Aus der Abteilung für Experimentelle Neurologie der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin und dem Max-Delbrück-Centrum für
Molekulare Medizin (MDC), Berlin-Buch

DISSERTATION

Expression von Glukokortikoid- und Mineralokortikoidrezeptoren auf neuronalen Vorläuferzellen im murinen Gyrus dentatus

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Ana Micaela García

aus Bielefeld

Gutachter: 1. Prof. Dr. G. Kempermann
2. Prof. Dr. J. Priller
3. Prof. Dr. J. Winkler

Datum der Promotion: 19. Mai 2008

Meiner Familie gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 7

1.1 Adulte Neurogenese 7

1.2 Funktion und Regulation adulter Neurogenese 10

1.3 Teilschritte adulter Neurogenese 13

1.4 Corticosteroid Hormone 18

1.5 Corticosteroid Hormone und Neurogenese 21

1.6 Problemstellung und Aufgabenstellung 24

2 Material und Methoden 26

2.1 Material 26
2.1.1 Versuchstiere 26
2.1.2 Nestin-GFP-Mäuse 26
2.1.3 Puffer und Lösungen 27
2.1.4 Primäre Antikörper 30
2.1.5 Sekundäre Antikörper 31

2.2 Versuchsaufbau und –bedingungen 31
2.2.1 Haltung der Versuchstiere 31
2.2.2 Standardlaborbedingungen 31
2.2.3 Bedingungen einer reizreichen Umgebung 32
2.2.4 Bedingungen freiwilliger körperlicher Aktivität 33
2.2.5 Experimentelles Design 34
2.2.5.1 Experimentelles Design der Zeitreihe 34
2.2.5.2 Experimentelles Design zur Phänotypisierung der Nestin-GFP-positiven Zellen in Nestin-GFP Mäusen 34
2.2.6 *In vivo* Markierung proliferierender Zellen mit BrdU 35
2.2.6.1 Allgemeines 35
2.2.6.2 Herstellung der BrdU-Lösung und Injektion 35

2.3 Gewebepräparation 35
2.3.1 Perfusion 35
2.3.2 Entnahme der Gehirne 36
2.3.3 Postfixation und Kryoprotektion 36
2.3.4 Anfertigung von Schnittserien der Gehirne 36
2.3.5 Lagerung der Gehirnschnitte 37

2.4 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz 37
2.4.1 Vorbehandlung der Schnitte 37
2.4.2 Immunfluoreszenz und Immunhistochemie 37

2.5 Quantifizierung der BrdU-positiven Zellen 40

2.6 Konfokale Mikroskopie 40
2.6.1 Immunotypisierung der BrdU-positiven Zellen 41
2.6.2 Immunotypisierung der Nestin-GFP-positiven Zellen 41

2.7 Statistik 41

2.8 Methodenkritik 42
2.8.1 BrdU als Proliferationsmarker 42
2.8.2 Phänotypisierung der Zellen 43
2.8.3 Nestin-GFP-Transgenes Mausmodel 44

3 Ergebnisse 46

3.1 Expression von GR und MR in BrdU-markierten Zellen der SGZ 48
3.1.1 Zusammenfassung 55

3.2 GR- und MR-Expression in phänotypisierten Zellen jung-adulter und alter Mäuse 56
3.2.1 Zusammenfassung 68

4 Diskussion 72

4.1 GR- und MR-Expression in BrdU-positiven Zellen in der SGZ des Gyrus dentatus 72

4.2 GR- und MR-Expression in phänotypisierten Vorläuferzellen der SGZ des Gyrus dentatus 77

4.3 Einfluss des Alters auf die GR- und MR-Expression in phänotypisierten Zellen der SGZ des Gyrus dentatus 90

5 Zusammenfassung 97

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes-Hormon
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BLBP	Brain lipid binding protein
BrdU	2-Bromo-5-desoxyuridin
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
DAB	Diaminobenzidin
DCX	Doublecortin
ENR	Enriched environment
GDNF	Glia derived neurotrophic factor
GFAP	Glial fibrillary acid protein
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GR	Glukokortikoidrezeptoren
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
HVL	Hypophysenvorderlappen
MR	Mineralokortikoidrezeptoren
MWM	Morris Water Maze
PSA-NCAM	Polysialylated neural cell adhesion molecule
PVN	Nucleus paraventricularis
RUN	Freiwillige körperliche Aktivität
SGZ	Subgranuläre Zone (hier: des Gyrus dentatus hippocampi)
TBS	TRIS-gepufferte Kochsalzlösung

1. Einleitung

1.1 Adulte Neurogenese

Lange Zeit wurde angenommen, dass das adulte Zentralnervensystem nicht zur Bildung neuer Nervenzellen befähigt sei.

Dieses weit verbreitete Dogma wurde in den sechziger Jahren des vorigen Jahrhunderts durch Arbeiten von J. Altman sehr in Frage gestellt. Anhand autoradiographischer Studien konnte J. Altman zeigen, dass selbst nach vermutetem Abschluss der Entwicklung des zentralen Nervensystems von Ratten teilungsaktive Zellen nachgewiesen werden können (Altman, 1966; Altman and Das, 1965a; Altman and Das, 1965b). Weitere Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet verdeutlichten, dass dieses neu entdeckte Phänomen nicht auf eine bestimmte Spezies beschränkt blieb. So wurden auch in adulten Gehirnen von anderen Nagetieren (Altman and Das, 1967; Altman, 1966; Altman and Das, 1965a; Altman and Das, 1965b), Vögeln (Goldman and Nottebohm, 1983), Fischen (Zupanc und Horschke, 1995), nicht-menschlichen Primaten (Gould *et al.*, 1999a; Kornack and Rakic, 1999) und schließlich Menschen (Eriksson *et. al.*, 1998) neu gebildete Neurone im adulten Gehirn entdeckt.

Diese Entdeckung weckte in Wissenschaftlern die Hoffnung auf eine kausale Therapiemöglichkeit bei Schädigungen des Nervensystems, zum Beispiel verursacht durch degenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer oder nach Schlaganfällen.

Die vielfältigen Nachforschungen über das Phänomen der adulten Neurogenese zeigten, dass nicht alle Gehirnregionen die Fähigkeit zur Neubildung von Nervenzellen haben. Dieses Potential bleibt, zumindest unter physiologischen Gegebenheiten, auf bestimmte Regionen beschränkt.

Bei diesen so genannten „neurogenen“ Gehirnregionen handelt es sich zum einen um die subventrikuläre Zone (Lois and Alvarez-Buylla, 1993; Alvarez-Buylla and Nottebohm, 1988; Kaplan and Hinds, 1977; Altman and Das, 1965a; Altman and Das, 1965b) und zum anderen um den Gyrus dentatus des

Hippokampus (van Praag *et al.*, 2002; Cameron *et al.*, 1993; Kaplan and Hinds, 1977; Altman and Das, 1965a; Altman and Das, 1965b).

Die subventrikuläre Zone, die sich in den Seitenwänden der Gehirnventrikel befindet, beherbergt sich teilende Zellen, deren Nachwuchs entlang des *Rostral Migratory Stream* in den Bulbus olfactorius einwandert und dort weiter zu periglomerulären Interneuronen und Körnerzellen ausdifferenziert (Lois and Alvarez-Buylla, 1993).

Die zweite Region mit neurogenem Potential befindet sich im Gyrus dentatus des Hippokampus. Der Gyrus dentatus besteht von innen nach außen aufgegliedert aus drei Schichten: dem Hilus (Stratum multiforme), der Körnerzellschicht (Stratum granulare) und der Molekularschicht (Stratum moleculare).

Während im innen liegenden Hilus die so genannten Mooszellen lokalisiert sind, welche durch Aussendung von Kommissurenfasern Verbindungen zum kontralateralen Hippokampus bilden, besteht die Körnerzellschicht vornehmlich aus den namensgebenden Neuronen, deren Axone den Gyrus dentatus über den Moosfasertrakt mit der CA3 Region verbinden. In der außen liegenden Molekularschicht sind vor allem Interneurone und Astrozyten beherbergt.

Die Stamm- bzw. Vorläuferzellen sind in der subgranulären Zone (SGZ) lokalisiert. Diese befindet sich zwischen Stratum granulare und Hilus und ist in ihrer Ausdehnung als eine zwei Zellkörper breite Schicht definiert. In dieser Schicht findet die Zellteilung der Vorläuferzellen statt. Nach der Teilung durchlaufen die unreifen Zellen einen komplexen Prozess bis sie sich zu ausgereiften Neuronen entwickeln, die in das bestehende Netwerk integriert werden.

Die neu gebildeten Zellen wandern nach der Teilung von der SGZ in das Stratum granulare ein und differenzieren dort nach und nach zu reifen Körnerzellen. Sie adaptieren ihre elektrophysiologischen Eigenschaften, wie die für Körnerzellen typischen neuronalen Membran- und Aktionspotentiale (van Praag *et al.*, 2002) und deren Morphologie (Kempermann *et al.*, 2004; Brandt *et al.*, 2003).

Die axonale Aussprossung der neu gebildeten Neurone beginnt nach etwa 10 bis elf Tagen und verbindet Gyrus dentatus mit der CA3 Region.

Die Entwicklung der Dendriten setzt zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Eintritt der Neurone in die postmitotische Phase ein und variiert in ihrer Dauer. Sie findet unabhängig von der Einwirkung neurogener Einflüsse statt (Plümpe *et al.*, 2006) und führt nach etwa drei Wochen zu der Ausbildung komplexer, verzweigter Strukturen (Zhao *et al.*, 2006).

Durch die Ausbildung dieser Zellfortsätze kommt es zu einer funktionellen Integration der jungen Nervenzellen in den intrinsischen trisynaptischen Schaltkreis, der entorhinalen Cortex, Gyrus dentatus, CA1 und CA3 Region des Hippokampus miteinander verbindet (Hastings and Gould, 1999; Markakis and Gage, 1999; Stanfield and Trice, 1988). Durch afferente Fasern zum entorhinalen Cortex (Tractus perforans) und Efferenzen der CA1-Pyramidalzellen ist der Hippokampus über größere neuronale Schaltkreise mit neocorticalen Assoziationsarealen verbunden.

Bereits auf der Ebene früher Vorläuferzellen erhalten die neu gebildeten Zellen erste synaptische Zuflüsse durch GABA-erge Afferenzen (Tozuka *et al.*, 2005), welche wiederum deren weitere neuronale Differenzierung fördern (Ge *et al.*, 2006; Tozuka *et al.*, 2005). In einer von Shors et al. durchgeführten Studie, in der Neurogenese selektiv durch Gabe von Zytostatika ausgeschaltet wurde, konnte gezeigt werden, dass neu gebildete Nervenzellen ab einem Alter von 1-2 Wochen in die Durchführung hippokampus-abhängiger Lernaufgaben funktionell integriert werden (Shors *et al.*, 2001).

Bezüglich der quantitativen Ausprägung des Phänomens Neurogenese gibt es recht unterschiedliche Daten. Für den in dieser Arbeit verwendeten Mausstamm C57BL/6 wird eine Erneuerung der absoluten Anzahl im Stratum granulare lokalisierter Körnerzellen von circa 0,3% alle sechs Tage angegeben (Kempermann *et al.,* 1997a). Nur etwa die Hälfte der neu entstandenen Zellen überlebt den komplexen Prozess von Reifung, Selektion und Differenzierung (Biebl *et al.*, 2000).

Auch entwickeln sich nicht alle neu gebildeten Zellen zu Neuronen. Neben Neurogenese konnten *in vivo* auch Glio- und Angiogenese nachgewiesen

werden (Steiner *et al.,* 2004; Palmer *et al.,* 2000). Endotheliale Zellen, die in der SGZ neu gebildet werden, scheinen im funktionellen Zusammenhang mit Neurogenese zu stehen, da zu beobachten ist, dass neu gebildete Neurone in Clustern mit endothelialen Vorläuferzellen um Blutkapillare herum gruppiert entstehen. Dies scheint vor allem im Sinne der Gewährleistung einer adäquaten Blutversorgung in dieser Zellnische eine Rolle zu spielen (Palmer *et al*., 2000).

1.2 Funktion und Regulation adulter Neurogenese

Die Frage nach der Funktion des Phänomens adulter hippokampaler Neurogenese ist bis heute nicht hinreichend geklärt. Es gibt aber viele Hinweise darauf, dass die Bildung neuer Nervenzellen eng mit der Aktivierung des Hippokampus im Sinne seiner Funktion „Lernen und Gedächtnis“ verknüpft ist.

Der Hippokampus spielt eine zentrale Rolle bei der Gewährleistung der episodischen und deklarativen Gedächtnisfunktion, er ist essentiell für die räumliche Orientierung und Erinnerung räumlicher Strukturen. Zusätzlich ist er eine wichtige Schaltstelle in der Kontrolle autonomer und vegetativer Funktionen, wie zum Beispiel der Corticosteroidsekretion der Nebennieren.

Die hippokampale Formation stellt das Tor zum Gedächtnis dar. Von ihr aus werden potentielle Gedächtnisinhalte an die Großhirnrinde weitergeleitet, die den Speicher repräsentiert. Vermutlich dient adulte Neurogenese nicht dem absoluten Zellzuwachs, sondern durch Zellerneuerung und der Bildung neuer synaptischer Verschaltungen der Gewährleistung einer strukturellen Plastizität, die die Adaption des Organismus an sich fortlaufend ändernde interne und externe Stimuli unterstützt. So gibt es Hinweise, dass Hippokampus abhängiges Lernen nicht von der Gesamtzahl der Körnerzellen im Gyrus dentatus abhängig ist (Wimer *et al.,* 1983).

Bei Kanarienvögeln konnte in den Gehirnzentren die für das Erlernen des Gesanges zuständig sind nachgewiesen werden, dass eine gesteigerte

Neurogenese mit dem Erlernen neuer Lieder assoziiert ist (Goldman and Nottebohm, 1983). Wild lebende Meisen (*black-capped chickadees*), die im Herbst höhere Leistungen des räumlichen Gedächtnisses erbringen müssen, bilden im Vergleich zum restlichen Jahr und verglichen zu ihren gefangen gehaltenen Artgenossen sehr viel mehr neue Neurone in der hippokampalen Formation aus (Barnea and Nottebohm, 1996; 1994).

Auch für adulte hippokampale Neurogenese von Säugetieren wird heute angenommen, dass das anhaltende Angebot neuer Neurone die Ausführung Hippokampus abhängiger Lern- und Gedächtnisleistungen ermöglicht. Zusammenhänge zwischen der Neurogeneserate und Leistungen im *Morris water maze* (MWM), einem Schwimmbecken mit versteckter Plattform, in welchem Nagetiere das Vermögen ihres räumlichen Gedächtnisses unter Beweis stellen, erhärten diese Vermutung. Auch in der schon weiter oben erwähnten Studie von Shors et al. wurde festgestellt, dass eine Unterbrechung hippokampaler Neurogenese eine Verminderung des Lernerfolges bei Ratten herbeiführt (Shors *et al.,* 2001).

Van Praag et al. konnten zeigen, dass freiwillige physikalische Aktivität (RUN) stimulierend auf Neurogenese wirkt. Bei Mäusen, die zu allen Zeiten freien Zugang zu einem im Käfig befindlichen Laufrad hatten, wurde bei der Untersuchung der Gehirne festgestellt, dass die Bildung hippokampaler Neurone zugenommen hatte und auch die Leistungen im MWM im Vergleich zu der Kontrollgruppe verbessert waren (van Praag *et al.,* 1999a). In einer weiteren Studie konnte der Neurogenese verstärkende Effekt spezifisch freiwilliger Laufaktivität zugeordnet werden, nicht jedoch dem Schwimmen im MWM und der damit verbundenen Aktivierung des Hippokampus durch räumliches Lernen (van Praag *et al.,* 1999b).

Ein weiteres Paradigma, das Neurogenese fördert, ist das des „*enriched environment*“ (ENR), - eine reizreiche Umgebung (Kempermann *et al.,* 1997). Im ENR leben die Mäuse in einem Käfig, der, verglichen mit Standardlaborkonditionen, großzügig bemessenen ist, in dem mehr Artgenossen untergebracht sind und der außerdem mit verschiedenen Gerätschaften, wie z.B. Klettergerüsten, Laufrädern und anderen Spielzeugen

ausgestattet ist. Mäuse, die in einer derartigen Umgebung untergebracht sind, zeigen nicht nur vermehrte Neurogenese, sondern auch bessere Ergebnisse im MWM (Nilsson *et al.,* 1999; Kempermann *et al.,* 1998a; 1998b; 1997). Besonders beeinflusst wird dabei nicht die Proliferation der neuen Neurone, sondern deren Überlebensrate.

Das experimentelle Modell „*Caloric restriction*" wirkt ebenfalls stimulierend auf hippokampale Neurogenese (Lee *et al.,* 2002a; 2002b; 2000). Hierbei handelt es sich um eine Diät, der die Versuchstiere ausgesetzt werden. Sie wirkt bei vielen Organismen lebensverlängernd (Lin *et al.,* 2000; Weindruch and Sohal, 1997) und zusätzlich neuroprotektiv, wobei die Steigerung der Neurogenese einer von mehreren Mechanismen zu sein scheint, die diese Neuroprotektivität bedingen.

Auf elektrophysiologischer Ebene lässt sich nachweisen, dass die neu gebildeten Körnerzellen vor allem in ihren frühen Stadien sehr empfänglich für die Ausbildung von *long term potentiations* sind. Diese werden als dem Prozess des Lernens zu Grunde liegender elektrophysiologischer Mechanismus angesehen (Schmidt-Heber *et al.,* 2004; Wang *et al.,* 2000; van Praag *et al.,* 1999a).

Neben Neurogenese stimulierenden Einflüssen gibt es auch Faktoren, die auf die Bildung der neuen Nervenzellen hemmend wirken. Allen voran steht hierbei das Alter (Bizon and Gallagher, 2003; Cameron and McKay, 1999; Kempermann *et al.,* 1998; Kuhn *et al*., 1996; Altman and Das, 1965). Der Grad der Neurogenese korreliert negativ mit dem Alter, je höher das Lebensalter, desto geringer die Neurogeneserate. Ab einem Lebensalter von sechs Wochen verringern sich in Ratten nicht nur Proliferation, sondern auch Differenzierung und Überleben der Zellen (Heine *et al.,* 2004).

Stress gehört ebenfalls zu den Neurogenese hemmenden Faktoren (Coe *et al.*, 2003; Malberg and Duman, 2003; Pham *et al.,* 2003; Fuchs *et al.,* 1998; Gould *et al*., 1998; Gould *et al*., 1997). Es scheint sich dabei um einen durchgängigen Effekt zu handeln, der sich unabhängig von Spezies, Art des Stresses oder Alter der Tiere nachweisen lässt (Mirescu and Gould, 2006). In diesem Zusammenhang hat Stress wahrscheinlich eine pathogenetische Bedeutung für

Beeinträchtigungen der Kognition und affektive Störungen, da er in der Lage ist, diese herbeizuführen oder zu verschlimmern (McEwen, 2005; Nemeroff and Vale, 2005).

Einer der bedeutendsten Mediatoren von körperlichen Reaktionen auf Stress ist das Hormon Corticosteron bei Nagetieren, beziehungsweise Cortisol bei Menschen. Im Zusammenhang mit Neurogenese finden Corticosteroide in der Literatur immer wieder Erwähnung. In erhöhter Blutkonzentration, so wie das zum Beispiel bei akutem oder chronischem Stress der Fall sein kann, werden sie von vielen Forschungssgruppen für einen ausgeprägt reduzierenden Effekt auf hippokampale Neurogenese verantwortlich gemacht (Mirescu *et al.,* 2006; Montaron *et al.,* 2003; Cameron and McKay, 1999; Montaron *et al*., 1999; Cameron *et al*., 1998; Gould *et al*., 1997; Cameron and Gould, 1994). Deshalb scheint Corticosteron der Hauptmediator in der Vermittlung des Einflusses von Stress auf adulte Neurogenese zu sein.

Allerdings ist die Korrelation zwischen Corticosteron-Konzentration und Proliferationsrate in der SGZ nicht immer gegeben. Unter bestimmten Konditionen ist vermehrte Neurogenese trotz erhöhter Corticosteron-Serumspiegel beobachtbar, sodass von der Aktivierung von Mechanismen ausgegangen werden muss, die die negativen Effekte des Corticosterons überwiegen.

Auf die komplizierte Beziehung zwischen Corticosteroiden und Neurogenese wird im Verlauf dieser Einführung noch eingegangen werden.

1.3 Teilschritte adulter Neurogenese

Betrachtet man den Prozess der Neurogenese genauer, so kann man diesen in drei Teilprozesse aufgliedern: Proliferation von Vorläuferzellen, Differenzierung der unreifen Zellen und Überleben („*Survival*“) der reifen, ausdifferenzierten Zellen.

Neurogenese beeinflussende Faktoren haben einen zum Teil sehr selektiven Einfluss auf diese Teilschritte der Zellentwicklung. Während freiwillige,

physikalische Aktivität Proliferation, Differenzierung und Überleben der Zellen im Gyrus dentatus fördert, hat eine reizreiche Umgebung zum Beispiel vor allem einen Effekt auf das Überleben der neu gebildeten Zellen. Die Administration von Antidepressiva wirkt wiederum vor allem Proliferations-steigernd (Sairanen *et al.,* 2005; Malberg *et al.,* 2000).

Allein die mit mitotischen Markern gemessene Proliferation im Gyrus dentatus zu bestimmen reicht nicht aus, um Neurogenese zu untersuchen. Damit statt Neurogenese nicht zelluläre Neogenese ohne weitere Differenzierung untersucht wird, ist es notwendig, die Phänotypen der neu gebildeten Zellen zu untersuchen. Dies kann mit Hilfe so genannter „Marker" durchgeführt werden. Hierbei handelt es sich um Moleküle, die sich durch Immunfluoreszenzfärbungen sichtbar machen lassen und jeweils mehr oder weniger spezifisch für bestimmte Eigenschaften der Zellen, wie zum Beispiel Zelltyp, Reifegrad und Aktivitätszustand sind. So lassen sich die Zellen der neuronalen oder glialen Linie zuordnen, und auch der Entwicklungsstand, z.B. ob es sich um eine Stamm- oder Vorläuferzelle oder reifere Zelle handelt, kann bestimmt werden.

Zuvor erhobene Daten zeigen, dass sich mit Hilfe dieser Marker mehrere spezifische Schritte in der neuronalen Entwicklung einer Zelle identifizieren lassen.

Der Ursprung der neu gebildeten Zellen scheint ein astrozytenähnlicher Zelltyp zu sein (Ming and Song, 2005; Alvarez-Buylla and Lim, 2004; Kriegstein and Götz; 2003; Doetsch *et al.,* 1999) der vermutlich von radialer Glia abstammt (Steiner *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007; Bonfanti *et al.,* 2006; Seri *et al.,* 2004; 2001).

Durch Verwendung von Gehirngewebe einer transgenen Maus lassen sich diese, radialer Glia ähnlichen Stammzellen identifizieren. In diesem transgenen Mausmodell (Yamaguchi *et al.,* 2000) synthetisieren Zellen unter dem Nestin-Promoter ein grün-fluoreszierendes Protein (GFP). Nestin ist ein intermediäres Filament, dessen Expression als spezifisch für cerebrale Stammzellen gilt (Lendhal *et al*., 1990).

