strukturelle Unterschiede auf. Antidepressiva werden daher unterteilt in trizyklische Antidepressiva (TZA) bzw. tetrazyklische Antidepressiva, die neben serotonergen und noradrenergen Effekten auch anticholinerge und antihistaminerge Effekte haben, selektive Serotonin-Rückaufnahme-Inhibitoren (SSRI), selektive Noradrenalin-Rückaufnahme-Inhibitoren (NARI), selektive Serotonin- und Noradrenalin-Rückaufnahme-Inhibitoren (SNRI), Monoaminoxidase-Hemmer (MAO-Hemmer) sowie weitere Gruppen mit nur einzelnen Präparaten. Additiv können, je nach Typ der Erkrankung, Neuroleptika, β -Rezeptorenblocker und Tranquilizer in die Therapie mit eingegliedert werden.

Das psychopathologische Wirkungsspektrum erstreckt sich bei den SSRI auf Stimmungsaufhellung und Anxiolyse. Bei TZA kommt zum Teil noch eine initiale Dämpfung oder auch Antriebssteigerung dazu. TZA vom Amitriptylin-Typ wirken eher dämpfend, während TZA vom Desipramin-Typ antriebssteigernd wirken. Die stimmungsaufhellenden Effekte setzen jedoch erst nach einer gewissen Wirklatenz ein, die je nach Antidepressivum variieren kann (Gelenberg and Cheser 2000), während die unerwünschten Arzneimittelwirkungen bereits früher auftreten können. Der akute Effekt von Antidepressiva besteht in der Erhöhung des Neurotransmitter-Angebots. Dies geschieht im Fall von TZA sowie bei neueren SSRI und SNRI, indem die Transmitter-Rückaufnahme über den 5-HT-Transporter (5-HTT) oder den NA-Transporter (NET) inhibiert wird. Teilweise erfolgt ebenfalls eine dopaminerge Wirkung über die Inhibition des Dopamin-Transporters (DAT). Konsekutiv erfolgt eine Erhöhung der noradrenergen und/oder serotonergen Neurotransmission (White et al. 2005). Eine Sonderrolle hinsichtlich des Wirkmechanismus nimmt die Gruppe der MAO-Hemmer ein. Ihre Wirkung besteht in einer reversiblen oder irreversiblen Hemmung der Monoaminoxidasen A und B. Auf diesem Weg kann der Abbau der Monoamine Serotonin, Noradrenalin, Dopamin und Adrenalin beeinflusst werden. Das Phytopharmakon Johanniskraut (Wirkstoffe: Hyperforin und

Hypericin) bewirkt sowohl eine Wiederaufnahmehemmung von 5-HT, NA und DA, als auch eine direkte Herunterregulation von β -Rezeptoren.

1.4.1 Anpassungseffekte bei chronischer Antidepressivatherapie

Der wichtigste Anpassungseffekt bei länger währender Applikation von Antidepressiva ist die Herunterregulation im Sinne einer Minderung der Anzahl und Desensitivierung der β -Adrenorezeptoren (Vetulani and Nalepa 2000; Möller H-J 2002). Vor allem bei der Therapie mit TZA treten die beiden genannten Effekte bei postsynaptischen β -adrenergen Rezeptoren auf (Potter et al. 2004).

Unter der Therapie mit SSRI kann eine Herunterregulation von präsynaptischen 5-HT_{1A}-Rezeptoren sowie von postsynaptischen 5-HT₂-Rezeptoren festgestellt werden. Der aktivierte 5-HT_{1A}-Rezeptor inhibiert die 5HT-Freisetzung in den synaptischen Spalt (siehe unten). Die verringerte 5HT-Konzentration führt wiederum zu einer reduzierten Anzahl verfügbarer präsynaptischer 5-HT_{1A}-Rezeptoren. Chronische Administration von SSRI verursacht über einen erhöheten 5HT-Spiegel eine Desensitivierung von 5-HT_{1A}-Rezeptoren und somit eine Inhibition des negativen Feedbacks. Dadurch resultiert insgesamt ein erhohetes 5HT-Angebot in der Synapse (Celada et al. 2004; Iritani et al. 2006).

Diese Effekte der Rezeptor-Adaptation werden ebenfalls bei der Schlafentzugsmethode und bei der Elektrokrampftherapie beobachtet. Man vermutet, dass solche Adaptationsphanomene bei Antidepressiva-Gabe auch noch andere neurochemische Transmissionssysteme betreffen. Die Anpassungsreaktionen werden zum einen als mögliche Ursache für die Latenz bis zum Wirkungseintritt der Antidepressiva und zum anderen für die Absetzphänomene nach Abschluss der Medikation diskutiert. Aus dem letztgenannten Aspekt sollte die Therapie langsam herab gestuft und ausgeschlichen werden. Die molekulare Basis der Adaptationsphanomene liegt vor allem im Bereich der intrazellulären Signalverarbeitung und Transkriptionsregulation. Es wird vermutet, dass die Adaptation der Rezeptoren Anteil am biologischen Korrelat der anhaltenden klinischen Symptomremission haben. Man kann annehmen, dass das Transmissionssystem durch die

Einwirkung der Antidepressiva ein neues Funktionsgleichgewicht zwischen Transmitterproduktion und Transmitterrezeption findet.

Bemerkenswert ist der Effekt der Antidepressiva im Hinblick auf die Schlafregulation: Sowohl bei Depressiven als auch bei Gesunden werden die Wachphasen und die REM-Phasen verringert, der Tiefschlaf dauert länger.

Prinzipiell ist zur besseren Steuerbarkeit eine Monotherapie mit einem Antidepressivum anzustreben. Zudem wird als Erhaltungstherapie empfohlen, die antidepressiv wirkenden Medikamente mindestens 6 Monate über die Symptomfreiheit hinaus fortzusetzen.

1.4.2 Grundlagen der Wirkungsmechanismen

TZA und SSRI gehören in die Gruppe der Monoamin-Rückaufnahme-Inhibitoren. TZA weisen allerdings umfangreichere unerwünschte Arzneimittelwirkungen auf als SSRI, wie zum Beispiel Mundtrockenheit, Sedierung oder kardiovaskuläre Effekte. Der Grund hierfür liegt in der Vielzahl der Rezeptorsysteme, mit denen TZA interagieren (Vetulani and Nalepa 2000); so nehmen diese Antidepressiva nicht nur Einfluss auf noradrenerge, serotonerge und dopaminerge Rezeptoren, sondern auch auf das muskarinerge, histaminerge oder adrenerge System. SSRI inhibieren hingegen selektiver den 5HT-Transporter. Je selektiver der SSRI hierbei an serotonerge Transportproteine bindet, desto seltener werden unerwünschte Arzneimittelwirkungen beobachtet (Owens et al. 2001; Owens and Rosenbaum 2002). Daher sind SSRI mittlerweile aufgrund der besseren Verträglichkeit die Medikamente der ersten Wahl (Karow T. 2006).

1.4.3 Charakteristika des serotonergen Systems

Das zentralnervöse serotonerge System ist wegen seiner unzähligen Verzweigungen und verschiedenen Rezeptorsubtypen das komplexeste Neurotransmitter-System des menschlichen Gehirns (Jacobs and Azmitia 1992; Adell et al. 2002). Der größte Anteil der 5HT-Nervenzellkörper ist im Nucleus

raphe lokalisiert, der sich im Hirnstamm befindet. Es wird geschätzt, dass sich im menschlichen Gehirn etwa 250 000 5HT-Neurone (bei einer Gesamtanzahl von 10^{11}) Neuronen befinden. Trotz dieses geringen Anteils erreichen die 5HT-Neurone mit ihren weit verzweigten Axonen alle Hirnregionen (Celada et al. 2004). Die Aktivität der 5HT-Neurone wird durch mehrere Signalwege kontrolliert, hierzu gehören in erster Linie glutamaterge Signale aus dem präfrontalen Kortex, tonische noradrenerge Impulse von verschiedenen pontinen Kernen und inhibitorische GABA-erge Signale von lokalen Interneuronen (Adell et al. 2002). Ein weiterer wichtiger Kontrollmechanismus der 5HT-Neurone ist ihre Auto-Inhibition über 5-HT_{1A}-Autorezeptoren. Die Freisetzung des 5HT erfolgt hauptsächlich parakrin (Beaudet and Descarries 1978). Die 5HT-Neurone weisen eine langsame Schrittmacheraktivität auf, die lediglich während des *rapid eye movements sleep* (REM-Schlaf) pausiert (Jacobs and Azmitia 1992). Das serotonerge System umfasst 15 verschiedene 5HT-Rezeptorsubtypen (Hoyer and Martin 1997; Barnes and Sharp 1999). Die Aktivierung der häufig präsynaptisch lokalisierten 5-HT₁-Rezeptoren mittels 5HT führt zur Öffnung eines Kaliumkanals in der Zellmembran mit konsekutiver Hyperpolarisation der Zelle und Stillstand der Aktionspotential-Generierung (Blier and de Montigny 1987; Sprouse and Aghajanian 1987). Somit besteht ein negativer Rückkopplungsmechanismus der Transmitterfreisetzung (Adell and Artigas 1991; Artigas et al. 1996). Zusätzlich inhibieren 5-HT_{1B/1D}-Rezeptoren die Freisetzung von 5HT in den synaptischen Spalt, wenn sie durch 5HT aktiviert werden (Adell et al. 2001). 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2C}-Rezeptoren stimulieren die Phospholipase C (PLC) des Neurons, wodurch die Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) *Second-Messenger*-Kaskaden aktiviert werden. Der Aktivierung des 5-HT_{2A}-Rezeptors im Kortex folgt die Freisetzung von Glutamat aus thalamokortikalen Afferenzen (Marek et al. 2001). Das serotonerge System ist für eine Vielzahl von Funktionen, wie zum Beispiel Schlaf, Appetit, Sexualfunktionen, Schmerzwahrnehmung und Angstempfindung verantwortlich (Nelson 1997).

1.4.4 Antidepressiva und deren molekulare Effekte

Die Signalweiterleitung im serotonergen System erfolgt vermutlich größtenteils über Kinasen. Der 5HT-Rezeptor verfügt über Seitenketten, die sowohl von der Proteinkinase C (PKC) und der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) als auch von der cGMP-abhängigen Proteinkinase phosphoryliert werden können (Qian et al. 1997; Ramamoorthy et al. 1998). In Anwesenheit des Liganden 5HT wird die PKC-vermittelte Phosphorylierung vermindert. Studien an humanen embryonalen Nierenzellen konnten zeigen, dass der PKC-aktivierte 5HT-Rezeptor internalisiert wird und gleichzeitig die 5HT-Rezeptor-Aktivität abfällt (Ramamoorthy et al. 1998), wodurch die Wiederaufnahme von 5HT im synaptischen Spalt abnimmt und die 5HT-Konzentration steigt. In weiterführenden Untersuchungen fiel auf, dass Antidepressiva in Abwesenheit von 5HT nicht die Phosphorylierung durch die PKC beeinflussen konnten. Die Kombination von 5HT-Rezeptor-selektiven Antidepressiva (Imipramin, Paroxetin, Citalopram) mit 5HT resultierte dagegen in dem Ergebnis, dass der 5HT-Rezeptor in humanen embryonalen Nierenzellen durch die PKC phosphoryliert wurde (White et al. 2005). Die Neurotransmittererhöhung durch Antidepressiva wird also nicht nur durch eine direkte Hemmung der Monoamintransporter, sondern partiell auch durch eine Reduktion der Transporteranzahl bewirkt (Ramamoorthy and Blakely 1999).

Chronische Antidepressivatherapie geht mit einem Anstieg von CREB im Hippokampus, Kortex und Amygdala einher (Nibuya et al. 1996). *In vitro* wird CREB unter anderem via Noradrenalinrezeptoren (β -adrenerg und α -adrenerg) und 5-HT_{4,7}-Rezeptoren durch die cAMP-Proteinkinase (PKA) aktiviert (Roseboom and Klein 1995). Die direkte Aktivierung von CREB ist ebenfalls durch calciumabhängige Proteinkinasen und die PKC, die durch adrenerge und serotonerge Rezeptoren stimuliert werden, möglich (Duman 1998). Letztendlich kann CREB genauso durch den aktivierten Ras-MAPK Signalweg (mitogen-aktivierte Proteinkinase) direkt phosphoryliert werden (Ghosh et al. 1994). Über diese Zusammenhänge entfalten möglicherweise 5-HT/NA-Rückaufnahme-Inhibitoren und SSRI ihre Wirkung (Fossati et al. 2004). Effektive Antidepressivatherapie, sei sie nun physikalischer oder chemischer Natur,

bringt eine Erhöhung der BDNF-Konzentration über den CREB-Signalweg mit sich und wirkt somit neurotroph und neuroprotektiv (Nibuya et al. 1995). Hinzu kommt ein möglicher therapeutischer Effekt durch stimulierte adulte Neurogenese (Malberg and Schechter 2005).

Unklar ist jedoch, ob diese adaptiven Veränderungen tatsächlich kausal die antidepressive Wirkung implizieren. Keine dieser Modifikationen konnte bisher als „der“ stimmungsaufhellende Wirkmechanismus identifiziert werden.

1.4.5 Nebenwirkungsprofil trizyklischer Antidepressiva

Neben gesteigertem Durst, Mundtrockenheit, Palpitationen und Schwindelgefühl (Rollman et al. 1997) ist die wichtigste unerwünschte Wirkung von TZA die Verlangsamung der Erregungsleitung im Herzen (AV-Überleitung und His-Purkinje-System (Matthews and Eagles 1991)). Verantwortlich ist die chinidinartige Wirkung mit Blockade des Natriumkanals mit „membranstabilisierender“, erregungsleitungsverzögernder Wirkung. Vorbestehende Erregungsleitungsstörungen oder gleichzeitige Gabe anderer Medikamente, die solche induzieren können, stellen daher eine Kontraindikation für die Verabreichung von TZA dar. Grundsätzlich gilt auch eine QT-Verlängerung als Risikofaktor; dies insbesondere in Kombination mit Pharmaka, die selbst wiederum zu einer QT-Verlängerung führen. Es ist außerdem zu bedenken, dass das Infarktrisiko selbst bei Herzgesunden unter TZA verdoppelt ist. Die Behandlung mit TZA ist durch diese arrhythmogene Wirkung im Alter besonders risikoreich. Intoxikationen mit TZA durch relative Überdosierung oder in suizidaler Absicht können zu lebensbedrohlichen Arrhythmien führen.

1.4.6 Nebenwirkungsprofil selektiver Serotonin-Rückaufnahme-Inhibitoren

SSRI sind eine homogene Gruppe von Antidepressiva, innerhalb derer sich die einzelnen Substanzen in ihrer Selektivität unterscheiden. Zurzeit sind sechs SSRI im Handel: Citalopram und dessen Stereoisomer Escitalopram, Fluoxetin, Fluvoxamin, Paroxetin und Sertralin. Diese unterscheiden sich deutlich in ihren

chemischen Strukturen, stellen aber dennoch die homogenste Gruppe der neuen Antidepressiva dar. Die Effizienz von TZA und SSRI ist in etwa gleich, der Vorteil der SSRI liegt aufgrund ihres selektiveren Rezeptorprofils in der geringeren Anzahl an unerwünschten Nebenwirkungen (Ferguson 2001). Dies ist in Hinblick auf die Compliance, vor allem in der Langzeitbehandlung, ein wichtiger Fortschritt. Außerdem weisen die neuen Antidepressiva eine wesentlich geringere Toxizität als die Trizyklika auf (Williams et al. 2000). Die Nebenwirkungen der SSRI sind vor allem auf die verstärkte 5HT-Verfügbarkeit zurückzuführen. Daher dominieren gastrointestinale Störungen, Gewichtszunahme, Unruhe, Schlafstörungen, Kopfschmerzen und sexuelle Dysfunktion (Ackermann and Williams 2002).

1.4.7 Klinisch relevante Sedierung

Eine klinische relevante Sedierung kann bei Antidepressiva auftreten, die 5HT₂- und Histamin-Rezeptoren antagonisieren. Eine Beeinträchtigung der Reaktionsfähigkeit kommt bei Antidepressiva mit sedierender Komponente meist zu Behandlungsbeginn vor und bildet sich im Verlauf von 2-4 Wochen oft zurück. Während der ersten Behandlungswochen kann unter Antidepressiva-Therapie besonders bei gehemmt-depressiven Patienten der Antrieb gesteigert sein, ohne dass die Stimmung bereits aufgeheitert ist. Dies birgt das Risiko der Suizidalität in sich. Ein Antidepressivum mit sedierenden Eigenschaften kann daher bei suizidalen Patienten als Monotherapie Vorteile bieten. Bei starker Unruhe, Angst, Suizidalität und Panikattacken sind Benzodiazepine für einen kurzfristigen Einsatz in Kombination mit Antidepressiva empfehlenswert. Entgegen früheren Befürchtungen fördern SSRI die Suizidalität nicht, sondern haben eher einen (mittelfristig) suizidprotektiven Effekt.

1.4.8 Lebensbedrohliche Nebenwirkungen

Lebensbedrohliche Nebenwirkungen treten unter medikamentöser Therapie mit neueren Antidepressiva nur sehr selten auf (Linde et al. 2005). Bei SSRI wurden Bradykardien, Blutungen, Granulozytopenien, Krampfanfälle,

Hyponatriämie, Hepatotoxizität und extrapyramidale Störungen beobachtet (Ackermann and Williams 2002). Vor allem bei SSRI können, allerdings ebenfalls sehr selten, extrapyramidalmotorische Störungen (EPS) auftreten, besonders gefährdet scheinen dabei ältere Patienten zu sein. Patienten mit Dopamin-Mangel sind offenbar ebenfalls empfindlich gegenüber extrapyramidalmotorischen Störungen unter SSRI-Therapie.

Äußerst selten tritt unter Antidepressiva-Behandlung das Serotoninsyndrom auf. Es ist gekennzeichnet durch Verwirrtheit, Hyperthermie, Hyperreflexie, Tremor, Blutdruckschwankungen und Diarrhö. Die Ursache liegt hier in der sehr stark erhöhten Serotoninkonzentration. Unter den neueren Antidepressiva scheint dieses Serotoninsyndrom nur in Kombination mit weiteren serotonerg wirksamen Medikamenten, z.B. MAO-Hemmern, aufzutreten – jedoch können auch Alkohol oder Kokain die Serotoninfreisetzung erhöhen.

Im Allgemeinen ist festzustellen, dass die medikamentöse Therapie mit TZA aufgrund der Nebenwirkungen häufiger abgebrochen wird, als eine Therapie mit neueren Arzneien, wie zum Beispiel SSRI (Simon et al. 1996).

1.4.9 Für die vorliegende Arbeit verwendete Medikamente

1.4.9.1 Escitalopram

Escitalopram ist das S-Enantiomer des Racemats Citalopram, ein SSRI, der als Antidepressivum eingesetzt wird. Die Muttersubstanz Citalopram besteht aus den Enantiomeren S-Citalopram und R-Citalopram, wobei S-Citalopram (Escitalopram) nahezu 30 Mal potenter an 5HT-Rezeptoren zu binden vermag, als sein Enantiomer (Owens et al. 2001). Escitalopram ist zudem hochselektiv für 5HT-Transporter im Vergleich zu noradrenergen oder dopaminergen Bindungsstellen (Owens et al. 2001). *In vitro* Tests konnten zeigen, dass Escitalopram wenig bzw. kaum Affinität zu mehr als einhundert anderen untersuchten Rezeptoren oder Bindungsstellen hat, zu denen unter anderem α_1 -adrenerge (α_1) Rezeptoren, muskarinerge (M_1) Rezeptoren und Histaminrezeptoren (H_1) gehören (Sanchez et al. 2003). Escitalopram wird im Menschen von drei hepatischen Cytochromoxidasen P450 (CYP) metabolisiert,

die einen annähernd gleichen Beitrag zur Biotransformation der Substanz leisten (von Moltke et al. 2001). Angesichts dieser drei parallelen Routen der Biotransformation bleibt die Gesamt-Clearance von Escitalopram selbst bei gleichzeitiger Interaktion eines anderen Medikamentes mit den CYP-Enzymen relativ stabil (von Moltke et al. 2001). Des Weiteren zeigen Escitalopram und seine zwei Metabolite nur vernachlässigbare inhibitorische Effekte auf CYP-Enzyme und beeinflussen daher kaum die Biotransformation anderer Arzneien (Culpepper 2002). Das Interaktionsrisiko wird weiter durch die geringe Plasmaeiweißbindung (55%) reduziert (Lexapro 2002).

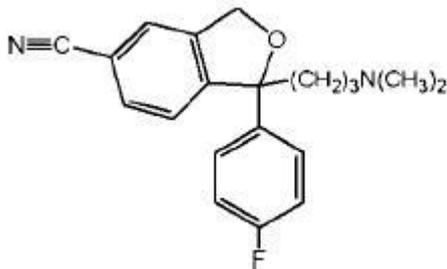


Abbildung 1: Citalopram (White et al. 2005)

1.4.9.2 Imipramin

Imipramin ist ein trizyklisches Antidepressivum und hemmt die Rückaufnahme von NA und 5HT etwa gleich stark. Zusätzlich hat Imipramin anticholinerge und α 1-antagonistische Effekte. Das Psychopharmakon wird vollständig resorbiert, unterliegt aber einem hohen First-pass-Metabolismus. Die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) beträgt 11-25 Stunden und die Zeit zum benötigten Plasmaspiegel beträgt 2,2 Stunden. Die orale Bioverfügbarkeit liegt bei ca. 22-77% und die Plasmaproteinbindung bei ca. 90%. Der Hauptmetabolit ist Desipramin, der eine etwas längere Halbwertszeit aufweist.

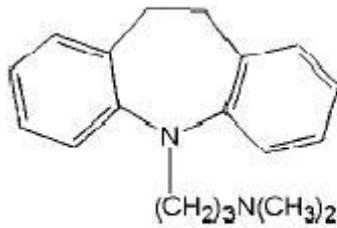


Abbildung 2: Imipramin (White et al. 2005)

1.5 Die Rolle der Astrozyten im zentralen Nervensystem

Astrozyten gehören zur Gruppe der Makrogliazellen im zentralen Nervensystem (ZNS) und sind die größte Population der Gliazellen. Im Säugetiergehirn machen Neurone 10% der zellulären Bestandteile aus, Gliazellen stellen die restlichen 90% dar. Seit ihrer Entdeckung durch Ramon y Cajal (1913) werden die sternförmigen Zellen eingehend studiert. Ihr Name leitet sich von dem Wort „Nerven kitt“ her, welches ursprünglich von Rudolph Virchow verwendet wurde (Kettenmann H 2005). Für verschiedene neurologische und psychiatrische Erkrankungen konnten Pathologien der Astrozytenstruktur nachgewiesen werden (Miller 2005). Astrozyten bilden zahlreiche Kontakte mit Neuronen der grauen und weißen Substanz. Dabei ist ein einzelner Astrozyt nicht nur mit zehntausenden von Synapsen verbunden, sondern auch mit Kapillaren und Arteriolen. Wegen ihrer hohen Kaliumleitfähigkeit und zahlreicher *Gap junctions* sind Astrozyten für die Kaliumhomöostase (Haydon and Carmignoto 2006) und ebenso für die Regulation der synaptischen Transmission und der neurovaskulären Koppelung zuständig (Araque et al. 2001). Des Weiteren scheinen Astrozyten eine wichtige Rolle für das neuronale Überleben, die Bildung glialer Narben und die Induktion der Blut-Hirn-Schranke zu spielen (Nishiyama et al. 2005). Zusätzlich wird diskutiert, dass diese Gliazellen die gleichen Ionenkanäle und Neurotransmitter-Rezeptoren exprimieren wie Neurone, sich via intrazellulär weiter geleiteter Calciumwellen verständigen und ebenso wie Neurone Neurotransmitter freisetzen können (Haydon 2001). Astrozyten wird außerdem eine wichtige Rolle in der Glutathomöostase zugeschrieben, da sie extraneuronale Glutamat-Transporter exprimieren,

dadurch für die Terminierung der Glutamat-Wirkung an der Synapse verantwortlich sind und auf diese Weise eine toxische Akkumulation des Transmitters verhindern können. Sie exprimieren für viele Neurotransmitter Rezeptoren, die über den Inositoltrisphosphat (IP_3)-Signalweg den intrazellulären Calciumspiegel erhöhen (Kawabata et al. 1996). Die Kommunikation der Astrozyten untereinander wird zum einen *Gap junctions* zugeschrieben, durch die auch in den angrenzenden Nachbarzellen die Calciumkonzentration gesteigert wird (Sul et al. 2004), zum anderen ist möglicherweise ein ATP-aktivierter Rezeptor an der Signalweiterleitung beteiligt (Guthrie et al. 1999; Cotrina et al. 2000; Fam et al. 2000). Die Calciumerhöhung führt wiederum zur Akkumulation von Arachidonsäure und der Freisetzung der Transmitter Glutamat, D-Serin (Mothet et al. 2005) und Adenosintriphosphat (ATP) (Haydon and Carmignoto 2006). Astrozyten beeinflussen wahrscheinlich zudem die zerebrale Durchblutung. Dass Astrozyten mit Arteriolen und Kapillaren in Kontakt stehen, wurde das erste Mal Ende des 18. Jahrhunderts von Golgi beschrieben (Golgi 1989). Diese Beziehung ließ vermuten, dass Astrozyten Nährstoffe und Metabolite aus dem Blut aufnehmen (Andrienzen 1893). Heutzutage wird diskutiert, ob der enge Kontakt zu Blutgefäßen dazu dient, astrozytäre Glukosevorräte wieder aufzufüllen. Die Glukose dient den glialen Zellen als ATP-Spender, welches für die Na^+/K^+ -ATPase benötigt wird. Die Na^+/K^+ -ATPase hat wiederum die Aufgabe, den für den Glutamat-Transport notwendigen Glutamatgradienten aufrecht zu erhalten (Pellerin and Magistretti 1994; Tsacopoulos and Magistretti 1996). Ebenso scheinen diese glialen Zellen an der lokalen Mikrozirkulationsregelung beteiligt zu sein; so konnte demonstriert werden, dass Astrozyten eine Vielzahl vasoaktiver Substanzen, wie zum Beispiel Stickoxid (NO) (Murphy et al. 1993; Li et al. 2003), Cyclooxygenase- und Epoxygenase-Produkte (Pearce et al. 1989; Oomagari et al. 1991) und ATP synthetisieren (Queiroz et al. 1999). Die produzierten Arachidonsäuremetabolite Prostaglandin E_2 und Eikosanoide wirken vasodilatierend, vasokonstringierend wirkt 20-Hydroxyeikosatetraenoidsäure (20-HETE) (Nithipatikom et al. 2001). Zusätzlich zur Regulation der zerebralen Durchblutung beeinflussen Astrozyten neuronale Funktionen über die

Freisetzung von chemischen Botenstoffen, wie zum Beispiel Glutamat, D-Serin und ATP. Von Astrozyten synthetisiertes Glutamat bindet bevorzugt an extrasynaptische Rezeptoren und fördert sowohl die neuronale Synchronisation als auch die neuronale Erregbarkeit (Haydon and Carmignoto 2006). Ebenso scheint es die synaptische Transmission beeinflussen zu können (Fiacco and McCarthy 2004). Es wird angenommen, dass über die Freisetzung von D-Serin, welches an der Glycin-Bindungsstelle des N-Methyl-D-Aspartat Rezeptors bindet, die synaptische Plastizität moduliert wird (Mothet et al. 2000). ATP wird extrazellulär zu Adenosin hydrolysiert und vermittelt über diesen Metaboliten inhibitorische Funktionen (Haydon and Carmignoto 2006).

1.5.1 Astrozyten im Zusammenhang mit antidepressiver Therapie

2002 wiesen Song und Stevens nach, dass Astrozyten in der Lage sind, adulte neuronale Stammzellen zur Neurogenese zu veranlassen. Die Resultate dieser Studie lassen vermuten, dass Astrozyten Faktoren sezernieren, welche die Rate der sich zu neuronalen Zellen differenzierenden Vorläuferzellen versechsfacht und die Proliferationsrate verdoppelt (Song et al. 2002). Dies war insofern unerwartet, als dass während der Entwicklung des Säugetiergehirns die Neurone zeitlich vor Gliazellen entstehen (Nicholls 1992; Temple 2001). Unlängst konnte demonstriert werden, dass Antidepressiva-induzierte adulte Neurogenese für die Effekte der medikamentösen antidepressiven Therapie eine Rolle spielen könnte (Santarelli et al. 2003). Die adulte Neurogenese wird von verschiedenen Wachstumsfaktoren reguliert, wie zum Beispiel *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *fibroblast growth factor* (FGF), *insulin-like growth factor* (IGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) (Stokes 1995; Aberg et al. 2000; Jin et al. 2003; Santarelli et al. 2003; Newton and Duman 2004; Chen et al. 2005; Scharfman et al. 2005). Zahlreiche Ergebnisse von Tierstudien zeigen, dass Veränderungen der Genexpression und Signaltransduktionen, welche in Zusammenhang mit neuronaler und glialer Plastizität und Anpassungsvorgängen bei chronischer antidepressiver Therapie stehen, wichtig für den therapeutischen Effekt der Antidepressiva sind (Duman 2004).

Die Volumen-Reduktion bestimmter Hirnareale bei Patienten mit Stimmungsstörungen wird auf den Rückgang von Gesamtvolumen und Zelldichte, insbesondere der ortständigen Gliazellen (Ongur et al. 1998; Manji et al. 2001; Rajkowska 2002), zurückgeführt. Demzufolge entstand die Hypothese, dass eine depressive Episode mit dem Verlust sowohl neurotropher Unterstützung als auch neuraler und glialer Plastizität einhergeht. Antidepressive Therapie wirkt möglicherweise den nachteiligen Effekten depressiver Episoden entgegen, indem sie neuronale Plastizität durch die Produktion neurotropher Faktoren unterstützt (Newton and Duman 2004; Malberg and Schechter 2005).

1.5.2 Astrozyten synthetisieren NO

Im Gehirn produzieren Neurone, Astroglia und endotheliale Zellen Stickoxid (NO), welches an unterschiedlichen Signalwegen partizipiert. Es existieren drei verschiedene Isoformen der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS), die NO aus L-Arginin synthetisieren (Buskila et al. 2007): Eine induzierte Form (NOS-II) und zwei konstitutive Isoformen, die brain Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS-I) und die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS, NOS-III). Es konnte nachgewiesen werden, dass Astrozyten bei einem Insult oder einer Verletzung NOS-II synthetisieren, jedoch war es nicht sicher, ob diese Zellen auch eine der konstitutiven NOS-Isoformen unter physiologischen Bedingungen produzieren (Murphy et al. 1993; Ridet et al. 1997). Wiencken und Casagrande wiesen daraufhin nach, dass NOS-III in Astrozyten vorkommt, jedoch mit der Einschränkung, dass sie die astrozytären Zellen nur nach morphologischen Gesichtspunkten als solche identifizierten. Da Astrozyten mit Blutgefäßen in Kontakt stehen, wurde konsekutiv vermutet, dass über die astrozytäre NO-Freisetzung der zerebrale Blutfluss reguliert werden kann (Wiencken and Casagrande 1999). Letztlich konnten diese Befunde bislang jedoch noch nicht repliziert werden und daraufhin folgende Untersuchungen mittels hochspezifischen NOS-III-Antikörpern konnten keine NOS-III Expression in Astrozyten zeigen (Reif und Fritzen, unpubliziert).

2 Zusammenfassung der Einleitung und Herleitung der Hypothesen

Die Entstehung depressiver Episoden fußt auf einer Vielzahl von Theorien, die in ihrer Zusammenschau die multifaktorielle Genese der Erkrankung widerspiegeln. In den letzten Jahren hat sich die Forschung intensiv mit den Wirkmechanismen medikamentöser antidepressiver Therapie auseinandergesetzt. Aufgrund der Komplexität der betroffenen Systeme konnten jedoch die präzisen Effekte der einzelnen Medikamente noch nicht hinreichend belegt werden, wobei sich eine Beteiligung neurotropher Faktoren – insbesondere BDNF - herauskristallisiert. Im Zuge dessen ist in letzter Zeit die Rolle der Astrozyten und deren Beitrag zur antidepressiven Therapien in den Vordergrund gerückt. Das Ziel dieser Arbeit ist nun, den Einfluss des TZA Imipramin und SSRI Escitalopram auf den astrozytären Stoffwechsel zu untersuchen.

Hypothesen:

1. Astrozyten exprimieren unter medikamentöser antidepressiver Therapie verstärkt den Brain-derived neurotrophic factor (BDNF).
2. Astrozyten exprimieren als Zielstruktur antidepressiver Therapien den Serotonin-Transporter.
3. Daneben soll untersucht werden, ob Astrozyten den Dopamin-Transporter (DAT) und die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS-III) exprimieren.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Zur Untersuchung lagen messenger-RNA (mRNA) aus Astrozytenkulturen vor, die von neugeborenen Lewis-Ratten gewonnen worden waren. Diese Astrozytenkulturen wurden durch Dr. Kenis, Universität Maastricht, entweder mit Pharmaka (Escitalopram, Imipramin) oder Vehikel inkubiert. Drei Mal wurden unterschiedlich behandelte mRNAs aus Astrozytenkulturen zugesandt.

3.1.1 mRNA-Proben der Astrozytenkulturen

Erste mRNA-Charge

Nummer	Bedingung
---------------	------------------

16/09	Kontrolle (C1)
16/09	Kontrolle (C2)
16/09	Imipramin (I)
16/09	Escitalopram (E)

22/09	Kontrolle (C1)
22/09	Kontrolle (C2)
22/09	Imipramin (I1)
22/09	Imipramin (I2)
22/09	Escitalopram (E1)
22/09	Escitalopram (E2)

Bei der Reihe 16/09 wurden die primären Astrozyten sechsmal passagiert.

Die primären Astrozyten der Reihe 22/09 wurden einmal nach dem Reinigungsvorgang passagiert.

Den Nährmedien beider Serien wurde für jeweils vier Stunden bei 37°C und 5% CO₂ das entsprechende Antidepressivum hinzugefügt. Die finale Konzentration der Medikamente betrug 50µM. Für die Kontrollproben (Kontrolle) wurde steriles Wasser verwendet. Dieses Vorgehen wurde auch bei den anderen beiden Chargen (s. u.) durchgeführt.

3. Material und Methoden

Procedere:

Aus der ersten Astrozyten mRNA wurden durch cDNA-Erststrangsynthese zwei copy-DNAs (cDNA) gewonnen und jeweils per PCR amplifiziert. Die Produkte wurden dann mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) und Agarose-Gelelektrophorese untersucht (siehe Abbildung 3).

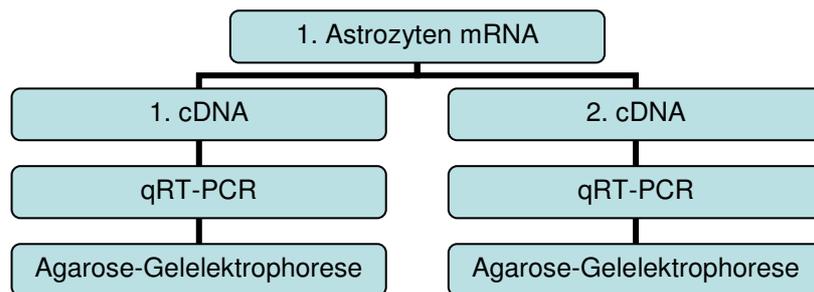


Abbildung 3: Procedere bezüglich der 1. Astrozyten mRNA

Zweite mRNA-Charge

Nummer	Bedingung
---------------	------------------

1A	Kontrolle
1B	Kontrolle
2A	50 µM Imipramin; 4hr
2B	50 µM Imipramin; 4hr
3A	50 µM Escitalopram; 4hr
3B	50 µM Escitalopram; 4hr
4A	Kontrolle
4B	Kontrolle
5A	50 µM Imipramin; 24hr
5B	50 µM Imipramin; 24hr
6A	50 µM Escitalopram; 24hr
6B	50 µM Escitalopram; 24hr

Die primären Astrozyten wurden zweimal nach dem Reinigungsvorgang passagiert.

3. Material und Methoden

Für die Kontrollproben (Kontrolle) wurde erneut steriles Wasser verwendet. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ für 4 oder 24 Stunden inkubiert. Das weitere Vorgehen war wie unter der ersten Charge beschrieben.

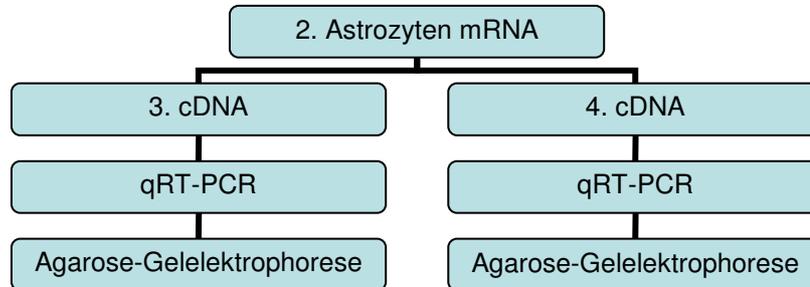


Abbildung 4: Procedere bezüglich der 2. Astrozyten mRNA

Dritte mRNA-Charge

Nummer Bedingung

1	Kontrolle
2	Kontrolle
3	Kontrolle
4	100 µM Imipramin
5	100 µM Imipramin
6	100 µM Imipramin
7	50 µM Escitalopram
8	50 µM Escitalopram
9	50 µM Escitalopram
10	Kontrolle
11	Kontrolle
12	50 µM Imipramin
13	50 µM Imipramin
14	50 µM Imipramin
15	50 µM Imipramin
16	50 µM Imipramin
17	50 µM Escitalopram
18	50 µM Escitalopram
19	50 µM Escitalopram

Die primären Astrozyten wurden zweimal nach dem Reinigungsvorgang passagiert. Die Zellen sind bei 37°C und 5% CO₂ für 4 Stunden inkubiert worden und dann wie oben beschrieben weiter untersucht.

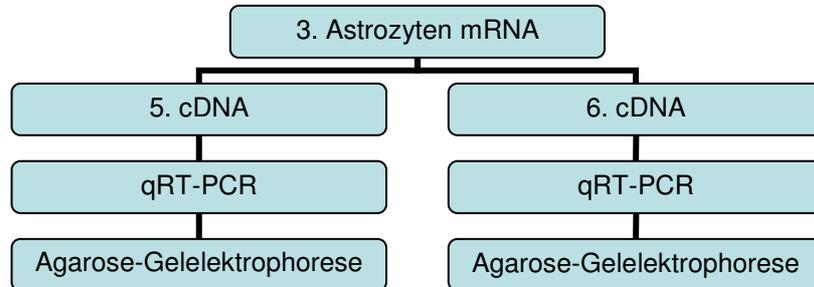


Abbildung 5: Procedere bezüglich der 3. Astrozyten mRNA

3.1.2 Primer

Die folgenden Primer wurden von MWG Biotech AG (Ebersberg) bezogen

BDNF forward	5' - TGC CGC AAA CAT GTC TAT GAG G - 3'
BDNF reverse	5' - GCT GTG ACC CAC TCG CTA ATA C - 3'
NOS-III forward	5' - CCT TCC GCT ACC AGC CAG A - 3'
NOS-III reverse	5' - CAG AGA TCT TCA CTG CAT TGG CTA - 3'
GAPDH forward	5' - AAC GAC CCC TTC ATT GAC - 3'
GAPDH reverse	5' - TCC ACG ACA TAC TCA GCA C - 3'
ARP forward	5' - CGA CCT GGA AGT CCA ACT AC - 3'
ARP reverse	5' - ATC TGC TGC ATC TGC TTG - 3'
18S forward	5' - GAA ACT GCG AAT GGC TCA TTA AA - 3'
18S reverse	5' - CCA CAG TTA TCC AAG TAG GAG AGG A - 3'

3.1.3 Chemikalien und Kits

cDNA - Herstellung

iScript™ cDNA Synthesis Kit Bio-Rad (Hercules CA, USA)

Real Time PCR

iQ™ SYBR Green Supermix Bio-Rad (Hercules CA, USA)

QuantiTect™ SYBR® Green PCR
Kit Qiagen (Hilden)

Rn_Slc6a3_SG_1 QuantiTect®
Primer Assay (200) Qiagen (Hilden)

Rn_Slc6a4_1_SG QuantiTect®
Primer Assay (200) Qiagen (Hilden)

Fluorescein Calibration Dye Bio-Rad (München)

H₂O LiChrosolv® Merck (Darmstadt)

Agarosegel - Elektrophorese

TAE (Tris Acetat Puffer)

0,5M / pH 8

- 40 mM Tris AppliChem GmbH (Darmstadt)
- 20 mM Essigsäure Merck (Darmstadt)
- 1 mM EDTA Sigma – Aldrich Chemie GmbH
(Steinheim)

SeaKem® LE Agarose Biozym (Hess. Oldendorf)

Ethidiumbromid Sigma – Aldrich Chemie GmbH
(Steinheim)

Gene Ruler™ 100bp MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)

DNA Ladder

3. Material und Methoden

8 x Loading Dye Solution Fermentas GmbH (St.Leon-Rot)

DNA-Extraktion

Quantum Prep® Freeze 'N
Squeeze DNA Gel Extraction Bio-Rad (Hercules CA, USA)

DNA-Fällung

3 M Natrium Acetat pH 5,2 Merck (Darmstadt)
100% Ethanol J.T.Baker (Deventer, Holland)

3.1.4 Geräte und Software

Gerät	Typ	Hersteller
PCR-Gerät	T-Gradient	Biometra GmbH (Göttingen)
	Thermoblock	
	Thermocycler	
	Thermoblock	
Gelkammer	40-1214	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Geldokumentationssystem- Computer	Chemie Doc	Bio-Rad (Hercules CA, USA)
Geldokumentationssystem UV-Lampe	Fluo_Link TFL 20M	MWG Biotech AG (Ebersberg)
Real Time PCR	iCycler iQ™ Optical Modul	Bio-Rad (Hercules CA, USA)
Zentrifuge	Hettich Mikro Rapid/K	Heinse+Ziller (Würzburg)
Bio Photometer	No: 6131 03377	Eppendorf AG (Hamburg)

Software

Microsoft Word 2002	Microsoft Corporation, Unterschleißheim
Microsoft Excel 2002	Microsoft Corporation, Unterschleißheim
GeNorm	http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm
iCycler iQ™ Optical System Software 3.1	Bio-Rad Laboratories
Endnote	Niles & Asc.Inc.
Quantity One 4.5	Bio-Rad Laboratories

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung von RNase freien Gegenständen

Da RNAsen durch Autoklavieren nicht vollständig zerstört werden, ist eine Behandlung aller für das Arbeiten mit RNA benötigten Lösungen und Plastikgegenstände mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) notwendig. DEPC inaktiviert unter anderem Ribonukleasen durch die Bindung an den Imidazol-Stickstoff von Histidin-Resten. Die Behandlung mit DEPC in einer Konzentration von 0,05% erfolgte für mindestens 2 Stunden bei 37°C. Da DEPC aber seinerseits RNA durch Carboxymethylierung schädigen kann, wurden die Lösungen und Gegenstände anschließend autoklaviert. Durch diesen Vorgang wurde DEPC degradiert.

3.2.2 cDNA Erststrangsynthese

Zur Synthese von cDNA aus RNA wurde das iScript cDNA-Synthese Kit von Bio-Rad verwendet, welches eine modifizierte Reverse Transkriptase (RT) aus dem Moloney Mäuse Leukämie Virus (MMLV) enthält. Da diese RT RNase H-Aktivität besitzt, entfällt die anschließende Zugabe des entsprechenden Enzyms. Der zum Kit gehörende Reaktions-Mix enthält sowohl Oligo (dT)-Primer, als auch Hexamer (dN)-Primer (sogenannten Random Primer).

Es wurden jeweils 500ng RNA zur cDNA Synthese eingesetzt. Pro Ansatz wurden 4µl 5x iScript Reaktions-Mix und 1µl iScript Reverse Transkriptase

pipettiert. Mit nukleasefreiem Wasser wurden die Ansätze auf ein Reaktionsvolumen von 20µl aufgefüllt und im T1-Thermocycler inkubiert. Bei der Verwendung von Random Primern war eine anfängliche Inkubation bei 25°C für 5 Minuten notwendig, um eine Verlängerung der Primer zu ermöglichen. Bei 42°C war die RT aktiv, wobei sie die RNA als Matrize zur Synthese der cDNA nutzte. Gleichzeitig baute das Enzym mit Hilfe seiner RNase H-Aktivität die RNA der RNA-DNA-Hybride ab. Dieser Reaktionsschritt benötigte 30 min. Nach erfolgter Hitzeinaktivierung der Enzyme für 5 min bei 85°C wurde das Volumen des RT-Ansatzes auf 100µl mittels nukleasefreien Wassers erhöht.

3.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert geringe Mengen spezifischer Nukleinsäure-Sequenzen *in vitro* bis zu einem detektierbaren Niveau. Dabei wurde eine DNA-abhängige DNA-Polymerase, die DNA-Primer als Startpunkt benötigt, verwendet. Eine PCR-Reaktion besteht aus mehreren Zyklen, welche sich üblicherweise aus drei Teilschritten mit unterschiedlichen Temperaturen zusammensetzen. Im ersten Schritt werden die DNA-Doppelstränge bei 95°C denaturiert (siehe Abbildung 6). Beim zweiten Schritt, dem sogenannten Annealing, können die Primer an das Template binden. Die dafür geeignete Temperatur (T_M) ist abhängig von dem GC-Gehalt und der Länge der Primer und lässt sich für Oligodesoxynukleotide mit weniger als 50 Basen nach der Formel: $T_M = 2x(A+T) + 4x(G+C)$ bestimmen. Die gebundenen Primer dienen dann im dritten Schritt der DNA-Polymerase als Startmoleküle zum Kopieren der beiden Matrizenstränge. Die *Taq*-Polymerase hat ihr Aktivitätsoptimum bei 72°C und stammt ursprünglich aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*. Dieses Enzym wird, anders als die Polymerasen mesophiler Bakterien, bei der Hitzeeinwirkung während der Denaturierung der DNA nicht zerstört. Auf diese Weise ist es möglich, die Amplifikation über mehrere Zyklen hinweg durchzuführen, ohne nach jedem Denaturierungsschritt neue Polymerase zugeben zu müssen. Die beiden entstandenen DNA-Stränge bilden dann die Vorlage für den nächsten Durchlauf, die Menge an DNA

3. Material und Methoden

verdoppelt sich also optimalerweise mit jedem neuen Zyklus und kann mittels Agarose-Gelelektrophorese qualitativ nachgewiesen werden. Die genauen PCR-Bedingungen für jeden dieser Schritte (Anzahl, Temperatur, Dauer) sind unten angegeben.