Durch die Visualisierung von Nestin-GFP lassen sich die Vorläuferzellen sehr gut mit dem Mikroskop untersuchen. Bei der genaueren Untersuchung dieser Zellen wurde deutlich, dass es sich bei der Nestin-GFP-exprimierenden Zellpopulation in der SGZ um eine heterogene Zellpopulation handelt. Im Gyrus dentatus dieser Mäuse konnten Nestin-GFP exprimierende Typ-1 Zellen lokalisiert werden, die sehr viele astrozytäre Charakteristika aufweisen und den von Seri et al. beschriebenen, radialer Glia ähnelnden Zellen entsprechen könnten (Filippov *et al.,* 2003). Diese Zellen haben ein großes, triangulär geformtes Soma und ein langes, bis in das Stratum moleculare reichendes Axon, dass sich im Stratum granulare baumartig aufzweigt. Weiterhin exprimieren sie „*glial fibrillary acid protein*" (GFAP), einen astrozytären Marker, den Stammzellmarker Sox2 sowie *brain lipid-binding protein* (BLBP) (Steiner *et al.*, 2006), ein Protein, dessen Expression charakteristisch für radiale Glia ist (Feng *et al.*, 1994).

Typ-1 Zellen machen zwar den größten Teil der Nestin-exprimierenden Zellen aus, zeigen aber insgesamt eine sehr geringe Teilungsaktivität (Filippov *et al.,* 2003). Pathogene Reize wie Hypoxie oder die Auslösung epileptischer Anfälle können die proliferative Aktivität dieser Zellen allerdings erhöhen (Kunze *et al*., 2006; Huttmann *et al*., 2003). Neurogene Stimuli wie die Exposition der Tiere gegenüber ENR oder RUN beeinflussen ihre Proliferationsrate nicht, sodass die Population in ihrer Ausdehnung normalerweise sehr stabil bleibt (Kronenberg *et al.,* 2003). Vermutlich wird durch die proliferationsträgeren Typ-1 Zellen der Nachschub an teilungsaktiveren Typ-2 Zellen gewährleistet (Seri *et al*. 2004, 2001).

Im Gegensatz dazu stehen Typ-2 Zellen, die ein kleineres rundliches Soma und keine oder nur sehr kurze tangentiale Zellfortsätze besitzen. Sie sind stark mitotisch aktiv und reagieren auf externe neurogene Stimuli wie zum Beispiel freiwillige physikalische Aktivität mit erhöhter Zellteilung (Kronenberg *et al.,* 2003).

Die Population der Typ-2 Zellen ist heterogen und kann mit Hilfe von Markern und elektrophysiologischen Untersuchungen in Typ-2a und Typ-2b Zellen eingeteilt werden. Typ-2a Zellen exprimieren wie Typ-1 Zellen die

Stammzellmarker Nestin und Sox2, sowie BLBP (Steiner *et al.*, 2006) und sind durchgehend negativ für neuronale Zellmarker. Typ-2b Zellen hingegen exprimieren nur zu einem sehr geringen Teil BLBP und Sox-2. Neben Nestin sind sie vor allem für neuronale Marker wie Doublecortin (DCX) (Brown *et al.,* 2003) und *polysialylated neural cell adhesion molecule* (PSA-NCAM) immunoreaktiv. Die Immunoreaktivität der beiden neuronalen Marker DCX und PSA-NCAM überlappt vollständig, weshalb diese in der Differenzierung von Typ-2a und Typ-2b Zellen einander äquivalent sind.

Elektrophysiologische Untersuchungen konnten eine Subpopulation der Typ-2 Zellen identifizieren, die als weiteres neuronales Merkmal Natriumkanäle ausbildet und wahrscheinlich Typ-2b Zellen entspricht (Wang *et al.*, 2005; Filippov *et al.*, 2003; Fukuda *et al.*, 2003). Auf dieser Ebene der Entwicklung projizieren GABAerge Afferenzen auf die neu gebildeten Zellen (Wang *et al.*, 2005) und die Aktivierung dieser unterstützt ihre weitere neuronale Differenzierung (Ge *et al.*, 2006; Tozuka *et al.*, 2005).

Im Stadium der Typ-2 Zellen findet der Übergang vom glialen zum neuronalen Phänotyp statt. Multipotente, radialer Glia ähnliche Stammzellen wandeln sich in Vorläuferzellen mit festgelegtem neuronalen Phänotyp um, erkennbar an der Abnahme der Expression von Stammzell- und glialen Markern und gleichzeitiger Zunahme der Expression neuronaler Marker (Steiner *et al.*, 2006).

Des Weiteren finden sich in der SGZ Typ-3 Zellen, die Nestin-GFP-negativ und zum allergrößten Teil Sox2-negativ sind, aber neuronale Marker wie DCX und PSA-NCAM exprimieren. Wie Typ-2 Zellen sind auch sie sehr teilungsaktiv, sodass zusammenfassend gesagt werden kann, dass die quantitative Vermehrung des Pools an hippokampalen Vorläuferzellen auf der Ebene der Typ-2a, Typ-2b und Typ-3 Zellen stattfindet (Kronenberg *et al.,* 2003).

Körnerzellen, die zwar noch unreif, aber in ein postmitotischen Stadium gelangt sind, zeigen Immunoreaktivität für Calretinin, dessen Expression während der Reifung der Neurone beendet wird und bei reifen Körnerzellen durch Calbindin ersetzt wird (Brandt *et al.,* 2003). In diesem Stadium lastet ein

hoher Selektionsdruck auf den jungen Calretinin exprimierenden Körnerzellen, da sich in dieser Phase entscheidet, ob die Zelle in das bestehende neuronale Netzwerk integriert wird. Findet die funktionelle Integration nicht statt, wird die unreife Körnerzelle durch apoptotische Mechanismen eliminiert (Biebl *et al*., 2000).

Reife granuläre Nervenzellen im hippokampalen Gyrus dentatus exprimieren Calbindin (Sloviter, 1989), ein neuronales Calcium-bindendes Protein, welches vier Wochen nach Gabe von 2-Bromo-5-desoxyuridin (BrdU) von fast allen neu gebildeten granulären Neuronen des Gyrus dentatus exprimiert wird (Kempermann *et al.,* 1997a). Die Funktion von Calbindin ist unklar. Wahrscheinlich ist aber, dass dieses Proteins in der Aufrechthaltung der Calcium-Homeostase der Zelle und der Regulation der Aktivität von Calcium-Kanälen involviert ist (Lledo *et al.,* 1992).

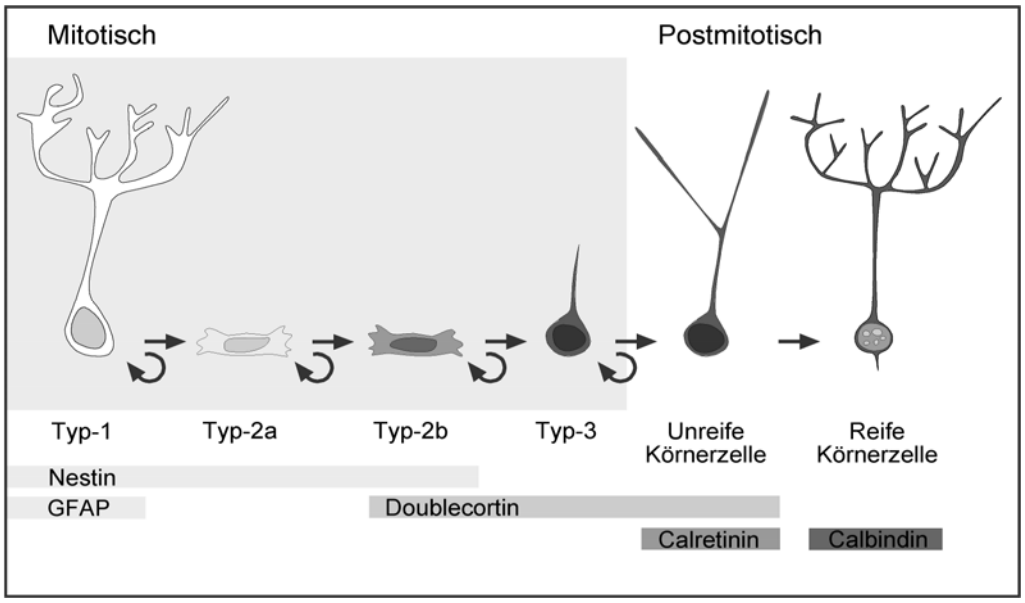

Abb. 2: Die Expression verschiedener Marker ermöglicht die Zuordnung der neu gebildeten Zellen in der SGZ des Gyrus dentatus zum neuronalen beziehungsweise glialen Phänotyp und die Bestimmung des Reifegrades (abgewandelt aus Garcia *et al.*, 2004).

1.4 Corticosteroid Hormone

Jeder Einfluss von außen, der den Körper aus der Homöostase "reißt", ruft eine Stressreaktion hervor. Ziel dieser Stressreaktion ist es, den Körper möglichst rasch wieder in seine ausgeglichene Ausgangssituation zu bringen. Vorraussetzung für diese sogenannte *Fight and Flight*-Reaktion ist die rasche Mobilisierung von Energiereserven. Dazu werden Stresshormone ausgeschüttet, unter anderem Katecholamine und Corticosteroide. Die Corticosteroidausschüttung wird über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse, im Deutschen auch HPA-Achse (abgeleitet von dem englischen *hypothalamic-pituitary-adrenal system*) genannt, kontrolliert. Der Nucleus paraventricularis (PVN), der sich im Hypothalamus befindet, beherbergt Neurone, die Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) im pulsatilem Rhythmus sezernieren, welches die Sekretion von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH) im Hypophysenvorderlappen (HVL) stimuliert. Das ACTH gelangt über die Blutbahn zur Nebennierenrinde (NNR) und ruft dort in der Zona fasciculata die Freisetzung von Corticosteroidhormonen hervor. Hypophyse und (PVN) des Hypothalamus sind die hauptsächlichen Regionen, über die Glukokortikoide den Feedback-Mechanismus auslösen. Aber auch über die Bindung an hippokampale Steroidrezeptoren bewirken sie eine Inhibition der HPA-Achse (Jacobson and Sapolsky, 1991).

Die Wirkung von Steroidhormonen ist vielfältig und wird im Wesentlichen über die Bindung an zwei verschiedene Steroidrezeptortypen vermittelt: Glukokortikoidrezetoren (GR), auch als Typ II-Rezeptoren bezeichnet und Mineralokortikoidrezeptoren (MR), bzw. Typ I-Rezeptoren. Diese beiden Rezeptortypen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Affinität zum Liganden, der Lokalisation im Organismus und ihrer Funktion. Gemeinsam ist ihnen die Art der Einwirkung auf den Metabolismus: Steroidrezeptor und Ligand bilden ein Dimer, das spezifische palindromische DNA-Sequenzen in der Promoterregion von Zielgenen erkennt und so die Gentranskription und konsekutiv Proteinsynthese beeinflusst (Beato *et al.,* 1995). Darüber hinaus verursachen sie Membraneffekte an hippokampalen Neuronen, sofern diese

sich nicht im Ruhepotential befinden, und modulieren dadurch deren elektrische Aktivität (Joëls and De Kloet, 1989).

MR und GR befinden sich sowohl im zentralen Nervensystem als auch in der Peripherie des Organismus. GR sind sowohl zentral als auch peripher ubiquitär verteilt, im Gehirn aber am zahlreichsten in CRH-sezernierenden Neuronen des Hypothalamus und in der Hypophyse vertreten. Dahingegen konzentriert sich die Lokalisation von MR auf bestimmte Regionen. Peripher sind MR vor allem in Niere, Kolon und Speicheldrüsen lokalisiert, im Gehirn finden sich MR in Regionen des Hypothalamus, die für die Regulation des Wasser- und Salzhaushaltes zuständig sind (Vallee *et al.,* 1995; McEwen *et al.*, 1986; Brody *et al.,* 1980). In allen diesen Organen binden MR selektiv Aldosteron. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass sich die höchste MR Konzentration im Hippokampus findet. Die dort befindlichen MR binden nicht nur Aldosteron, sondern auch Corticosteron und zwar mit einer circa zehnfach höheren Affinität als GR (Krozowski *et al*., 1983; Veldhuis *et al*., 1982; De Kloet *et al.,* 1975; McEwen *et al.,* 1968). Daher sind sie selbst bei basalen Blutspiegeln fast vollständig besetzt. GR haben eine niedrigere Affinität zu ihrem Liganden und binden diesen vor allem bei erhöhten Corticosteron-Spiegeln, also zum Beispiel bei akutem oder chronischem Stress, oder während diurnaler physiologischer Schwankungen des Serumspiegels.

Daraus lassen sich zwei unterschiedliche Funktionen der beiden Rezeptorentypen ableiten: Aktivierung des MR dient der basalen Aufrechterhaltung der Aktivität der HPA-Achse, Aktivierung des GR ist Teil eines Feedback-Mechanismus und führt zur Beendigung der Stressantwort, die in der Sekretion von Corticosteron besteht. So wird der Organismus vor einer zu starken Wirkung des Hormons geschützt. Weiterhin impliziert die unterschiedliche Affinität der Rezeptoren, dass bei Bindung von Corticosteron an den GR, MR stets koaktiviert sind und im Hippokampus durch diesen selben Liganden unter physiologischen Bedingungen zur gleichen Zeit zwei unterschiedliche Signalkaskaden ausgelöst werden (Reul and De Kloet, 1985). Betrachtet man deshalb die Funktion des GR, sollte die Ratio der GR/MR-

Aktivierung mit berücksichtigt werden, da eine alleinige GR-Aktivierung kaum vorkommt.

Die Bedeutung des Verhältnisses der GR- und MR-Aktivierung zueinander wird besonders deutlich, wenn man den Vorgang GR-vermittelter Apoptose betrachtet: Die Bindung von Corticosteron an GR löst eine Erhöhung der Ratio proapoptotischer Moleküle in Relation zu antiapoptotischen Molekülen aus, während die Aktivierung des MR das Gegenteil bewirkt und die Ratio dieser Moleküle sich zugunsten der antiapoptotischen Proteine verschiebt (Almeida *et al.,* 2000). Diese von Almeida et al. beobachtete Apoptose fand vor allem in der hippokampalen SGZ statt.

Was aber, wenn die HPA-Achse gestört ist und die Ausschüttung von Corticosteron zu lange anhält oder zu hoch ausfällt? Verschiedene Theorien beschäftigen sich mit der Frage, ob chronischer Stress sich schädigend auf das Gehirn auswirkt. Abgesehen von der vermehrten Ausschüttung dieses Hormons als Reaktion auf Stress, oder während diurnaler Schwankungen der Sekretion, gibt es Krankheitsbilder, die mit einer gestörten HPA-Achse und konsekutiv mit einer erhöhten Corticosteroid-Konzentrationen im Blut einhergehen können. Zu diesen zählen unter anderen neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und affektive Störungen, wie Depression (Hassan *et al.,* 1999; de Kloet *et al.,* 1998; Lupien *et al*., 1998; Sapolsky, 1998; Reagan and McEwen, 1997; Checkley, 1996; De Leon *et al.,* 1988). Auch kognitive Defizite bei älteren Menschen werden mit einer gestörten HPA-Achse und reduziertem hippokampalen Volumen in Verbindung gebracht (Lupien *et al.,* 1994). Hierbei stellt sich die Frage nach der Rolle, die das Stresshormon bei diesen Pathologien spielt.

Ob höheres Alter zu einer Erhöhung des Corticosteronspiegels im Organismus führt, wird letztendlich kontrovers diskutiert: Sapolsky et al. berichten über erhöhte Corticosteron-Spiegel in gealterten Ratten (Sapolsky *et al.,* 1992) und Lupien et al. fanden erhöhte Cortisol-Spiegel in alten Menschen vor (Lupien *et al.,* 1994). Heine et al. hingegen berichten über signifikant verminderte Corticosteron-Level in älteren Ratten (Heine *et al.,* 2003) und Dalm et al.

fanden Corticosteron-Level älterer C57BL/6-Mäuse, (dieser Stamm wurde auch von uns verwendet) ebenfalls signifikant vermindert (Dalm *et al.,* 2005). Insbesondere aber bei einer gesteigerten, GR-aktivierenden Corticosteron-Sekretion würde die Auslösung von Apoptose in der hippokampalen SGZ durch Bindung an GR eine Rolle spielen.

1.5 Corticosteroid Hormone und Neurogenese

Viele weitere Effekte von Corticosteron auf den Hippokampus und auf die dort stattfindende Neurogenese sind bekannt: Schon in den fünfziger Jahren gab es Hinweise, dass eine chronische Erhöhung von Corticosteron nicht nur die Erregbarkeit von Neuronen beeinflusst, sondern auch deren Morphologie. Selbst Veränderungen der Hippokampusproportionen wurden beobachtet. So wurde festgestellt, dass besonders hippokampale CA3-Neurone auf erhöhte Corticosteron-Konzentrationen mit Atrophie ihrer apikalen Dendriten reagieren (Clark *et al.,* 1995; Woolley *et al.,* 1990;). Gleiche Effekte lassen sich bei Ratten auch durch Stressexposition (Margarinos and McEwen, 1995; Watanabe *et al.,* 1992) hervorrufen.

Glukokortikoide haben auch auf anderer Ebene Einfluss auf Mechanismen der hippokampalen Plastizität: Zahlreiche Experimente befassen sich mit der Fragestellung, inwieweit Corticosteron auf hippokampale Neurogenese einwirkt. Wie schon vorher angeführt, wurde in mehreren Studien festgestellt, dass erhöhte Blutspiegel des Stresshormons einen hemmenden Effekt auf die Neurogeneserate im Gyrus dentatus des Hippokampus haben (Mirescu *et al.,* 2006; Montaron *et al.,* 2003; Cameron and McKay, 1999; Montaron *et al*., 1999; Cameron *et al*., 1998; Gould *et al*., 1997; Cameron & Gould, 1994).

Auch auf die Lern- und Gedächtnisfunktion des Hippokampus scheinen sich erhöhte Corticosteroid-Level auszuwirken: Selbst milder Stress beeinträchtigt die Fähigkeit von Mäusen, räumliche Gedächtnisinhalte im *Morris water maze* zu erlernen (Song *et al*., 2006). In einer von Lemaire et al. durchgeführten Studie wurden Ratten nicht nur bezüglich einer erhöhten Corticosteron-

Sekretion hin untersucht, sondern auch ihre behaviorale Reaktion auf Neuheiten in der Umgebung analysiert. Tiere, die auf Neuheiten mit vermehrter Lokomotorik und einer damit assoziierten Erhöhung des Corticosteron-Spiegels reagierten, zeigten im Vergleich zu angepassteren Tieren eine verminderte Neurogeneserate (Lemaire *et al.,* 1999). Hierbei stellt sich eine ähnliche Frage wie bei den sich möglicherweise gegenseitig bedingenden Faktoren Lernen und Neurogenese: Ist es die verminderte Neurogenese, die eine angepasste Reaktion auf die neue Umgebung verhindert, oder ist es der Stress, der Neurogenese hemmt?

Durch eine Adrenalektomie werden dem Körper Corticosteroide entzogen, da die Nebennieren die Hauptproduktionsstätte dieses Hormons sind. Experimente, in denen diese Operation durchgeführt wurde, haben gezeigt, dass die Abwesenheit von Corticosteron zu einer Proliferationssteigerung in der SGZ des Gyrus dentatus führte (Cameron and Gould, 1994). Gleichzeitig ist die Apoptoserate reifer Zellen erhöht, und somit der „Gesamtumsatz" gesteigert. In 26 Monate alten Ratten lies sich die Neurogeneserate durch Adrenalektomie sogar soweit steigern, dass sie dreimal höher war als in fünf Monate alten Kontrolltieren (Cameron and McKay, 1999). Eine Schlussfolgerung dieser Beobachtung könnte sein, dass erhöhte Glukokortikoidspiegel Neurogenese im Hippokampus alter Tiere vermindern, Stammzellen aber noch vorhanden sind und sich durch Reduktion der Corticosteron-Serumspiegel die Hemmung der Zellteilung aufhebt.

Andere Experimente weisen darauf hin, dass die Beziehung zwischen Neurogenese und Corticosteron sehr wahrscheinlich viel komplexeren Mechanismen unterliegt.

Mehrere schon erwähnte Paradigmen, wie zum Beispiel das ENR, RUN und auch das Modell der *caloric restriction* führen zu gesteigerter hippokampaler Neurogenese. Jedes dieser Modelle ist aber auch mit erhöhten Corticosteron-Serumspiegeln assoziiert (Adlard and Cotman, 2004; Benaroya-Milshtein *et al.,* 2004; Moncek *et al.,* 2004; Droste *et al.,* 2003; Makatsori *et al.,* 2003; Kempermann *et al*., 2002; Han *et al.,* 2001; Sabatino *et al*., 1991). So wurde zum Beispiel bei zehn Monate alten Mäusen, die für zehn Monate im ENR

gehalten wurden, am Ende dieser Zeit Blut abgenommen und erhöhte Corticosteron-Konzentrationen im Serum gemessen. Dennoch konnte bei diesen Versuchstieren ein Neurogenese-stimulierender - vor allem in Bezug auf das Überleben der Zellen - Effekt gemessen werden und auch die kognitiven Leistungen der alten Mäuse hatten sich im Vergleich zu Kontrolltieren verbessert (Kempermann *et al.,* 2002).

Es kann also davon ausgegangen werden, dass diese Experimente positive Effekte auslösen, die den hemmenden Einfluss von Corticosteron auf die Neubildung von Zellen überwiegen.

Die komplexe Relation zwischen HPA-Achse und Neurogenese-Regulation wird auch durch ein Experiment von Czéh et al. beleuchtet, in welchem transkranielle Magnetstimulation bei Ratten nach Exposition gegenüber Stress zwar zu einer Normalisierung der HPA-Achse führte, nicht jedoch die durch Stress ausgelöste Reduktion der Neurogenese rückgängig machen konnte. Die verminderte Proliferation der Vorläuferzellen blieb sogar nicht nur bestehen, sondern verminderte sich mit der Zeit weiter (Czéh *et al.*, 2002). Thomas et al. untersuchten in Ratten den Effekt von akutem, psychosozialen Stress auf Neurogenese und fanden eine Reduktion der Überlebensrate der neu gebildeten Neurone, ohne dass deren Proliferation quantitativ beeinflusst wurde (Thomas *et al.*, 2007).

1.6 Problemstellung und Aufgabenstellung

In der SGZ des Gyrus dentatus findet adulte Neurogenese statt (Gould *et al.,* 1999a; Kornack and Rakic, 1999; Eriksson *et. al.,* 1998; Zupanc and Horschke, 1995; Goldman and Nottebohm, 1983; Altman and Das, 1967; Altman, 1966; Altman and Das, 1965a; Altman and Das, 1965b). Stress und erhöhte Corticosteronspiegel scheinen einen stark reduzierenden Effekt auf adulte Neurogenese auszuüben (Mirescu *et al.,* 2006; Montaron *et al.,* 2003; Cameron and McKay, 1999; Montaron *et al*., 1999; Cameron *et al*., 1998; Fuchs *et al.,* 1998; Gould *et al.,* 1998; Gould *et al*., 1997; Cameron and Gould, 1994).