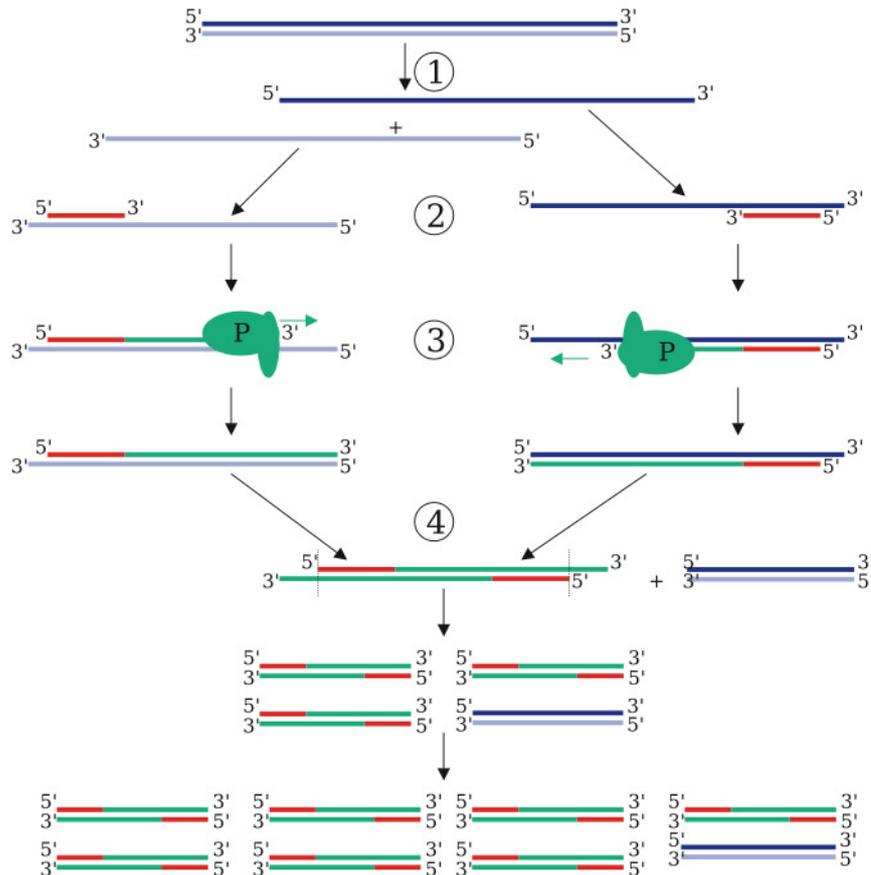


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines PCR-Zyklus.

6.1 Denaturierung bei 95 °C, 6.2 Annealing bei primerspezifischer Temperatur T_M , 6.3 Elongation bei 72 °C durch die DNA-Polymerase (P), 6.4 Der erste Zyklus ist beendet, es folgen weitere, bis die DNA-Menge ein detektierbares Niveau erreicht (Grafik mod. von (Wikipedia 2007))

3.2.4 Quantitative Real-time PCR

Die quantitative Analyse des PCR-Ausgangsprodukts ist mit einer gewöhnlichen PCR nicht möglich, da nach einer gewissen Anzahl von Zyklen keine exponentielle Anreicherung des PCR-Produkts mehr erfolgt, sondern die PCR-

Reaktion in die sogenannte Plateau-Phase übergeht (Ginzinger 2002). Ursachen hierfür sind die Inhibition der Polymerase zum Beispiel durch die Matrize, aufgebrauchte Reagenzien oder die Akkumulation von Pyrophosphat.

Die Quantifizierung von PCR-Ausgangsprodukten wird durch die sogenannte Real-time PCR möglich gemacht. Bei der Real-time PCR wird einmal pro Zyklus die vorhandene Nukleinsäuremenge detektiert, wodurch festgestellt werden kann, ab welchem Zyklus (Schwellenwert-Zyklus, engl. threshold cycle, Ct) die PCR-Reaktion in die exponentielle Phase übergeht. Der Nachweis der durch spezifische Amplifikation gebildeten Nukleinsäuren kann durch Verwendung des Fluorophors SYBr Green erfolgen, welches während der PCR in die DNA-Doppelhelix interkaliert und die Detektion aller doppelsträngigen DNA-Moleküle ermöglicht. Nach Anregung durch Licht entsprechender Wellenlänge fluoresziert an die DNA gebundenes SYBr Green wesentlich stärker als frei vorliegendes SYBr Green, wodurch die amplifizierte DNA nachweisbar wird. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass der Farbstoff unspezifisch bindet. Neben dem gewünschten PCR-Produkt werden daher auch Primerdimere und andere eventuell unspezifisch gebildete PCR-Produkte detektiert. Deshalb ist es nötig, mit Hilfe einer Schmelzpunktanalyse die Reinheit der gebildeten PCR-Produkte zu überprüfen. Die Schmelzpunktanalyse wird im Anschluss an die PCR durchgeführt und ermöglicht die Differenzierung zwischen spezifischen und unspezifischen PCR-Produkten inklusive Primerdimeren, da Nukleinsäuren unterschiedlicher Größe und mit verschiedenem GC-Gehalt voneinander abweichende Schmelzpunkte besitzen. Es wird hierbei die Abnahme der Fluoreszenzemission gemessen, die durch die hitzebedingte Denaturierung der doppelsträngigen DNA erfolgt. Der Scheitelpunkt der Kurve stellt den Schmelzpunkt der DNA-Stränge dar, an dem noch die Hälfte des gebildeten PCR-Produktes als Doppelstrang vorliegt. Zusätzliche Maxima, deren Scheitel nicht bei der Schmelztemperatur des gewünschten PCR-Produktes lägen, würden auf ebenfalls amplifizierte Primer-Dimere oder andere PCR-Produkte hinweisen.

3. Material und Methoden

Neben diesen Maßnahmen wurde das durch Real-time PCR entstandene Produkt mittels Gelelektrophorese analysiert und dadurch die Spezifität des detektierten Signals überprüft. Die PCR-Effizienz wurde mit Hilfe einer Verdünnungsreihe des jeweiligen, zuvor aufgereinigten PCR-Produkts (10^{-1} bis 10^{-6} ng/ μ l), einer sogenannten Standardkurve, überprüft. Bei einer vollständigen Verdopplung der vorhandenen DNA in jedem Zyklus spricht man von einer Effizienz von 100%, die in der Praxis allerdings selten erreicht wird. Effizienzwerte über 90% werden als gute Arbeitswerte angesehen. Durch Vergleich der Expression des zu untersuchenden Gens mit der Expression von Housekeeping-Genen (18s rRNA, Glycerinaldehyddehydrogenase [GAPDH] und ARP [Acidic ribosomal phosphoprotein]) wurden Ungenauigkeiten bei der RNA-Konzentrationsbestimmung und der cDNA-Synthese ausgeglichen. Die rechnerische Auswertung der qRT-PCRs erfolgte unter Verwendung der Ct-Werte mit Hilfe der *geNORM Normalisierungs Software* (Vandesompele et al. 2002).

Für jede cDNA, die aus den zugrunde liegenden mRNAs hergestellt worden war, lief jeweils eine Versuchsreihe mit jedem Kandidaten-Gen (5-HTT, BDNF, DAT, und NOS3) und den Haushalts-Genen (18s, GAPDH, ARP).

Die PCR-Bedingungen der einzelnen Gene sahen wie folgt aus:

3.2.4.1 Haushaltsgene

18s

Zyklus	Wiederholungen	Schritt	Dauer [mm:ss]	Temp [°C]	+ Temp [°C]
1	1	1	03:00	95.0	
2	35	1	00:30	95.0	
		2	00:45	60.0	
3	1	1	01:00	95.0	
4	80	1	00:10	55.0	0.5
5	1	1	HOLD	15.0	

3. Material und Methoden

GAPDH

Zyklus	Wiederholungen	Schritt	Dauer [mm:ss]	Temp [°C]	+ Temp [°C]
1	1	1	03:00	95.0	
2	40	1	00:30	95.0	
		2	00:45	60.0	
3	1	1	01:00	95.0	
4	80	1	00:10	55.0	0.5
5	1	1	HOLD	15.0	

ARP

Zyklus	Wiederholungen	Schritt	Dauer [mm:ss]	Temp [°C]	+ Temp [°C]
1	1	1	03:00	95.0	
2	40	1	00:30	95.0	
		2	00:45	60.0	
3	1	1	01:00	95.0	
4	80	1	00:10	55.0	0.5
5	1	1	HOLD	15.0	

3.2.4.2 Kandidatengene

5HTT

Zyklus	Wiederholungen	Schritt	Dauer [mm:ss]	Temp [°C]	+ Temp [°C]
1	1	1	15:00	95.0	
2	35	1	00:15	94.0	
		2	00:30	55.0	
		3	00:30	72.0	
3	1	1	00:30	95.0	
4	80	1	00:15	55.0	0.5
5	1	1	HOLD	15.0	

3. Material und Methoden

BDNF

Zyklus	Wiederholungen	Schritt	Dauer [mm:ss]	Temp [°C]	+ Temp [°C]
1	1	1	03:00	95.0	
2	40	1	00:30	95.0	
		2	00:45	58.4	
3	1	1	01:00	95.0	
4	80	1	00:10	55.0	0.5
5	1	1	HOLD	15.0	

DAT

Zyklus	Wiederholungen	Schritt	Dauer [mm:ss]	Temp [°C]	+ Temp [°C]
1	1	1	15:00	95.0	
2	45	1	00:15	94.0	
		2	00:30	55.0	
		3	00:30	72.0	
3	1	1	00:30	95.0	
4	80	1	00:15	55.0	0.5
5	1	1	HOLD	15.0	

NOS3

Zyklus	Wiederholungen	Schritt	Dauer [mm:ss]	Temp [°C]	+ Temp [°C]
1	1	1	03:00	95.0	
2	35	1	00:30	95.0	
		2	00:45	61.8	
3	1	1	01:00	95.0	
4	80	1	00:10	55.0	0.5
5	1	1	HOLD	15.0	

3.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese ist es möglich, Desoxyribonukleinsäuren (DNA) nach ihrer Größe zu trennen und ihre Basenpaarlänge durch Vergleich mit DNA-Fragmenten bekannter Größe zu bestimmen. Für die Herstellung eines 1%-Agarosegels wurde 1g Agarose in

3. Material und Methoden

100ml TAE-Puffer gegeben und im Mikrowellenherd gekocht, bis sich das Pulver restlos aufgelöst hatte. Unter stetigem Rühren kühlte die Lösung bei Raumtemperatur bis auf ca. 60°C ab und wurde anschließend mit 3µl Ethidiumbromid versetzt. War das Ethidiumbromid durch fortdauerndes Rühren ausreichend verteilt, wurde die Lösung in eine hierfür vorgesehene Gelkammer gegossen, in der je nach Bedarf eine bestimmte Anzahl an Platzhaltern für die zu entstehenden Geltaschen (Slots) angebracht waren. Bei Abkühlung der Agarose polymerisierte diese und bildete ein netzartiges Gel, welches umso engmaschiger vorlag, je höher die Agarose konzentriert wurde. Nach Festigung des Gels platzierte man dieses in einer Plexiglaskammer mit 0,5x TAE-Laufpuffer. Die Geltaschen mussten hierbei an der negativen Elektrode der Kammer zu liegen kommen. Um die DNA-Lauffront sichtbar zu machen, wurden die aufzutrennenden DNA-Proben mit 5 µl Ladepuffer versetzt, und mit einer Pipette in jeweils eine Geltasche des Gels gespritzt. Zudem wurde eine DNA-Leiter mit DNA-Fragmenten bekannter Größe aufgetragen (siehe Abbildung 7) und ein elektrisches Feld (100 Volt) angelegt. Die Gelelektrophorese funktionierte nun wie ein Sieb für Moleküle. Durch das elektrische Feld wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle durch die Gelmatrix, wobei sich die kleineren DNA-Moleküle schneller durch das Gel bewegen können und somit eine Auftrennung der Stränge nach ihrer Größe ermöglicht wird. Waren die Fragmente genügend weit aufgetrennt, konnte das Gel unter einer UV-Lampe ausgewertet werden, da Ethidiumbromid, welches sich in die DNA eingelagert hat, im ultravioletten Licht fluoresziert.

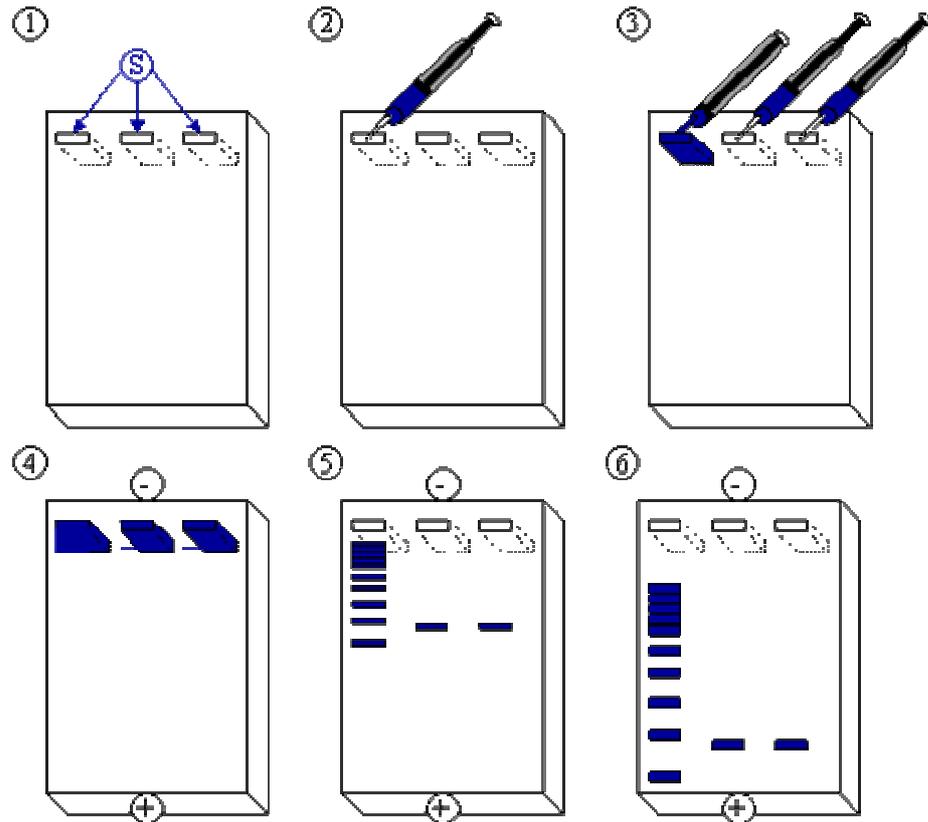


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Elektrophorese

7.1: Agarosegel mit 3 Geltaschen (Slots) (S), 7.2: Auftragen des Größenmarkers, 7.3: Auftragen der DNA Proben 2 und 3, 7.4: Anlegen des elektrischen Feldes, die negativ geladene DNA wandert zur positiven Anode, 7.5: Kleine DNA-Fragmente wandern schnell, große langsam durch das Gel, 7.6: Anhand des Ladebuffers kann abgeschätzt werden, wann die Elektrophorese beendet werden kann (Grafik mod. von (Wikipedia 2007))

3.2.6 DNA Gel-Extraktion

Die DNA Gel-Extraktion und die DNA-Fällung waren für die Herstellung von Standard-DNA notwendig, die die Grundlagen für die qRT-PCR Standardkurven waren.

Zur DNA Gel-Extraktion und deren Aufreinigung aus einem TAE - Agarosegel wurden Quantum Prep™ Freeze 'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns von Bio-Rad verwendet.

Bei diesem Verfahren wurde nach einer Agarose-Gelelektrophorese die entsprechende DNA-Bande aus dem Gel geschnitten und in eine Zentrifugensäule platziert. Diese bestand aus einem Filterstück, auf welches das Agarose-Gelstück gelegt wurde und einem Auffangröhrchen. Nachdem der Gelbereich mit der Zentrifugensäule fünf Minuten in einem -20 °C Gefrierschrank abgekühlt worden war, wurde er bei 13.000 rpm bei Raumtemperatur drei Minuten zentrifugiert. Durch die Zentrifugalkräfte tritt die zu gewinnende DNA in die Auffangröhre über und ist somit extrahiert, das Agarosegel kann den Filter der Zentrifugensäule nicht passieren.

3.2.7 DNA-Fällung

Im Anschluss an die DNA Gel-Extraktion wurde eine DNA-Fällung durchgeführt, damit das vorher gewonnene Extrakt von unerwünschten Verunreinigungen befreit wird.

Hierfür wurde zur gelösten DNA 0,1 Volumen 3M NaAc (pH 5,2) gegeben und gemischt. Hinzu kamen 2,5 Volumen gekühltes 100% EtOH. Das Gemisch wurde nun für 2 Stunden bei -20 °C inkubiert. Im Anschluss daran wurde es bei 4 °C mit 13000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert, der dabei entstehende Überstand wurde verworfen. Das entstandene Pellet wurde zweimal gewaschen, indem pro Waschgang 500 µl 70% EtOH zugegeben und das Gemisch für 10 Minuten bei 4 °C mit 13000 rpm zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde jeweils ebenfalls verworfen. Zum Trocknen wurden die Gefäße in einen eisgefüllten Behälter gestellt. Sobald die überschüssige Flüssigkeit verdampft war, löste man das Pellet entweder in 10-15 µl 1xTE-Puffer oder H₂O.

4 Ergebnisse

4.1 Auswertungsgrundlagen

Bei den aus den verschiedenen RNAs gewonnenen cDNAs wurde mittels der quantitativen Real-Time PCR untersucht, ob in Antidepressiva-stimulierten Astrozyten mRNA für *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), Serotonin-Transporter (5-HTT), Stickstoffmonoxid-Synthase III (eNOS, NOS-III) oder den Dopamin-Transporter (DAT) gebildet wird. Die durch dieses Verfahren gewonnenen Ergebnisse wurden unter Verwendung der Ct-Werte in relative Expressionswerte (W_R) umgerechnet (Wiedemann 2004) und mit Hilfe der *geNORM* Normalisierungs Software (Vandesompele et al. 2002) ausgewertet. Ungenauigkeiten bei der vorhergegangenen cDNA-Synthese werden durch Vergleich der Expression des zu untersuchenden Gens mit der Expression der Housekeeping-Gene 18s-rRNA, Glycerinaldehyd-Dehydrogenase (GAPDH) und *Acidic ribosomal phosphoprotein* (ARP) ausgeglichen. Die nun vorliegenden Ergebnisse stellen die normalisierten relativen Expressionswerte (W_R/NF) des jeweils untersuchten Gens dar.

Die jeweiligen Signifikanzniveaus werden mit dem Student's t-test berechnet. Die Signifikanzniveaus sind festgelegt mit:

$$p \leq 0,05 *$$

$$p \leq 0,01 **$$

$$p \leq 0,001 ***$$

Die jeweils signifikanten Ergebnisse sind entsprechend ihres Signifikanzniveaus mit den oben aufgeführten Markierungen gekennzeichnet. Aufgrund der unterschiedlichen Behandlung der Astrozytenkulturen werden die Ergebnisse nicht gemittelt, sondern für die jeweiligen RNA-Gruppen einzeln dargestellt.

Im Folgenden steht „C“ für Kontrollproben, „I“ für Imipramin-behandelte Proben und „E“ für Escitalopram-behandelte Proben.

4.2 Quantitative Real-Time PCR: BDNF

Im Folgenden sind die Resultate der BDNF-Untersuchungen vorgestellt. Alle synthetisierten cDNA-Proben (1. - 6. cDNA) wurden getestet.

4.2.1 Grafische Darstellung der Ergebnisse

Stellvertretend für alle Versuche werden hier die qRT-PCR Ergebnisse der 2. cDNA der ersten mRNA-Charge für die BDNF-Versuchsreihe grafisch dargestellt.

Abbildung 8 zeigt die grafische Auswertung der verwendeten Kontroll- Proben. Es zeigt sich, dass die Proben bei einem Schwellenwertzyklus von 25-28 in die exponentielle Phase übergehen.

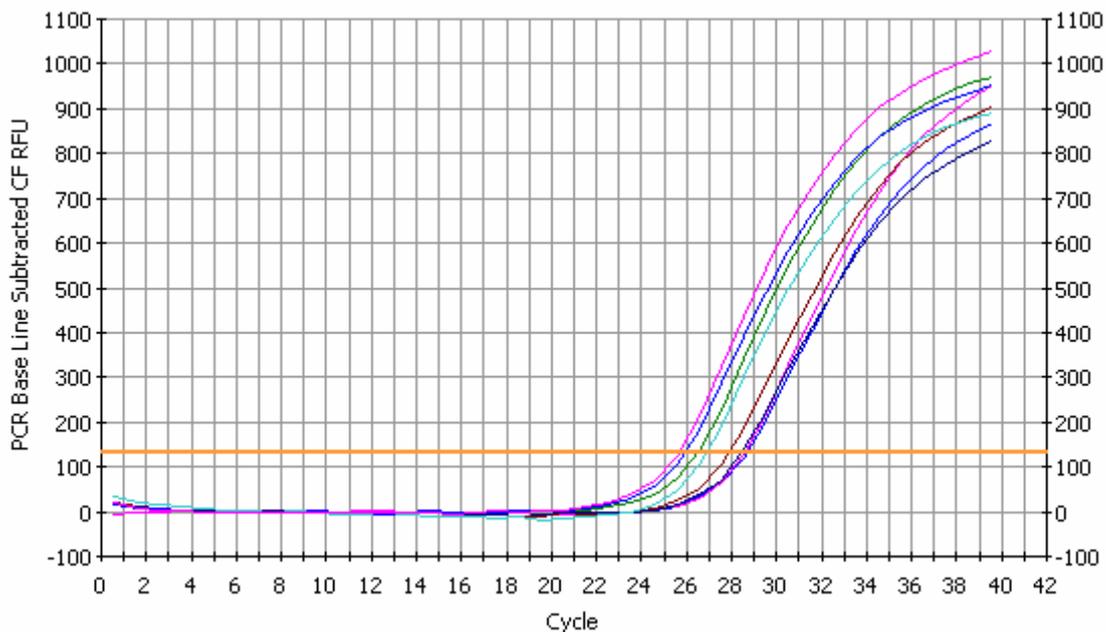


Abbildung 8: Grafische Darstellung der Kontroll-Proben

Ordinate: Fluoreszenzintensität, Abszisse: Zykluszahl, rote Linie: Schwellenwert-Horizontale
Jede Kontroll-Probe wurde in Triplikaten untersucht. Die rote Linie stellt die Schwellenwert-Horizontale dar, ab diesem Wert übersteigt die Fluoreszenzemission signifikant die Hintergrundfluoreszenz. Die Schnittpunkte der jeweiligen Kurven mit der Schwellenwert-

4. Ergebnisse

Horizontalen markieren den Schwellenzyklus (Threshold Cycle, Ct), ab dem die PCR in die exponentielle Phase übergeht.

Abbildung 9 zeigt hingegen die Ergebnisse der mit Imipramin behandelten Astrozyten. Im Gegensatz zu den Kontrollen liegen die Cts hier schon bei 24-25. Dies bedeutet, dass bei den antidepressiv behandelten Zellen die PCR-Reaktion früher in die exponentielle Phase übergeht als bei den unbehandelten.

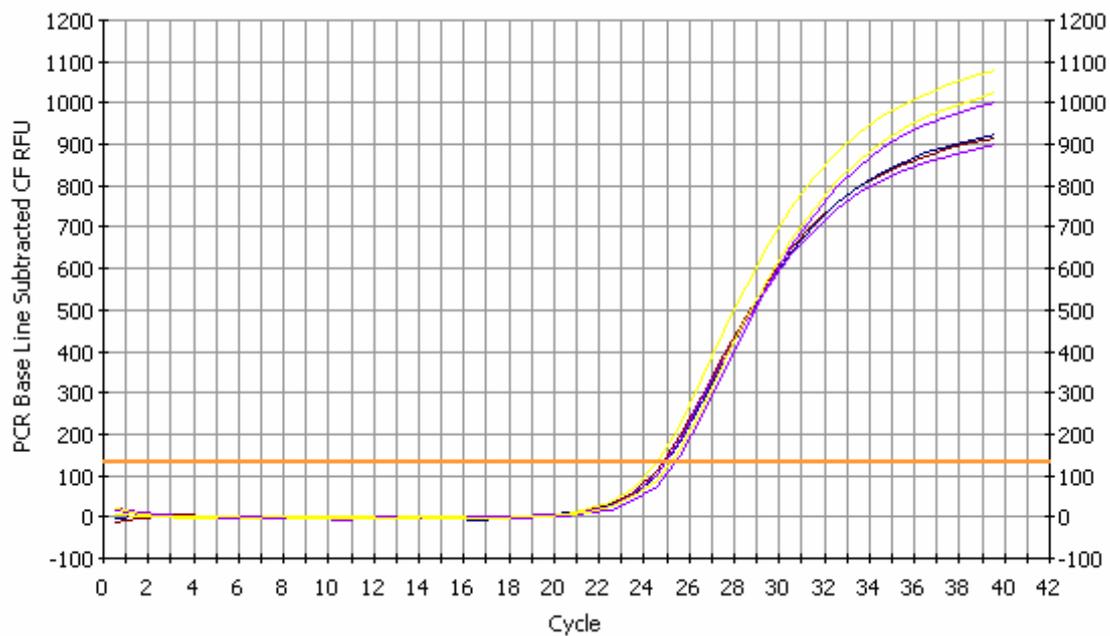


Abbildung 9: Grafische Darstellung der Imipramin-behandelten Proben

Jede Imipramin-Probe wurde in Triplikaten untersucht. Ordinate: Fluoreszenzintensität, Abszisse: Zykluszahl, rote Linie: Schwellenwert-Horizontale

4. Ergebnisse

Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse der mit Escitalopram behandelten Astrozyten. Die Schwellenwertzyklen liegen hier bei 25.

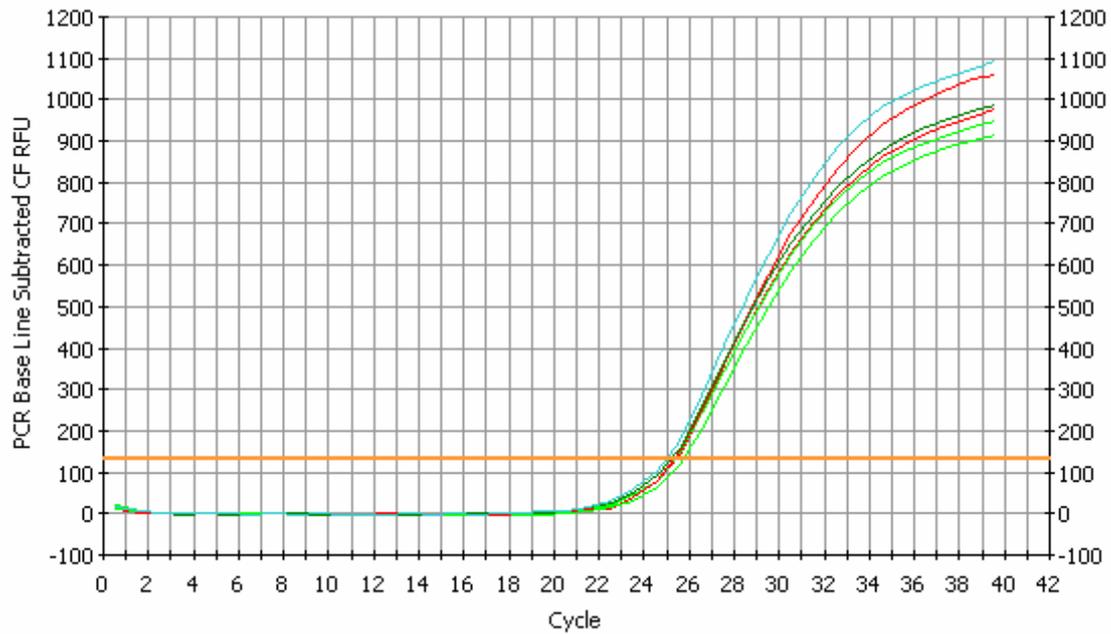


Abbildung 10: Grafische Darstellung der Escitalopram-behandelten Proben
Jede Escitalopram-Probe wurde in Triplikaten untersucht. Ordinate: Fluoreszenzintensität,
Abszisse: Zykluszahl, rote Linie: Schwellenwert-Horizontale

4. Ergebnisse

Abbildung 11 ist die grafische Darstellung der verwendeten 17 Standard-cDNA- Proben in absteigender Konzentration zu entnehmen. Die Standardkurven zeigen, dass die jeweiligen Verdünnungsreihen nacheinander gestaffelt den Schwellenzyklus erreichen. Je stärker die Verdünnung, desto später wird der Schwellenwert überschritten.

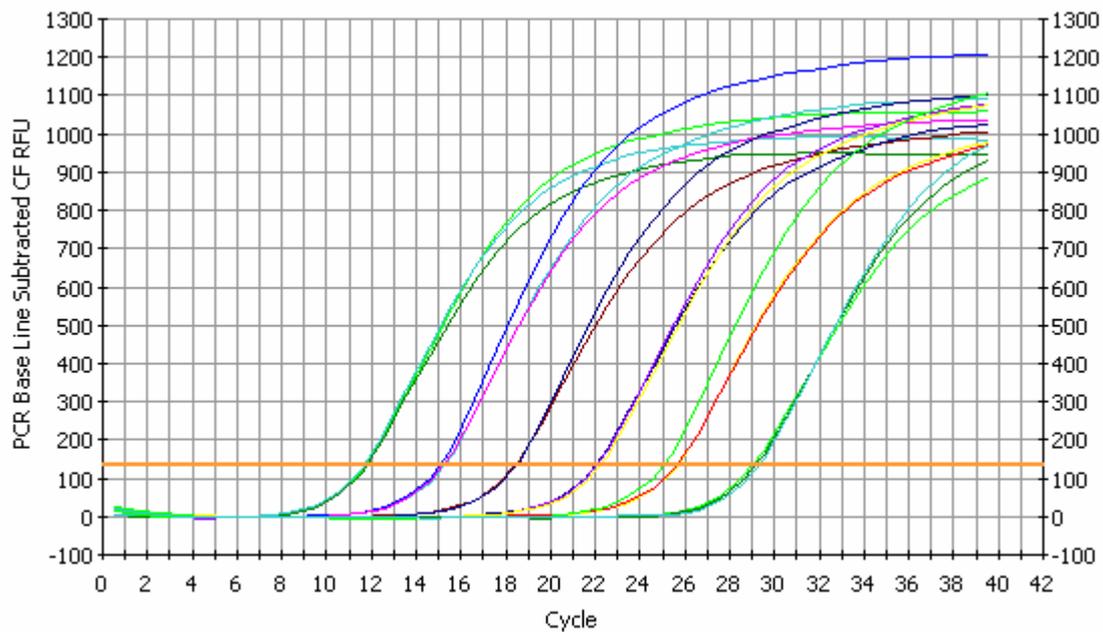


Abbildung 11: Graphische Darstellung der Standard-cDNAs

Jede Standard-Probe wurde in Triplikaten untersucht. Ordinate: Fluoreszenzintensität, Abszisse: Zykluszahl, rote Linie: Schwellenwert-Horizontale

Abbildung 12 zeigt die Schmelzkurve aller untersuchten Proben.

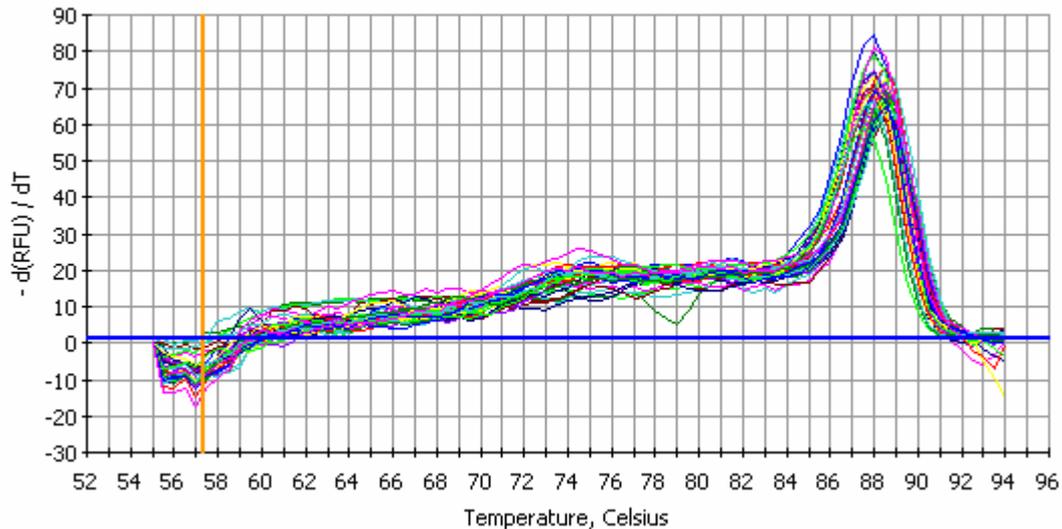


Abbildung 12: Schmelzkurve einer qRT-PCR

Ordinate: negativer Quotient aus Fluoreszenz- und Temperaturdifferenz, Abszisse: Temperatur in °C

4.2.2 BDNF: Ergebnisse der ersten mRNA-Charge

4.2.2.1 BDNF-Ergebnisse der 1. cDNA

Wie Tabelle 2 zeigt, wurden die normalisierten relativen Expressionswerte der BDNF-mRNA innerhalb der jeweiligen Serie zusätzlich gemittelt und die Standardabweichung der Ergebnisse berechnet. Um die veränderte BDNF-Expression der behandelten gegenüber den unbehandelten Ratten-Astrozyten beurteilen zu können, wurde aus den normalisierten relativen Expressionswerten der BDNF mRNA (W_R/NF) mit Hilfe des Student's t-tests das jeweilige Signifikanzniveau der Vergleichsgruppen errechnet. Für die nachfolgenden Testreihen wurde in analoger Weise verfahren.

4. Ergebnisse

Tabelle 2: Normalisierte relative Ergebnisse der BDNF mRNA und errechnete Signifikanzniveaus der 1. cDNA

Serie	Probe	W_R/NF	Gemittelte Proben	Mittelwert W_R/NF	SD	T-test	Ergebnis
16/09	C1	0,1597	C1, C2	0,2137	0,0764	C/I+E	0,0049**
16/09	C2	0,2678					
16/09	50μM I; 4h	2,0199	---	---	---		
16/09	50μM E; 4h	1,7067	---	---	---		
22/09	C1	0,7015	C1, C2	0,5931	0,1532	C/I+E	0,1401
22/09	C2	0,4848					
22/09	50μM I1; 4h	1,6086	I1, I2	1,4243	0,2607	C/I	0,0301*
22/09	50μM I2; 4h	1,2399					
22/09	50μM E1; 4h	0,6751	E1, E2	0,6552	0,0280	C/E	0,3148
22/09	50μM E2; 4h	0,6354					

Die rechnerische Auswertung der 1. cDNA zeigte, dass in der Reihe 16/09 die mit Antidepressiva (Imipramin / Escitalopram zusammen analysiert) behandelten Astrozyten signifikant mehr BDNF exprimieren als die unbehandelten Kontrollen. Auch in der Reihe 22/09 konnte ein signifikanter Anstieg der BDNF-Expression bei den mit Imipramin behandelten Astrozyten gegenüber den Kontrollen festgestellt werden.

4. Ergebnisse

4.2.2.2 BDNF-Ergebnisse der 2. cDNA

Die normalisierten relativen Expressionswerte der BDNF-mRNA wurden innerhalb der jeweiligen Serie zusätzlich gemittelt und die Standardabweichung der Ergebnisse berechnet.

Tabelle 3: Normalisierte relative Ergebnisse der BDNF mRNA und errechnete Signifikanzniveaus der 2. cDNA

Serie	Probe	W_R/NF	Gemittelte Proben	Mittelwert W_R/NF	SD	T-test	Ergebnis
16/09	C1	0,1490	C1, C2	0,1581	0,0128	C/I+E	0,0095**
16/09	C2	0,1673					
16/09	50μM I; 4h	1,1002	---	---	---		
16/09	50μM E; 4h	0,8690	---	---	---		
22/09	C1	0,5314	C1, C2	0,5839	0,0742	C/I+E	0,0425*
22/09	C2	0,6365					
22/09	50μM I1; 4h	1,4745	I1, I2	1,5495	0,1060	C/I	0,0044**
22/09	50μM I2; 4h	1,6246					
22/09	50μM E1; 4h	0,7510	E1, E2	0,9491	0,2802	C/E	0,1083
22/09	50μM E2; 4h	1,1473					

Bei der Auswertung der 2. cDNA zeigte sich ebenfalls, dass in der Reihe 16/09 die mit Antidepressiva behandelten Astrozyten (Imipramin/Escitalopram) signifikant mehr BDNF exprimieren als die unbehandelten Kontrollen. In der Reihe 22/09 konnte sowohl ein signifikanter Anstieg der BDNF-Expression bei den mit Imipramin behandelten Astrozyten gegenüber den Kontrollen festgestellt werden als auch bei den gemittelten Antidepressiva-stimulierten Astrozyten (Imipramin/Escitalopram) gegenüber den Kontrollen.

4. Ergebnisse

4.2.2.3 Gemittelte BDNF-Ergebnisse der 1. und 2. cDNA

Um die Ergebnisse der ersten RNA-Charge zu vergleichen und eine größere Stichprobenanzahl zu erreichen, wurden die normalisierten relativen Expressionswerte der BDNF-mRNA der 1. und 2. cDNA innerhalb der jeweiligen Serie gemittelt und die Standardabweichung der Ergebnisse berechnet.

Tabelle 4: Normalisierte relative Ergebnisse der BDNF mRNA und errechnete Signifikanzniveaus für die Imipramin-behandelten Proben der gemittelten 1. und 2. cDNA

Serie	Probe	Gemittelte Proben	Mittelwert W_R/NF	SD	T-test	Ergebnis
16/09	C1	C1, C2	0,1859	0,0550		
16/09	C2					
16/09	50µM I; 4h	I	1,5600	0,6503		
16/09	50µM E;4h	E	1,2878	0,5923		
22/09	C1	C1, C2	0,5885	0,0984	[[C/I _{1. cDNA})+(C/I _{2. cDNA}):2	0,0172*
22/09	C2					
22/09	50µM I1; 4h	I1, I2	1,4869	0,1778		
22/09	50µM I2; 4h					
22/09	50µM E1; 4h	E1, E2	0,8022	0,2350		
22/09	50µM E2; 4h					

Bei der rechnerischen Auswertung der gemittelten Imipraminwerte der 1. und 2. cDNA zeigte sich eine signifikante Steigerung der BDNF-Expression in der Reihe 22/09.

4. Ergebnisse

4.2.3 BDNF-Ergebnisse der zweiten Astrozyten RNA-Charge

Die zweite mRNA-Charge (04/2007) dient als Vorlage für zwei weitere cDNA: 3. cDNA und 4. cDNA, wobei die Ergebnisse der letztgenannten cDNA aufgrund eines Translationsfehlers nicht verwendet werden können. Daher sind im Folgenden nur Ergebnistabellen der 3. cDNA dargestellt.

4.2.3.1 BDNF-Ergebnisse der 3. cDNA

Tabelle 5: Normalisierte relative Ergebnisse der BDNF mRNA und errechnete Signifikanzniveaus der 3. cDNA

Nr	Probe	W_R/NF	Gemittelte Proben	Mittelwert W_R/NF	SD	T-test	Ergebnis
1A	C	0,7885	1A,1B	0,8659	0,1094	C/I+E	0,4853
1B	C	0,9434					
2A	50 μ M I; 4h	1,6575	2A, 2B	1,0510	0,8576	C/I	0,3953
2B	50 μ M I; 4h	0,4446					
3A	50 μ M E; 4h	0,7812	3A, 3B	0,6480	0,1883	C/E	0,1463
3B	50 μ M E; 4h	0,5149					
4A	C	0,4462	4A, 4B	0,4504	0,0058	C/I+E	0,2269
4B	C	0,4545					
5A	50 μ M I; 24h	1,0952	5A, 5B	2,4216	1,8757	C/I	0,1377
5B	50 μ M I; 24h	3,7479					
6A	50 μ M E; 24h	0,4197	6A, 6B	0,4385	0,0265	C/E	0,3004
6B	50 μ M E; 24h	0,4573					

Bei der rechnerischen Auswertung der 3. cDNA zeigte sich kein signifikantes Ergebnis.

4. Ergebnisse

4.2.4 BDNF-Ergebnisse der dritten Astrozyten RNA-Charge

4.2.4.1 BDNF-Ergebnisse der 5. cDNA

Tabelle 6: Normalisierte relative Ergebnisse der BDNF mRNA und errechnete Signifikanzniveaus der 5. cDNA

Nr	Probe	W _R /NF	Gemittelte Proben	Mittelwerte	SD	T-test	Ergebnis	
1	C	0,4957	1-3;10-11	0,4638	0,0539	C/I _(50µM) +E	0,2991	
2	C	Kein Wert						
3	C	0,4203				C/I _(100µM) +E		0,1747
10	C	0,5234						
11	C	0,4160				C/I _(50µM+100µM) +E		0,1349
17	50µM E	0,2695	7-9;17-19	0,4178	0,1598	C/E	0,2999	
7	50µM E	0,2895						
8	50µM E	0,4653						
9	50µM E	0,3907						
18	50µM E	0,3825						
19	50µM E	0,7094						
12	50µM I	0,8344	12-16	0,6737	0,2874	C/I _(50µM)	0,0991	
13	50µM I	0,5972						
14	50µM I	1,0872						
15	50µM I	0,3806						
16	50µM I	0,4689						
4	100µM I	1,3470	4-6	1,1940	0,1345	C/I _(100µM)	<0,001***	
5	100µM I	1,1407						
6	100µM I	1,0943						
	50µM I+ 100µM I		4-6;12-16	0,8688	0,3534	C/I _(50µM+100µM)	0,0251*	

Bei der rechnerischen Auswertung der 5.cDNA wurden die Signifikanzniveaus sowohl für die 50µM Imipramin-Proben und die 100µM Imipramin-Proben getrennt als auch gesammelt berechnet.

Bei der rechnerischen Auswertung der 5. cDNA zeigte sich eine Tendenz bezüglich eines Anstiegs der BDNF – Expression bei den mit 50µM Imipramin

4. Ergebnisse

behandelten Astrozytenkulturen und eine signifikante Steigerung der BDNF - Expression bei den mit 100µM Imipramin behandelten Astrozytenkulturen gegenüber den Kontrollen. Ebenso war eine signifikante Erhöhung der BDNF – Expression bei den gemittelten mit Imipramin behandelten Astrozytenkulturen gegenüber den Kontrollen festzustellen.

4.2.4.2 BDNF-Ergebnisse der 6. cDNA

Tabelle 7: Normalisierte relative Ergebnisse der BDNF mRNA und errechnete Signifikanzniveaus der 6. cDNA

Nr	Probe	W_R/NF	Gemittelte Proben	Mittelwerte	SD	T-test	Ergebnis	
1	C	0,3553	1-3;10-11	0,2862	0,0542	C/I (50µM) +E	0,0515	
2	C	0,2653						
3	C	0,2622				C/I (100µM) +E		0,0630
10	C	0,3276						
11	C	0,2207				C/I (50µM+100µM)+E		0,0222*
17	50µM E	0,3401	7-9;17-19	0,3236	0,0326	C/E	0,0952	
7	50µM E	0,3251						
8	50µM E	0,3542						
9	50µM E	0,3537						
18	50µM E	0,2779						
19	50µM E	0,2903						
12	50µM I	0,8244	12-16	0,7082	0,2703	C/I (50µM)	0,0045*	
13	50µM I	0,7102						
14	50µM I	1,0950						
15	50µM I	0,4840						
16	50µM I	0,4274						
4	100µM I	1,0672	4-6	1,0788	0,0251	C/I (100µM)	<0,001***	
5	100µM I	1,0616						
6	100µM I	1,1077						
	50µM I+ 100µM I		4-6;12-16	0,8472	0,2805	C/I (50µM+100µM)	<0,001***	

4. Ergebnisse

Bei der rechnerischen Auswertung der 5.cDNA wurden die Signifikanzniveaus sowohl für die 50µM Imipramin-Proben und die 100µM Imipramin-Proben getrennt als auch gesammelt berechnet.

Die Auswertung der 6. cDNA zeigte sich eine signifikante Steigerung der BDNF – Expression bei den mit 50µM Imipramin behandelten Astrozytenkulturen und dass signifikant mehr BDNF bei den mit 100µM Imipramin behandelten Astrozytenkulturen gegenüber den Kontrollen exprimiert wurde. Außerdem konnte gezeigt werden, dass signifikant mehr BDNF bei den gesammelten mit Imipramin behandelten Astrozytenkulturen gegenüber den Kontrollen exprimiert worden ist. Die BDNF – Expression der mit Antidepressiva-behandelten Astrozyten (Imipramin / Escitalopram) war ebenfalls gegenüber den Kontrollen signifikant gesteigert.

4.2.4.3 Gemittelte BDNF-Ergebnisse der 5. und 6. cDNA

Um die Ergebnisse der dritten RNA-Charge vergleichen zu können und eine größere Stichprobenanzahl zugrunde liegen zu haben, wurden die normalisierten relativen Expressionswerte der BDNF mRNA der 5. und 6. cDNA innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen gemittelt und die Standardabweichung der Ergebnisse berechnet.

Tabelle 8: Normalisierte relative Ergebnisse und errechnete Signifikanzniveaus der BDNF mRNA der gemittelten 5. und 6. cDNA

Gemittelte Proben	Probe	Mittelwerte	SD	T-test	Ergebnis
1-3; 10-11	C	0,3652	0,1064		
7-9; 17-19	50µM E	0,3707	0,1204		
12-16	50µM I	0,6909	0,2636	$[(C/I_{5. \text{ cDNA}}) + (C/I_{6. \text{ cDNA}})]:2$	0,0518
4-6	100µM I	1,1364	0,1070	$[(C/I_{5. \text{ cDNA}}) + (C/I_{6. \text{ cDNA}})]:2$	<0,001***
4-6; 12-16	50µM I +100µM I	0,8580	0,3084	$[(C/I_{5. \text{ cDNA}}) + (C/I_{6. \text{ cDNA}})]:2$	0,0128 *

4. Ergebnisse

Bei der rechnerischen Auswertung der gemittelten 5. und 6. cDNA zeigte sich eine Tendenz bezüglich einer BDNF – Expressionsteigerung bei den mit 50 μ M Imipramin behandelten Astrozyten. Ein signifikanter Anstieg der BDNF – Expression zeigte sich bei den gemittelten Werten der gemittelten mit 100 μ M Imipramin Proben, dieser Anstieg ist in Abbildung 13 noch einmal grafisch dargestellt. Werden die Werte der mit 50 μ M und mit 100 μ M Imipramin behandelten Astrozytenkulturen gemittelt, errechnet sich ebenfalls eine signifikante Steigerung der BDNF – Expression.