Dennoch gibt es auch Konstellationen, die zu einer erhöhten Sekretion von Corticosteron führen, nicht aber zu einer verminderten Neurogeneserate (Adlard & Cotman, 2004; Benaroya-Milshtein *et al.,* 2004; Moncek *et al.,* 2004; Droste *et al.,* 2003; Makatsori *et al.,* 2003; Kempermann *et al*., 2002; Han *et al.,* 2001; Sabatino *et al*., 1991).
Die Beziehung zwischen dem Stresshormon Corticosteron und der in der SGZ des Gyrus dentatus stattfindenden Neurogenese bleibt also trotz vieler Studien unklar.
Corticosteroide vermitteln den größten Teil ihrer Effekte durch Bindung an ihre Rezeptoren GR und MR.
Ob Corticosteron neu gebildete Nervenzellen und deren Vorläufer direkt beeinflussen kann, in dem es an seine Rezeptoren, GR und MR, bindet, ist bis jetzt noch nicht ausreichend untersucht worden (Cameron *et al.*, 1993).
Diese Studie hat zum Ziel, die Expression von GR und MR auf hippokampalen Vorläuferzellen und ihren Nachkommen, bis zum Stadium der ausgereiften Körnerzelle zu untersuchen, um beantworten zu können, ob Corticosteron direkten Einfluss auf diese Zellpopulationen ausüben kann.
Dazu wurden mit speziellen Zellmarkern mitotische und unreife postmitotische Zellen in der SGZ visualisiert und auf ihre GR- und MR-Expression hin untersucht.

Die Neurogeneserate sinkt mit zunehmendem Alter (Bizon and Gallagher, 2003; Cameron and McKay, 1999; Kempermann *et al.,* 1998; Kuhn *et al*., 1996; Altman and Das, 1965).

Die Frage, ob zunehmendes Lebensalter einen Einfluss auf die Ausbildung von Steroidrezeptoren in den verschiedenen Zellpopulationen während unterschiedlicher Stadien der Neurogenese hat, ist noch nicht untersucht worden.

Der zweite Teil dieser Studie beschäftigt sich mit dem Einfluss des Alters auf die Expression von GR und MR in neuronalen Vorläuferzellen und deren Nachkommen in der SGZ des Gyrus dentatus. Dazu wurden mit den gleichen Zellmarkern wie bei jüngeren Tieren hippokampale Vorläuferzellen visualisiert und auf ihre Immunoreaktivität für GR und MR hin geprüft.

Ziel dieser Erforschungen war es, durch die Untersuchung der physiologischen Situation unterschiedlich alter Tiere eine Basis für weitere, detailliertere und interventionelle Studien zu schaffen und wichtige Hinweise für ein besseres Verständnis der Regulation von Neurogenese durch Corticosteron zu liefern.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Für die Studie wurden C57BL/6 und Nestin-GFP Mäuse unterschiedlichen Alters, aber sämtlich weiblichen Geschlechts, die unter unterschiedlichen Bedingungen gehalten wurden, verwendet.
Das für die BrdU-Zeitreihe verwendete Gewebe stammte von sieben Wochen alten, weiblichen C57BL/6 Mäusen. Diese Mäuse wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen und unter Standardbedingungen gehalten.
Das Gewebe für die Färbungen zur Phänotypisierung der Zellen stammte von sieben Wochen und 20 Monaten alten, weiblichen Nestin-GFP Mäusen, die ursprünglich von Masahiro Yamaguchi, University of Tokyo, entwickelt wurden (Yamaguchi *et al.*, 2000).
Des Weiteren wurde das Gewebe von acht Tage alten, unter Standardbedingungen lebenden C57BL/6 Mäusen untersucht, von elf Wochen alten C57BL/6 Mäusen die einer reizreichen Umgebung (ENR) ausgesetzt waren und zusätzlich elf Wochen alten C57BL/6 Mäusen, die unter den Bedingungen freiwilliger körperlicher Aktivität (RUN) lebten.

2.1.2 Nestin-GFP-Mäuse

In den transgenen Nestin-GFP-Mäusen wird das verstärkte grüne Fluoreszenzprotein (GFP) unter der Kontrolle des Promotors und der regulatorischen Region des zweiten Introns des Nestin-Gens exprimiert. Dadurch zeigen alle Nestin-exprimierenden Zellen eine grüne Eigenfluoreszenz. Das aus der Qualle *Aequorea victoria* stammende GFP-Gen wirkt als Reportergen, dessen Produkt GFP angeregt durch blaues (470 nm) oder UV-Licht (395 nm) grünes Licht mit einem Emissionsmaximum von 509

nm emittiert (Prasher, 1995). Das Transgen liegt in Form mehrerer im Genom integrierter Kopien vor. Die Nestin-GFP-Expression korreliert mit den Regionen, in denen Neurogenese stattfindet (Yamaguchi *et al.*, 2000). Die gleichmäßige Verteilung von GFP im Zytoplasma und Nukleus der Zellen erlaubt es, die Morphologie der Zellen genau zu studieren, da selbst feinste Zellfortsätze sichtbar sind. Die Ansammlung von GFP in der Zelle interferiert nicht mit dem Zellmetabolismus und hat deshalb keinen Effekt auf die Zelle. GFP-exprimierende Zellen besitzen die gleiche Morphologie wie nicht GFP-exprimierende Zellen und machen dieselbe Entwicklung wie diese durch (van den Pol and Gosh, 1998).

2.1.3 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	**Zusammensetzung**
Beschichtungslösung für Objektträger	0,5% (w/v) Gelatine [Sigma] 0,05% (w/v) Chrom-Kalium-Sulfat, $CrK(SO_4) \times H_2O$ [Sigma] in destilliertem Wasser
Blockierungslösung	3% Normales Serum aus dem Esel [Chemicon] 0,1% Triton X-100 0,05% Tween 20 in TBS
0,1 M Boratpuffer	0,05 M Borsäure, H_3BO_3 [Merck] pH 8,5 in destilliertem Wasser

5-Bromo-2'-Desoxyuridin	10 mg/ml 5-Bromo-2'-Desoxyuridin [Sigma] in 0,9% (w/v) Kochsalzlösung
Cryoprotectant (CPS)	25% (v/v) Glycerol [Merck] 25% (v/v) Ethylenglycerol [Merck] in 0,1% M Phosphatpuffer
3'-Diaminobenzidin-Lösung	10 mg 3,3'-Diaminobenzidin Tablette [Sigma] 12 µl 30% (v/v) Wasserstoffperoxid, H_2O_2 [Merck] 200 µl 8% (v/v) Nickelchlorid [Merck] in 40 ml TBS
Kochsalzlösung	0,9% (w/v) Natriumchlorid, NaCl [Merck] in destilliertem Wasser
Nickelchlorid	8% (w/v) Nickelchlorid, NiCl x $6H_2O$ [Merck] in destilliertem Wasser
Paraformaldehyd	4% (w/v) Paraformaldehyd [Merck] in 0,2 M Phosphatpuffer
0,1 M Phosphatpuffer	0,02 M Natriumdihydrogenphosphat, NaH_2PO_4 x $1H_2O$ $1H_2O$ 0,12 M di-Natriumhydrogenphosphat, Na_2HPO_4 x $1H_2O$ $1H_2O$ [AppliChem] auf 1 l destilliertes Wasser
Polyvinyl Alkohol (PVA)/ 1,4	1,25 g 1,4 Diazabicyclo[2.2.2]octan [Sigma]

Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO)	12 g Glycerol (100%) [Merck] 4,8 g Polyvinyl Alkohol [Sigma] 12 ml destilliertes Wasser 24 ml Trizma® Hydrochlorid [Sigma] pH 8-8,5
Saccharose	30% (w/v) Saccharose [Merck] in 0,1 M Phosphatpuffer
Salzsäure	2N HCL, Salzsäure [Roth] in destilliertem Wasser
TBS	0,1 M Trizma® Hydrochlorid, $C_4H_{11}NO_3$ x HCL [Sigma] pH 7,5 0,02 M Trizma® Base [Sigma] 0,155 M Natriumchlorid [Merck] in destilliertem Wasser
Triton X-100	0,1% Triton X-100 (v/v) [Sigma] in destilliertem Wasser
Tween 20	0,05% (v/v) Tween 20 [Serva] in destilliertem Wasser
0,6% Wasserstoffperoxid	30% (v/v) Wasserstoffperoxid, H_2O_2 [Merck] in TBS

2.1.4 Primäre Antikörper

Antikörper (Spezies) [Herkunft]	**Verdünnung**
Anti-Bromdesoxyuridin, BrdU; (Ratte) [Biozol]	1 : 500
Anti-Calbindin (Kaninchen) [Swant]	1 : 250
Anti-Calretinin (Kaninchen oder Maus) [Swant]	1 : 250
Anti-Doublecortin, DCX; (Ziege) [Santa Cruz Biotechnologies]	1 : 200
Anti-Glukokortikoidrezeptor, GR; (Kaninchen) [Abcam]	1 : 50
Anti-Mineralokortikoidrezeptor, MR; (Ziege) [Santa Cruz Biotechnologies]	1: 50
Anti-Polysialylated cell adhesion molecule, PSA-NCAM; (Maus) [Chemicon]	1 : 400

2.1.5 Sekundäre Antikörper

Die eingesetzten sekundären Antikörper wurden von Jackson Laboratories (Vertrieb: Dianova, Hamburg) bezogen und alle in einer Verdünnung von 1:250 verwandt. Sämtliche sekundären Antikörper stammten aus dem Esel und waren gegen das Fc-Fragment von Antikörpern aus der Ratte, der Maus, der Ziege oder dem Kaninchen gerichtet. Sie waren zur Verwendung für Immunfluoreszenzfärbungen entweder mit FITC, Rhodamine-X oder CY-5 konjugiert und für die Durchführung von immunhistochemischen Färbungen mit Biotin/SP.

2.2 Versuchsaufbau und -bedingungen

2.2.1 Haltung der Versuchstiere

Die C57BL/6 und Nestin-GFP Mäuse wurden im selben Raum, nach Stamm getrennt, zu viert oder zu fünft in Standardkäfigen gehalten. Der Tag-Nacht-Zyklus betrug 12 Stunden, wobei das Licht von 6-18 Uhr an- und von 18-6 Uhr ausgeschaltet war. Die Mäuse hatten ad libitum Zugang zu Nahrung und Wasser. Die Tierkäfige wurden einmal pro Woche gereinigt und die Streu ausgewechselt.

2.2.2 Standardlaborbedingungen

Mäuse, die unter Standardlaborbedingungen gehalten wurden, waren zu viert oder fünft in Standardtierkäfigen untergebracht und hatten freien Zugang zur Nahrung. Außer Streu, Futter- und Wasservorrichtungen waren in diesen Käfigen keine weiteren Gegenstände enthalten.

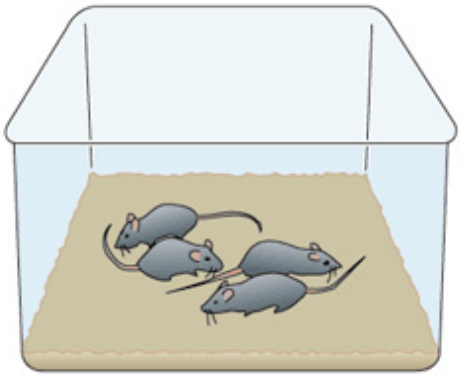

Abb. 3: Standardlaborbedingungen (Abbildung aus van Praag *et al.*, 2000).

2.2.3 Bedingungen einer reizreichen Umgebung

Jeweils acht Mäuse wurden gemeinsam in einem Käfig gehalten, der den Bedingungen einer reizreichen Umgebung entsprach. Die Käfige besitzen eine Grundfläche von 80 cm x 80 cm und sind mit verschiedenen Gerätschaften bestückt. Zu diesen zählen zum Beispiel ein Tunnelsystem, bestehend aus drei Röhren, und Metallstücke, die als Klettermöglichkeiten dienen. Die Anordnung der Röhren wurde 1-2 mal wöchentlich verändert. Außerdem wurden Papiertücher, die von den Mäusen zum Nestbau verwendet werden mehrmals pro Woche in den Käfig gelegt und dabei die alten Tücher entfernt. Pflege und Nahrungsbedingungen der Tiere unterschieden sich nicht von Kontrollbedingungen.

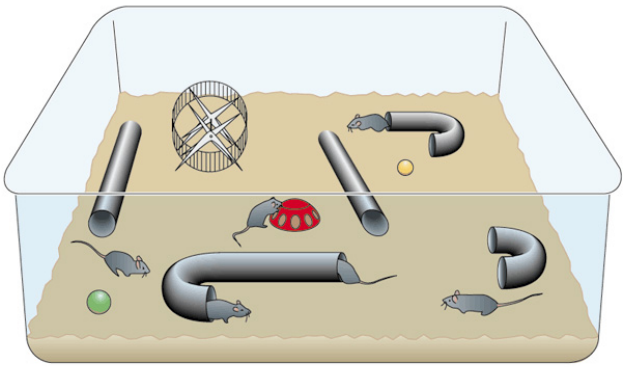

Abb. 4: Bedingungen einer reizreichen Umgebung (ENR) (Abbildung aus van Praag *et al.*, 2000).

2.2.4 Bedingungen freiwilliger körperlicher Aktivität

RUN-Mäuse des C57BL/6-Stammes lebten in einem Käfig mit Standardgröße. Zwei bis drei Tiere wurden in einem solchen Käfig unter den gleichen Nahrungsbedingungen wie Kontrolltiere gehalten. In diesem Käfig war ein Laufrad platziert, zu dem die Mäuse Tag und Nacht freien Zugang hatten.

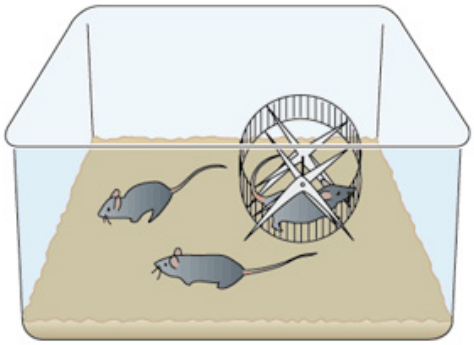

Abb. 5: Bedingungen körperlicher Aktivität (RUN) (Abbildung aus van Praag *et al.*, 2000)

2.2.5 Experimentelles Design

2.2.5.1 Experimentelles Design der Zeitreihe

Um die neu gebildeten Zellen im Gyrus dentatus zu verschiedenen Zeitpunkten auf die Expression von GR und MR hin zu untersuchen, wurden jeweils fünf bzw. sechs weibliche, sieben Wochen alte Mäuse des C57BL/6 Stammes, fünf verschiedenen Gruppen zugeordnet. Den einzelnen Gruppen wurden unterschiedliche Zeiträume zwischen BrdU-Verabreichung und Tötung zugeordnet. Ausgewählt wurden folgende Zeitpunkte: Vier Stunden, ein Tag, drei Tage, sieben Tage und vier Wochen nach Gabe des BrdUs. Jede Maus erhielt eine einmalige, intraperitoneal vorgenommene BrdU-Injektion (50 mg BrdU/ kg Körpergewicht) und wurde dann, je nach Gruppenzuteilung, zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der BrdU-Injektion getötet. Diese Mäuse wurden unter Standardbedingungen gehalten.

2.2.5.2 Experimentelles Design zur Phänotypisierung der Nestin-GFP-positiven Zellen in Nestin-GFP-Mäusen

Die Nestin-GFP Mäuse wurden ebenfalls unter Standardbedingungen gehalten, erhielten aber keine BrdU-Injektionen, da in diesen Tieren weder Proliferation noch Überleben der neu gebildeten Zellen untersucht werden sollte. Dadurch wurde eine unnötige Stressexposition vermieden, die eventuell die Rezeptorexpression im Sinne einer Hochregulation hätte verändern können (Ahmed and Korz, 2006).

2.2.6 *In vivo* Markierung proliferierender Zellen mit BrdU

2.2.6.1 Allgemeines

5-Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU) ist ein Thymidin-Analogon und wird während der Synthesephase von Zellen kompetetiv in die zelluläre DNA integriert. Durch Bindung von spezifischen Antikörpern an BrdU kann es immunhistochemisch und in Immunfluoreszenzfärbungen sichtbar gemacht werden. BrdU hat eine kurze Bioverfügbarkeit, sie liegt bei etwa zwei Stunden (Takahashi *et al.*, 1992). Daher kann davon ausgegangen werden, dass eine BrdU-inkorporierende Zelle, ihre DNA in dem Zeitraum repliziert haben muss, in dem BrdU bioverfügbar war (Kuhn *et al.*, 1996; Nowakowski *et al.*, 1989). Der Zeitpunkt der Zellteilung ist daher bekannt.

2.2.6.2 Herstellung der BrdU-Lösung und Injektion

BrdU wurde bei -20ºC gelagert und wenige Stunden vor der Applikation durch Zugabe von 0,9% NaCl Lösung in einer Konzentration von 20mg BrdU/ml in Lösung gebracht. Die Injektion der BrdU-Lösung (50mg/kg KG) erfolgte intraperitoneal. Um auszuschließen, dass die Injektion intravasal, intraintestinal oder intravesikal erfolgte, wurde die korrekte Position der Kanüle durch vorherige Aspiration mit der Spritze überprüft.

2.3 Gewebepräparation

2.3.1 Perfusion

Um in Körper und Gehirn befindliches Blut der Maus zu entfernen und das Gewebe zu fixieren, wurden die Mäuse perfundiert.

Dazu wurde nach tiefer Analgosedierung der Mäuse durch eine überdosierte intraperitoneale Injektion mit dem Injektionsnarkotikum Ketaminhydrochlorid (Exalgon® 1000, Merial), eine Sternotomie vorgenommen und so ein Zugang zum Herzen hergestellt. Das rechte Atrium wurde eröffnet und anschließend der linke Ventrikel eingeschnitten. Durch die Inzision wurde eine Kanüle bis in die Aorta ascendens vorgeschoben und mit einer Klemme fixiert. Über ein angehängtes Infusionsbesteck, angetrieben durch eine Pumpe, wurde der große Kreislauf der Mäuse erst mit 50 ml 0,9% Natriumchloridlösung und anschließend mit 150 ml kaltem 4% Paraformaldehyd in 0,1M Phosphatpuffer gespült.

2.3.2 Entnahme der Gehirne

Im Anschluss an die Perfusion wurden die Mäuse dekapitiert und die Schädelkalotte durch Schneiden entlang der Schädelnähte eröffnet und abgehoben, um das Gehirn zu präparieren und entnehmen.

2.3.3 Postfixation und Kryoprotektion

Das Gehirn wurde zur weiteren Fixierung für 24 Stunden bei 4ºC in 4% Paraformaldehyd in 0,1M Phosphatpuffer gelagert und anschließend für 24 Stunden bei 4°C in 30% Saccharoselösung entwässert, um eine Zerstörung der Zellen beim Einfrieren zu verhindern.

2.3.4 Anfertigung von Schnittserien der Gehirne

Auf einem mit Trockeneis gekühlten Kupferblock wurden an einem Schlittenmikrotom (Leica) von den Gehirnen koronare Schnittserien erstellt,

wobei die Dicke eines einzelnen Schnittes 40 µm betrug. Die rechte Hemisphäre wurde vorher durch eine geringfügige Inzision markiert.

2.3.5 Lagerung der Hirnschnitte

Die Gehirnschnitte wurden bei -20ºC in einer Kälteschutzlösung mit 25% Glycerin und 25% Ethylenglykol in Phosphatpuffer (v/v) bis zur Weiterverwendung gelagert.

2.4 Immunohistochemie und Immunfluoreszenz

2.4.1 Vorbehandlung der Schnitte

Um die Kälteschutzlösung aus den Gehirnschnitten zu entfernen, wurden die Schnitte zuerst in TRIS-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) für jeweils fünf Minuten zweimal gewaschen. Damit bei späteren Arbeitsschritten hinzugegebene anti-BrdU-Antikörper an das in die DNA inkorporierte BrdU binden können, muss die DNA vorher denaturiert werden. Dazu wurden die Gewebeschnitte für 30 Minuten bei 37ºC mit 2N HCL inkubiert. Danach wurden die Schnitte zehn Minuten in 0,1M Boratpuffer gewaschen (pH 8,5, Raumtemperatur) und anschließend folgte ein sechzigminütiger Waschschritt in TBS, welches alle fünf Minuten ausgewechselt wurde.

2.4.2 Immunfluoreszenz und Immunhistochemie

Die Gehirnschnitte wurden nun für 30 Minuten in einer Lösung inkubiert, die zu 96 vol% aus TBS, 1 vol% Triton X-100 10% und 3 vol% Eselserum (TBS-plus) bestand.

Durch das beigefügte Detergenz Triton X-100 werden lipophile Strukturen, wie zum Beispiel die Zellmembranen aufgelöst. Dieser Vorgang ist notwendig, damit die zur Färbung verwendeten Antikörper an intrazellulär gelegene Antigene binden können.

Durch unspezifische Bindungen der Antikörper an Gewebestrukturen kann in einer immunhistochemischen Färbung ein störender Hintergrund entstehen, der die Färbung undeutlicher werden lässt. Um diese unspezifische Reaktion zu vermindern, wird Serum derjenigen Tierspezies verwendet, aus der der Sekundärantikörper stammt. Durch die Zugabe des Serums werden unspezifische Antikörperbindungsstellen abgesättigt und die Spezifität der Färbung erhöht. Da bei unseren Färbungen in Eseln gewonnene Sekundärantikörper verwendet wurden, wurde die TBS-plus Lösung mit Serum von Eseln versetzt.

Anschließend folgte das Zusammenbringen der Schnitte mit den in 2.1.4 beschriebenen Primärantikörpern. Dazu wurde eine Lösung der Primärantikörper mit TBS-plus mit vom verwendeten Primärantikörper abhängigen, verschiedenen Verdünnungen (siehe 2.1.4) hergestellt. In dieser Lösung wurden die Schnitte bei 4ºC für 48 Stunden unter ständigem Schütteln inkubiert.

Danach wurden die Gehirnschnitte zweimal für jeweils 15 Minuten in TBS gewaschen, um nicht gebundene, überschüssige Primärantikörper zu entfernen. Anschließend wurde das Gewebe erneut mehrmals in TBS-plus gewaschen, um unspezifische Bindungsstellen zu besetzen und so die Anfärbung des Hintergrundes zu verringern.

Dann kam es zur Inkubation der Schnitte mit den jeweiligen Sekundärantikörpern. Dazu wurden in einem nächsten Schritt die Schnitte in einer aus TBS-plus und den Sekundärantikörpern (in einer Verdünnung von 1:250) bestehender Lösung, verwahrt. In dieser Lösung verblieben die Schnitte für 2 Stunden bei Raumtemperatur, wodurch eine Kopplung von Sekundärantikörpern und Fc-Fragmenten der Primärantikörper ermöglicht wurde.