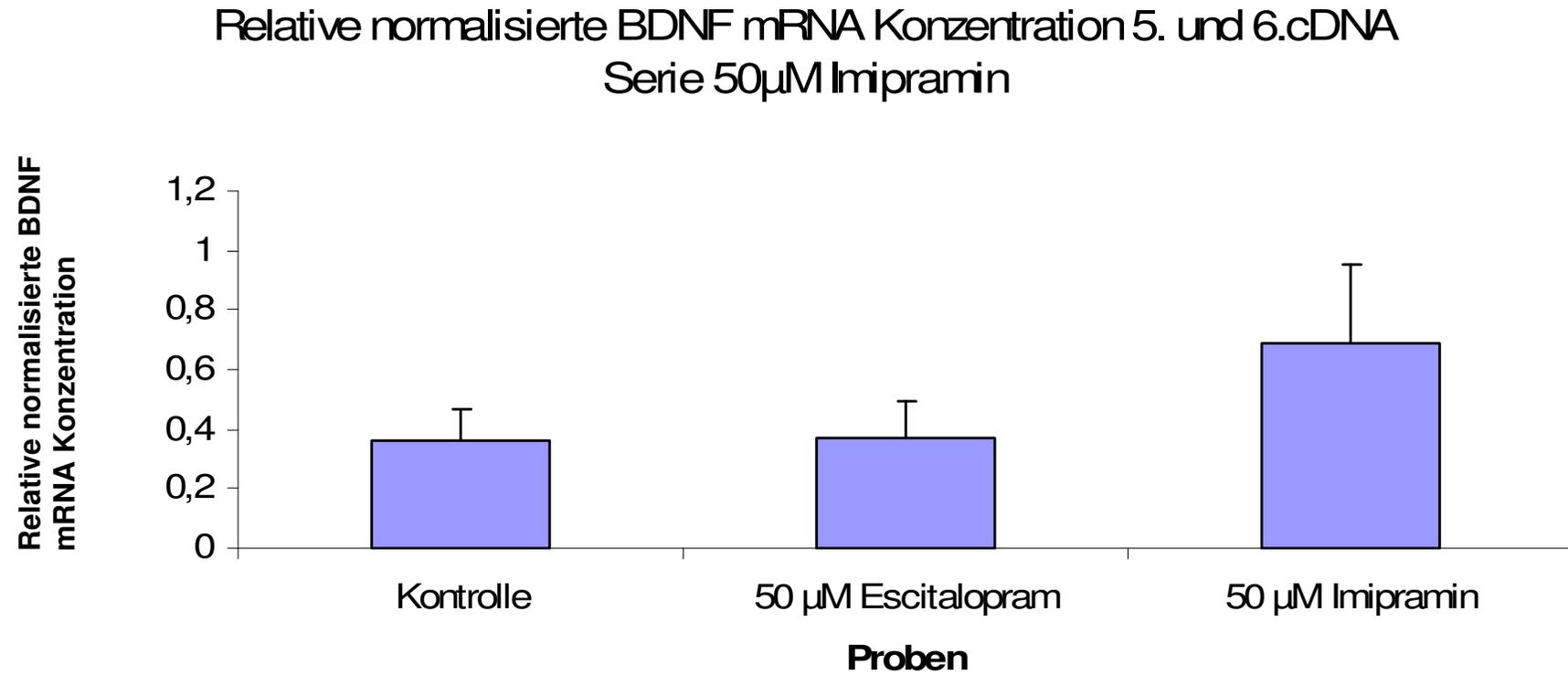


Abbildung 13: Relative normalisierte BDNF mRNA Konzentration der 5. und 6. cDNA (Serie 50 μ M Imipramin)

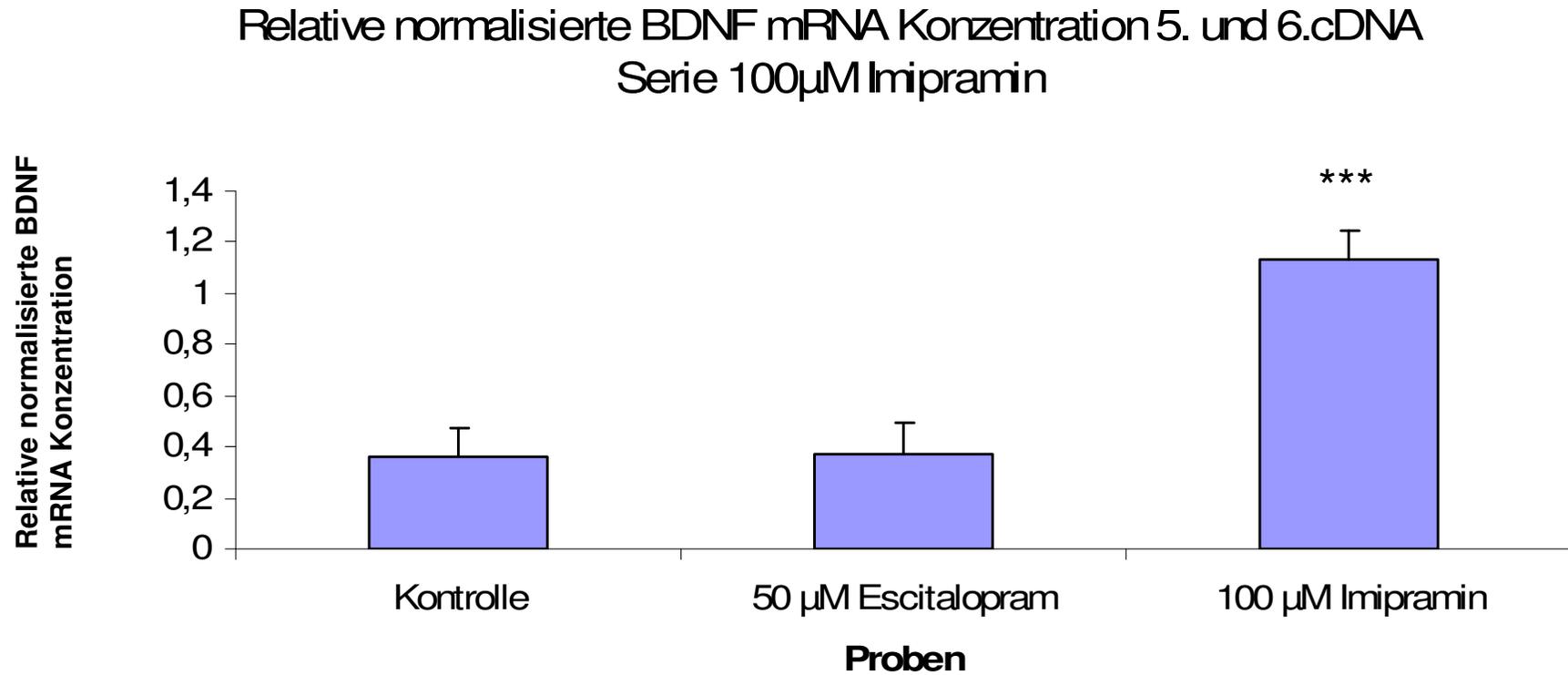


Abbildung 14: Relative normalisierte BDNF mRNA Konzentration der 5. und 6. cDNA (Serie 100 μ M Imipramin);
***, $p < 0,001$ (Student's t-test)

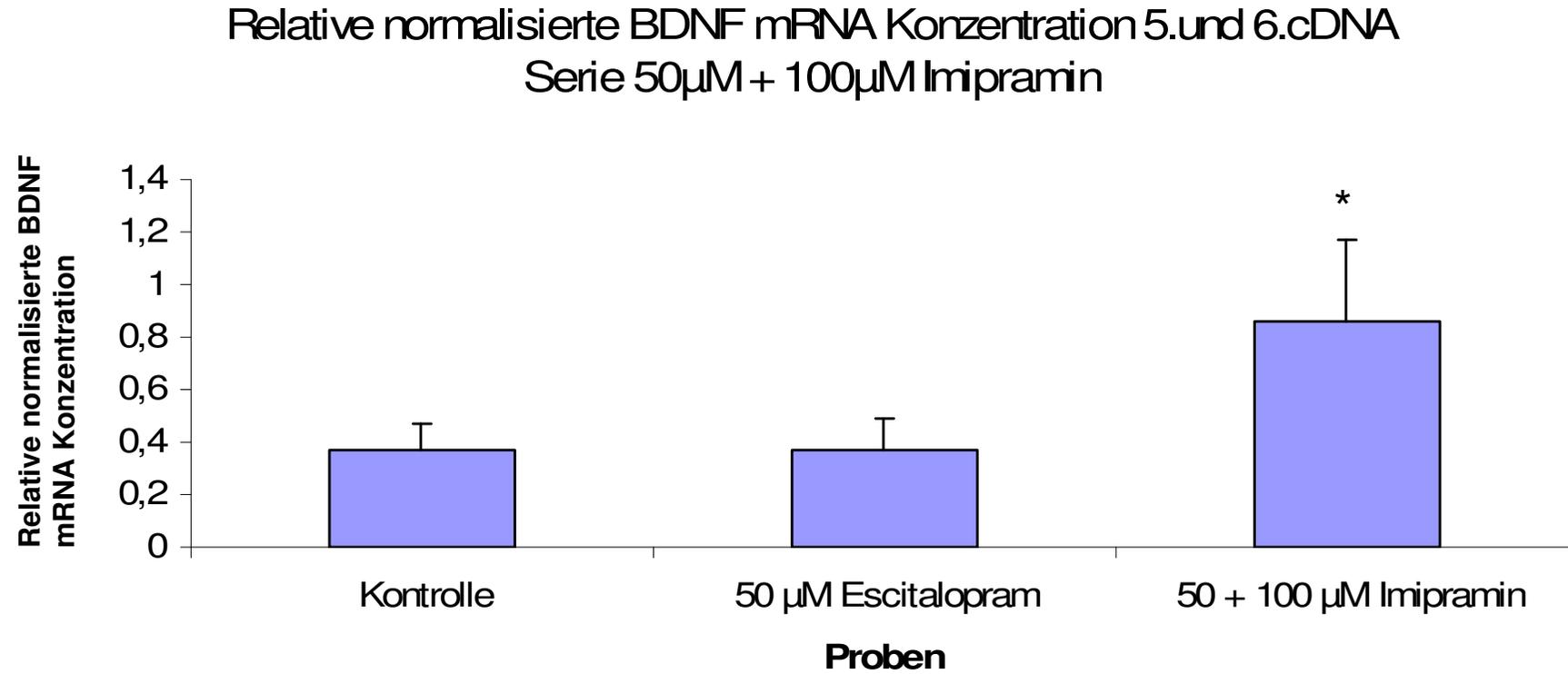


Abbildung 15: Relative normalisierte BDNF mRNA Konzentration der 5. und 6. cDNA (Serie 50 μ M und 100 μ M Imipramin);
*, $p < 0,05$ (Student's t-test)

4.2.5 Prozentualer Anstieg der BDNF Konzentration

Um einen zusammenfassenden Überblick über die Effekte der jeweiligen Substanz erlangen zu können, wurden die Proben einander gegenübergestellt, welche vier Stunden mit Escitalopram oder Imipramin inkubiert worden waren. Hierbei wird deutlich, dass sowohl die Behandlung mit 50µM Imipramin als auch mit 100µM Imipramin eine signifikante Steigerung der BDNF Expression bewirkt. Die Inkubation mit 50µM Escitalopram erreicht im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen keine signifikante Änderung der BDNF-Expression. Der Fehlerindikator ist der Standard Error of the Mean (SEM).

Tabelle 9: Prozentualer Anstieg der BDNF Konzentration der 4 Stunden inkubierten Proben

	Mittelwert der W_R/NF -Werte [%]	SEM	T-test	Ergebnis
50 µM E ; 4h	57,64	8,02	C/E _(50µM)	0,0648
50 µM I ; 4h	100,43	12,01	C/I _(50µM)	<0,001***
100 µM I ; 4h	113,64	4,37	C/I _(100µM)	<0,001***

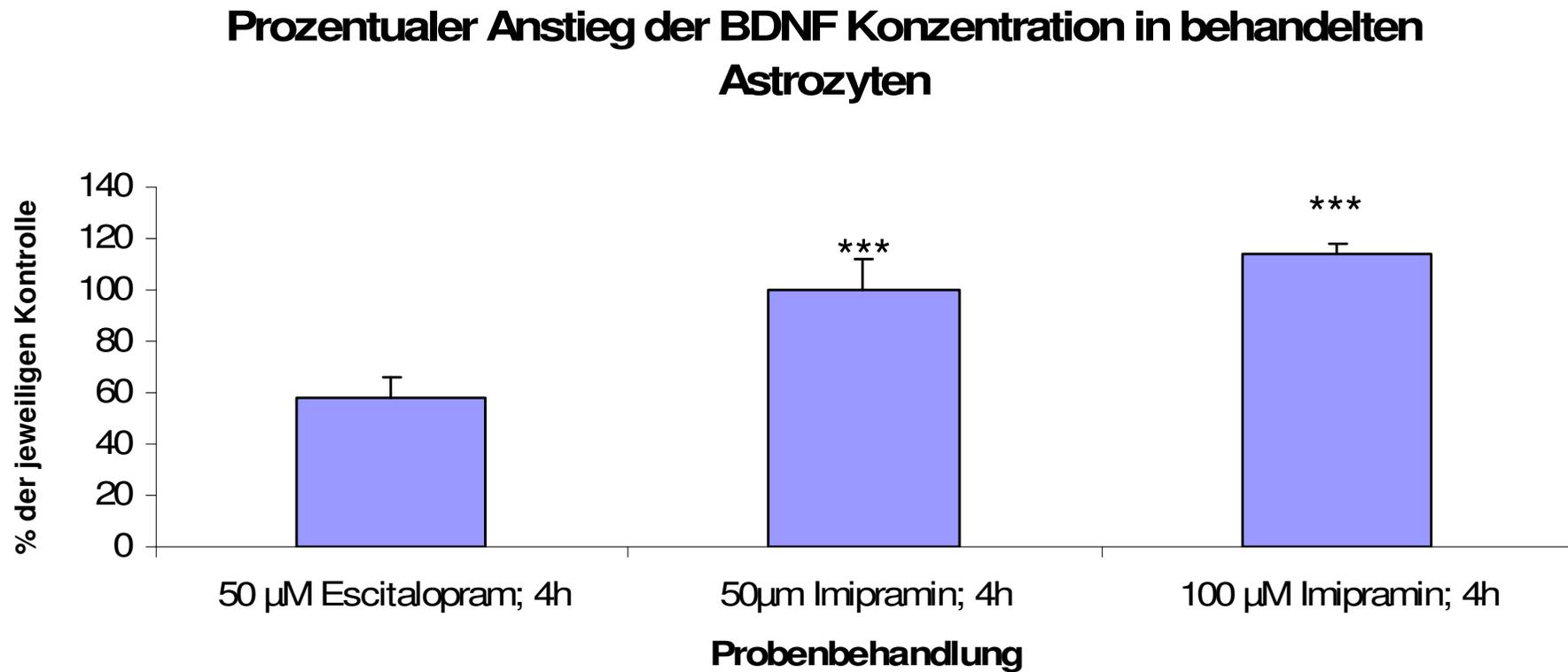


Abbildung 16: Prozentualer Anstieg der BDNF Konzentration in behandelten Astrozyten gegenüber den jeweiligen Kontrollen
***, $p < 0,001$ (Student's t-test)

4.3 Quantitative Real-Time PCR: 5-HTT

Im Folgenden sind die Resultate der 5-HTT-Untersuchungen vorgestellt. Die Proben der 1. – 3. cDNA wurden getestet.

4.3.1 5-HTT: Ergebnisse der ersten mRNA Charge

4.3.1.1 5-HTT-Ergebnisse der 1.cDNA

Die normalisierten relativen Expressionswerte der 5-HTT mRNA wurden innerhalb der jeweiligen Serie zusätzlich gemittelt und die Standardabweichung der Ergebnisse berechnet. Um die veränderte 5-HTT Expression der behandelten gegenüber den unbehandelten Ratten-Astrozyten beurteilen zu können, wurde aus den normalisierten relativen Expressionswerten der 5-HTT mRNA (W_R/NF) mit Hilfe des Student's t-tests das jeweilige Signifikanzniveau der Vergleichsgruppen errechnet. Im weiteren Verlauf wird mit den erarbeiteten Ergebnissen in gleicher Weise verfahren.

Tabelle 10: Normalisierte relative Ergebnisse der 5-HTT mRNA und errechnete Signifikanzniveaus der 1. cDNA

Serie	Probe	W_R/NF	Gemittelte Proben	Mittelwert W_R/NF	SD	T-test	Ergebnis
16/09	C1	0,3163	C1, C2	0,9211	0,8554	C/I+E	0,3428
16/09	C2	1,5260					
16/09	50μM I; 4h	0,6622	---	---	---		
16/09	50μM E; 4h	0,6131	---	---	---		
22/09	C1	2,0550	C1, C2	1,4213	0,8961	C/I	0,3481
22/09	C2	0,7877					
22/09	50μM I1; 4h	1,6086	I1, I2	1,0366	0,8089		
22/09	50μM I2; 4h	0,4646					
22/09	50μM E1; 4h	0,4375	E1, E2	n.a.	n.a.		
22/09	50μM E2; 4h	Kein Wert					

4. Ergebnisse

Bei der rechnerischen Auswertung der 1. cDNA zeigte sich kein signifikantes Ergebnis.

4.3.1.2 5-HTT-Ergebnisse der 2. cDNA

Tabelle 11: Normalisierte relative Ergebnisse der 5-HTT mRNA und errechnete Signifikanzniveaus der 2. cDNA

Serie	Probe	W _R /NF	Gemittelte Proben	Mittelwert W _R /NF	SD	T-test	Ergebnis
16/09	C1	1,2157	C1, C2	1,2201	0,0061	C/I+E	<0,001***
16/09	C2	1,2244					
16/09	50µM I; 4h	0,4849	---	---	---		
16/09	50µM E; 4h	0,4797	---	---	---		
22/09	C1	1,1286	C1, C2	1,0273	0,1431	C/I+E	0,1263
22/09	C2	0,9261					
22/09	50µM I1; 4h	1,3522	I1, I2	1,1772	0,2475	C/I	0,2679
22/09	50µM I2; 4h	1,0021					
22/09	50µM E1; 4h	1,1583	E1, E2	1,2667	0,1533	C/E	0,1239
22/09	50µM E2; 4h	1,3751					

Bei der rechnerischen Auswertung der 1. cDNA zeigte sich ein signifikanter Anstieg der 5-HTT – Expression bei den gemittelten Werten der mit Escitalopram und Imipramin behandelten Astrozyten, also bei den behandelten gegenüber den unbehandelten Kontrollen der Reihe 16/09.

4. Ergebnisse

4.3.2 5-HTT: Ergebnisse der zweiten mRNA-Charge

4.3.2.1 5-HTT-Ergebnisse der 3. cDNA

Tabelle 12: Normalisierte relative Ergebnisse der 5-HTT mRNA und errechnete Signifikanzniveaus der 3. cDNA

Nr	Probe	W_R/NF	Gemittelte Proben	Mittelwert W_R/NF	SD	T-test	Ergebnis
1A	C	0,9441	1A, 1B	1,0567	0,1592	C/I+E	0,0972
1B	C	1,1693					
2A	50 μ M I; 4h	0,7790	2A, 2B	0,6344	0,2044	C/I	0,0738
2B	50 μ M I; 4h	0,4898					
3A	50 μ M E; 4h	1,0818	3A, 3B	0,8246	0,3637	C/E	0,2476
3B	50 μ M E; 4h	0,5673					
4A	C	0,9561	4A, 4B	0,9261	0,0424	C/I+E	0,4190
4B	C	0,8961					
5A	50 μ M I; 24h	0,6121	5A, 5B	0,7717	0,2258	C/I	0,2211
5B	50 μ M I; 24h	0,9314					
6A	50 μ M E; 24h	1,0186	6A, 6B	1,1784	0,2259	C/E	0,1303
6B	50 μ M E; 24h	1,3382					

Bei der rechnerischen Auswertung der 3. cDNA zeigte sich kein signifikantes Ergebnis.

4.4 Quantitative Real-Time PCR: DAT und eNOS

Bei der Untersuchung der ersten und zweiten Astrozyten-cDNA-Chargen konnten weder NOS3 noch DAT mittels qRT-PCR detektiert werden.

4.5 Zusammenfassungen der Ergebnisse:

BDNF

Die voneinander unabhängigen Experimente zeigen eine signifikant erhöhte BDNF-Expression nach Inkubation mit 100µM, in geringerem Maß auch mit 50µM Imipramin. Escitalopram stimuliert die BDNF-Expression zwar nominell, jedoch ist der Effekt nicht signifikant.

Werden alle Proben zusammen analysiert, die mit dem jeweiligen Antidepressivum 4 Stunden inkubiert wurden, zeigte sich sowohl bei der Behandlung mit 50µM Imipramin als auch mit 100µM Imipramin eine signifikante Steigerung der BDNF Expression. Die vierstündige Inkubation mit 50µM Escitalopram erreichte im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen keine signifikante Änderung der BDNF-Expression.

5-HTT

Es konnte klar eine Expression von 5-Hydroxytryptophan-Transporter-mRNA in Astrozytenkulturen detektiert werden. Jedoch konnte mittels qRT-PCR nicht nachgewiesen werden, dass eines der verwendeten Antidepressiva einen signifikanten Effekt auf die 5-HTT-Expression hat.

NOS-III

Es konnte kein Nachweis von NOS-III mRNA in Astrozyten erbracht werden.

DAT

Es konnte kein Nachweis von DAT mRNA in Astrozyten erbracht werden.

5 Diskussion

Die Wirkungsmechanismen und Angriffspunkte von Antidepressiva stehen derzeit im Fokus der psychopharmakologischen Forschung. Besonders die Effekte von Antidepressiva auf neuronale Zellen werden häufig untersucht; daneben stehen seit kurzer Zeit jedoch auch gliale Zellen im Zentrum des Interesses, um deren Beitrag zur Wirkung antidepressiver Therapien nachweisen zu können.

5.1 Einflüsse von depressiven Episoden und Stress auf das adulte Gehirn

Hinsichtlich der Pathophysiologie von affektiven Störungen wie depressiven Episoden geht man von der Beteiligung mehrerer Hirnstrukturen aus (Drevets 2001). Besondere Beachtung finden der präfrontale Kortex, die Amygdala und der Hippokampus. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass das jeweilige Volumen dieser Hirnregionen bei depressiven Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen reduziert ist (Warner-Schmidt and Duman 2006). Ob die morphologischen Änderungen dieser Hirnareale nun eine depressive Episode bedingen oder erst während ihres Auftretens entstehen, ist jedoch ungeklärt.

Es werden mehrere Gründe für diese Volumenverluste diskutiert: So konnte zum einen von Stockmeier et al. gezeigt werden, dass eine erhöhte Dichte der Zellen zu einer Veränderung der hippokampalen Struktur beiträgt (Stockmeier et al. 2004). Zum anderen wird in Bezug auf den präfrontalen Kortex eine Reduktion der Glia-Zellzahl als Ursache des Volumenverlustes diskutiert (Duman 2004). Schließlich beeinflusst chronischer Stress die Struktur von ausgereiften Neuronen im adulten Hippokampus, indem er signifikant die Länge und die Anzahl der Verzweigungen der CA3 Pyramidenzellen herabsetzt (Watanabe et al. 1992; Magarinos et al. 1996) (siehe Abbildung 17).