An die Sekundärantikörper sind entweder Fluoreszenzmoleküle gekoppelt (FITC, Rhodamin-X oder CY-5) oder, wie im Falle der immunhistochemischen Färbung das Vitamin Biotin/SP. Bei letztgenannter Methode wird der Umstand genutzt, dass Biotin und das Protein Streptavidin eine starke Affinität zueinander besitzen, wobei Streptavidin ist in diesem Falle wiederum an eine Peroxidase gekoppelt ist. Anschließend wird Diaminobenzidin (DAB) zugegeben, dass als chromogenes Substrat durch die Peroxidase in einer Farbreaktion umgesetzt wird.

Durch die Kopplung der Sekundärantikörper an Fluoreszenzmoleküle beziehungsweise an Biotin/SP, wird die Bindung von Primär- und Sekundärantikörpern unter dem Mikroskop sichtbar.

Der Vorteil dieser Methode im Vergleich zur Verwendung markierter Primärantikörper ist, dass bei dieser Methode durch den zweifachen Bindungsschritt eine Potenzierung der direkten und indirekten Bindungen der Antikörper an das Antigen entsteht und so das Signal der Färbung um ein Vielfaches verstärkt wird.

Nach Ablauf der zweistündigen Inkubationszeit wurden die Schnitte in TBS überführt und achtmal jeweils fünf Minuten gewaschen. Nach jedem Waschgang wurde das TBS ausgewechselt. Danach wurden die Schnitte in 0,1M Phosphatpuffer eingebracht und auf mit Glycerin beschichtete Objektträger gezogen. Nach Trocknung unter Lichtabschluss wurden diese anschließend mit PVA-DABCO (10% Polyvinylalkohol und 25% Glycerin in TBS mit 2,5% Diazabicyclo-Oktan) beschichtet, dass ein frühzeitiges Ausbleichen der Fluoreszenzmoleküle verhindert. Danach wurden die Objektträger mit einem Deckglas versehen und erneut unter Lichtabschluss luftgetrocknet.

2.5 Quantifizierung der BrdU-positiven Zellen

Die Bestimmung der absoluten Anzahl BrdU-positiver Zellen in der SGZ des Gyrus dentatus eines Gehirns erfolgte bereits in einer vorher durchgeführten Studie.

Dazu wurden in immunhistochemisch gefärbten, 40 µm dicken Schnitten alle in der SGZ des Gyrus dentatus befindlichen BrdU-positiven Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Jeder sechste Gehirnschnitt, in dem Gewebe des Gyrus dentatus enthalten war, wurde ausgewertet. Um die absolute Anzahl der sich in dieser Region befindlichen BrdU-positiven Zellen zu erhalten, wurde das Ergebnis der Auszählung mit sechs multipliziert.

2.6 Konfokale Mikroskopie

Die mit den in 2.1.4 beschriebenen Primärantikörpern erstellten Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit Hilfe eines spektralen Leica TCS-SP2 Mikroskops untersucht.

Der Vorteil der konfokalen Mikroskopie gegenüber der konventionellen Fluoreszenz-Lichtmikroskopie liegt in der Fähigkeit zur räumlichen Auflösung von Fluoreszenz-Signalen. Bei konventioneller Fluoreszenz-Lichtmikroskopie werden bei Bestrahlung mit Licht immer auch Signale aus nicht fokussierten Bereichen zurückgesendeten. Dadurch werden die begutachteten Strukturen weniger deutlich abgebildet. Beim konfokalen Mikroskop sorgt eine Blende vor dem Detektionssystem dafür, dass nur fokussierte Strukturen Fluoreszenzsignale zurücksenden, wodurch das Bild schärfer wird.

Die bei der Immunfluoreszenz verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe haben unterschiedliche Anregungs- und Emissionsmaxima, sodass mehrere Farbstoffe gleichzeitig verwendet und abgebildet werden können. Dadurch bietet die Fluoreszenzmikroskopie die Möglichkeit, das Vorhandensein mehrerer verschiedener Antigene (in dieser Studie drei verschiedene Antigenstrukturen) einer Zelle gleichzeitig darzustellen.

2.6.1 Immunotypisierung der BrdU-positiven Zellen

Die in der SGZ des Gyrus dentatus lokalisierten BrdU-positiven Zellen wurden auf ihre Immunoreaktivität für GR und MR untersucht. Dafür wurden mit dem konfokalen Mikroskop die 40 µm dicken Schichten gescannt und die Kolokalisation der BrdU-positiven Zellen mit den Immunofluoreszenzmarkern für GR oder MR ausgewertet. Da es sich bei allen drei Markern um nukleäre Marker handelt und die verschiedenen Antigenanfärbungen sich deshalb räumlich überlagern, ist die Kolokalisation von BrdU mit Anti-GR-Antikörpern und Anti-MR-Antikörpern sehr gut bestimmbar.

2.6.2 Immunotypisierung der Nestin-GFP-positiven Zellen

Nestin-GFP-positive Zellen in der SGZ des Gyrus dentatus wurden auf ihre Kolokalisation mit anderen Markern hin untersucht. Es wurden in diesen Vorläuferzellen die Expressionsmuster der Antigene DCX, PSA-NCAM, GR und MR charakterisiert.
Da GFP sich gleichmäßig in der Zelle verteilt, sind sowohl Soma als auch Zellfortsätze deutlich erkennbar. Um einen dreidimensionalen Eindruck von den Zellen zu gewinnen wurden Scans in mehreren Ebenen, so genannte Z-Schnittserien, mit dem konfokalen Mikroskop durchgeführt und die gewonnen Daten anschließend vom Computer rekonstruiert. Dadurch konnte die Immunreaktivität für verschiedene Marker den untersuchten Zellen nicht nur in einer Ebene, sondern auch in die Tiefe zugeordnet werden.

2.7 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit Statview 5.0.1. für Macintosh durchgeführt. Für alle Vergleiche wurde ANOVA angewendet. Die Ergebnisse wurden ab einem $p < 0.05$ als statistisch signifikant bewertet.

2.8 Methodenkritik

2.8.1 BrdU als Proliferationsmarker

Als Alternativverfahren zur radioaktiven Markierung proliferierender Zellen wurde BrdU von Gratzner (1982) als neue Methode entwickelt.
BrdU ist ein Thymidinanalogon und wird von der Zelle während der DNA-Synthese inkorporiert und in die DNA eingebaut. DNA-Synthese ist aber ein Prozess, der nicht nur bei der Zellteilung stattfindet, sondern ganz normaler Bestandteil des Zellumsatzes ist, nämlich in Form der DNA-Reparatur nach Schädigungen des Genmaterials, zum Beispiel durch Strahleneinwirkung. Es wurde auch über das Vorkommen von DNA-Synthese in Hepatozyten bei Anpassung einer Zelle an einen erhöhten metabolischen Bedarf berichtet (Rakic, 2002).
Aus diesen Gründen stellte sich die Frage, ob BrdU wirklich als „Proliferationsmarker“ bezeichnet werden kann und es sich vielleicht nicht doch um einen Marker ohne größere Spezifität für den Vorgang Zellteilung handelt.
Deshalb wurden BrdU und seine Eigenschaften als Marker mit weiteren Nachweismethoden für Zellteilung genauer charakterisiert und festgestellt, dass BrdU-positive Zellen auch andere Merkmale gerade stattfindender oder schon abgelaufener Mitose zeigen. So überschnitten sich die Inkorporation von BrdU in die Zelle mit dem Auftreten von retroviralen Markierungen, Mitosefiguren und dem immunhistochemischen Nachweis zellzyklus-assoziierter Proteine.
Um zu untersuchen, ob DNA-Synthese zum Zwecke der DNA-Reparatur nach Strahlenschäden zu detektierbarer BrdU-Inkorporation in Zellen führt und somit auch in postmitotischen Zellen nachweisbar wäre, wurden bestrahlte Zellen untersucht. Anhand des Ergebnisses konnte gezeigt werden, dass die Induktion von DNA-Reparatur durch Bestrahlung nicht zu einer Zunahme BrdU-positiver Zellen führt (Palmer *et al.*, 2000).

Trotzdem blieben noch Zweifel, ob Zellen, die BrdU zwar infolge von abgelaufener Mitose aufgenommen hatten, aber im Nachhinein durch programmierten Zelltod eliminiert worden waren, nicht zur Konfusion der Zahlen BrdU-positiver Zellen führen würden. Deshalb wurden BrdU-positive Zellen auf ihre Koimmunoreaktivität mit TUNEL (apoptoseassoziierte Caspasen) hin untersucht. Es konnte keine Kolokalisation festgestellt werden.
Zusammenfassend kann abgeleitet werden, dass BrdU als Marker weitgehend spezifisch für den Vorgang der S-Phase ist und die Ergebnisse bei Auszählung BrdU-positiver Zellen nicht wesentlich durch Prozesse wie DNA-Reparatur oder Zelltod nach abgelaufener Zellteilung konfundiert werden. Somit ist BrdU ein geeigneter Marker zur Untersuchung der Proliferation von Zellen in der SGZ des Gyrus dentatus (Cooper-Kuhn and Kuhn, 2002).

2.8.2 Phänotypisierung der Zellen

Die Genauigkeit der Phänotypisierung von Zellen mit dem konfokalen Mikroskop ist von verschiedenen Faktoren abhängig, so zum Beispiel von der Beschaffenheit der verwendeten Marker und von der Qualität der Färbungen.
Marker können hinsichtlich ihrer Lokalisation sehr unterschiedlich sein, so sind manche Marker vor allem nukleär lokalisiert, andere in der kompletten Ausdehnung der Zelle, also im Zytosol. Wiederum andere sind membranständig und umzeichnen den Umriss einer Zelle. Das bedeutet, dass es zwischen manchen Markern keinen so genannten „Overlay“, also eine Überlagerung, gibt und die Beurteilung der Kolokalisation der verschiedenen Immunreaktivitäten einer Zelle schwieriger werden kann.
Begegnen lässt sich diesem Sachverhalt durch Erstellung von Z-Schnittserien, die dem Verlauf der Zelle in die Tiefe folgen und einen dreidimensionalen Eindruck der Zelle schaffen. Dadurch ist die Beurteilung der Immunoreaktivitäten der Zelle zwar aufwendiger, aber gut durchführbar.
Ein weiterer, die Genauigkeit der Phänotypisierung beeinflussender Faktor ist die Qualität der Färbung. Ein starker Hintergrund erschwert die Feststellung

der Markerexpression. In den Färbungen für die Zeitreihe, in denen BrdU-positive Zellen auf ihre Immunoreaktivität für GR und MR hin untersucht wurden, war die Qualität der Färbungen unterschiedlich ausgeprägt.

2.8.3 Nestin-GFP-Transgenes Mausmodell

Von mehreren verschiedenen Forschungsgruppen wurden transgene Mausmodelle entwickelt, in denen das Markerprotein GFP unter der Kontrolle regulatorischer Regionen des Nestingens exprimiert wird (Beech *et al.*, 2004; Mignone *et al.*, 2004; Kawaguchi *et al.*, 2001; Yamaguchi *et al.*, 2000). Diese Entwicklung soll der Erleichterung der Erforschung des Phänomens Neurogenese im adulten zentralen Nervensystem dienen.
In dem in dieser Arbeit verwendeten transgenen Mausmodell (Yamaguchi *et al.*, 2000) wurde das zweite Intron des Nestingens verwendet, das der Expression von Nestin in neuralen Stamm- und Vorläuferzellen zugeordnet wird. Das erste Intron des Nestingens soll für die Determination von Muskelzellen verantwortlich sein (Zimmermann *et al.*, 1994).
Die Expression von GFP stimmte in Untersuchungen nicht in allen Fällen mit der Expression von Nestin überein. So wurden im Riechkolben GFP-positive Zellen entdeckt, die kein Nestin exprimierten (Mignone *et al.*, 2004). Auch im von Yamaguchi et al. entwickelten Mausmodell konnte diese Beobachtung bestätigt werden (Yamaguchi, 2005). Bei GFP-positiven Zellen in neurogenen Regionen kann also nicht automatisch davon ausgegangen werden, dass es sich um neurale Stamm- oder Vorläuferzellen handelt. Eine genauere Spezifizierung der Zellen, zum Beispiel durch die Anwendung weiterer zellulärer Marker ist deshalb sinnvoll.
Ein Vergleich der verschiedenen transgenen Mausmodelle, in denen unterschiedliche Nestingen-regulierende Regionen zur Konstruktion verwendet wurden, zeigt außerdem eine Abhängigkeit der GFP-Positivität von der Verwendung unterschiedlicher regulierender Regionen bei der Konstruktion des Mausmodells. Je nach Konstrukt zeigt sich, dass es nicht

immer die gleichen Zelltypen sind, die GFP-positiv sind. Beech et al., die auf Grundlage aller drei Nestingen-Introns ein transgenes Mausmodell entwickelten, konnten die Bildung von GFP nur in periglomerulären Zellen des Riechkolbens nachweisen, nicht jedoch in granulären Neuronen (Beech *et al.*, 2004).

Es gilt also, dass, obwohl es in allen Konstrukten um die GFP-Expression bei Anschaltung des Nestingens geht, die Muster der GFP-Expression bei Verwendung unterschiedlicher regulatorischer Regionen mit Vorsicht zu vergleichen sind, bzw. scheinen ein Teil der verschiedenen Modelle gar nicht miteinander vergleichbar zu sein.

Unklar ist ebenfalls, wie lange die Degradierung von GFP benötigt. Vermutet wird, dass der Zerfall von GFP länger dauert als der des Reporter-Produktes Nestin (Mellodew *et al.*, 2004; Verkhusha et al., 2003; Corish and Tyler-Smith, 1999). Somit wäre GFP länger detektierbar als Nestin, was eine quantitative Überschätzung der Nestin-positiven Zellpopulationen bedingen würde.

Auch beobachtet wurde, dass die Intensität der GFP-Positivität vom Reifegrad der Zelle abhängig ist. So konnten Mignone et al. zeigen, das Zellen, deren GFP-Fluoreszenzlevel sehr hoch war, GFAP-positiv waren, während GFP-positive Zellen mit niedrigem GFP-Fluoreszenz-Level βIII-Tubulin-, ein neuronaler Marker, positiv waren (Mignone *et al.*, 2004). Ohne genauere Klassifizierung der GFP-positiven Zellen anhand weiterer Merkmale wäre also ein Übersehen der Heterogenität dieser Zellen möglich. In dieser Arbeit wurden weitere Marker, wie zum Beispiel DCX, und morphologische Merkmale wie Größe und Form der GFP-positiven Zellen zur Unterscheidung herbeigezogen. Außerdem wurden nur in der SGZ des Gyrus dentatus lokalisierte GFP-positive Zellen berücksichtigt.

3 Ergebnisse

Der erste Teil der Experimente widmete sich der Fragestellung, ob adulte Neurogenese in der subgranulären Zone des Gyrus dentatus durch Corticosteron reguliert werden kann. Da Corticosteron die meisten seiner Wirkungen über die Bindung an zwei verschiedene Rezeptortypen, nämlich den Glukokortikoidrezeptor (GR) und den Mineralokortikoidrezeptor (MR) entfaltet, wurden die sich in der subgranulären Zone des Gyrus dentatus befindlichen, neu gebildeten Zellen auf die Expression dieser beiden Rezeptortypen hin untersucht. Dazu wurde eine BrdU-Zeitreihe durchgeführt. Weibliche, sieben Wochen alte Mäuse des Stammes C57BL/6 wurden zufällig fünf verschiedenen Gruppen zugeordnet. Jede der Mäuse erhielt eine einmalige BrdU-Injektion und wurde zu verschiedenen Zeitintervallen nach Erhalt der Injektion getötet. Die ausgewählten Intervalle für die Perfusion nach der BrdU-Injektion waren vier Stunden, ein Tag, drei Tage, eine Woche und vier Wochen. Das Gehirn-Gewebe der Mäuse wurde mit Antikörpern gegen BrdU, GR und MR in Immunfluoreszenz gefärbt und mit Hilfe des konfokalen Mikroskops ausgewertet.

Da der Proliferationsmarker BrdU während der S-Phase sich teilender Zellen in die DNA integriert wird, repräsentiert der Zeitraum vier Stunden nach BrdU-Injektion vor allem Zellen, die sich gerade im Prozess der Zellteilung befinden. Durch die anderen, länger andauernden Zeiträume werden insbesondere die überlebenden Nachkommen dieser sich anfangs teilenden und BrdU-integrierenden Zellen dargestellt. Dadurch konnte die altersabhängige Expression von GR und MR in den neu gebildeten Zellen, von den unreifen Vorläuferzellen bis zu den ausgereiften Zellstadien, untersucht werden.

Diese Methode liefert Informationen über die Expression von Corticosteronrezeptoren in neu gebildeten Zellen unterschiedlichen Alters nach der Teilung, sagt aber nichts über ihren Phänotyp aus.

Bezüglich der Fragestellung inwieweit in der SGZ neu generierte Zellen GR und MR exprimieren wurden bereits im Jahre 1993 von Cameron et al. Daten

erhoben (Cameron *et al.*, 1993). Diese Studie unterscheidet sich jedoch in vielen wesentlichen Aspekten von der von uns durchgeführten Untersuchung, im Folgenden seien nur einige davon genannt: Zum einen wurde Gewebe von Ratten verwendet. Zum anderen wurde der radioaktive Proliferationsmarker [^{3}H]Thymidin eingesetzt, der nur die Untersuchung sehr oberflächlicher Schichten des Gewebeschnittes erlaubt. Weiterhin wurden nicht nur in der SGZ neu gebildete Zellen (die Zellschicht, auf die adulte hippokampale Neurogenese im wesentlichen beschränkt ist) in die Auswertung einbezogen, sondern sämtliche [^{3}H]Thymidin-markierte, im Gyrus dentatus befindliche Zellen. Da zusätzlich keine Phänotypisierung der Zellen vorgenommen wurde, ist diese Studie hinsichtlich der Beantwortung der ursprünglichen Fragestellung als eingeschränkt zu betrachten.

Im darauf folgenden Abschnitt des Kapitels werden die Ergebnisse des zweiten Teils der Studie dargelegt. Aufgabe dieser Untersuchungen war es, die GR- und MR-Expressionsmuster der verschiedenen proliferativen Zell-populationen zu untersuchen. Diese GR- und MR-Analysen wurden in jung-adulten und in alten Mäusen durchgeführt. Um die verschiedenen Zellpopulationen voneinander zu unterschieden, wurden Marker zur Phänotypisierung dieser Zellen verwendet.

Um nicht nur den Einfluss von hohem Alter auf die Expression von GR und MR in neuronalen Vorläuferzellen in der SGZ zu untersuchen und einen Eindruck der Abhängigkeit von Neurogenese von Corticosteron während der Entwicklung zu erlangen, wurden unreife, aber bereits postmitotische hippokampale Neurone von acht Tage alten Mäusen des C57BL/6-Stammes untersucht.

Auch extrinsische neurogene Stimuli wie die Bedingungen einer reizreichen Umgebung „ENR“ und die Möglichkeit zur freiwilligen körperlichen Aktivität „RUN“, wurden auf ihr Potential, GR- und MR-Expression in neuronalen Vorläuferzellen zu beeinflussen, hin überprüft.

Im letzten Abschnitt dieses Kapitels wird ein zusammenfassender Überblick über die erhobenen Daten gegeben.

3.1 Expression von GR und MR in BrdU-markierten Zellen der SGZ

Um zu untersuchen, ob Corticosteron einen Einfluss auf proliferative Zellen und deren Nachkommen in der SGZ des Gyrus dentatus der Maus ausüben kann, wurde die GR- und MR-Expression auf BrdU-markierten Zellen in dieser Region untersucht.
Da während Neuro- und zellulärer Neogenese in der SGZ mehrere Stadien durchlaufen werden und nicht nur Proliferation, sondern auch das Überleben der dortigen Zellen einen Einfluss auf den Nettoeffekt der dort stattfindenden Produktion neuer Zellen hat, wurde eine Zeitreihe durchgeführt. Diese erlaubt Aussagen zur Expression von GR und MR im Stadium der Mitose der Zellen und des nachfolgenden Reifeprozesses.

Vier Stunden nach BrdU-Injektion

Zellen, die vier Stunden nach BrdU-Injektion BrdU inkorporiert haben, repräsentieren im Allgemeinen Zellen, die sich gerade in der S-Phase befinden.
Zu diesem Zeitpunkt wurden von dem größten Teil der mit BrdU markierten Zellen in der SGZ weder GR noch MR exprimiert (82,9 ± 7,7% Standardabweichung).
Ein geringerer Teil der Zellen exprimierte GR (17,1 ± 7,7%), keine der Zellen war nur MR-positiv. Es ist also davon auszugehen, dass Zellen in der SGZ die sich im Mitoseprozess befinden, zwar zu einem geringerem Teil GR, in keinem Fall jedoch MR exprimieren.
Die absolute Anzahl der BrdU inkorporierenden Zellen betrug zum Zeitpunkt vier Stunden 152,7 ± 20,4 Zellen, davon waren 27,1 ± 16,1 GR-positiv.

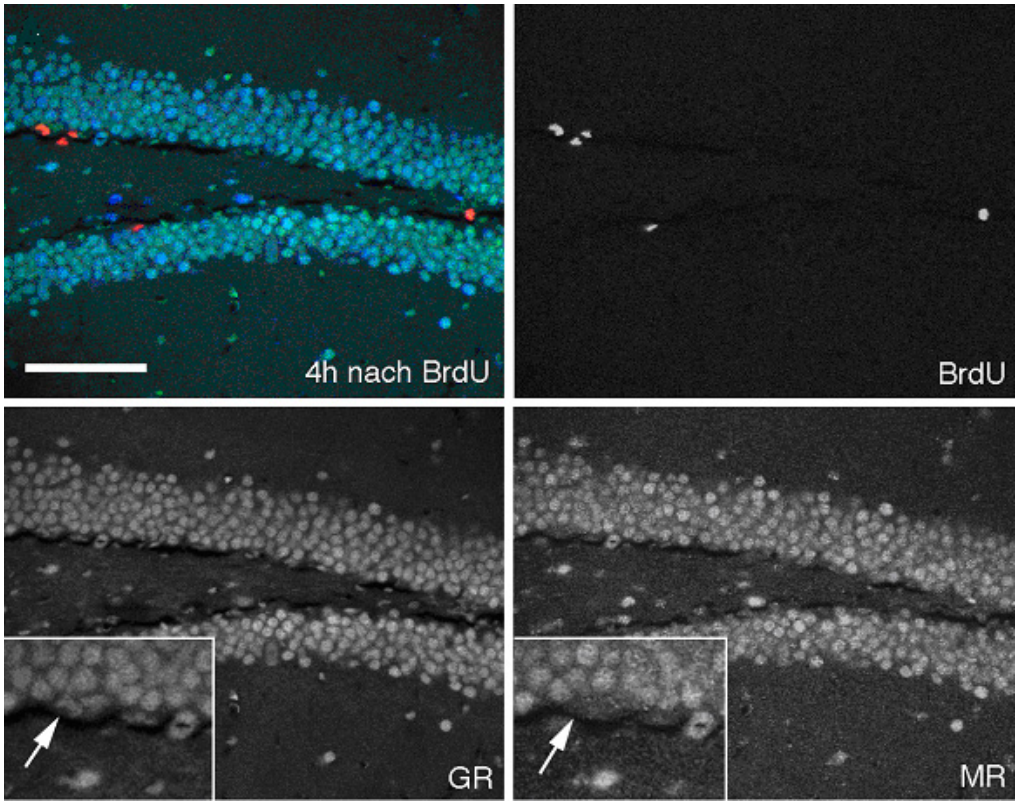

Abb. 6: GR und MR Expression in der SGZ des Gyrus dentatus der Maus: Vier Stunden nach BrdU-Injektion exprimieren einige der in der SGZ proliferierenden, BrdU-positiven Zellen GR, nicht jedoch MR. Angezeigter Maßstab 200 µm (Garcia *et al.*, 2004).