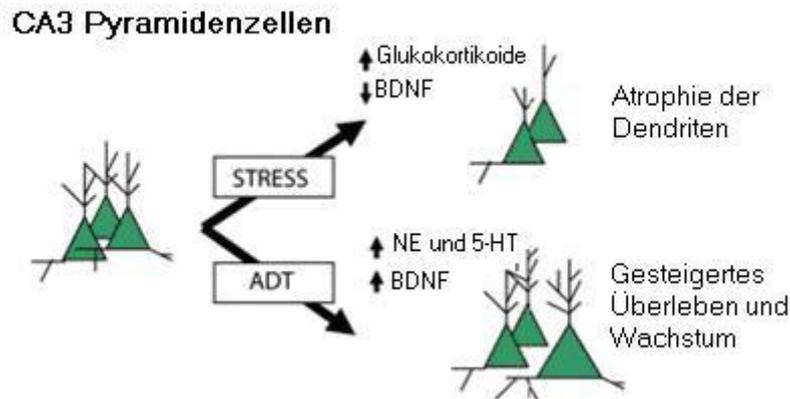


Abbildung 17: Einwirkungen von Stress und antidepressiver Therapie im Hippokampus modifiziert nach (Warner-Schmidt and Duman 2006)

5.1.1 Auswirkung von depressiven Episoden auf den Hippokampus

Der Hippokampus exprimiert eine hohe Dichte an Glukokortikoid-Rezeptoren, weswegen dieser Bereich des Gehirns bei einem erhöhten Glukokortikoid-Spiegel, wie er bei einer depressiven Episode durch die stimulierte Hypothalamus-Hypophysen-Achse auftritt, besonders beeinflusst wird (Holsboer and Barden 1996; Gold and Chrousos 2002). Glukokortikoid-Hormone reagieren mit zwei Haupttypen von Rezeptoren im Hirn: Dem Mineralokortikoid-Rezeptor und dem Glukokortikoid-Rezeptor. Wegen seiner niedrigeren Affinität ist der Glukokortikoid-Rezeptor in erster Linie dann aktiviert, wenn in Stressphasen der Glukokortikoid-Spiegel relativ hoch ist. Im Zuge der Aktivierung translozieren diese Rezeptoren in den Zellkern, wo sie die Genexpression verändern. Auf diesem Weg werden langandauernde Effekte auf Struktur und Funktion der Zellen vermittelt (Gould et al. 1992; Cameron et al. 1998).

Des Weiteren ist der Hippokampus in der negativen Feedback-Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Achse eingegliedert, die die Glukokortikoid-Freisetzung kontrolliert und bei depressiven Patienten oft disinhibiert ist (Sapolsky 2001). Ferner können chronischer Stress oder erhöhte Glukokortikoid-Spiegel zur Atrophie oder dem Verlust von hippokampalen Neuronen führen, was erneut zu einer Abnahme der Feedback-Inhibition der Hypothalamus-Hypophysen-Achse führt (McEwen 1999; Sapolsky 2001).

Zuletzt unterhält der Hippokampus anatomischen Verbindungen mit der Amygdala und dem präfrontalen Kortex, zwei Strukturen, die sowohl an Stimmung als auch an der Denkfähigkeit teilhaben (Drevets 2001). Eine angeborene oder erworbene Fehlfunktion des Hippokampus trägt zu den kognitiven Defiziten bei, die auch während einer Depression beobachtet werden (Warner-Schmidt and Duman 2006).

5.2 BDNF und Neurogenese im adulten Gehirn

Zahlreiche Forschergruppen konnten nachweisen, dass im adulten Säugetiergehirn Neurogenese statt findet (Kempermann et al. 1997; Eriksson et al. 1998; Gould et al. 1999; Gage 2000). Im Hippokampus ist die subgranuläre Zone die größte der adulten Neurogenesezonen. Von den Progenitorzellen in diesem Bereich gehen Bildung und Wachstum von neuen Neuronen aus, indem sie in der subgranulären Zone proliferieren, in die Granulärzellschicht wandern und sich zu Neuronen und anderen Zelltypen entwickeln. Die adulte Neurogenese ist dabei kein statischer, sondern ein dynamischer Prozess, der durch eine Vielzahl von endokrinen, umgebungsbedingten und pharmakologischen Faktoren hoch- oder herunterreguliert werden kann.

5.2.1 Neurotrophine und die adulte Neurogenese

Viele Studien, die sich in den letzten 10 Jahren mit Depressionen und dem Hippokampus befassten, führen zu der neurotrophen und neurogenen Hypothese der Depression. Die Neurotrophin-Hypothese basiert auf der Beobachtung, dass Stress die Expression verschiedener Neurotrophine und die Neurogenese im adulten Hippokampus herab setzt und so zu dessen Atrophie beiträgt (Duman 2004; Duman 2004).

Zu den untersuchten Neurotrophinen gehören unter anderem der Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Duman 2004), der Vascular endothelial growth factor (VEGF) und das Zytokin Interleukin 1 β (IL-1 β). Dem Wachstumsfaktor VEGF wird ebenso wie BDNF eine Rolle in der hippokampalen Neurogenese zugewiesen, was eine vaskuläre Komponente in der adulten Neurogenese

vermuten lässt (Palmer et al. 2000; Heine et al. 2005; Warner-Schmidt and Duman 2006). Interleukin 1 β inhibiert im Gegensatz zu den vorher genannten Faktoren neurogenetische Prozesse. Dies führt zu der Hypothese, dass durch eine Blockade von IL-1 β der stressbedingten herbeigeführten Reduktion der Neurogenese entgegen gewirkt werden kann (Koo 2005).

5.3 Astrozyten und ihre Aufgaben im zentralen Nervensystem

Astrozyten machen im reifen Säugerhirn beinahe die Hälfte aller Zellen aus und bieten strukturelle, metabolische und trophische Unterstützung für Neuronen. Inzwischen ist bekannt, dass Astrozyten nicht nur eine passiv-unterstützende Rolle im zentralen Nervensystem einnehmen, sondern auch aktiv in zahlreiche neurobiologische Prozesse involviert sind. Obwohl der Fokus der Forschung bezüglich umgebungsbedingter Plastizität des Gehirns traditionell auf Änderung der Morphologie von Neuronen und besonders der Synapsen lag, konnte auch von astrozytären Zellen gezeigt werden, dass sie sich im Zuge einer veränderten, anspruchsvolleren Umwelt reorganisieren (Diamond et al. 1964; Szeligo and Leblond 1977). Astrozyten passen sich an die neuen Bedingungen mittels Hypertrophie und Hyperplasie an (Sirevaag and Greenough 1987; Sirevaag and Greenough 1991). Das erhöhte astrozytäre Volumen steht jedoch in erster Linie in Zusammenhang mit lern-spezifischer Synaptogenese und folgt nicht generell auf verstärkte neuronale Aktivität (Anderson et al. 1994).

Im Neokortex bedecken Astrozyten partiell prä- und postsynaptische Elemente von axo-dendritischen Synapsen. Es handelt sich hierbei um einen dynamischen Prozess: Mittels Elektronenmikroskopie kann beobachtet werden, dass im visuellen Kortex von Ratten der Grad der synaptischen Umscheidung durch Astrozyten dann erhöht ist, wenn die Tiere in einer komplexen Umgebung leben (Jones and Greenough 1996). In einer diffizilen Umgebung entsteht eine verstärkte Synapsenaktivierung, die mit der gewandelten Funktion der Astrozyten korreliert. Die Anstieg der astrozytisch-synaptischen Kommunikation kann auf astrozytär sezernierte chemische Botenstoffe zurückgeführt werden, die die synaptische Transmission modulieren (Araque, et al. 1999; Carmignoto

2000; Araque et al. 2001; Haydon 2001; Oliet et al. 2001; Smit et al. 2001; Nedergaard et al. 2003; Newman 2003; Todd et al. 2006). Die astrozytäre Transmitterfreisetzung wird wiederum von Neurotransmittern reguliert, die aus synaptischen Endigungen stammen (Oliet et al. 2001; Zhang and Haydon 2005).

Ein einziger Astrozyt steht mit seinen Ausläufern sowohl mit tausenden Synapsen, als auch mit Kapillaren und Arteriolen in Kontakt, weshalb die Vermutung nahe liegt, dass Gliazellen Einfluss auf die neurovaskuläre Kopplung haben.

Von Astrozyten war bisher in erster Linie bekannt, dass sie ein hohes Kalium-Ruhepotential besitzen, per *Gap junctions* miteinander verbunden und für die Kalium-Homöostase verantwortlich sind. Auf Depolarisation reagieren Astrozyten mit einem linearen Strom-Spannungs-Verhältnis und sind ansonsten elektrisch unerregbar (Haydon and Carmignoto 2006). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass nach Glutamat-Applikation in den Astrozyten Kalzium-Schwankungen zu beobachten sind (Cornell-Bell et al. 1990; Charles et al. 1991; Finkbeiner 1992). Die glutamaterge Aktivierung resultiert in der Stimulation von metabotropen Rezeptoren auf Astrozyten, die ihrerseits die Akkumulation des Phospholipase-abhängigen Inositol-Trisphosphat (IP_3) induzieren. Über diesen Signalweg wird intrazelluläres Kalzium freigesetzt (Kawabata et al. 1996). Betrachtet man also Kalzium-abhängige Signale und weniger Änderungen des Membranpotentials, sind Astrozyten durchaus erregbar.

In den letzten zehn Jahren wurde gezeigt, dass Astrozyten eine Vielzahl von Rezeptoren ausbilden. So konnte für Noradrenalin (Duffy and MacVicar 1995; Kulik et al. 1999), GABA (Kang et al. 1998), Acetylcholin (Shelton and McCarthy 2000; Araque et al. 2002), Histamin (Shelton and McCarthy 2000), Adenosin (Porter and McCarthy 1995), ATP (Bowser and Khakh 2004; Perea and Araque 2005) und Glutamat (Porter and McCarthy 1995; Porter and McCarthy 1996; Pasti et al. 1997) nachgewiesen werden, dass sie eine Erhöhung des inner-astrozytären Kalzium-Spiegels induzieren können. Es bleibt jedoch noch zu

zeigen, ob diese Rezeptoren auch unter natürlichen Bedingungen exprimiert werden.

Der in der vorliegenden Arbeit erbrachte Nachweis der 5-Hydroxytryptophan-Transporter-mRNA in Astrozyten wird durch verschiedene Studien unterstützt, die ebenfalls die Expression des 5HTT-Gens als auch des zugehörigen Proteins aufzeigen konnten (Inazu et al. 2001; Kubota et al. 2001). Kubota et al. haben zudem nachgewiesen, dass die Expression des Serotonin-Transporter-Gens durch trophische Faktoren, wie zum Beispiel dem basic fibroblast growth factor (bFGF) und dem epidermal growth factor (EGF) veränderbar ist (Kubota et al. 2001).

Ebenfalls konsistent zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde der Dopamin-Transporter bislang nahezu exklusiv in Neuronen und niemals in Astrozyten nachweisbar (Amara and Kuhar 1993; Blakely et al. 1994; Torres et al. 2003; Dahlin et al. 2007). Aber nicht nur über Transmitter scheinen Astrozyten in der Lage zu sein, synaptische Transmission und neuronale Erregbarkeit modulieren zu können (Haydon and Carmignoto 2006), sondern auch über die Freisetzung von D-Serin (Schell et al. 1995; Schell et al. 1997; Wolosker et al. 1999) und ATP. D-Serin wirkt als Glutamat-Coagonist am N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDAR) (Mothet et al. 2000), wohingegen das aus ATP entstehende Adenosin inhibitorisch wirkt (Koizumi et al. 2003).

Die konstitutive Expression von NOS III in Astrozyten ist umstritten: Hamby et al. verweisen darauf, dass NOS III in Neuronen und endothelialen Zellen und nicht in Astrozyten exprimiert wird (Hamby et al. 2008). Diese Meinung wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützt. Allerdings deuten mehrere Studien darauf hin, dass es lokale phänotypische Unterschiede bei Astrozyten gibt, sogar innerhalb einer bestimmten ZNS-Region (Miller and Szigeti 1991; Hosli and Hosli 1993; Whitaker-Azmitia et al. 1993; Conti et al. 1994; Shao et al. 1994; Porter and McCarthy 1995; Nikcevich et al. 1997; Swanson et al. 1997; Venance et al. 1998; St-Pierre et al. 2000; Zhou and Kimelberg 2001; Bowman et al. 2003; Matthias et al. 2003; Hamby et al. 2006; Imura et al. 2006). Diese Besonderheit ist möglicherweise ein Grund der mitunter gegensätzlichen Ergebnisse in den Untersuchungen dieser Zellen.

5.3.1 Astrozyten und Neurogenese

Wie stehen nun Astrozyten und Neurogenese in Zusammenhang? Adulte Neurogenese tritt normalerweise nur in zwei spezifischen Hirnregionen auf: In der subventrikulären Zone und in der subgranulären Zone des Hippokampus (Temple 2001; Rakic 2002). Außerhalb dieser zwei Regionen lassen proliferierende Zellen im intakten adulten ZNS zwar neue Glia entstehen, jedoch keine neue Neuronen (Gage 2000; Kornack and Rakic 2001). Die Astrozyten des adulten Hippokampus bewahren ihr Potential, Neurogenese zu fördern, wohingegen Astrozyten des adulten Rückenmarks diese Fähigkeit nicht beibehalten (Song et al. 2002). Song et al. beschrieben, dass Astrozyten des Hippokampus Wachstumsfaktoren sezernieren, die die neuronalen Stammzellen anregen, sich zu Neuronen zu differenzieren (Song et al. 2002). Dieses Ergebnis der Untersuchungen von Song et al. war insofern unerwartet, als dass Neuronen zeitlich vor den Astrozyten entstehen. Auch Reifung und Überleben von sich entwickelnden Neuronen und Neuroblasten werden durch Astrozyten unterstützt (Nicholls 1992; Pixley 1992). Diese Resultate lassen vermuten, dass hippokampale Astrozyten eine einzigartige Umgebung für die adulte Neurogenese bieten. Des Weiteren scheint die adulte Neurogenese zumindest zum Teil in Verbindung mit bestimmten Signalen zu stehen, die im ZNS von regional spezifischen Astrozyten aktiv angeboten werden. Trotz der generellen Fähigkeit der adulten Astrozyten Neurogenese zu fördern, muss auf den Unterschied zu Astrozyten, die einem neonatalen Hippokampus entnommen wurden hingewiesen werden: Letztere sind nämlich in der Lage, etwa doppelt so effektiv Neurogenese induzieren zu können wie adulte Astrozyten (Song et al. 2002).

5.4 Die Wirkung von Antidepressiva in Bezug auf Neurogenese

Die neurogene Theorie der Depression basiert auf dem zweizeitigen Effekt von Antidepressiva (Duman et al. 1997):

Akut aktivierte Serotonin- bzw. Noradrenalin-Rezeptoren regen intrazelluläre Signalkaskaden an, die langfristig die Gentranskription regulieren (Duman et al. 1997; Carlezon et al. 2005). Einer dieser Signalwege ist die cAMP-CREB-Kaskade. Im Hippokampus ist dieser *second messenger pathway* unter antidepressiver Therapie hochreguliert, die erhöhten Spiegel der cAMP-abhängigen Proteinkinase und der erhöhten Funktion und Expression des cAMP response element binding protein (CREB) inbegriffen (Nestler et al. 1989; Nibuya et al. 1996; Thome et al. 2000) (siehe Abbildung 18). Diese Änderungen resultieren in einer erhöhten Expression von neurotrophen Faktoren und vermitteln langfristig Veränderungen der Zellmorphologie und deren Funktion. Die vorliegende Arbeit unterstützt diese Entdeckung, da eine signifikant erhöhte BDNF-Expression nach Inkubation mit Imipramin und eine vorhandene, wenn auch weniger deutliche Stimulation nach Inkubation mit Escitalopram nachgewiesen werden konnte.

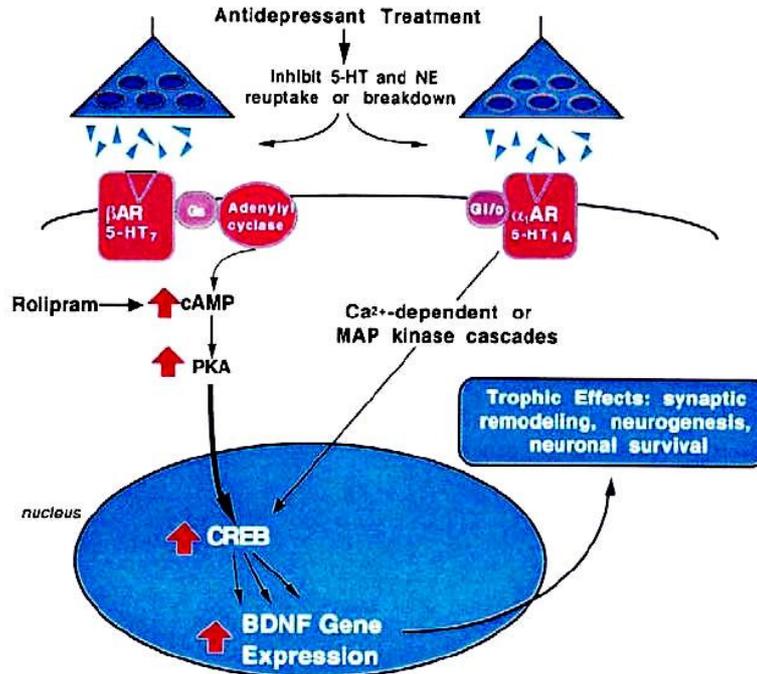


Abbildung 18: cAMP-CREB-Kaskade modifiziert nach (Duman et al. 2001)

Chronische Antidepressivabehandlung mit TZA, SSRI oder auch Lithium steigert die Zellproliferation von neuronalen Progenitorzellen in der subgranulären Zone (Chen et al. 2000) und das Überleben von eben diesen neu entstandenen Neuronen (Nakagawa et al. 2002; Sairanen et al. 2005). Die Proliferationsphase ist hierbei eher durch eine Erhöhung von extrazellulären Serotonin- und Noradrenalinspiegeln reguliert, als denn von Neurotrophinen (Kulkarni et al. 2002; Santarelli et al. 2003). Das Langzeitüberleben der neu entstandenen Neuronen hängt hingegen von einem funktionierenden BDNF-Signalweg ab (Lee et al. 2002).

Neu entstandene Neurone müssen zuerst in die Granulärzellschicht wandern, ihren dendritischen Baum ausbilden, ein Axon in Richtung der Moosfasern in das CA3-Areal entwickeln und dann afferente und efferente Verbindungen aufbauen, bevor sie zur Hippokampusfunktion beitragen können. Die Zeitspanne bis zum Abschluss dieser Vorgänge korreliert hierbei mit der Wirksamkeit von Antidepressiva (van Praag et al. 2002).

Das Verhältnis von Neuronen zu Glia (ca. 80:20) bleibt hierbei jedoch unbeeinflusst (Malberg et al. 2000). Diese Effekte werden zumindest partiell durch die Aktivierung von 5-HT_{1A}-Rezeptoren vermittelt, da bei Deletion von 5-HT_{1A}-Rezeptoren sowohl Proliferation als auch Verhaltenseffekte aufgehoben sind (Santarelli et al. 2003). Mittels dieser verschiedenen Mechanismen erhöht die antidepressive Therapie Neurogenese im adulten Hippokampus (Manev et al. 2001; Nakagawa et al. 2002; Santarelli et al. 2003).

5.4.1 Antidepressive Therapie und BDNF

Sowohl in der Erhöhung der neuronalen Überlebensrate spielen Neurotrophine eine Schlüsselrolle, als auch in der Selektion von funktional aktiven neu entstandenen Neuronen (Huang and Reichardt 2001), wobei sie auf folgende Weise in den Wirkungsmechanismus von Antidepressiva eingebunden sind (Saarelainen et al. 2000; Castren 2004):

Chronische Antidepressiva-Verabreichung erhöht nicht nur die mRNA-Level für den Brain-Derived Neurotrophic Factor, sondern zudem die seines trkB-Rezeptors im Hippokampus (Nibuya et al. 1995; Russo-Neustadt et al. 2000).

Des Weiteren ist die Aktivierung von trkB durch Antidepressiva-Behandlung erhöht. Dies lässt darauf schließen, dass Antidepressiva die BDNF Freisetzung im präfrontalen Kortex und Hippokampus fördern (Saarelainen et al. 2003). So konnte gezeigt werden, dass die BDNF-Proteinlevel in post-mortem Hirnproben von Antidepressiva-behandelten Patienten im Vergleich zu unbehandelten Patienten gesteigert sind (Chen et al. 2001).

Bei Ratten bewirken BDNF-Infusionen in den Hippokampus ebenfalls Antidepressiva-ähnliche Effekte (Siuciak et al. 1997; Shirayama et al. 2002). Eine Studie von Sairanen et al. konnte zeigen, dass BDNF das Überleben neu gebildeter Neurone beeinflusst: So ist das Überleben, weniger die Proliferation, sowohl in BDNF heterozygoten Null-Mutanten Mäusen als auch bei dominant negativen trkB-Mutanten herabgesetzt. Ein Antidepressiva-induzierter Anstieg der neuronalen Überlebensrate ist in diesen transgenen Mäusen ebenso inhibiert. Zudem ist reaktiv auf die Antidepressiva-Gabe ein gesteigerter Zellumsatz zu beobachtet worden (Sairanen et al. 2005). Hierbei muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass der BDNF-Signalweg keineswegs unselektiv das Überleben jeglicher Neuronen fördert, sondern auf solche Neuronen wirkt, die den effektivsten Kontakt mit ihren Zielzellen hergestellt haben (Barde 1989). Auf diese Weise werden wahrscheinlich ineffiziente Verbindungen eliminiert (Thoenen 1995). Im Überblick lassen diese Daten erkennen, dass sowohl eine erhöhte BDNF-Freisetzung sowie suffiziente BDNF-Signalwege für den Erfolg von antidepressiver Therapie notwendig sind.

Die Inhibition von Neurotrophin-Signalwegen stört zwar die Neurogenese, hat jedoch keinen Einfluss auf die durch chronische Antidepressiva-Therapie erhöhte Proliferation von hippokampalen neuronalen Progenitorzellen; wie oben erwähnt, wird jedoch das Überleben dieser letztgenannten Zellen durch BDNF ermöglicht. Dabei ist aber unter Therapie neben der Proliferationsrate die Apoptoserate im selben zeitlichen Rahmen erhöht. Daraus kann auf einen homöostatischen Mechanismus geschlossen werden, der die Anzahl von Körnerzellen im Gyrus dentatus des Hippokampus über die Zeit konstant hält (Sairanen et al. 2005). Demzufolge steigert medikamentöse antidepressive

Therapie eher den Umsatz von Körnerzellen im Gyrus dentatus, als deren absolute Anzahl (Sairanen et al. 2005). Der verstärkte Umsatz von Granulärzellen durch Antidepressivatherapie bedingt so, dass mehr konkurrierende Neurone der Selektion zugänglich sind (Sairanen et al. 2005).