Ein Tag nach BrdU-Injektion

Im Vergleich zum Zeitpunkt vier Stunden hatte sich an der Expression der Steroidrezeptoren in BrdU-markierten Zellen der SGZ nach einem Intervall von einem Tag nicht viel verändert: 83 ± 2,9% der BrdU-positiven Zellen hatten noch keinen der beiden Rezeptoren exprimiert, 17 ± 2,9% der BrdU-markierten Zellen waren GR-positiv und keine der untersuchten Zellen bildete MR aus.

Die absoluten Zahlen der BrdU-markierten Zellen hatte im Vergleich zum Zeitpunkt vier Stunden leicht, jedoch nicht signifikant zugenommen (von 152,7 ± 20,4 auf 198,7 ± 22,2 Zellen). Dies hatte auch geringe Auswirkungen auf die absoluten Werte der BrdU- und GR-positiven Zellen: 33,3 ± 2.

Da relative und absolute Werte sich im Zeitraum vier Stunden bis ein Tag nicht wesentlich verändert hatten, ist davon auszugehen, dass es sich bei der untersuchten Population nicht um BrdU-positive Zellen transienter Natur handelte, sondern die untersuchte Population zumindest über diesen Zeitraum persistierte und auch ihr GR-Expressionsmuster sich nicht veränderte.
Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass Zellneubildung und Zelluntergang sich die Waage hielten und diese Zellen ein fast identisches GR-Expressionsmuster aufwiesen, da von Zellen inkorporiertes BrdU auch nach mehrfacher Zellteilung noch nachweisbar ist.

Drei Tage nach BrdU-Injektion

Drei Tage nach BrdU-Injektion begann die MR-Expression in BrdU-markierten Zellen in der SGZ einzusetzen. Diese trat ausschließlich in Kombination mit GR auf, sodass zu vermuten ist, dass proliferierende Zellen, die initial nur GR exprimierten nach Abschluss ihrer mitotischen Aktivität begannen, auch MR auszubilden. Der Prozentsatz BrdU-markierter Zellen, die sowohl GR- als auch MR-positiv waren, betrug drei Tage nach Injektion 27,3 ± 1,1%. Nur GR- positiv waren 7,6 ± 1,1% der BrdU-positiven Zellen und der Rest (65,1 ± 2,8%) der Zellen blieb GR- und MR-negativ.
Die absoluten Zahlen der BrdU-inkorporierenden Zellen in der SGZ des Gyrus dentatus fanden nach diesem Zeitintervall ihren Höhepunkt: Mit einem Wert von 601,7 ± 52,8 waren sie im Vergleich zum Zeitraum vier Stunden (152,7 ± 20,4) und ein Tag (198,7 ± 22,2) nach BrdU-Injektion signifikant gestiegen ($p < 0,0001$). Die absolute Anzahl der BrdU-positiven Zellen, die GR exprimierten betrug 45,9 ± 11.
164,3 ± 16,2 der BrdU-markierten Zellen in der SGZ kolokalisierten mit GR- und MR.

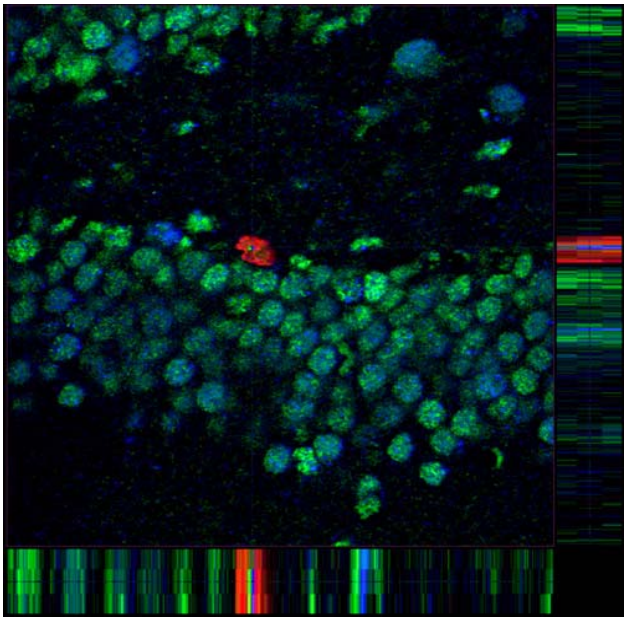

Abb. 7: BrdU-positive Zelle (rot) in der SGZ des Gyrus dentatus einer C57BL/6 Maus die drei Tage nach BrdU- Injektion sowohl GR (grün) als auch MR (blau) exprimiert.

Sieben Tage nach BrdU-Injektion

Nach sieben Tagen hatte die GR- und MR-Expression unter den BrdU-positiven Zellen deutlich zugenommen, sie betrug sieben Tage nach Erhalt der BrdU-Injektion 54,1 ± 7%.

10,5 ± 4,3% der mit BrdU markierten Zellen waren GR-positiv. Auch nach sieben Tagen waren wie schon zuvor keine nur MR-tragenden Zellen zu sehen und nur noch 35,4 ± 3,4% der Zellen waren negativ für beide Rezeptoren.

Nachdem die absoluten Zahlen BrdU-positiver Zellen in der SGZ des Gyrus dentatus am dritten Tag ihren Höhepunkt erfahren hatten, waren sie jetzt signifikant abgefallen (von 601,7 ± 52,8 auf 284 ± 27,5; $p < 0,0001$) und auch GR exprimierende Zellen waren in ihrer Anzahl geringer vertreten: 30,6 ± 15. Die absolute Anzahl GR- und MR-positiver Zellen in der SGZ betrug 152,9 ± 16,1.

Vier Wochen nach BrdU-Injektion

Vier Wochen nach BrdU-Injektion hatte sich die absolute Anzahl BrdU-markierter Zellen in der SGZ weiter verringert, sie betrug nun 65,5 ± 14,9 Zellen.

Zu diesem Zeitpunkt waren fast keine BrdU-markierten Zellen in der SGZ mehr auffindbar, die keine der beiden Rezeptortypen aufwiesen. Die meisten Zellen exprimierten beide Rezeptoren (92,9%), ein sehr viel kleinerer Teil nur GR (2,5%). Nur noch 6,1% der BrdU-markierten Zellen bildeten weder GR noch MR aus.

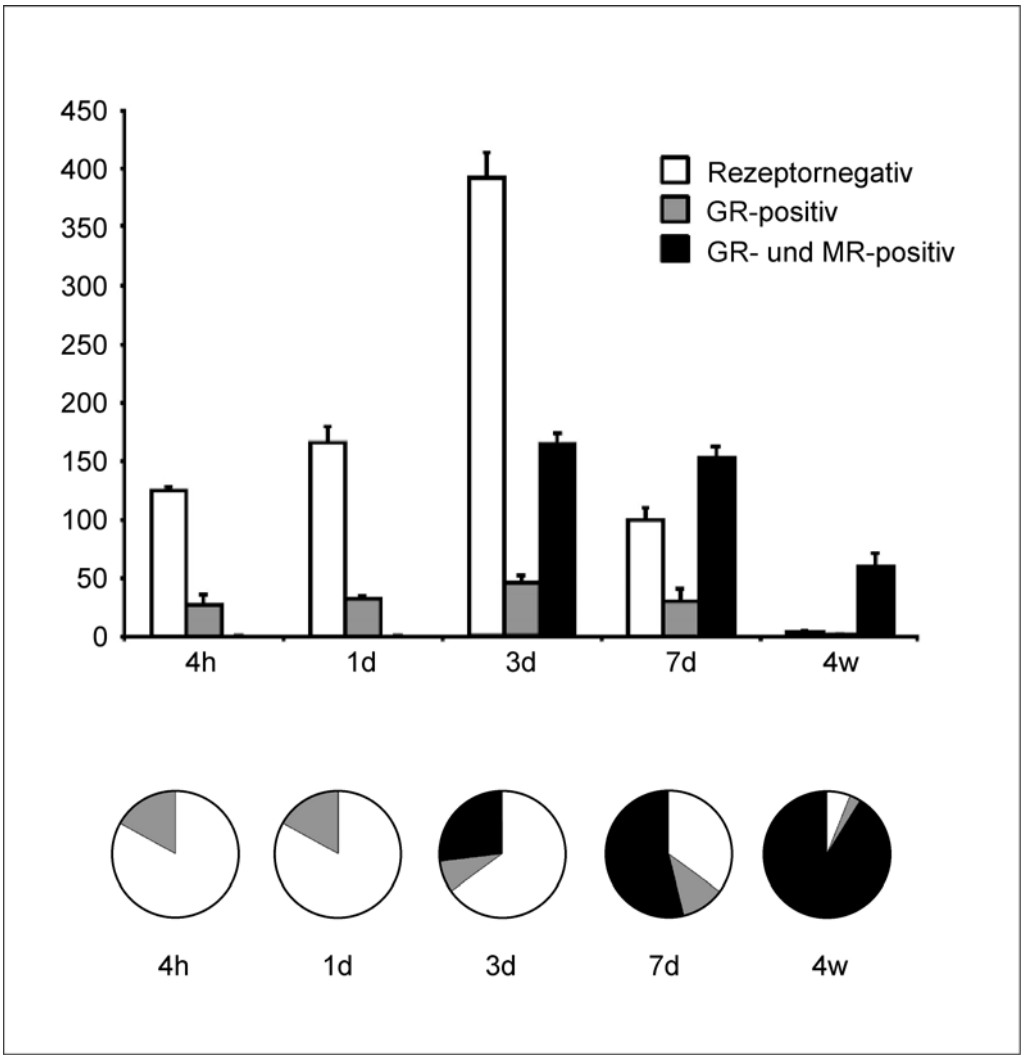

Abb. 8: Absolute und relative Werte der GR und MR Expression in BrdU-markierten Zellen in der SGZ des Gyrus dentatus der Maus (aus Garcia *et al.*, 2004).

GR- und MR-Expression in BrdU-markierten Zellen in der SGZ des Gyrus dentatus der Maus			
Zeiträume nach BrdU	**nur BrdU**	**GR**	**GR + MR**
4 Stunden	82,9 ± 7,7%	17,1 ± 7,7%	0
1 Tag	83 ± 2,9%	17 ± 2,9%	0
3 Tage	65,1 ± 2,8%	7,6 ± 1,1%	27,3 ± 1,1%
7 Tage	35,4 ± 3,4%	10,5 ± 4,3%	54,1 ± 7%
4 Wochen	6,1%	2,5%	92,9%

Tab. 1: Relative Werte der GR und MR Expression in BrdU-markierten Zellen in der SGZ des Gyrus dentatus der Maus zu verschiedenen Zeitpunkten in der Übersicht.

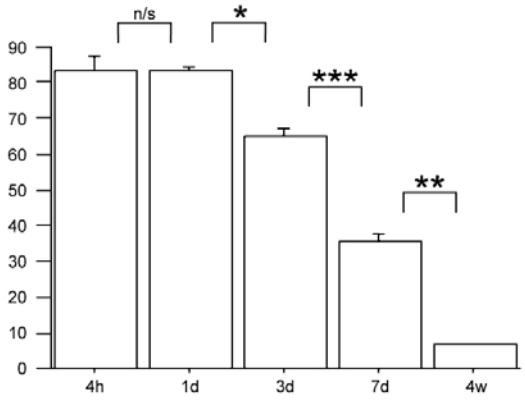

Abb. 9A: Der relative Wert der neu gebildeten Zellen, die weder GR noch MR exprimieren, hatte sich von vier Stunden zu einem Tag nicht signifikant (p = 0,9796) verändert. Im Vergleich vier Stunden zu drei Tagen nach BrdU-Gabe war die Abnahme jedoch hochsignifikant (p < 0,0001), ebenso wie die weitere Abnahme der nur BrdU-positiven Zellen von drei zu sieben Tagen (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; n/s nicht signifikant).

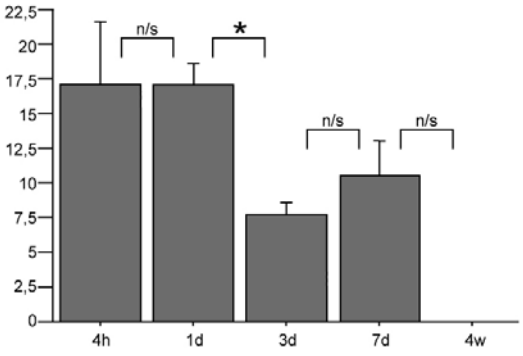

Abb. 9B (relative Werte): GR-exprimierende Zellen waren schon vier Stunden nach BrdU-Gabe detektierbar. Die Anteile nur GR expri-mierender Zellen nahmen von einem zu drei Tagen signifikant ab ($p < 0,0407$).

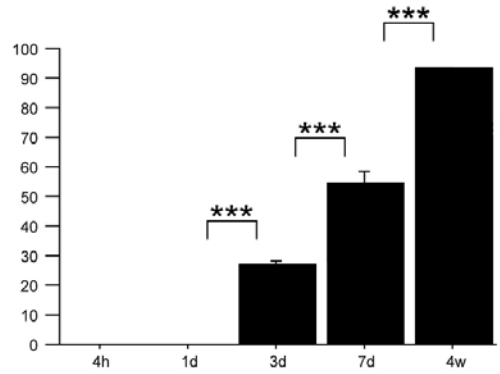

Abb. 9C (relative Werte): Die MR-Expression der Zellen war drei Tage nach BrdU-Injektion detektierbar und nur in Kombination mit der Ex-pression von GR zu beobachten. Nach Eintreten der MR-Expression nahm diese von Zeitpunkt zu Zeitpunkt jeweils

3.1.1 Zusammenfassung

Die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen am konfokalen Mikroskop zeigte, dass der Anteil der BrdU-markierten Zellen, die GR und MR ausbilden, mit Zunahme des zeitlichen Abstandes zur erfolgten BrdU-Injektion immer weiter anstieg, sodass nach einem Zeitintervall von vier Wochen fast sämtliche Zellen GR- und MR-positiv waren. Diese sowohl GR als auch MR exprimierenden reifen Zellen waren ab dem dritten Tag nach BrdU-Injektion detektierbar.

Hierbei war zu beobachten, dass die GR-Expression zeitlich vor der MR-Expression einsetzte und mitotisch aktive Zellen in der SGZ zwar zu einem Anteil GR, nie jedoch MR ausbildeten. BrdU-markierte Zellen, die nur MR, nicht jedoch GR ausbildeten, fanden sich zu keinem Zeitpunkt.

Die absoluten Zahlen der BrdU-markierten Zellen nahmen, wie schon vorher beschrieben (Biebl *et al*., 2000), ab dem dritten Tag stark ab um nach vier Wochen geringer ausgeprägt zu sein als vier Stunden nach BrdU-Injektion. Es kann davon ausgegangen werden kann, dass diese Zellen durch Apoptose eliminiert wurden.

3.2. GR- und MR-Expression in phänotypisierten Zellen jung-adulter und alter Mäuse

Um zu untersuchen, welche Zellpopulationen durch GR- und MR-Aktivierung vermittelte Corticosteron-Wirkungen beeinflusst werden können, wurde die GR- und MR-Expression in mitotischen und postmitotitischen phänotypisierten Zellen der SGZ bestimmt.
Verwendet wurde dazu Gehirngewebe eines transgenen Mausmodelles, der Nestin-GFP-Maus, in der Stamm- bzw. Vorläuferzellen eine grüne Eigenfluoreszenz aufweisen. Für die Analyse der GR- und MR-Expression in späteren Stadien der Zellentwicklung wurde das Gehirngewebe von C57BL/6 Mäusen untersucht, da durch die grüne Eigenfluoreszenz der Stammzellen in den transgenen Tieren die Farbe grün nicht mehr zur Anfärbung anderer Zellmarker zur Verfügung gestanden hätte. Es wurde also die Immunoreaktivität für GR und MR von Typ-1, Typ-2a und Typ-2b, Typ-3 Zellen in transgenen GFP-Mäusen untersucht und die von Calretinin- und Calbindin-positiven Zellen in C57BL/6 Mäusen. Da zur Differenzierung von Typ-2b und Typ-3 Zellen die Verwendung von zwei Markern, Nestin-GFP und DCX beziehungsweise PSA-NCAM, notwendig war, musste bei diesen Zelltypen die Immunoreaktivität für GR und MR getrennt ausgewertet werden. Die Untersuchungen wurden in Gewebe von sieben Wochen alten C57BL/6 und transgenen Nestin-GFP-Mäusen und in 16 Monaten alten C57BL/6 und 20 Monate alten Nestin-GFP-Mäusen durchgeführt.
Im Folgenden werden die Ergebnisse getrennt nach Zelltyp und Alter dargestellt.

Typ-1 Zellen

Typ-1 Zellen sind charakterisiert durch ihre auffällige Morphologie, die stark radialer Glia ähnelt: Ein langer, unipolarer Fortsatz reicht durch das Stratum granulare in das Stratum molekulare hinein und zweigt sich dort baumartig

auf. Sie exprimieren auch BLBP, einen Marker für radiale Glia. Des Weiteren ist ihre Immunoreaktivität für die Stammzellmarker Nestin und Sox2 und den glialen Marker GFAP charakteristisch. (Steiner *et al.*, 2006; Filippov *et al.*, 2003). Die hier untersuchten Färbungen wurden mit Antikörpern gegen GR und MR angefärbt.

Jung (sieben Wochen)

Typ-1 Zellen in sieben Wochen alten Nestin-GFP-Mäusen waren in 50.0 ± 5,8% (Standardfehler) immunoreaktiv für GR. Dabei konnte kein Zusammenhang mit Lokalisation oder Morphologie der Zellen in Abhängigkeit von ihrem GR-Expressionsmuster beobachtet werden. Keine dieser Zellen zeigte Immunoreaktivität für MR.

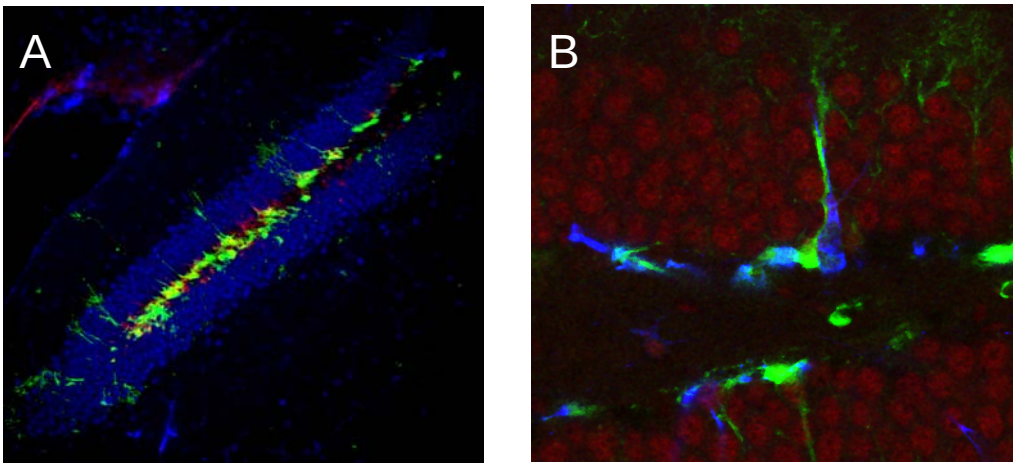

Abb. 10A: Koronare Schnittführung durch den Gyrus dentatus einer sieben Wochen alten transgenen Nestin-GFP-Maus. Die grünen Zellstrukturen entsprechen GFP-positiven Vorläuferzellen, die in der SGZ lokalisiert sind und zum Teil mit dem Marker unreifer Neurone, PSA-NCAM (rot) kolokalisieren. Blau stellen sich MR-positive, reife Körnerzellen dar, die das Stratum granulare bilden. Abb. 10B: Verschiedene GFP- (grün) und PSA-NCAM- (blau) positive Zell-populationen, die in der SGZ proliferativ aktiv sind und zu einem Teil GR (rot) exprimieren.

Alt (zwanzig Monate)

In alten Mäusen war die absolute Zahl der Nestin-positiven Zellen sehr verringert. Der prozentuale Anteil der Typ-1 Zellen, die GR exprimierten, war im Vergleich zu Jungtieren stark angestiegen, nämlich auf 77.9% ± 3.3% (Standardfehler).

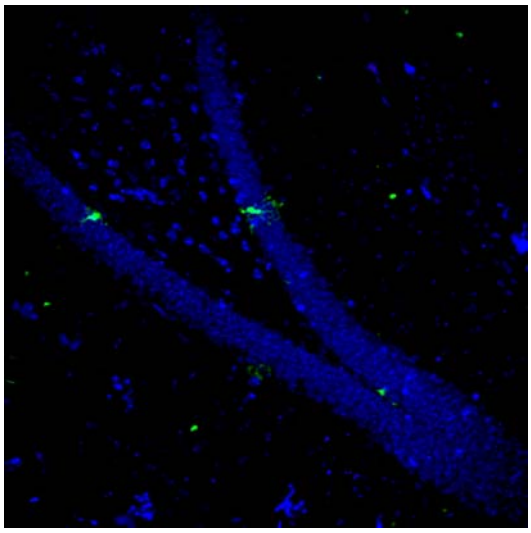

Abb. 11: Im Vergleich zu sieben Wochen alten Mäusen (siehe Abb. 7 A) hat die Anzahl der GFP-positiven Vorläuferzellen (grün) in der SGZ im Gyrus dentatus einer 20 Monate alten Nestin-GFP-Maus stark abgenommen. Unreife Neurone die PSA-NCAM exprimieren (rot) sind in dieser Schnittführung nicht zu sehen. MR stellen sich in dieser Färbung blau dar.

Typ-2a Zellen

Typ-2a Zellen sind im Vergleich zu Typ-1 Zellen kleiner, besitzen ein rundliches Zellsoma und haben nur wenige, kurze Zellfortsätze. Sie sind, wie auch Typ-1 Zellen, durch die Expression von Nestin-GFP und Sox2 und die gleichzeitige Abwesenheit einer Immunoreaktivität für neuronale Marker charakterisiert.

Jung (sieben Wochen)

Interessanterweise wiesen Typ-2a Zellen ein sehr ähnliches GR- und MR-Expressionsmuster wie Typ-1 Zellen auf: 53.0 ± 7.7% (Standardfehler) waren GR-positiv. Ebenfalls wie in Typ-1 Zellen konnte auch in diesem frühen Stadium der Zellentwicklung keine Immunoreaktivität für MR detektiert werden.

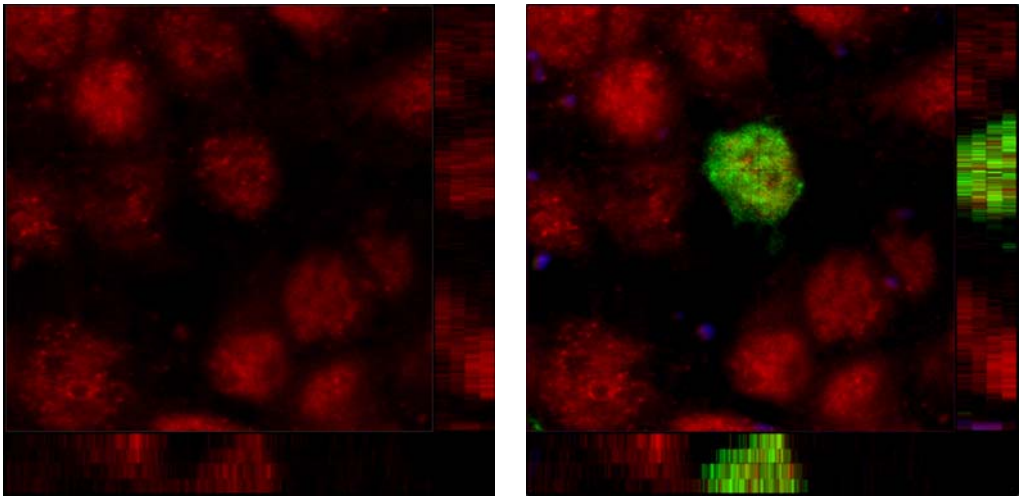

Abb. 12: Typ-2a-Zelle die EGFP (grün), nicht aber Doublecortin (blau) exprimiert und GR(rot) –positiv ist, in der SGZ des Gyrus dentatus einer sieben Wochen alten, transgenen Nestin-GFP-Maus.

Alt (zwanzig Monate)

Typ-2a Zellen in alten Nestin-GFP-Mäusen waren verglichen mit jungen Mäusen in ihrer absoluten Anzahl ebenfalls stark vermindert. Das Muster der GR-Immunoreaktivität glich dem von Typ-1 Zellen in alten Mäusen und war verglichen zu jung-adulten Tieren stark angestiegen: 79.7 ± 3.9% (Standardfehler) der Typ-2a Zellen waren GR-positiv. Keine der Typ-2a Zellen war MR-positiv.

Typ-2b Zellen

Typ-2b Zellen koexprimieren den Stammzellmarker Nestin-GFP und neuronale Marker wie DCX beziehungsweise PSA-NCAM (zwischen beiden Markern besteht eine beinahe hundertprozentige Überlappung). Bezüglich der Morphologie ähneln Typ-2b Zellen Typ-2a Zellen, sie sind relativ klein und eher rundlich geformt.

Jung (sieben Wochen)

Die Immunoreaktivität für GR und MR musste in diesem Zelltyp aus den oben erwähnten Gründen getrennt untersucht werden. Die Frage der Kolokalisation stellte sich auf Grund des Expressionsmusters aber nicht, sodass dieser Umstand keine Rolle spielte.

Alle untersuchten Typ-2b Zellen waren frei von jeglicher Immunoreaktivität für GR und MR, es konnte keine Typ-2b Zelle detektiert werden, die mit GR oder MR kolokalisierte.

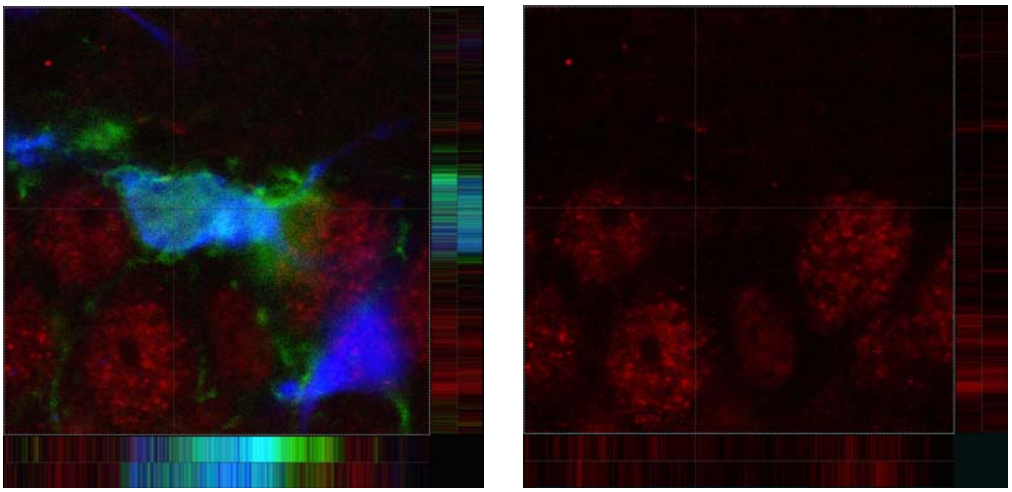

Abb. 13: Typ-2b Zellen zeichnen sich durch ihre Kolokalisation des Stammzellmarkers GFP (grün) mit Doublecortin (blau), einem Marker für unreife Neurone, aus. Typ-2b Zellen in der SGZ waren sämtlich negativ für GR (rot).

Alt (zwanzig Monate)

In alten Nestin-GFP-Mäusen waren Typ-2b Zellen sehr selten detektierbar. In manchen Tieren waren in den gefärbten Schnitten (jeder zwölfte) sogar gar keine Typ-2b Zellen auffindbar. Deshalb konnte die GR- und MR-Immunoreaktivität von Typ-2b Zellen in alten Mäusen nicht ausreichend sicher bestimmt werden. Die Typ-2b-Zellen, die detektiert wurden, waren jedoch wie auch in jungen Nestin-GFP-Mäusen der Fall, ausschließlich GR- und MR-negativ.

Typ-3 Zellen

Dieser Zelltyp wurde ebenfalls in Nestin-GFP-Mäusen untersucht. Typ-3 Zellen exprimieren neuronale Marker wie DCX und PSA-NCAM und sind gleichzeitig durch die Abwesenheit von Immunoreaktivität für Nestin-GFP charakterisiert. In einer C57BL/6 Maus wären Typ-3 Zellen aufgrund dieser Definition Typ-2b Zellen nicht abgrenzbar.

Jung (sieben Wochen)

49.3% ± 2.1 (Standardfehler) der Typ-3 Zellen waren GR-positiv. Keine der Typ-3 Zellen war immunoreaktiv für MR. Dieser Zelltyp bot also das gleich GR- und MR-Expressionsmuster wie Typ-1 und Typ-2a Zellen.

Alt (zwanzig Monate)

Auch dieser Zelltyp war in zwanzig Monate alten Nestin-GFP-Mäusen so stark rarefiziert wie auch schon Typ-2b Zellen, sodass eine ausreichend exakte Bestimmung des GR- und MR-Expressionmusters nicht möglich war.

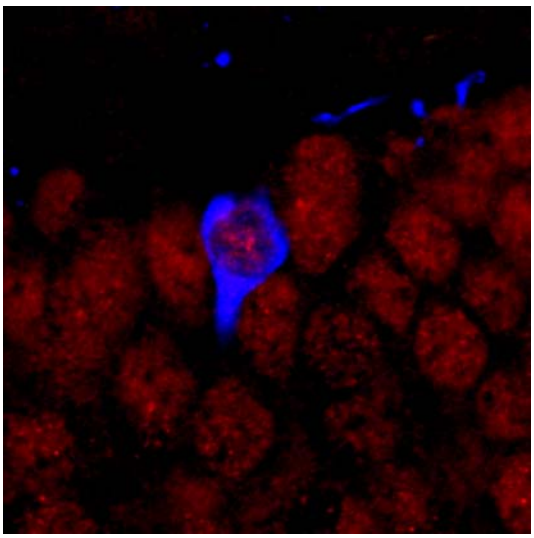

Abb. 14: GR- (rot) positive Typ-3-Zelle in der SGZ einer sieben Wochen alten Nestin-GFP-Maus, die Doublecortin (blau), einen Marker für unreife Neurone, exprimiert.

Calretinin-positive Zellen

Calretinin-positive Zellen in der SGZ des Gyrus dentatus repräsentieren unreife Körnerzellen, die nicht mehr mitotisch aktiv sind. In diesem Stadium reifen die Zellen zu fertig ausgebildeten Körnerzellen heran und unterliegen hierbei noch immer einem starken Selektionsdruck. Wesentlich für das Überleben der Zellen in diesem Stadium ist, dass sie in das bestehende neuronale Netzwerk integriert werden und in diesem eine Funktion übernehmen. Geschieht dies nicht, werden die unreifen Körnerzellen durch apoptotische Mechanismen ausgeschaltet (Biebl *et al.*, 2000). Dieser Zelltypus wurde in C57BL/6 Mäusen untersucht.

Jung (sieben Wochen)

Calretinin-positive Zellen in der SGZ in jung erwachsenen Mäusen waren sämtlich negativ für GR und MR.

Alt (16 Monate)

Bei der Untersuchung Calretinin-positiver Zellen in alten Mäusen bot sich ein verändertes Bild im Vergleich zu jungen Mäusen: Fast die Hälfte der Calretinin-positiven Zellen war immunoreaktiv für GR und MR (47.7% ± 7.7), weitere 13.3% ± 0 waren GR-positiv. Das bedeutet, dass insgesamt über 60% der Calretinin-positiven Zellen den GR exprimierte. Zusätzlich war ersichtlich, dass in den Färbungen pro Tier nur etwa 15 Calretinin-positive Zellen ausgewertet werden konnten, was in etwa der absoluten Anzahl auffindbarer Calretinin-exprimierenden Zellen entsprach. Da die Färbung jeden zwölften Gehirnschnitt enthielt, belief sich die absolute Anzahl der unreifen postmitotischen Körnerzellen auf ungefähr 180 Zellen pro Tier. Diese Anzahl ist verglichen zu Jungtieren sehr niedrig.

Calbindin-positive Zellen

Calbindin ist ein Calcium-bindendes Protein, dessen Expression spezifisch für reife Körnerzellen ist (Sloviter *et al.*, 1989). Vier Wochen nach Gabe von BrdU sind fast alle neu gebildeten Neurone positiv für Calbindin (Kempermann *et al.*, 1997a).

Jung (sieben Wochen) und alt (sechzehn Monate)

Unsere Untersuchungen zeigten, dass reife, Calbindin-exprimierende Körnerzellen im Gyrus dentatus sowohl junger als auch älterer C57BL/6 Mäuse altersunabhängig GR und MR koexprimieren.

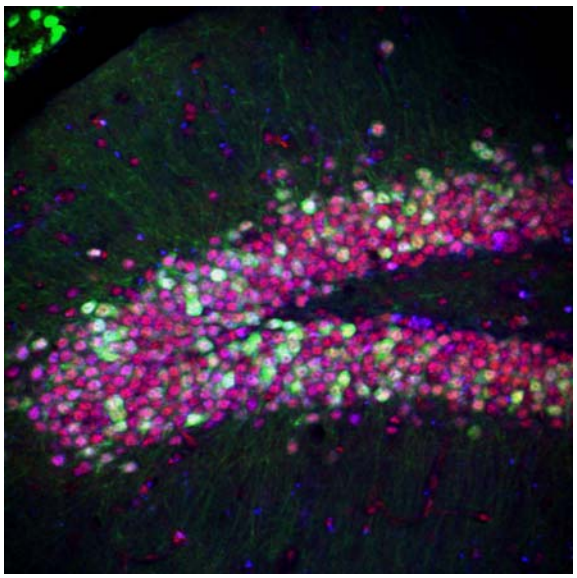

Abb. 15: Calbindin-positive (grün), reife Körnerzellen exprimieren sowohl GR (rot) als auch MR (blau). Hier ist ein koronarer Schnitt durch den Gyrus dentatus einer 16 Monate alten C57BL/6 Maus zu sehen.

Calretinin-positive Zellen in RUN und ENR

Der Befund, dass Calretinin-exprimierende Zellen in Mäusen, die unter Standardbedingungen gelebt haben, weder Immunoreaktivität für GR noch für MR aufweisen war so überraschend, dass geprüft werden sollte, ob dies auch der Fall wäre unter Bedingungen, in denen Proliferations- und Überlebensraten der neu gebildeten Zellen ansteigen.

Sowohl in Mäusen die dem Paradigma RUN als auch in Mäusen, die einer reizreichen Umgebung ausgesetzt waren, konnten in der SGZ keine Calretinin exprimierenden Zellen gefunden werden, die eine Kolokalisation mit GR oder MR aufwiesen. Neurogene Stimuli wie RUN oder ENR hatten also keinen Einfluss auf die GR- und MR-Expression in postmitotischen, unreifen Körnerzellen.

Calretinin am postnatalen Tag acht

Ungefähr zum Zeitpunkt des postnatalen Tages acht erfährt die Neurogeneserate in der SGZ des Gyrus dentatus ihren Höhepunkt. Danach fällt sie stetig ab und pendelt sich langsam auf dem Level adulter Neurogenese ein. Aber nicht nur die Quantität der Neurogenese ändert sich, sondern auch der Prozess an sich erfährt eine Transformation von embryonaler und früher postnataler Neurogenese zur adulten Neurogenese (Altman and Bayer, 1990).
Durchgeführt wurde dieser Teil der Untersuchungen, um festzustellen, ob auch zu diesem Zeitpunkt der Gehirnentwicklung Calretinin-positive Zellen GR- und MR-negativ sein würden. Dies könnte bedeuten, dass es sich bei der Verschiebung der GR- und MR-Expression in alten Mäusen vom reifen in ein früheres Stadium der Zellentwicklung um einen altersspezifischen Effekt handelt.
Auch am postnatalen Tag acht waren alle Calretinin-positiven Zellen GR- und MR-negativ. Auf Abb. 16 ist zu sehen, wir stark ausgeprägt die Immunoreaktivität für GR ist und wie der Gradient der GR- und MR-Expression der Zellen mit Zunahme der Reife der Zellen ansteigt: In der innen liegenden SGZ, in der sich die neu gebildeten und noch unreifen Neurone befinden, ist weder GR noch MR detektierbar, während weiter außen befindliche reife Neurone stark GR- und MR-positiv sind, jedoch Calretinin-negativ. Das Schema der GR-und MR-Expression in Calretinin-positiven Zellen während adulter Neurogenese in jung erwachsenen Tieren gleicht also dem, das sich am postnatalen Tag acht findet. Im Gegensatz dazu findet eine

alterspezifische Induktion der GR- und MR-Expression in 16 Monate alten Tieren statt.

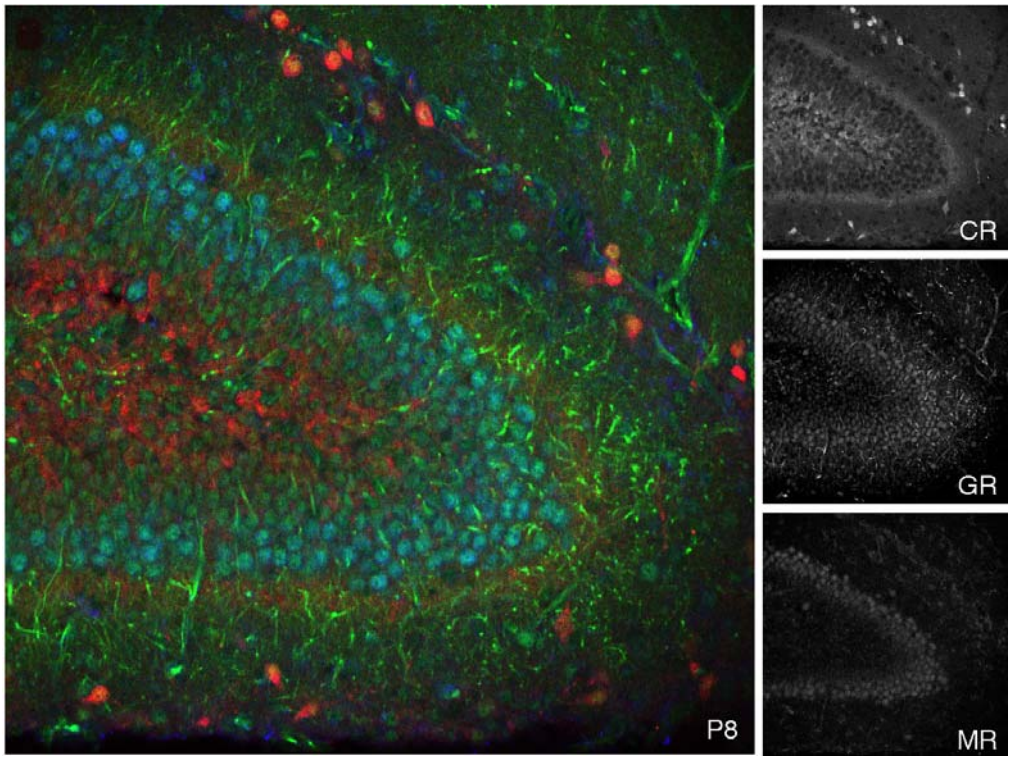

Abb. 16: Expression von GR und MR in Calretinin-positiven Zellen am postnatalen Tag 8 im Gyrus dentatus von C57BL/6-Mäusen: Während in der innen liegenden SGZ zahlreiche neu generierte und noch unreife Calretinin–positive (rot) Neurone zu sehen sind die sämtlich GR- und MR-negativ sind, exprimieren die weiter außen liegenden, reiferen Neurone sowohl GR als auch MR (aus Garcia *et al.*, 2004).

GR- und MR-Immunoreaktivität in hippokampalen Mooszellen

Abgesehen von in der SGZ lokalisierten postmitotischen aber noch unreifen Körnerzellen gibt es in dieser Region noch weitere Zelltypen, die Calretinin exprimieren. Es handelt sich hierbei unter anderem um die so genannten Mooszellen, die sich im Hilus des Gyrus dentatus befinden. Sie sind, verglichen zu Körnerzellen, ausgesprochen groß und dadurch in ihrer Morphologie sehr eindrücklich. Die Afferenzen der Mooszellen werden durch Kollateralen der Körnerzell-Axone gebildet, die so genannten Moosfasern. Die

Axone der Mooszellen sind exzitatorischer Natur und mit den Dendriten der Körnerzellen beider Hemisphären verbunden. Sie verlaufen über die Komissurenbahn (Ribak *et al*., 1985) und sind Teil eines intrinsischen, exzitatorischen Schaltkreises zwischen den Körnerzellen (Amaral and Witter, 1995) des Hippokampus (Frotscher *et al.*, 1994; Soriano and Frotscher 1994; Storm-Mathisen *et al.*, 1983).

In einer anderen Arbeit (Patel and Bulloch, 2003) wurde bereits die GR-Immunoreaktivität von Mooszellen beschrieben.

In der von uns durchgeführten Studie zeigte sich, dass hilär lokalisierte Mooszellen im Gyrus dentatus der Maus nicht nur GR- sondern auch stark MR-positiv sind. Sie verhalten sich in ihrem Expressionsmuster also wie reife, Calbindin-positive Körnerzellen. Dieses Ergebnis fand sich sowohl in sieben Wochen als auch in 16 Monate alten Tieren. Es konnte also keine altersspezifische Beeinflussung des GR- und MR-Expressionsmusters gefunden werden.

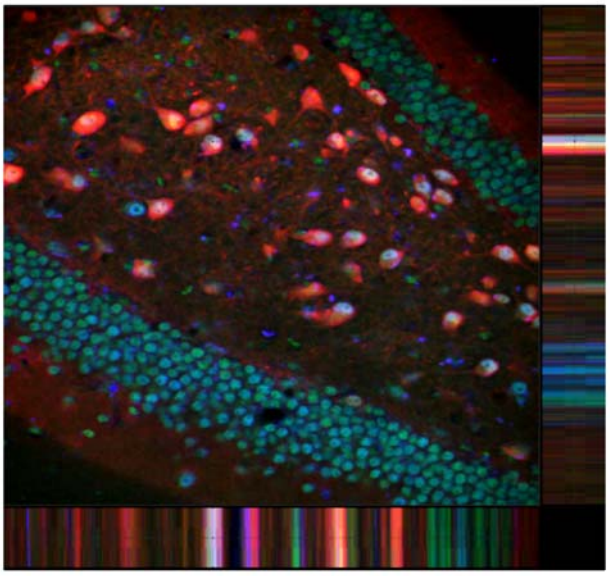

Abb. 17: Hilär lokalisierte Mooszellen (Pfeile) sind Calretinin–positiv (rot) und exprimieren GR (grün) und MR (blau). Durch Form und Lokalisation sind sie eindeutig von unreifen, Calretinin-exprimierenden Körnerzellen, die sich in der SGZ des Gyrus dentatus befinden, zu unterscheiden.

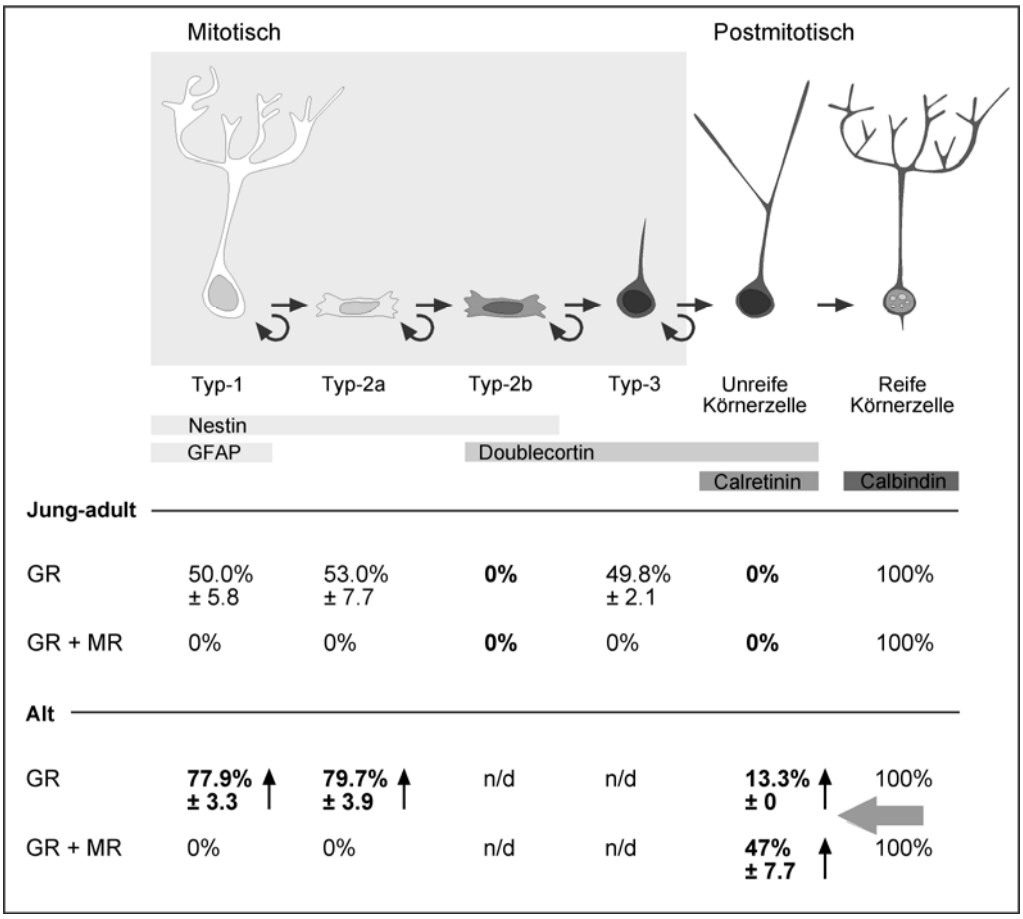

Abb. 18: Zusammenfassung der Daten zur GR- und MR-Expression neuronaler Vorläuferzellen in der SGZ des adulten Gyrus dentatus: Die Expression von GR und MR folgt keinem einheitlichem Schema, sondern variiert abhängig vom Zellstadium. Typ-2b Zellen und Calretinin-positive Zellen in jung-adulten Mäusen waren grundsätzlich GR- und MR-negativ, MR wurde erst von reifen postmitotischen Zellen exprimiert. In älteren Tieren (16 Monate) konnte die Rezeptorexpression von Typ-2b und Typ-3 Zellen nicht sicher untersucht werden, da deren absolute Anzahl zu gering war. Generell war aber ein Anstieg der MR- und vor allem GR-Expression zu beobachten: In Typ-1, Typ-2a- und Typ-3 Zellen war die GR-Expression stark erhöht und Calretinin-positive Zellen waren zu einem großen Anteil GR- und MR-positiv (alle Werte Mittelwerte ± Standardfehler).