5.4.2 Effekte Antidepressiva-behandelter Astrozyten auf Neurogenese

Song et al. berichten, dass astrogliale Zellen Neurogenese induzieren, indem sie Proliferation und Differenzierung der neuronalen Vorläuferzellen im Gyrus dentatus des Hippokampus erhöhen (Song et al. 2002). Auf der Basis dieser Forschungsergebnisse untersuchten Ko et al., ob antidepressiva-stimulierte Astrozyten Wachstumsfaktoren sezernieren, die gegenüber unbehandelten Astrozyten eine intensivierete Neurogenese im Gyrus dentatus des Hippokampus bedingen und somit dem volumenreduzierenden Effekt depressiver Episoden entgegenwirken. Ausgangspunkt für diese Hypothese war, dass Astrozyten Transporter für Serotonin und Noradrenalin ausbilden, die die Angriffspunkte zahlreicher Antidepressiva darstellen. Die Astrozyten wurden zusammen mit neuronalen Progenitorzellen (NPC) kultiviert, wobei die Zelltypen entweder in direktem Kontakt standen oder über Diffusion kommunizieren konnten. Das Ergebnis dieser Studie war, dass weder die in Kontakt stehenden, noch die *per diffusionem* kommunizierenden Antidepressiva-behandelten Astrozyten die Proliferation von neuronalen Progenitorzellen signifikant steigern konnten (Ko et al. 2007). Allerdings wurde auch darauf hingewiesen, dass Differenzierung und Langzeitüberleben von Neuronen durch Antidepressiva-behandelte Astrozyten durchaus erhöht sein können. Im Hinblick auf den Befund, dass BDNF ja vor allem das Survival neu gebildeter Zellen, nicht jedoch die Proliferation per se fördert, gerade auch bei Behandlung mit Antidepressiva, sprechen diese Ergebnisse nicht gegen den Hauptbefund der vorliegenden Arbeit: nämlich dass eine erhöhte, Antidepressiva-induzierte astrozytäre BDNF-Expression zu dem Wirkmechanismus zumindest trizyklischer Antidepressiva beiträgt.

5.5 Konsequenzen in Hinblick auf zukünftige Forschung

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Astrozyten unter Imipramin-Therapie im Vergleich zu Escitalopram-behandelten und im Vergleich zu unbehandelten Astrozyten vermehrt BDNF mRNA produzieren. Die akut eintretende Rückaufnahmeinhibition von Neurotransmittern durch Antidepressiva kann nicht als Grund für die erhöhte Synthese der BDNF mRNA genannt werden. Unklar ist noch, in wie weit die verstärkte BDNF mRNA-Synthese eine ebenso erhöhte BDNF Proteinbiosynthese nach sich zieht. Zurzeit wird daher untersucht, auf welche Weise sich eine Antidepressiva-bedingte Veränderung des BDNF mRNA-Spiegels auf der Proteinebene auswirkt. Die ersten Ergebnisse dieser Untersuchungen weisen allerdings nicht auf eine erhöhte BDNF Protein-Synthese in Antidepressiva-behandelten Astrozyten hin. Daher wirft sich die Frage auf, ob für diesen Schritt Cofaktoren notwendig sind, die in dem für diese Arbeit zugrunde liegenden Zellmodell nicht eingesetzt wurden.

Es wird zu untersuchen sein, in wie weit die hier gewonnenen Ergebnisse auch auf Proteinebene Gültigkeit haben. Ist dies der Fall, kann in einem nächsten Schritt untersucht werden, ob Antidepressiva-stimulierte Astrozyten in Kultur einen Effekt auf das Überleben neu gebildeter Neurone haben. Sind die Effekte der antidepressiven Therapie bei Astrozyten sowohl auf Proteinebene als auch in Kultur nachgewiesen, könnte in einem weiteren Forschungsschritt getestet werden, welche antidepressiv wirkenden Medikamente hierbei am effektivsten sind.

Weiterführende Untersuchungen der glialen Funktionen werden in jedem Fall dazu beitragen, Astrozyten bei der Entwicklung von neuartigen Antidepressiva nutzbringend einbinden zu können.

6 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, ob in Astrozyten der Serotonin-Transporter (5-HT-Transporter, 5-HTT), der Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), der Dopamin-Transporter oder die Stickstoffmonoxyd-Synthase III (endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, eNOS) gebildet werden und falls ja, ob sich deren Expression durch Applikation von Antidepressiva ändert. Die aus Rattenhirnen gewonnenen Astrozytenkulturen wurden hierfür entweder mit dem trizyklischen Antidepressivum Imipramin, dem selektiven Serotoninrückaufnahmehemmer Escitalopram oder zur Kontrolle mit Kochsalzlösung inkubiert. Nachdem die entsprechende mRNA aus den behandelten Astrozytenkulturen extrahiert wurde, ist sie in cDNA translatiert und mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR quantifiziert worden. Durch Vergleich der Expression des zu untersuchenden Gens mit der Expression der Housekeeping-Gene 18s-rRNA, Glycerinaldehyddehydrogenase (GAPDH) und Acidic ribosomal phosphoprotein (ARP) wurden Ungenauigkeiten bei der cDNA-Synthese ausgeglichen und die Daten normalisiert. Die rechnerische Auswertung der quantitativen Real-Time PCR erfolgte unter Verwendung der Ct-Werte unter Zuhilfenahme der *geNORM* Software (Vandesompele et al. 2002).

Die Ergebnisse zeigen eine signifikant erhöhte BDNF-Expression nach Imipramingabe. Hierbei zeigen bei den getrennten Untersuchungen der jeweiligen mRNA Chargen die mit 100µM Imipramin behandelten Astrozytenkulturen stärker signifikante Ergebnisse, als die mit 50µM Imipramin behandelten Astrozytenkulturen. Werden alle Proben, die mit der jeweiligen Imipraminkonzentration 4 Stunden inkubiert wurden, zusammen analysiert und mit den jeweiligen Kontrollen verglichen, zeigt sich sowohl bei der Behandlung mit 50µM Imipramin als auch mit 100µM Imipramin eine signifikante Steigerung der BDNF Expression. Escitalopram stimulierte die BDNF-Expression zwar ebenfalls nominell, jedoch war der Effekt nicht signifikant. Des Weiteren konnte eine deutliche Expression von 5-HTT-mRNA in Astrozytenkulturen

6. Zusammenfassung

nachgewiesen werden. Jedoch hatte keines der Antidepressiva einen signifikanten Effekt auf die 5-HTT-Expression. Es konnten weder in den behandelten, noch in den unbehandelten Astrozytenkulturen DAT oder NOS-III nachgewiesen werden.

7 Literaturverzeichnis

- Aberg, M. A., N. D. Aberg, et al. (2000). "Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus." *J Neurosci* 20(8): 2896-903.
- Ackermann, R. T. and J. W. Williams, Jr. (2002). "Rational treatment choices for non-major depressions in primary care: an evidence-based review." *J Gen Intern Med* 17(4): 293-301.
- Adell, A. and F. Artigas (1991). "Differential effects of clomipramine given locally or systemically on extracellular 5-hydroxytryptamine in raphe nuclei and frontal cortex. An in vivo brain microdialysis study." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 343(3): 237-44.
- Adell, A., P. Celada, et al. (2002). "Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei." *Brain Res Brain Res Rev* 39(2-3): 154-80.
- Adell, A., P. Celada, et al. (2001). "The role of 5-HT_{1B} receptors in the regulation of serotonin cell firing and release in the rat brain." *J Neurochem* 79(1): 172-82.
- Altar, C. A. (1999). "Neurotrophins and depression." *Trends Pharmacol Sci* 20(2): 59-61.
- Amara, S. G. and M. J. Kuhar (1993). "Neurotransmitter transporters: recent progress." *Annu Rev Neurosci* 16: 73-93.
- Anderson, B. J., X. Li, et al. (1994). "Glial hypertrophy is associated with synaptogenesis following motor-skill learning, but not with angiogenesis following exercise." *Glia* 11(1): 73-80.

7. Literaturverzeichnis

- Andrienzen (1893). On a system of fibre-like cells surrounding the blood vessels of the brain of man and mammals and its physiological significance.
- Araque, A., G. Carmignoto, et al. (2001). "Dynamic signaling between astrocytes and neurons." *Annu Rev Physiol* 63: 795-813.
- Araque, A., E. D. Martin, et al. (2002). "Synaptically released acetylcholine evokes Ca²⁺ elevations in astrocytes in hippocampal slices." *J Neurosci* 22(7): 2443-50.
- Araque, A., V. Parpura, et al. (1999). "Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner." *Trends Neurosci* 22(5): 208-15.
- Artigas, F., L. Romero, et al. (1996). "Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A} antagonists." *Trends Neurosci* 19(9): 378-83.
- Ashcroft, G. W. (1975). "Psychological medicine. Management of depression." *Br Med J* 2(5967): 372-6.
- Barde, Y. A. (1989). "Trophic factors and neuronal survival." *Neuron* 2(6): 1525-34.
- Barnes, N. M. and T. Sharp (1999). "A review of central 5-HT receptors and their function." *Neuropharmacology* 38(8): 1083-152.
- Beaudet, A. and L. Descarries (1978). "The monoamine innervation of rat cerebral cortex: synaptic and nonsynaptic axon terminals." *Neuroscience* 3(10): 851-60.
- Beck, A. T., C. H. Ward, et al. (1961). "An inventory for measuring depression." *Arch Gen Psychiatry* 4: 561-71.

7. Literaturverzeichnis

- Bermejo, I., S. Kratz, et al. (2003). "[Agreement in physicians' and patients' assessment of depressive disorders]." *Z Arztl Fortbild Qualitatssich* 97 Suppl 4: 44-9.
- Bhagwagar, Z., S. Hafizi, et al. (2002). "Acute citalopram administration produces correlated increases in plasma and salivary cortisol." *Psychopharmacology (Berl)* 163(1): 118-20.
- Blair-West, G. W., G. W. Mellsop, et al. (1997). "Down-rating lifetime suicide risk in major depression." *Acta Psychiatr Scand* 95(3): 259-63.
- Blakely, R. D., L. J. De Felice, et al. (1994). "Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters." *J Exp Biol* 196: 263-81.
- Blier, P. and C. de Montigny (1987). "Modification of 5-HT neuron properties by sustained administration of the 5-HT_{1A} agonist gepirone: electrophysiological studies in the rat brain." *Synapse* 1(5): 470-80.
- Bothwell, M. (1995). "Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors." *Annu Rev Neurosci* 18: 223-53.
- Bowman, C. C., A. Rasley, et al. (2003). "Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products." *Glia* 43(3): 281-91.
- Bowser, D. N. and B. S. Khakh (2004). "ATP excites interneurons and astrocytes to increase synaptic inhibition in neuronal networks." *J Neurosci* 24(39): 8606-20.
- Buskila, Y., Y. Abu-Ghanem, et al. (2007). "Enhanced astrocytic nitric oxide production and neuronal modifications in the neocortex of a NOS2 mutant mouse." *PLoS ONE* 2(9): e843.

7. Literaturverzeichnis

- Cameron, H. A., P. Tanapat, et al. (1998). "Adrenal steroids and N-methyl-D-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway." *Neuroscience* 82(2): 349-54.
- Carlezon, W. A., Jr., R. S. Duman, et al. (2005). "The many faces of CREB." *Trends Neurosci* 28(8): 436-45.
- Carmignoto, G. (2000). "Reciprocal communication systems between astrocytes and neurones." *Prog Neurobiol* 62(6): 561-81.
- Castren, E. (2004). "Neurotrophic effects of antidepressant drugs." *Curr Opin Pharmacol* 4(1): 58-64.
- Celada, P., M. Puig, et al. (2004). "The therapeutic role of 5-HT1A and 5-HT2A receptors in depression." *J Psychiatry Neurosci* 29(4): 252-65.
- Charles, A. C., J. E. Merrill, et al. (1991). "Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate." *Neuron* 6(6): 983-92.
- Chen, B., D. Dowlatshahi, et al. (2001). "Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication." *Biol Psychiatry* 50(4): 260-5.
- Chen, G., G. Rajkowska, et al. (2000). "Enhancement of hippocampal neurogenesis by lithium." *J Neurochem* 75(4): 1729-34.
- Chen, Y., Y. Ai, et al. (2005). "Progenitor proliferation in the adult hippocampus and substantia nigra induced by glial cell line-derived neurotrophic factor." *Exp Neurol* 196(1): 87-95.
- Conti, F., A. Minelli, et al. (1994). "Cellular localization and laminar distribution of AMPA glutamate receptor subunits mRNAs and proteins in the rat cerebral cortex." *J Comp Neurol* 350(2): 241-59.

7. Literaturverzeichnis

- Cornell-Bell, A. H., S. M. Finkbeiner, et al. (1990). "Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling." *Science* 247(4941): 470-3.
- Cotrina, M. L., J. H. Lin, et al. (2000). "ATP-mediated glia signaling." *J Neurosci* 20(8): 2835-44.
- Culpepper, L. (2002). "Escitalopram: A New SSRI for the Treatment of Depression in Primary Care." *Prim Care Companion J Clin Psychiatry* 4(6): 209-214.
- Dahlin, A., L. Xia, et al. (2007). "Expression and immunolocalization of the plasma membrane monoamine transporter in the brain." *Neuroscience* 146(3): 1193-211.
- De Kloet, E. R. and R. H. Derijk (2007). "Therapy insight: is there an imbalanced response of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in depression?" *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 3: 168-179.
- De Kloet, E. R. and M. Joels (2005). "Stress and the brain: from adaption to disease." *Nat. Rev. Neurosci.* 6: 463-475.
- Deakin, J. F., I. Pennell, et al. (1990). "A neuroendocrine study of 5HT function in depression: evidence for biological mechanisms of endogenous and psychosocial causation." *Psychopharmacology (Berl)* 101(1): 85-92.
- Derijk, R. H., N. van Leeuwen, et al. (2008). "Corticosteroid receptor-gene variants: modulators of the stress-response and implications for mental health." *Eur J Pharmacol* 585(2-3): 492-501.
- Diamond, M. C., D. Krech, et al. (1964). "The Effects of an Enriched Environment on the Histology of the Rat Cerebral Cortex." *J Comp Neurol* 123: 111-20.

7. Literaturverzeichnis

- Dilling H, M. W., Schmidt MH (1999). Internationale Klassifikation psychischer Störungen: ICD-10, Kapitel V (F). Klinisch-diagnostische Leitlinien. Bern: Huber, Weltgesundheitsorganisation.
- Dolan, R. J., S. P. Calloway, et al. (1985). "Life events, depression and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function." *Br J Psychiatry* 147: 429-33.
- Dowlatshahi, D., G. M. MacQueen, et al. (1998). "Increased temporal cortex CREB concentrations and antidepressant treatment in major depression." *Lancet* 352(9142): 1754-5.
- Drevets, W. C. (2001). "Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders." *Curr Opin Neurobiol* 11(2): 240-9.
- Duffy, S. and B. A. MacVicar (1995). "Adrenergic calcium signaling in astrocyte networks within the hippocampal slice." *J Neurosci* 15(8): 5535-50.
- Duman, R. S. (1998). "Novel therapeutic approaches beyond the serotonin receptor." *Biol Psychiatry* 44(5): 324-35.
- Duman, R. S. (2004). "Depression: a case of neuronal life and death?" *Biol Psychiatry* 56(3): 140-5.
- Duman, R. S. (2004). "Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders." *Neuromolecular Med* 5(1): 11-25.
- Duman, R. S., G. R. Heninger, et al. (1997). "A molecular and cellular theory of depression." *Arch Gen Psychiatry* 54(7): 597-606.
- Duman, R. S., S. Nakagawa, et al. (2001). "Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment." *Neuropsychopharmacology* 25(6): 836-44.

7. Literaturverzeichnis

- Eriksson, P. S., E. Perfilieva, et al. (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." *Nat Med* 4(11): 1313-7.
- Fam, S. R., C. J. Gallagher, et al. (2000). "P2Y(1) purinoceptor-mediated Ca(2+) signaling and Ca(2+) wave propagation in dorsal spinal cord astrocytes." *J Neurosci* 20(8): 2800-8.
- Ferguson, J. M. (2001). "SSRI Antidepressant Medications: Adverse Effects and Tolerability." *Prim Care Companion J Clin Psychiatry* 3(1): 22-27.
- Fiacco, T. A. and K. D. McCarthy (2004). "Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons." *J Neurosci* 24(3): 722-32.
- Finkbeiner, S. (1992). "Calcium waves in astrocytes-filling in the gaps." *Neuron* 8(6): 1101-8.
- Fossati, P., A. Radtchenko, et al. (2004). "Neuroplasticity: from MRI to depressive symptoms." *Eur Neuropsychopharmacol* 14 Suppl 5: S503-10.
- Frodl, T., C. Schule, et al. (2007). "Association of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism with reduced hippocampal volumes in major depression." *Arch Gen Psychiatry* 64(4): 410-6.
- Gage, F. H. (2000). "Mammalian neural stem cells." *Science* 287(5457): 1433-8.
- Geddes, J. and R. Butler (2002). "Depressive disorders." *Clin Evid*(8): 951-73.
- Gelenberg, A. J. and C. L. Cheslen (2000). "How fast are antidepressants?" *J Clin Psychiatry* 61(10): 712-21.

7. Literaturverzeichnis

- Ghosh, A., J. Carnahan, et al. (1994). "Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons." *Science* 263(5153): 1618-23.
- Gibbons, J. L. (1964). "Cortisol Secretion Rate in Depressive Illness." *Arch Gen Psychiatry* 10: 572-5.
- Ginzinger, D. G. (2002). "Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream." *Exp Hematol* 30(6): 503-12.
- Gold, P. W. and G. P. Chrousos (2002). "Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states." *Mol Psychiatry* 7(3): 254-75.
- Gold, P. W., W. C. Drevets, et al. (2002). "New insights into the role of cortisol and the glucocorticoid receptor in severe depression." *Biol Psychiatry* 52(5): 381-5.
- Golgi, C. (1898). "On the structure of nerve cells. 1898." *J Microsc* 155(Pt 1): 3-7.
- Gould, E., H. A. Cameron, et al. (1992). "Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus." *J Neurosci* 12(9): 3642-50.
- Gould, E., P. Tanapat, et al. (1999). "Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning." *Trends Cogn Sci* 3(5): 186-192.
- Guthrie, P. B., J. Knappenberger, et al. (1999). "ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves." *J Neurosci* 19(2): 520-8.
- Hamby, M. E., A. R. Gragnolati, et al. (2008). "TGF beta 1 and TNF alpha potentiate nitric oxide production in astrocyte cultures by recruiting distinct subpopulations of cells to express NOS-2." *Neurochem Int* 52(6): 962-71.

7. Literaturverzeichnis

- Hamby, M. E., T. F. Uliasz, et al. (2006). "Characterization of an improved procedure for the removal of microglia from confluent monolayers of primary astrocytes." *J Neurosci Methods* 150(1): 128-37.
- Hamilton, M. (1960). "A rating scale for depression." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 23: 56-62.
- Haydon, P. G. (2001). "GLIA: listening and talking to the synapse." *Nat Rev Neurosci* 2(3): 185-93.
- Haydon, P. G. and G. Carmignoto (2006). "Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling." *Physiol Rev* 86(3): 1009-31.
- Heine, V. M., J. Zareno, et al. (2005). "Chronic stress in the adult dentate gyrus reduces cell proliferation near the vasculature and VEGF and Flk-1 protein expression." *Eur J Neurosci* 21(5): 1304-14.
- Holsboer, F. (1988). "Implications of altered limbic-hypothalamic-pituitary-adrenocortical (LHPA)-function for neurobiology of depression." *Acta Psychiatr Scand Suppl* 341: 72-111.
- Holsboer, F. and N. Barden (1996). "Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation." *Endocr Rev* 17(2): 187-205.
- Hosli, E. and L. Hosli (1993). "Receptors for neurotransmitters on astrocytes in the mammalian central nervous system." *Prog Neurobiol* 40(4): 477-506.
- Hoyer, D. and G. Martin (1997). "5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome." *Neuropharmacology* 36(4-5): 419-28.
- Huang, E. J. and L. F. Reichardt (2001). "Neurotrophins: roles in neuronal development and function." *Annu Rev Neurosci* 24: 677-736.

7. Literaturverzeichnis

- Hyman SE, R. M. (2000). Depressive and bipolar mood disorders. Dale DC, Federman DD, eds. Scientific American. Medicine. Vol. 3. New York: Healtheon/WebMD Corp.: Sect. 13, Subsect. II, p. 1.
- Imura, T., I. Nakano, et al. (2006). "Phenotypic and functional heterogeneity of GFAP-expressing cells in vitro: differential expression of LeX/CD15 by GFAP-expressing multipotent neural stem cells and non-neurogenic astrocytes." *Glia* 53(3): 277-93.
- Inazu, M., H. Takeda, et al. (2001). "Pharmacological characterization and visualization of the glial serotonin transporter." *Neurochem Int* 39(1): 39-49.
- Iritani, S., M. Tohgi, et al. (2006). "Immunohistochemical study of the serotonergic neuronal system in an animal model of the mood disorder." *Exp Neurol* 201(1): 60-5.
- Jacobi, F., M. Hofler, et al. (2002). "[Prevalence, detection and prescribing behavior in depressive syndromes. A German federal family physician study]." *Nervenarzt* 73(7): 651-8.
- Jacobi, F., H. U. Wittchen, et al. (2004). "Prevalence, co-morbidity and correlates of mental disorders in the general population: results from the German Health Interview and Examination Survey (GHS)." *Psychol Med* 34(4): 597-611.
- Jacobs, B. L. and E. C. Azmitia (1992). "Structure and function of the brain serotonin system." *Physiol Rev* 72(1): 165-229.
- Jin, K., Y. Sun, et al. (2003). "Neurogenesis and aging: FGF-2 and HB-EGF restore neurogenesis in hippocampus and subventricular zone of aged mice." *Aging Cell* 2(3): 175-83.

7. Literaturverzeichnis

- Jones, T. A. and W. T. Greenough (1996). "Ultrastructural evidence for increased contact between astrocytes and synapses in rats reared in a complex environment." *Neurobiol Learn Mem* 65(1): 48-56.
- Kang, J., L. Jiang, et al. (1998). "Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission." *Nat Neurosci* 1(8): 683-92.
- Karege, F., G. Perret, et al. (2002). "Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients." *Psychiatry Res* 109(2): 143-8.
- Karow T., L.-R. R. (2006). *Pharmakologie und Toxikologie*. Köln, Karow / Lang.
- Kawabata, S., R. Tsutsumi, et al. (1996). "Control of calcium oscillations by phosphorylation of metabotropic glutamate receptors." *Nature* 383(6595): 89-92.
- Kempermann, G., H. G. Kuhn, et al. (1997). "More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment." *Nature* 386(6624): 493-5.
- Kendler, K. S. (2001). "Twin studies of psychiatric illness: an update." *Arch Gen Psychiatry* 58(11): 1005-14.
- Kettenmann H, R. B. (2005). "The concept of neuroglia: A historical perspective." *Neuroglia*; Oxford University Press 2nd edition: pp. 1-8.
- Ko, H. G., S. J. Lee, et al. (2007). "Null effect of antidepressants on the astrocytes-mediated proliferation of hippocampal progenitor cells in vitro." *Mol Pain* 3: 16.
- Koizumi, S., K. Fujishita, et al. (2003). "Dynamic inhibition of excitatory synaptic transmission by astrocyte-derived ATP in hippocampal cultures." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(19): 11023-8.