3.2.1 Zusammenfassung

Proliferierende Zellpopulationen im Gyrus dentatus exprimieren keine MR

Sowohl die Ergebnisse der Zeitreihe als auch der Analyse der GR- und MR-Expression in phänotypisierten Zellen zeigen, dass in der mitotischen Phase neu gebildeter Zellen keine MR exprimiert werden. In der Zeitreihe treten MR erst ab Tag drei auf, es handelt sich also mit großer Wahrscheinlichkeit um Zellen, die sich schon mehrfach geteilt haben. In phänotypisierten Zellen repliziert sich dieses Ergebnis: Erst in reifen, postmitotischen Körnerzellen, die Calbindin-positiv sind, wurden MR detektiert, alle anderen Reifestadien bilden keinen MR aus.

Verschiedene proliferative Zellpopulationen in der SGZ des Gyrus dentatus zeigen unterschiedliche GR- und MR-Expressionsmuster

Typ-1, Typ-2a und DCX-positive Zellen zeigen sehr ähnliche GR-Expressionsmuster. Etwa 50% der Zellen der jeweiligen Zelltypen exprimieren GR, der Rest ist GR- und MR-negativ.
Innerhalb eines Zelltypes war keine Heterogenität an Hand morphologischer oder lokalisatorischer Merkmale auszumachen, die einen weiteren Hinweis auf die Existenz GR-exprimierender beziehungsweise nicht-exprimierender Subpopulationen innerhalb dieser Zelltypen gegeben hätte. Es ist aber denkbar, dass es innerhalb dieser Zelltypen weitere unterscheidende Merkmale, abgesehen von dem Charakteristikum, ob die Zellen GR exprimieren oder nicht, bestehen.

Typ-2b Zellen exprimieren weder GR noch MR

Typ-2b Zellen sind in jenem Zellstadium, indem erstmalig die neuronale Linie innerhalb der Reifeentwicklung eingeschlagen wird. Dies ist zum Beispiel erkennbar am Beginn der Expression von Markern unreifer Neurone wie beispielsweise DCX. Typ-2b Zellen unterschieden sich in der GR- und MR-Expression von allen anderen proliferativen Zelltypen. Sie exprimieren weder GR noch MR und sind somit unempfänglich für rezeptorvermittelte Corticosteron-Effekte.

In jung-adulten Mäusen und in Mäusen am postnatalen Tag acht exprimieren neu gebildete Zellen zu Beginn des postmitotischen Zellstadiums weder GR noch MR

Calretinin exprimierende Zellen in der SGZ sind unreife Körnerzellen, die nicht mehr teilungsfähig sind. In jung-adulten Mäusen exprimieren diese Zellen keine Steroidrezeptoren. Dieses Expressionsschema wiederholte sich auch in acht Tage alten Mäusen. Die Reifung der neu gebildeten Körnerzellen scheint also ebenfalls unabhängig von rezeptorvermittelten Wirkungen von Corticosteron stattzufinden.

In alten Mäusen verschiebt sich die GR- und MR-Expression in ein früheres Zellstadium

Dieses Expressions-Muster findet sich jedoch nicht in alten Mäusen: Über die Hälfte Calretinin-positiver Zellen in alten Mäusen exprimieren GR, fast die Hälfte auch MR. Ein Teil der Calretinin-positiven Zellen war nur GR-positiv (13.3% ± 0), bei dem viel größeren Teil der Zellen wurden GR und MR koexprimiert (47.7 ± 7.7). MR traten nur in Kombination mit GR auf, keine

Zelle exprimierte MR isoliert, sowie dies auch in allen anderen von uns beobachteten GR- und MR-Expressionsmustern der Fall war.

Das Ausmaß der GR-Expression in proliferativen Zellstadien steigt im Alter an

In teilungsaktiven Zellstadien ähnelt sich das qualitative Muster der GR- und MR-Expression in den bestimmbaren Zelltypen sehr: Typ-1 und Typ-2a Zellen exprimieren GR sowohl in jungen als auch in sehr alten Tieren. Allerdings ist die Quantität der Rezeptorexpression verändert. In alten Mäusen ist die GR-Expression dieser proliferativen Zelltypen stark erhöht. Während in jung-adulten Mäusen etwa die Hälfte der Zellen dieser genannten Zelltypen GR exprimiert, sind es in alten Mäusen etwa 80% der Zellen. MR konnte in diesen frühen proliferativ aktiven Zellstadien auch in alten Mäusen nicht nachgewiesen werden. Typ-2b und DCX-positive Zellen waren zu wenig vorhanden, um deren GR- und MR-Expressionsmuster zu bestimmen.

RUN und ENR lassen die Expression von Steroidrezeptoren unbeeinflusst

Im Gegensatz zum Einflussfaktor Alter, der einen verstärkenden Einfluss auf die GR- und MR-Expression in unreifen, postmitotischen Zellen ausübt, lassen die Exposition von Mäusen gegenüber den neurogenen Stimuli RUN oder ENR die Rezeptorexpression unverändert.

Reife Körnerzellen sind GR- und MR-positiv

Calbindin-positive Zellen exprimieren GR und MR, sowohl in jung-adulten als auch in alten Mäusen. In jung-adulten Mäusen handelt es sich hierbei um das erste phänotypisierte Zellstadium, in dem beide Rezeptoren koexprimiert

werden. In alten Tieren fand eine Verschiebung der Rezeptorexpression in ein früheres Stadium statt und bereits Calretinin-positive, also noch unreife Körnerzellen waren zu einem Teil GR- und MR-negativ.

4 Diskussion

4.1 GR- und MR-Expression in BrdU-positiven Zellen in der SGZ des Gyrus dentatus

Die Expression von GR und MR in BrdU-positiven Zellen steigt mit zunehmender Reifung der Zellen an

Bei der Untersuchung neu gebildeter, proliferierender und reifender Zellen in der SGZ des Gyrus dentatus wurde festgestellt, dass zu den untersuchten frühen Zeitpunkten nach der BrdU-Injektion die Mehrzahl BrdU-positiver Zellen keine GR exprimierten. Der prozentuale Anteil GR-tragender Zellen stieg dann mit zunehmendem zeitlichem Abstand zur initialen BrdU-Injektion an.

MR-immunoreaktive Zellen waren erst später, nämlich drei Tage nach erfolgter BrdU-Injektion sichtbar. Das Ausmaß der MR Expression nahm dann ebenfalls, wie auch die GR-Expression, mit der Zeit zu.

Nach vier Wochen waren fast alle ausgezählten Zellen sowohl GR- als auch MR-immunoreaktiv. Dass MR erst nach einem relativ langen Zeitraum (drei Tage) in Erscheinung traten, lässt annehmen, dass die MR-Expression erst im postmitotischen Stadium der neu gebildeten Neurone einsetzte. Durch die Analyse der GR- und MR-Immunoreaktivität in phänotypisierten Zellen konnte diese Hypothese für Mäuse am postnatalen Tag 8, jung-adulte und auch sehr alte Tiere bestätigt werden. In jung adulten Tieren wurde MR erst sehr spät, und zwar in postmitotisch ausgereiften, Calbindin-positiven Zellen detektiert. In älteren Tieren setzte die MR-Expression in einem früheren Entwicklungsstadium der Zellen ein als bei jüngeren Tieren, aber ebenfalls erst im postmitotischen Stadium. MR-Expression fand hier bereits auf der Ebene der Calretinin-Expression statt, also in unreifen, aber nicht mehr teilungsfähigen Neuronen.

Die Arbeitsgruppe um Cameron veröffentlichte bereits 1993 Daten über GR- und MR-Expression in Vorläuferzellen (Cameron *et al.*, 1993).

Auf Grund der von ihnen angewandten Methode konnten Cameron et al. nicht die Koexpression von GR und MR in den untersuchten Zellen analysieren. In den nachfolgenden Kapiteln wird ersichtlich werden, dass die Tatsache, ob GR und MR einzeln oder gemeinsam aktiviert werden, für den von Corticosteron ausgelösten Effekt auf die Zellen von entscheidender Bedeutung ist.

Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen wurde in jener Veröffentlichung festgestellt, dass die Expression von Steroidrezeptoren in proliferierenden Zellen mit zunehmender Reifung über die Zeit ansteigt. Hinsichtlich der Angaben über die Quantität der GR- und MR-Expression in neu gebildeten Zellen und auch des Zeitpunktes des Beginns der Expression, weichen die unsrigen von den damals erhobenen Daten jedoch ab.

In der von Cameron et al. publizierten Studie kommt es zu einem signifikanten Anstieg GR-exprimierender Zellen von 10% auf 50% zwischen den Zeitpunkten eine Stunde und ein Tag nach Injektion des Proliferationsmarkers BrdU. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt die Studie auch bei der Analyse der MR-Expression: Nach einer Stunde sind etwa 10% MR-positiv, nach einem Tag sind es mehr als 30% der BrdU-markierten Zellen. Eine zu so einem frühen Zeitpunkt einsetzende und quantitativ ausgeprägte Rezeptorexpression konnten wir in unseren Untersuchungen nicht feststellen.

Nach Cameron et al.´s Ergebnis wäre anzunehmen, dass bereits in der mitotischen Phase von einem Teil der neu gebildeten Zellen sowohl GR als auch MR exprimiert werden, was unseren Daten hinsichtlich der MR-Expression deutlich widerspräche.

Die Steroidrezeptorexpression zu diesen frühen Zeitpunkten fiel in unseren Untersuchungen sehr viel niedriger aus: Nach vier Stunden und auch noch nach einem Tag sind nur 17% der Zellen immunoreaktiv für GR. Die Expression von MR wurde bei unseren Untersuchungen erst nach drei Tagen, und zwar in 27,3% der Zellen detektiert. Zellen, die nur MR, nicht aber GR exprimierten, konnten wir nicht beobachten.

Für die Diskrepanz der Daten gibt es mehrere mögliche Ursachen. Zum einen wurde in der erwähnten Studie eine andere Methode verwendet. Radioaktiv markiertes [^{3}H]Thymidin wurde als Proliferationsmarker eingesetzt, welches

nur die Untersuchung oberflächlicher Schichten des Gewebeschnittes erlaubt. Außerdem wurden Antikörper anderer Herstellung für die Anfärbungen von GR und MR verwendet, die sich möglicherweise in ihrer Bindungsspezifität voneinander unterscheiden und so zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben könnten.

Zum anderen wurden die Untersuchungen an Ratten durchgeführt, in denen das Expressionsmuster verglichen zu dem von Mäusen abweichen kann. Jongen-Relo et al. zeigen, dass selbst zwischen zwei unterschiedlichen Stämmen innerhalb der gleichen Spezies, in diesem Fall Ratten, die Expression von Steroidrezeptoren unterschiedlich ausfallen kann (Jongen-Relo *et al.*, 2000). Außerdem unterscheidet sich das Alter der Ratten (vier Monate) von dem der von uns untersuchten Mäuse (sieben Wochen). Unsere Beobachtung, auf die später noch zurückgekommen werden wird, dass mit zunehmendem Alter der Tiere die Rezeptorexpression in Vorläuferzellen zunimmt, stützt die Annahme, dass die Altersdifferenz der untersuchten Tiere eine weitere mögliche Erklärung für die Differenz der Daten sein könnte. Zusätzlich wurde in einer Studie von Bondolfi et al. festgestellt, dass die Proliferationsrate der Neurogenese in Mäusen des C57BL/6-Stammes zwischen einem Lebensalter von 2-18 Monaten abnimmt und danach nicht mehr (Bondolfi *et al.*, 2004). Es ist deshalb anzunehmen, dass sich innerhalb dieses Lebensalters auch die GR-Expression der Vorläuferzellen verändert. Dass das höhere Alter der von Cameron et al. verwendeten Tiere einen Einfluss auf die Rezeptorexpression gehabt hat, ist also durchaus möglich. Eine MR-Induktion würde dies im Kontext unserer Daten allerdings nicht erklären.

Weiterhin wurden in der Arbeit von Cameron et al. nicht nur in der SGZ lokalisierte, proliferierende Zellen ausgewertet, sondern sämtliche in Hilus, SGZ und granulärer Schicht befindliche, BrdU-positive Zellen zur Bewertung herangezogen. Es ist wahrscheinlich, dass die Einbeziehung außerhalb der SGZ lokalisierter Zellen die Zahlen der gemessenen GR- und MR-Expression beeinflusst hat, da eine größere Heterogenität der untersuchten Zellen durch diese Vorgehensweise wahrscheinlich ist und es dadurch dazu kommen kann,

dass möglicherweise eher zelluläre Neogenese denn Neurogenese untersucht wurde. Die Mehrzahl der im Hilus befindlichen proliferativen Zellen exprimieren astrozytäre, nicht neuronale Marker (Bondolfi *et al.*, 2004; Aberg *et al.*, 2000; Tanapat *et al.*, 1999).

Bei in der SGZ lokalisierten, GR-exprimierenden, BrdU-positiven Zellen könnte es sich theoretisch auch um GFAP-positive Astrozyten handeln. Diese wären von GFAP-positiven Nestinzellen nur im Ausschlussverfahren differenzierbar. Einige Arbeiten beschreiben GFAP-positive Astrozyten, die sowohl GR als auch MR exprimieren (Chou *et al.*, 1991; Vielkind *et al.*, 1990).

Etwa 37% der BrdU-positiven Zellen im Gyrus dentatus exprimieren endotheliale Marker und proliferieren im Rahmen der in dieser Zellnische stattfindenden Angiogenese. Beide Prozesse, Angiogenese und Neurogenese, scheinen funktionell miteinander verbunden zu sein, da viele der neu gebildeten endothelialen und neurogenen Vorläuferzellen in Clustern um Blutkapillare herum entstehen (Palmer *et al.*, 2000). Es ist also auch möglich, dass ein Teil der GR-, beziehungsweise GR- und MR- exprimierenden BrdU-markierten Zellen von endothelialen Gefäßzellen repräsentiert wird. Zumindest GR wurden in endothelialen Zellen der Blut-Hirn-Schranke immunhistochemisch nachgewiesen (Gaillard *et al.*, 2001).

Cameron et al. erwähnen in ihrer Publikation, dass alle MR-positiven Zellen morphologische Charakteristika von Neuronen aufwiesen, dass dies für GR-positive Zellen aber nicht immer zutraf. Dieser Hinweis konnte durch unsere Daten zur Phänotypisierung der Zellen weiterverfolgt werden, denn Typ-1 Zellen, von denen etwa 50% GR exprimieren, besitzen eine Morphologie, die der radialer Glia ähnelt (Filippov *et al.*, 2003) und nicht etwa der von Neuronen. MR hingegen wurden erst von Calbindin-positiven Zellen exprimiert, die bereits in das Stratum granulare eingewandert sind und Dendriten und Axone aussenden.

Die Mehrzahl der neu entstandenen Zellen wird durch Apoptose ausgeschaltet

An den absoluten Zahlen der BrdU-positiven Zellen ist zu sehen, dass proliferierende Zellen in dieser Region einem starken Selektionsdruck unterliegen. Nachdem bis zum dritten Tag nach BrdU-Injektion die absolute Anzahl BrdU-positiver Zellen massiv anstieg, sich im Vergleich zum Zeitpunkt vier Stunden sogar mehr als verdreifacht hatte, war sieben Tage nach erfolgter Injektion ein ebenso ausgeprägter Abfall der Zahl neu generierter Zellen zu beobachten. Schließlich waren BrdU-positive Zellen nach vier Wochen in ihrer Anzahl geringer vertreten als vier Stunden nach der Injektion. Die Auswertung der absoluten Zahlen BrdU-positiver Zellen ist konsistent mit anderen Studienergebnissen. Etwa die Hälfte der BrdU inkorporierenden Zellen stirbt nach kurzer Zeit (Biebl *et al.*, 2000). Diesem Rückgang der BrdU inkorporierenden Zellen unterliegt wahrscheinlich die Aktivierung apoptotischer Mechanismen (Biebl *et al.*, 2000). So wurde in transgenen Mäusen, die das anti-apoptotische Protein Bcl-2 überexprimieren, eine Steigerung der Neurogeneserate auf Ebene der im Reifeprozess befindlichen, neu gebildeten Zellen nachgewiesen (Kuhn *et al.,* 2005). Vermutlich nimmt die Aktivität beider Prozesse - Proliferation und programmierter Zelltod - mit zunehmenden Alter stark ab (Heine *et al.*, 2003). Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass Apoptose im höheren Alter zunehmend auftritt. In adrenalektomierten jungen und alten Ratten steigen beide Prozesse - Proliferation und Apoptose - an und korrelieren in ihrem Ausmaß miteinander (Cameron and McKay, 1999).

Auf mögliche Mechanismen, durch die Apoptose im Zusammenhang mit der Aktivierung von GR und MR ausgelöst werden kann, wird im Verlauf dieser Diskussion noch eingegangen werden.

4.2 GR- und MR-Expression in phänotypisierten Vorläuferzellen der SGZ des Gyrus dentatus

Proliferierende Zellen in der SGZ des Gyrus dentatus zeigen ein heterogenes GR-Expressionsmuster

In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass proliferierende Zellen in der SGZ keine homogene Zellpopulation darstellen. Die Auswertung von BrdU-positiven Zellen hinsichtlich ihrer Kolokalisation mit verschiedenen glialen und neuronalen Markern zeigt, dass bereits vier Stunden nach Verabreichung von BrdU ein Teil der Zellen einen glialen oder neuronalen Phänotyp aufweist und es sich dabei um getrennte Populationen handelt, die sich im Verlauf unabhängig voneinander weiterentwickeln und zu keinem Zeitpunkt eine Überlappung glialer und neuronaler Markern zeigen (Steiner *et al.*, 2004). Ergänzt werden diese Daten von Untersuchungen Nestin-GFP-positiver Zellpopulationen. Diese zeigen, dass innerhalb der Nestin-exprimierenden Gruppe von Zellen unterschiedliche teilungsfähige Subpopulationen existieren, die unter anderem durch ihre Kolokalisation mit glialen und neuronalen Markern und zusätzlich anhand ihrer unterschiedlichen Morphologie differenziert werden können (Filippov *et al.*, 2003). Die Erkenntnis, dass mehrere teilungsfähige Zellpopulationen in der SGZ des Gyrus dentatus existieren, die in verschiedenen Phasen der Reifung unterschiedliche Zellmarker exprimieren, hat zu der Annahme geführt, dass die dort neu generierten Zellen mehrere Entwicklungsschritte durchlaufen bevor sie zu reifen, in das lokale Netzwerk integrierte Körnerzellen werden.

Bei der Untersuchung der unterschiedlichen Reifestadien der Vorläuferzellen konnten wir feststellen, dass die Expression von GR keinem einheitlichen Schema folgt und abhängig vom untersuchten Zelltyp ist, wobei für die Neurogenese wesentliche Zellstadien GR- und MR-negativ sind.

Typ-1 und Typ-2a Zellen zeigen in jungen Mäusen sehr ähnliche (Typ-1 Zellen 50 ± 5,8% GR-positiv; Typ-2a Zellen 53 ± 7,7% GR-positiv) GR-Expressionsmuster. Diese beiden Zelltypen unterscheiden sich wesentlich in

ihrer proliferativen Aktivität voneinander. Typ-1 Zellen sind proliferativ „träge“, sie teilen sich nur selten im Vergleich zu Typ-2a-Zellen. Zusätzlich reagieren sie viel stärker auf externe neurogene Stimuli durch Zunahme ihrer proliferativen Aktivität (Kronenberg *et al.*, 2003).
Dieses unterschiedliche Teilungsverhalten bei sehr ähnlichem GR-Expressionsmuster lässt vermuten, dass keine direkte Beziehung zwischen der Aktivierung von GR durch Corticosteron und dem Ausmaß der proliferativen Aktivität dieser Zellen besteht.

Wesentliche Schritte der qualitativen als auch quantitativen Regulation der Neurogenese sind unabhängig von direkt vermittelten Corticosteron-Effekten

Typ-2b Zellen gehören zu den proliferativ aktiven hippokampalen Vorläuferzellen.
Sie sind während des Prozesses der Neurogenese in der ersten Entwicklungsphase angelangt, während der von den Zellen neuronale Charakteristika ausgebildet werden. Dadurch unterscheiden sie sich von Typ-2a Zellen, die eine sehr ähnliche Morphologie und auch ein ähnliches Teilungsverhalten besitzen, jedoch keine neuronalen Marker koexprimieren. Im Gegensatz dazu sind Typ-2b Zellen erkennbar an ihrer Koexpression von Nestin und DCX (Kronenberg *et al.*, 2003).
Im Stadium der DCX-Expression bilden Typ-2 Zellen weitere neuronale Eigenschaften aus. Sie beginnen Natriumkanäle zu synthetisieren (Wang *et al.*, 2005; Filippov *et al.*, 2003; Fukuda *et al.*, 2003) und ein Teil der neu gebildeten Zellen erhält GABAerge Afferenzen (Wang *et al.*, 2005), deren Aktivierung wiederum die weitere neuronale Differenzierung der Zellen unterstützt (Ge *et al.*, 2006; Tozuka *et al.*, 2005). Nach etwa 10 bis elf Tagen entsteht eine Verbindung zwischen Gyrus dentatus und CA3 Region durch axonale Aussprossung. Die Dendriten der Zellen sind nach drei Wochen zu komplexen, verzweigten Strukturen herangewachsen (Zhao *et al.*, 2006).