7. Literaturverzeichnis

- Koo , D. (2005). "Role of interleukin-1B in hippocampal cell proliferation impaired by acute stress." Abstr Soc Neurosci.
- Kornack, D. R. and P. Rakic (2001). "Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex." *Science* 294(5549): 2127-30.
- Kratz, S., M. Harter, et al. (2003). "[Reason for encounter and diagnosis of depression in patients in general practice]." *Z Arztl Fortbild Qualitatssich* 97 Suppl 4: 50-6.
- Kronmuller, K. T., J. Pantel, et al. (2008). "Life events and hippocampal volume in first-episode major depression." *J Affect Disord* 110(3): 241-7.
- Kubota, N., Y. Kiuchi, et al. (2001). "Regulation of serotonin transporter gene expression in human glial cells by growth factors." *Eur J Pharmacol* 417(1-2): 69-76.
- Kulik, A., A. Haentzsch, et al. (1999). "Neuron-glia signaling via alpha(1) adrenoceptor-mediated Ca(2+) release in Bergmann glial cells in situ." *J Neurosci* 19(19): 8401-8.
- Kulkarni, V. A., S. Jha, et al. (2002). "Depletion of norepinephrine decreases the proliferation, but does not influence the survival and differentiation, of granule cell progenitors in the adult rat hippocampus." *Eur J Neurosci* 16(10): 2008-12.
- Lee, B. H., H. Kim, et al. (2007). "Decreased plasma BDNF level in depressive patients." *J Affect Disord* 101(1-3): 239-44.
- Lee, J., W. Duan, et al. (2002). "Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice." *J Neurochem* 82(6): 1367-75.

7. Literaturverzeichnis

Lexapro (2002). Lexapro Prescribing Information. New York, NY.

Li, N., J. Y. Sul, et al. (2003). "A calcium-induced calcium influx factor, nitric oxide, modulates the refilling of calcium stores in astrocytes." *J Neurosci* 23(32): 10302-10.

Linde, K., C. D. Mulrow, et al. (2005). "St John's wort for depression." *Cochrane Database Syst Rev*(2): CD000448.

Magarinos, A. M., B. S. McEwen, et al. (1996). "Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews." *J Neurosci* 16(10): 3534-40.

Malberg, J. E., A. J. Eisch, et al. (2000). "Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus." *J Neurosci* 20(24): 9104-10.

Malberg, J. E. and L. E. Schechter (2005). "Increasing hippocampal neurogenesis: a novel mechanism for antidepressant drugs." *Curr Pharm Des* 11(2): 145-55.

Manev, H., T. Uz, et al. (2001). "Antidepressants alter cell proliferation in the adult brain in vivo and in neural cultures in vitro." *Eur J Pharmacol* 411(1-2): 67-70.

Manji, H. K., W. C. Drevets, et al. (2001). "The cellular neurobiology of depression." *Nat Med* 7(5): 541-7.

Marek, G. J., R. A. Wright, et al. (2001). "A major role for thalamocortical afferents in serotonergic hallucinogen receptor function in the rat neocortex." *Neuroscience* 105(2): 379-92.

Matthews, K. and J. M. Eagles (1991). "Which antidepressant?" *Br J Gen Pract* 41(344): 123-5.

7. Literaturverzeichnis

- Matthias, K., F. Kirchhoff, et al. (2003). "Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus." *J Neurosci* 23(5): 1750-8.
- McEwen, B. S. (1999). "Stress and hippocampal plasticity." *Annu Rev Neurosci* 22: 105-22.
- Miller, G. (2005). "Neuroscience. The dark side of glia." *Science* 308(5723): 778-81.
- Miller, R. H. and V. Szigeti (1991). "Clonal analysis of astrocyte diversity in neonatal rat spinal cord cultures." *Development* 113(1): 353-62.
- Möller H-J, M. W. E., Rüter E. (2002). *Moderne Antidepressiva*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Mothet, J. P., A. T. Parent, et al. (2000). "D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(9): 4926-31.
- Mothet, J. P., L. Pollegioni, et al. (2005). "Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(15): 5606-11.
- Murphy, B. E. (1991). "Steroids and depression." *J Steroid Biochem Mol Biol* 38(5): 537-59.
- Murphy, S., M. L. Simmons, et al. (1993). "Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells." *Trends Neurosci* 16(8): 323-8.
- Nakagawa, S., J. E. Kim, et al. (2002). "Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein." *J Neurosci* 22(9): 3673-82.

7. Literaturverzeichnis

- Nedergaard, M., B. Ransom, et al. (2003). "New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain." *Trends Neurosci* 26(10): 523-30.
- Nelson, J. C. (1997). "Safety and tolerability of the new antidepressants." *J Clin Psychiatry* 58 Suppl 6: 26-31.
- Nestler, E. J., R. Z. Terwilliger, et al. (1989). "Chronic antidepressant administration alters the subcellular distribution of cyclic AMP-dependent protein kinase in rat frontal cortex." *J Neurochem* 53(5): 1644-7.
- Newman, E. A. (2003). "New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission." *Trends Neurosci* 26(10): 536-42.
- Newton, S. S. and R. S. Duman (2004). "Regulation of neurogenesis and angiogenesis in depression." *Curr Neurovasc Res* 1(3): 261-7.
- Nibuya, M., S. Morinobu, et al. (1995). "Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments." *J Neurosci* 15(11): 7539-47.
- Nibuya, M., E. J. Nestler, et al. (1996). "Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus." *J Neurosci* 16(7): 2365-72.
- Nicholls, M., Wallace (1992). *From Neuron To Brain*. Massachusetts, Sinauer, Sunderland.
- Nikcevich, K. M., K. B. Gordon, et al. (1997). "IFN-gamma-activated primary murine astrocytes express B7 costimulatory molecules and prime naive antigen-specific T cells." *J Immunol* 158(2): 614-21.
- Nishiyama, A., Z. Yang, et al. (2005). "Astrocytes and NG2-glia: what's in a name?" *J Anat* 207(6): 687-93.

7. Literaturverzeichnis

- Nithipatikom, K., R. F. DiCamelli, et al. (2001). "Determination of cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in coronary venous plasma during ischemia and reperfusion in dogs." *Anal Biochem* 292(1): 115-24.
- Oliet, S. H., R. Piet, et al. (2001). "Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons." *Science* 292(5518): 923-6.
- Ongur, D., W. C. Drevets, et al. (1998). "Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(22): 13290-5.
- Oomagari, K., B. Buisson, et al. (1991). "Effect of Glutamate and Ionomycin on the Release of Arachidonic Acid, Prostaglandins and HETEs from Cultured Neurons and Astrocytes." *Eur J Neurosci* 3(10): 928-939.
- Owens, M. J., D. L. Knight, et al. (2001). "Second-generation SSRIs: human monoamine transporter binding profile of escitalopram and R-fluoxetine." *Biol Psychiatry* 50(5): 345-50.
- Owens, M. J. and J. F. Rosenbaum (2002). "Escitalopram: a second-generation SSRI." *CNS Spectr* 7(4 Suppl 1): 34-9.
- Palmer, T. D., A. R. Willhoite, et al. (2000). "Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis." *J Comp Neurol* 425(4): 479-94.
- Pasti, L., A. Volterra, et al. (1997). "Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ." *J Neurosci* 17(20): 7817-30.
- Pearce, B., S. Murphy, et al. (1989). "ATP-evoked Ca²⁺ mobilisation and prostanoid release from astrocytes: P₂-purinergic receptors linked to phosphoinositide hydrolysis." *J Neurochem* 52(3): 971-7.

7. Literaturverzeichnis

- Pellerin, L. and P. J. Magistretti (1994). "Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(22): 10625-9.
- Perea, G. and A. Araque (2005). "Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes." *J Neurosci* 25(9): 2192-203.
- Pixley, S. K. (1992). "CNS glial cells support in vitro survival, division, and differentiation of dissociated olfactory neuronal progenitor cells." *Neuron* 8(6): 1191-204.
- Porter, J. T. and K. D. McCarthy (1995). "Adenosine receptors modulate $[Ca^{2+}]_i$ in hippocampal astrocytes in situ." *J Neurochem* 65(4): 1515-23.
- Porter, J. T. and K. D. McCarthy (1995). "GFAP-positive hippocampal astrocytes in situ respond to glutamatergic neuroligands with increases in $[Ca^{2+}]_i$." *Glia* 13(2): 101-12.
- Porter, J. T. and K. D. McCarthy (1996). "Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals." *J Neurosci* 16(16): 5073-81.
- Potter, G. G., J. D. Kittinger, et al. (2004). "Prefrontal neuropsychological predictors of treatment remission in late-life depression." *Neuropsychopharmacology* 29(12): 2266-71.
- Qian, Y., A. Galli, et al. (1997). "Protein kinase C activation regulates human serotonin transporters in HEK-293 cells via altered cell surface expression." *J Neurosci* 17(1): 45-57.
- Queiroz, G., D. K. Meyer, et al. (1999). "A study of the mechanism of the release of ATP from rat cortical astroglial cells evoked by activation of glutamate receptors." *Neuroscience* 91(3): 1171-81.

7. Literaturverzeichnis

- Rajkowska, G. (2002). "Cell pathology in mood disorders." *Semin Clin Neuropsychiatry* 7(4): 281-92.
- Rakic, P. (2002). "Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis." *J Neurosci* 22(3): 614-8.
- Ramamoorthy, S. and R. D. Blakely (1999). "Phosphorylation and sequestration of serotonin transporters differentially modulated by psychostimulants." *Science* 285(5428): 763-6.
- Ramamoorthy, S., E. Giovanetti, et al. (1998). "Phosphorylation and regulation of antidepressant-sensitive serotonin transporters." *J Biol Chem* 273(4): 2458-66.
- Reul, J. M. and E. R. de Kloet (1985). "Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation." *Endocrinology* 117(6): 2505-11.
- Ridet, J. L., S. K. Malhotra, et al. (1997). "Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function." *Trends Neurosci* 20(12): 570-7.
- Rollman, B. L., M. R. Block, et al. (1997). "Symptoms of major depression and tricyclic side effects in primary care patients." *J Gen Intern Med* 12(5): 284-91.
- Roseboom, P. H. and D. C. Klein (1995). "Norepinephrine stimulation of pineal cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation: primary role of a beta-adrenergic receptor/cyclic AMP mechanism." *Mol Pharmacol* 47(3): 439-49.
- Rubin, R. T., R. E. Poland, et al. (1987). "Neuroendocrine aspects of primary endogenous depression--IV. Pituitary-thyroid axis activity in patients and matched control subjects." *Psychoneuroendocrinology* 12(5): 333-47.

7. Literaturverzeichnis

- Russo-Neustadt, A. A., R. C. Beard, et al. (2000). "Physical activity and antidepressant treatment potentiate the expression of specific brain-derived neurotrophic factor transcripts in the rat hippocampus." *Neuroscience* 101(2): 305-12.
- Saarelainen, T., P. Hendolin, et al. (2003). "Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects." *J Neurosci* 23(1): 349-57.
- Saarelainen, T., J. A. Lukkarinen, et al. (2000). "Transgenic mice overexpressing truncated trkB neurotrophin receptors in neurons show increased susceptibility to cortical injury after focal cerebral ischemia." *Mol Cell Neurosci* 16(2): 87-96.
- Sairanen, M., G. Lucas, et al. (2005). "Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus." *J Neurosci* 25(5): 1089-94.
- Sanchez, C., P. B. Bergqvist, et al. (2003). "Escitalopram, the S-(+)-enantiomer of citalopram, is a selective serotonin reuptake inhibitor with potent effects in animal models predictive of antidepressant and anxiolytic activities." *Psychopharmacology (Berl)* 167(4): 353-62.
- Santarelli, L., M. Saxe, et al. (2003). "Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants." *Science* 301(5634): 805-9.
- Sapolsky, R. M. (2001). "Depression, antidepressants, and the shrinking hippocampus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(22): 12320-2.
- Sapolsky, R. M. (2004). "Is impaired neurogenesis relevant to the affective symptoms of depression?" *Biol Psychiatry* 56(3): 137-9.

7. Literaturverzeichnis

- Schaaf, M. J., E. R. De Kloet, et al. (2000). "Corticosterone effects on BDNF expression in the hippocampus. Implications for memory formation." *Stress* 3(3): 201-8.
- Scharfman, H., J. Goodman, et al. (2005). "Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats." *Exp Neurol* 192(2): 348-56.
- Schell, M. J., R. O. Brady, Jr., et al. (1997). "D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors." *J Neurosci* 17(5): 1604-15.
- Schell, M. J., M. E. Molliver, et al. (1995). "D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(9): 3948-52.
- Shao, Y., J. T. Porter, et al. (1994). "Neuroligand receptor heterogeneity among astroglia." *Perspect Dev Neurobiol* 2(3): 205-15.
- Sheline, Y. I., P. W. Wang, et al. (1996). "Hippocampal atrophy in recurrent major depression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(9): 3908-13.
- Shelton, M. K. and K. D. McCarthy (2000). "Hippocampal astrocytes exhibit Ca²⁺-elevating muscarinic cholinergic and histaminergic receptors in situ." *J Neurochem* 74(2): 555-63.
- Shimizu, E., K. Hashimoto, et al. (2003). "Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants." *Biol Psychiatry* 54(1): 70-5.
- Shirayama, Y., A. C. Chen, et al. (2002). "Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression." *J Neurosci* 22(8): 3251-61.

7. Literaturverzeichnis

- Simon, G. E., M. VonKorff, et al. (1996). "Initial antidepressant choice in primary care. Effectiveness and cost of fluoxetine vs tricyclic antidepressants." *Jama* 275(24): 1897-902.
- Sirevaag, A. M. and W. T. Greenough (1987). "Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. III. Neuronal and glial nuclei, boutons, dendrites, and capillaries." *Brain Res* 424(2): 320-32.
- Sirevaag, A. M. and W. T. Greenough (1991). "Plasticity of GFAP-immunoreactive astrocyte size and number in visual cortex of rats reared in complex environments." *Brain Res* 540(1-2): 273-8.
- Siuciak, J. A., D. R. Lewis, et al. (1997). "Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF)." *Pharmacol Biochem Behav* 56(1): 131-7.
- Smit, A. B., N. I. Syed, et al. (2001). "A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission." *Nature* 411(6835): 261-8.
- Smith, M. A., S. Makino, et al. (1995). "Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus." *J Neurosci* 15(3 Pt 1): 1768-77.
- Song, F., N. Freemantle, et al. (1993). "Selective serotonin reuptake inhibitors: meta-analysis of efficacy and acceptability." *Bmj* 306(6879): 683-7.
- Song, H., C. F. Stevens, et al. (2002). "Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells." *Nature* 417(6884): 39-44.
- Spiessl, H., B. Hubner-Liebermann, et al. (2006). "[Depression, a widespread disease. Epidemiology, care situation, diagnosis, therapy and prevention]." *Dtsch Med Wochenschr* 131(1-2): 35-40.

7. Literaturverzeichnis

- Sprouse, J. S. and G. K. Aghajanian (1987). "Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists." *Synapse* 1(1): 3-9.
- Steckler, T. and F. Holsboer (1999). "Corticotropin-releasing hormone receptor subtypes and emotion." *Biol Psychiatry* 46(11): 1480-508.
- Steckler, T. and F. Holsboer (1999). "Enhanced conditioned approach responses in transgenic mice with impaired glucocorticoid receptor function." *Behav Brain Res* 102(1-2): 151-63.
- Steckler, T., F. Holsboer, et al. (1999). "Glucocorticoids and depression." *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 13(4): 597-614.
- Stockmeier, C. A., G. J. Mahajan, et al. (2004). "Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression." *Biol Psychiatry* 56(9): 640-50.
- Stokes, P. E. (1995). "The potential role of excessive cortisol induced by HPA hyperfunction in the pathogenesis of depression." *Eur Neuropsychopharmacol* 5 Suppl: 77-82.
- St-Pierre, J. A., D. Nouel, et al. (2000). "Sub-population of cultured hippocampal astrocytes expresses neuropeptide Y Y₁ receptors." *Glia* 30(1): 82-91.
- Strickland, P. L., J. F. Deakin, et al. (2002). "Bio-social origins of depression in the community. Interactions between social adversity, cortisol and serotonin neurotransmission." *Br J Psychiatry* 180: 168-73.
- Sul, J. Y., G. Orosz, et al. (2004). "Astrocytic Connectivity in the Hippocampus." *Neuron Glia Biol* 1(1): 3-11.
- Swanson, R. A., J. Liu, et al. (1997). "Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes." *J Neurosci* 17(3): 932-40.

7. Literaturverzeichnis

- Szeligo, F. and C. P. Leblond (1977). "Response of the three main types of glial cells of cortex and corpus callosum in rats handled during suckling or exposed to enriched, control and impoverished environments following weaning." *J Comp Neurol* 172(2): 247-63.
- Temple, S. (2001). "The development of neural stem cells." *Nature* 414(6859): 112-7.
- Thoenen, H. (1995). "Neurotrophins and neuronal plasticity." *Science* 270(5236): 593-8.
- Thome, J., N. Sakai, et al. (2000). "cAMP response element-mediated gene transcription is upregulated by chronic antidepressant treatment." *J Neurosci* 20(11): 4030-6.
- Todd, K. J., A. Serrano, et al. (2006). "Glial cells in synaptic plasticity." *J Physiol Paris* 99(2-3): 75-83.
- Tölle R., W. K. (2006). *Psychiatrie*. Heidelberg, Springer Verlag.
- Torres, G. E., R. R. Gainetdinov, et al. (2003). "Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function." *Nat Rev Neurosci* 4(1): 13-25.
- Tsacopoulos, M. and P. J. Magistretti (1996). "Metabolic coupling between glia and neurons." *J Neurosci* 16(3): 877-85.
- Urani, A., S. Chourbaji, et al. (2005). "Mutant mouse models of depression: candidate genes and current mouse lines." *Neurosci Biobehav Rev* 29(4-5): 805-28.
- Ustun, T. B., D. Goldberg, et al. (1995). "New classification for mental disorders with management guidelines for use in primary care: ICD-10 PHC chapter five." *Br J Gen Pract* 45(393): 211-5.

7. Literaturverzeichnis

- Vaidya, V. A. and R. S. Duman (2001). "Depression--emerging insights from neurobiology." *Br Med Bull* 57: 61-79.
- van Praag, H., A. F. Schinder, et al. (2002). "Functional neurogenesis in the adult hippocampus." *Nature* 415(6875): 1030-4.
- Vandesompele, J., K. De Preter, et al. (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." *Genome Biol* 3(7): RESEARCH0034.
- Venance, L., J. Premont, et al. (1998). "Gap junctional communication and pharmacological heterogeneity in astrocytes cultured from the rat striatum." *J Physiol* 510 (Pt 2): 429-40.
- Vetulani, J. and I. Nalepa (2000). "Antidepressants: past, present and future." *Eur J Pharmacol* 405(1-3): 351-63.
- von Moltke, L. L., D. J. Greenblatt, et al. (2001). "Escitalopram (S-citalopram) and its metabolites in vitro: cytochromes mediating biotransformation, inhibitory effects, and comparison to R-citalopram." *Drug Metab Dispos* 29(8): 1102-9.
- Warner-Schmidt, J. L. and R. S. Duman (2006). "Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment." *Hippocampus* 16(3): 239-49.
- Watanabe, Y., E. Gould, et al. (1992). "Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons." *Brain Res* 588(2): 341-5.
- Whitaker-Azmitia, P. M., C. Clarke, et al. (1993). "Localization of 5-HT_{1A} receptors to astroglial cells in adult rats: implications for neuronal-glia interactions and psychoactive drug mechanism of action." *Synapse* 14(3): 201-5.

7. Literaturverzeichnis

- White, K. J., C. C. Walline, et al. (2005). "Serotonin transporters: implications for antidepressant drug development." *Aaps J* 7(2): E421-33.
- Wiedemann (2004). "Quantitative Real-Time PCR - Eine Frage der Normalisierung." *Biospektrum* 10(1).
- Wiencken, A. E. and V. A. Casagrande (1999). "Endothelial nitric oxide synthetase (eNOS) in astrocytes: another source of nitric oxide in neocortex." *Glia* 26(4): 280-90.
- Wikipedia (2007). Agarose-Gelelektrophorese.
- Wikipedia (2007). "Polymerase-Kettenreaktion."
- Williams, J. W., Jr., C. D. Mulrow, et al. (2000). "A systematic review of newer pharmacotherapies for depression in adults: evidence report summary." *Ann Intern Med* 132(9): 743-56.
- Wittchen, H. U. M., N.; Schmidkunz, B.; Winter, S.; Pfister H. (2000). "Erscheinungsformen, Häufigkeit und Versorgung von Depressionen. Ergebnisse des bundesweiten Gesundheitssurveys "Psychische Störungen"." *Fortschr Med Orig* 118: 4-10.
- Wolkowitz, O. M., V. I. Reus, et al. (1999). "Antiglucocorticoid treatment of depression: double-blind ketoconazole." *Biol Psychiatry* 45(8): 1070-4.
- Wolkowitz, O. M., V. I. Reus, et al. (1993). "Ketoconazole administration in hypercortisolemic depression." *Am J Psychiatry* 150(5): 810-2.
- Wolosker, H., S. Blackshaw, et al. (1999). "Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(23): 13409-14.

7. Literaturverzeichnis

- Wong, M. L., M. A. Kling, et al. (2000). "Pronounced and sustained central hypernoradrenergic function in major depression with melancholic features: relation to hypercortisolism and corticotropin-releasing hormone." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(1): 325-30.
- Wulsin, L. R., G. E. Vaillant, et al. (1999). "A systematic review of the mortality of depression." *Psychosom Med* 61(1): 6-17.
- Yuan, J. and B. A. Yankner (2000). "Apoptosis in the nervous system." *Nature* 407(6805): 802-9.
- Zhang, Q. and P. G. Haydon (2005). "Roles for gliotransmission in the nervous system." *J Neural Transm* 112(1): 121-5.
- Zhou, M. and H. K. Kimelberg (2001). "Freshly isolated hippocampal CA1 astrocytes comprise two populations differing in glutamate transporter and AMPA receptor expression." *J Neurosci* 21(20): 7901-8.

8 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. K.-P. Lesch für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas und der Vergabe der Arbeit sowie Herrn Professor Dr. med. P. Kugler für die Übernahme des Koreferats.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen beiden Betreuern Frau Dipl.-Biol. S. Klein und Herrn Dr. med. A. Reif für ihre hervorragende Unterstützung bedanken, die über die engagierte fachliche Hilfe hinaus stets freundlich und motivierend war.

Dr. med. G. Kenis von der Universität Maastricht danke ich für die Bereitstellung der Astrozyten RNA.

Bei Frau Dr. rer. nat. A. Schmitt, Frau G. Ortega und Frau T. Töpner möchte ich mich für ihre wertvollen Hilfestellungen bei den Experimenten im Labor bedanken.

Insbesondere möchte ich mich bei allen hier aufgeführten Personen und auch bei den nicht namentlich genannten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors für die freundschaftliche und herzliche Arbeitsatmosphäre bedanken, die maßgeblich dazu beitrug, dass ich gern an diesem Promotionsthema gearbeitet habe.

Außerordentlich möchte ich mich bei Anne für die verlässliche Freundschaft und mentale Unterstützung bedanken.

Der wichtigste Dank gilt meinen Eltern, Christa und Dr. rer. nat. Gerhard Kuhlemann sowie meiner Schwester Heike, durch deren andauernden und liebevollen Rückhalt mein Weg möglich gemacht wird.

Curriculum Vitae

Julia Kuhlemann

geboren am 31. August 1982

in Bielefeld

deutsche Staatsangehörigkeit

ledig

Schule

08/1989 bis 07/1993

Grundschule Horn – Bad Meinberg

08/1993 bis 06/2002

Gymnasium Leopoldinum, Detmold,
Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

10/2002 bis 11/2008

Studium der Humanmedizin an der Bayerischen
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Staatsexamen

Berufliche Tätigkeit

ab 02/2009

Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für
Diagnostische Radiologie des Universitätsklinikum
Düsseldorf