Während adulte Neurogenese sich vielfältig durch externe Stimuli beeinflussen lässt, findet die Dendritogenese unabhängig von der Einwirkung neurogener Faktoren nach Eintritt in die postmitotische Phase statt (Plümpe *et el.*, 2006). Mit zunehmender Reifung gehen die neu gebildeten Zellen in ein postmitotisches Stadium über, migrieren in das Stratum granulare und nehmen die Morphologie reifer Körnerzellen an (Kempermann *et al.*, 2004; Brandt *et al.*, 2003). Da die DCX-Expression von den neu gebildeten Neuronen im Wesentlichen bis zum Abschluss des Reifeprozesses beibehalten wird, zeigt DCX eine starke Überlappung mit Calretinin, dem Marker postmitotischer, noch nicht ausgereifter Körnerzellen (Brandt *et al.*, 2003).

Es ist anzunehmen, dass in diesem Zellstadium die Umwandlung multipotenter, radialer Glia ähnlicher Stammzellen in Vorläuferzellen mit festgelegtem neuronalen Phänotyp stattfindet, veranschaulicht durch die Abnahme der Expression von Stammzellmarkern und der gleichzeitigen Zunahme der Expression neuronaler Marker (Steiner *et al.*, 2006).

Die Abwesenheit von GR- und MR-Expression während der DCX-Expression ist auffallend und zeigt, dass Neurogenese in dieser entscheidenden Phase, in der die Differenzierung der Vorläuferzellen zu neuronalen Körnerzellen stattfindet, zumindest von direkter Corticosteron-Einwirkung unabhängig ist.

Eine indirekte Einwirkung von Corticosteron ist durch unsere Untersuchungen nicht auszuschließen. Denkbar wäre zum Beispiel ein über GFAP-positive Astrozyten erfolgender Einfluss, da diese sowohl GR als auch MR exprimieren (Chou *et al.*, 1991; Vielkind *et al.*, 1990), und somit sensibel für direkt vermittelte Corticosteron-Effekte sind. Durch eine Änderung des Mikromilieus in der subgranulären Zellnische könnten Typ-2b Zellen also auf diese Art und Weise von Corticosteron beeinflusst werden.

Die Beobachtung der Abwesenheit von GR und MR in Typ-2b Zellen ist auch in der Hinsicht bemerkenswert, dass diese Zellen die einzigen von uns beobachteten Nestin-positiven proliferativen Zelltypen sind, die keine GR exprimieren.

Typ-3 Zellen, die durch die Expression des neuronalen Markers DCX in Abwesenheit des Stammzellmarkers Nestin charakterisiert sind, exprimieren

zu etwa 50% GR. Dies erlaubt zwei mögliche Interpretationen. Zum einen ist es möglich, dass GR von den Vorläuferzellen in diesem Stadium transient exprimiert werden und beim Übergang der Zellen in das Calretinin-positive Stadium die GR-Expression wieder abgeschaltet wird. Eine transiente GR-Expression ist nur sehr schwer zu untersuchen, da es dazu einer Technik bedürfte, die die Beobachtung entsprechender Zellen über die Zeit erlaubt.
Zum anderen könnte die GR-Expression eine Subpopulation der Typ-3 Zellen kennzeichnen, die den Prozess der neuronalen Differenzierung nicht weiterverfolgen und aus diesem, zum Beispiel durch Apoptose, ausselektiert werden. In verschiedenen anderen Zellarten ist die Auslösung von programmiertem Zelltod durch GR-Aktivierung bereits bekannt, so zum Beispiel in Thymozyten (McConkey *et al.,* 1989), Myozyten (te Pas *et al.,* 2000) und Osteoblasten (Chen *et al.*, 2004). Auch für die Auslösung von Apoptose in der hippokampalen SGZ gibt es zahlreiche Hinweise. Morphologisch waren GR-exprimierende Typ-3 Zellen nicht von GR-negativen Typ-3 Zellen zu unterscheiden, dennoch kann aber die Möglichkeit einer existierenden Subpopulation innerhalb dieses Zelltyps ohne die Durchführung weiterer Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden.
Calretinin-exprimierende Zellen sind im Erwerb der Morphologie von reifen Körnerzellen weiter fortgeschritten als DCX-positive Typ-3 Zellen: Im Gegensatz zu den eher rundlichen Typ-3 Zellen, senden Calretinin-positive Zellen Dendriten in die Molekularschicht aus und besitzen einen stärker ausgeprägten neuronalen Phänotyp. Während Typ-3 Zellen noch teilungsfähig und somit in der Lage sind, den Pool der Vorläuferzellen zu erweitern, sind Calretinin-positive Zellen bereits in der postmitotischen Phase (Brandt *et al.*, 2003). Calretinin-positive Zellen unterliegen einem starken Selektionsdruck und nur ein Teil von ihnen wird in das lokale neuronale Netzwerk integriert um dann über längere Zeit zu persistieren (Kempermann *et al.*, 2004). Die Überlebensrate der Zellen in diesem Stadium ist unter anderem abhängig von dem Einwirken externer Stimuli, unterliegt aber auch einer genetischen Kontrolle (Kempermann *et al.*, 2006; Kempermann *et al.,* 1997).

Unseren Untersuchungen zufolge sind Calretinin-positive Zellen GR- und MR-negativ. Die in diesem Zeitraum stattfindende, vor allem in quantitativer Hinsicht entscheidende Regulation der Neurogenese in jung-adulten Mäusen, erfolgt demnach unabhängig von der direkten Einwirkung Corticosterons.
In Calretinin-positiven Zellen älterer Tiere wurden in einem großen Teil der untersuchten Zellen GR und MR detektiert. Eine direkte Einwirkung von Corticosteron auf diese neu gebildeten, GR- und MR-positiven Neurone ist folglich durchaus möglich. Dieser Aspekt unserer Untersuchungen wird ausführlicher in Kapitel 4.3 diskutiert.

Externe neurogene Stimuli wie RUN und ENR induzieren in Calretinin-positiven Zellen keine GR- oder MR-Expression

In RUN und ENR nehmen Calretinin-positive Zellen in ihrer Anzahl in der SGZ des Gyrus dentatus zu und stellen ein Maß für die dort stattfindende Neurogenese dar (Brandt *et al.*, 2003).
Ausgehend von der Hypothese, dass durch Aktivierung von GR Corticosteron zur Induktion von Apoptose führt, wäre zu erwarten, dass in Neurogenese-stimulierenden Paradigmen, die zu einer Erhöhung der Anzahl Calretinin-positiver Zellen führen, die neu gebildeten Calretinin-positiven Zellen GR- und MR-negativ sind.
Die Untersuchung des Gehirngewebes von Mäusen, die unter den Bedingungen ENR und RUN gehalten wurden, ergab, dass auch hier, wie in der Kontrollgruppe, Calretinin-positive Zellen GR- und MR-negativ waren und somit zumindest für direkte, rezeptorabhängige Corticosteron-Effekte unzugänglich sind. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, warum in den Paradigmen RUN und ENR Corticosteronspiegel und Neurogeneserate keine Korrelation zueinander zeigen (Holmes *et al.*, 2004; Kempermann and Gage, 2002), denn die Serumkonzentrationen dieses Hormons sind unter diesen Neurogenese-stimulierenden Bedingungen in der Regel erhöht (Benaroya-Milshtein *et al.*, 2004; Moncek *et al.,* 2004; Kempermann *et al.,* 2002).

Indirekt ausgeübte Effekte durch Corticosteron sind durch unsere Untersuchungen natürlich nicht auszuschließen, dennoch kommen diese in ihrer üblicherweise Neurogenese-hemmenden Wirkung offensichtlich nicht zum Tragen, wenn die Tiere Neurogenese-verstärkenden Umgebungen wie ENR und RUN ausgesetzt sind.

Es ist also anzunehmen, dass andere Neurogenese fördernde Faktoren, wie zum Beispiel erhöhte Konzentrationen neurogener Neurotransmitter oder Proteine im Verhältnis zu den Corticosteron-vermittelten, antineurogenen Effekten in Konstellationen wie dem ENR überwiegen.

Im Neurogenese stimulierenden Modell der „Caloric Restriction" zum Beispiel wurde die Hochregulation von *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) beobachtet, die einen proliferations-hemmenden Effekt von Corticosteron dominieren könnte (Strasser *et al.,* 2006; Lee *et al.*, 2000). Auch die Einwirkung von *glia derived neurotrophic factor* (GDNF) ist mit einer Steigerung adulter Neurogenese assoziiert. Eine Erhöhung von BDNF (Strasser *et al.,* 2006) und GDNF im Hippokampus konnte auch bei Tieren, die einer reizreichen Umgebung expositioniert waren, festgestellt werden. Zusätzlich wurde eine verminderte Apoptoserate der Zellen in diesem Zusammenhang beobachtet (Young *et al.*, 1999).

Tiere, die dem Paradigma RUN ausgesetzt waren, zeigen erhöhte Konzentrationen von Corticosteron-bindendem Globulin (Droste *et al.,* 2003). Die verminderte Verfügbarkeit von freiem Corticosteron könnte eine weitere mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen Serumspiegel des Stresshormons und Neurogeneserate sein.

Dennoch wird durch unsere Untersuchungen deutlich, dass eine fehlende Korrelation zwischen Corticosteronspiegel und Neurogeneserate auch durch das Fehlen von GR und MR während entscheidender Phasen in der Regulation adulter Neurogenese erklärbar sein könnte.

Calretinin-positive Zellen in 8 Tage alten Mäusen sind ebenfalls GR- und MR-negativ

Um zu überprüfen, ob die Expression von MR in neu gebildeten Zellen auch im in der Entwicklung befindlichen Gehirn erst in postmitotischen, ausgereiften Zellen einsetzt, wurde Gehirngewebe von Mäusen am postnatalen Tag 8 untersucht. Die vorher in jung-adulten Mäusen gemachte Beobachtung der fehlenden Immunoreaktivität für GR und MR von Calretinin-positiven Zellen wiederholte sich in acht Tage alten Mäusen: GR waren weiter innerhalb des Gyrus dentatus in Hilus und SGZ zu finden, während MR erst weiter außen, in sehr viel reiferen Zellen, auftraten. Ein starker Gradient der Espression beider Steroidrezeptoren, ansteigend von innen nach außen war deutlich zu sehen und sämtliche Calretinin-positiven Zellen waren GR- und MR-negativ (siehe Abb. 16).
Die durch pränatalen Stress verursachte Verminderung von Neurogenese und hippokampaler Lernleistung (Coe *et al.,* 2003; Lemaire *et al*., 2000) wird also nicht durch Aktivierung von Steroidhormonrezeptoren in diesen Zellen ausgelöst.

Einfluss von GR und MR auf Proliferation und Differenzierung der neu gebildeten Zellen

GR fanden sich in etwa der Hälfte der untersuchten Typ-1, Typ-2a und Typ-3 Zellen, nicht vertreten waren sie jedoch in Typ-2b- und Calretinin-positiven Zellen. Ausgereifte Calbindin-positive Körnerzellen waren ausnahmslos immunoreaktiv für GR und MR.
Zumindest in jung-adulten Mäusen findet sich eine Kolokalisation der beiden Steroidrezeptortypen während der Entwicklung der Vorläuferzellen nur am Ende, im reifen Stadium der Körnerzellen. Bereits bekannt ist die Kolokalisation von GR und MR in hippokampalen Prinzipalzellen: Han et al. konnten eine Doppel-Immunoreaktivität für GR und MR in reifen

Körnerzellen des Gyrus dentatus und des Weiteren in hippokampalen CA1 und CA2 Neuronen der Ratte nachweisen. CA3 Neurone waren nur MR-positiv (Han *et al.*, 2005).

Einige Arbeiten beschreiben eine apoptosesteigernde Wirkung der Aktivierung des GR im Zusammenhang mit einer Hypoaktivität des MR (Kim *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2000; Sousa *et al.*, 1999; Hassan *et al.*, 1996). Die pharmakologische Blockade des GR wiederum führt zu einer Aufhebung der durch erhöhte Corticosteron-Spiegel herbeigeführten Verminderung der Proliferation (Wong and Herbert, 2005).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ein Teil der proliferativ aktiven Vorläuferzellen, nämlich Typ-1, Typ-2a und Typ-3 Zellen, nur GR exprimieren und sämtlich negativ für MR sind. Ein Einwirken von Corticosteron auf diese Zellen würde zu einer selektiven GR-Aktivierung ohne Koaktivierung des MR führen. Im Kontext der Ergebnisse der erwähnten Arbeiten deutet dies darauf hin, dass diese Zellen durch Aktivierung von Apoptose aus dem Prozess der Neurogenese, zum Beispiel im Sinne einer Selektion, ausgeschleust werden könnten. Der Gedanke an einen Selektionsmechanismus entsteht auch auf Grund des Umstandes, dass einige Zellen innerhalb derselben Population GR ausbilden und andere nicht. Die Ursache für die hinsichtlich der GR-Expression bestehenden Heterogenität innerhalb bestimmter proliferativ aktiver Zellpopulationen bleibt unklar. Wie bereits erwähnt, wäre vorstellbar, dass innerhalb der verschiedenen Vorläuferzellpopulationen weitere Subpopulationen existieren, die durch die von uns verwendeten Marker zur Identifizierung des Zelltyps nicht erfasst werden. Eine andere Erklärung wäre eine transiente Expression von GR in diesen Zellen.

Da in den erwähnten Studien aber beschrieben wird, dass eine selektive GR-Aktivierung zu einer verminderten Neurogenese-Rate und Körnerzell-Dichte im Gyrus dentatus führt (Almeida *et al.*, 2000; Sousa *et al.*, 1999; Hassan *et al.*, 1996), ist tatsächlich eine Aktivierung apoptotischer Mechanismen zu vermuten.

Über mögliche Mechanismen der apoptoseauslösenden Wirkung durch Aktivierung von GR in hippokampalen Körnerzellen in Ratten berichten Almeida et al.: Die Bindung von Corticosteron an GR löst eine Erhöhung der Ratio des proapoptotischen Moleküls Bax, relativ zu den antiapoptotischen Molekülen Bcl-2 und Bcl-x(L) aus. Im Gegensatz dazu bewirkt die Aktivierung des MR das Gegenteil und die Ratio dieser Moleküle verschiebt sich zugunsten der antiapoptotischen Proteine. Obwohl ältere Tiere mehr antiapoptotische Moleküle exprimierten, waren sie anfälliger für durch GR-Aktivierung ausgelöste Apoptose (Almeida *et al.*, 2000). Die von Almeida et al. beobachtete Apoptose fand vor allem in der SGZ statt. Unsere Daten zeigen, dass Vorläuferzellen der Neurogenese, die in der SGZ lokalisiert sind, isoliert GR und nicht MR ausbilden. In jung-adulten Tieren werden MR erst von ausgereiften Körnerzellen synthetisiert, die die SGZ bereits verlassen haben und in das Stratum granulare eingewandert sind. In Zusammenschau mit den Daten von Almeida et al. würde eine GR-Expression in Abwesenheit von MR-Synthese erklären, warum die in der SGZ lokalisierten Zellen besonders anfällig für durch GR-Aktivierung ausgelöste Apoptose sein könnten. Auch Almeida et al. vermuten, dass vor allem Vorläuferzellen und neu gebildete, unreife Neurone Ziel GR-ausgelöster Apoptose sind. Vor allem während Phasen erhöhter GR-aktivierender Corticosteron-Sekretion, wie dies durch diurnale Schwankungen des Hormonspiegels, Stress oder pathologische Zustände wie zum Beispiel Depression oder Demenz verursacht sein kann, würde dieser Pathomechnismus eine Rolle spielen (Hassan *et al.*, 1999; de Kloet *et al.*, 1998; Lupien *et al.*, 1998; Sapolsky, 1998; Reagan and McEwen, 1997).

Möglich ist auch, dass das Ausmaß der GR-Expression in den proliferativen Stadien Teil einer vererbten Prädisposition ist. Es ist bekannt, dass Neurogenese einer starken genetischen Kontrolle unterliegt (Kempermann *et al.*, 2006; Kempermann *et al.*, 1997). Diese genetisch bedingte, verschieden stark ausgeprägte GR-Expression könnte, abhängig vom jeweiligen Stamm, eine unterschiedliche Vulnerabilität der neu gebildeten Zellen für die Aktivierung von Apoptose bedingen. Wie schon in Kapitel 4.1 erwähnt, sind

selbst innerhalb einer Spezies, in diesem Fall Ratten, die Expressionsprofile der Steroidrezeptoren unterschiedlich (Jongen-Relo *et al.*, 2000).
In einer weiteren Arbeit wurde die Bedeutung der Hypoaktivität des MR bei der Auslösung von Apoptose durch Aktivierung des GR weiter untersucht: Im Vergleich zur Auslösung von Apoptose reifer, hippokampaler Neurone *in vitro* durch Gabe des GR-Agonisten Dexamethason konnte das Ausmaß der Apoptose noch weiter durch die zusätzliche Gabe des spezifischen MR-Antagonisten Spironolacton gesteigert, und vice versa durch die Gabe von Aldosteron, einem spezifischen MR-Agonisten wiederhergestellt werden (Crochemore *et al.*, 2005).
Übereinstimmend mit unserer Beobachtung, dass in proliferativen Stadien GR exprimiert werden, im ersten Schritt der Differenzierung der Vorläuferzellen in Richtung neuronale Zellen, also in Typ-2b-Zellen, jedoch nicht, sind Ergebnisse von anderen Gruppen.
Kim et al. beispielsweise konnten zeigen, dass die Aktivierung von GR durch den spezifischen Agonisten Dexamethason zwar *in vitro* und *in vivo* den Prozess der Proliferation hippokampaler Vorläuferzellen inhibiert, nicht jedoch den der Differenzierung (Kim *et al.*, 2004).
Im Gegensatz dazu stehen Daten von Yu et al., die beschreiben, dass durch Aktivierung von GR und MR bei Gabe von Corticosteron sowohl Proliferation als auch Differenzierung hippokampaler Neurogenese *in vitro* gehemmt werden. Wie Kim et al. beobachten sie aber ebenfalls eine isolierte Hemmung der Proliferation und nicht der Differenzierung der Zellen, wenn nur GR durch die Dexamethason-Gabe aktiviert werden (Yu *et al.*, 2004).

MR werden erst in ausgereiften, nicht mehr proliferativ aktiven Zellen exprimiert

In der von uns durchgeführten BrdU-Zeitreihe wurde die Expression von MR erst zu sehr späten Zeitpunkten detektiert. Deshalb ist anzunehmen, dass die Expression von MR in den neu gebildeten Zellen erst einsetzt, wenn diese

nicht mehr proliferationsfähig sind. Diese Vermutung bestätigte sich dann auch bei weiteren Untersuchungen zur Phänotypisierung dieser Zellen.

In jung-adulten Mäusen waren die Zellen erst in der Phase der Calbindin-Expression MR-positiv, wobei Calbindin ein Marker für ausgereifte, nicht mehr teilungsfähige Körnerzellen ist. Die Expression von MR setzt wahrscheinlich sogar erst nach Abschluss der Migration statt, denn innerhalb der gesamten SGZ, auf die die Neurogenese im Gyrus dentatus beschränkt ist, konnte keine MR Immunoreaktivität festgestellt werden, eine regelrechte „Aussparung“ war in diesem Bereich zu sehen. Calbindin-positive Zellen, in denen MR während der Zellentwicklung erstmalig exprimiert werden, sind bereits in die granuläre Schicht eingewandert und auch innerhalb dieser lokalisiert, wie in Kapitel 3 auf Abb. 15 zu sehen ist.

Als Nebenbefund konnte in unseren Untersuchungen festgestellt werden, dass exzitatorische Mooszellen, die vor allem im Hilusbereich anzutreffen sind und über die hippokampale Kommissur in den kontralateralen Gyrus dentatus projizieren, sowohl GR- als auch MR-immunoreaktiv sind. Die GR-Expression dieser Zellen wurde bereits vorbeschrieben (Patel and Bulloch, 2003), dass diese Zellen jedoch auch immunoreaktiv für MR sind, war bisher noch nicht bekannt.

Wie bereits ausgeführt, ergeben sich aus der Kolokalisation von GR und MR andere Konsequenzen für das weitere Schicksal der Zelle, als aus der isolierten Expression von GR.

Anhand unserer Daten kann davon ausgegangen werden, dass die Prozesse Proliferation, Differenzierung und Ausreifung der Vorläuferzellen sowohl in der früh postnatalen als auch adulten Neurogenese in unreifen Zellen unabhängig von der direkten Einwirkung von Corticosteron auf MR sind. Hingegen scheint das Überleben der neu gebildeten, aber postmitotisch ausgereiften hippokampalen Körnerzellen entscheidend von der Ausbildung und Aktivität des MR abhängig zu sein. Wie schon erwähnt, kommen funktionelle Interventionsstudien zu dem Ergebnis, dass die Gabe des selektiven GR-Agonisten Dexamethason ein gesteigertes Vorkommen von Apoptose im Gyrus dentatus erwirkt (Kim *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2000;

Sousa *et al.*, 1999; Hassan *et al.*, 1996). Diese Erhöhung der Apoptoserate kann wiederum durch Gaben von Aldosteron sowie geringen Dosen Corticosteron, die zu einer selektiven Besetzung von MR führen, verhindert werden (Sousa *et al.*, 1999; Hassan *et al.*, 1996). Des Weiteren führten supraphysiologische Dosen von Corticosteron nicht zu einer Erhöhung der Apoptoserate, sodass von einer Hypoaktivität des MR als Ursache für gesteigerten programmierten Zelltod im Gyrus dentatus ausgegangen wird.

Gestützt wird diese Hypothese zusätzlich durch die Beobachtung, dass Mäuse, die derart gentechnisch verändert sind, dass sie keinen MR ausbilden ($MR^{-/-}$), im Gegensatz zu GR-defizienten Mäusen ($GR^{-/-}$) eine verringerte Körnerzell-Dichte in der hippokampalen Region aufweisen (Gass *et al.*, 2000). Außerdem war in den $MR^{-/-}$ Mäusen die Neurogeneserate um 65% reduziert, während in $GR^{-/-}$ Mäusen keine Änderung der Neurogenese eintrat (Gass *et al.*, 2000). Es ist also anzunehmen, dass die Aktivierung von GR die proliferative Aktivität im Gyrus dentatus hemmt, während die Aktivierung von MR keinen Einfluss auf die Proliferation in dieser Region, wohl aber auf die Überlebensrate der neu gebildeten Zellen hat. Eine Auslösung von Apoptose in Zellen, die GR und MR ausbilden, könnte also durch die gemeinsame Aktivierung beider Rezeptoren verhindert werden.

Durch unsere phänomenologischen Studien zeigen wir weiterhin, dass auf proliferativ aktiven Zellen, also BrdU-inkorpierenden Zellen, beziehungsweise Typ-1, Typ-2a, Typ-2b und Typ-3 Zellen keine MR, jedoch GR detektierbar sind, sodass durch eine selektive GR-Aktivierung Apoptose ausgelöst werden könnte.

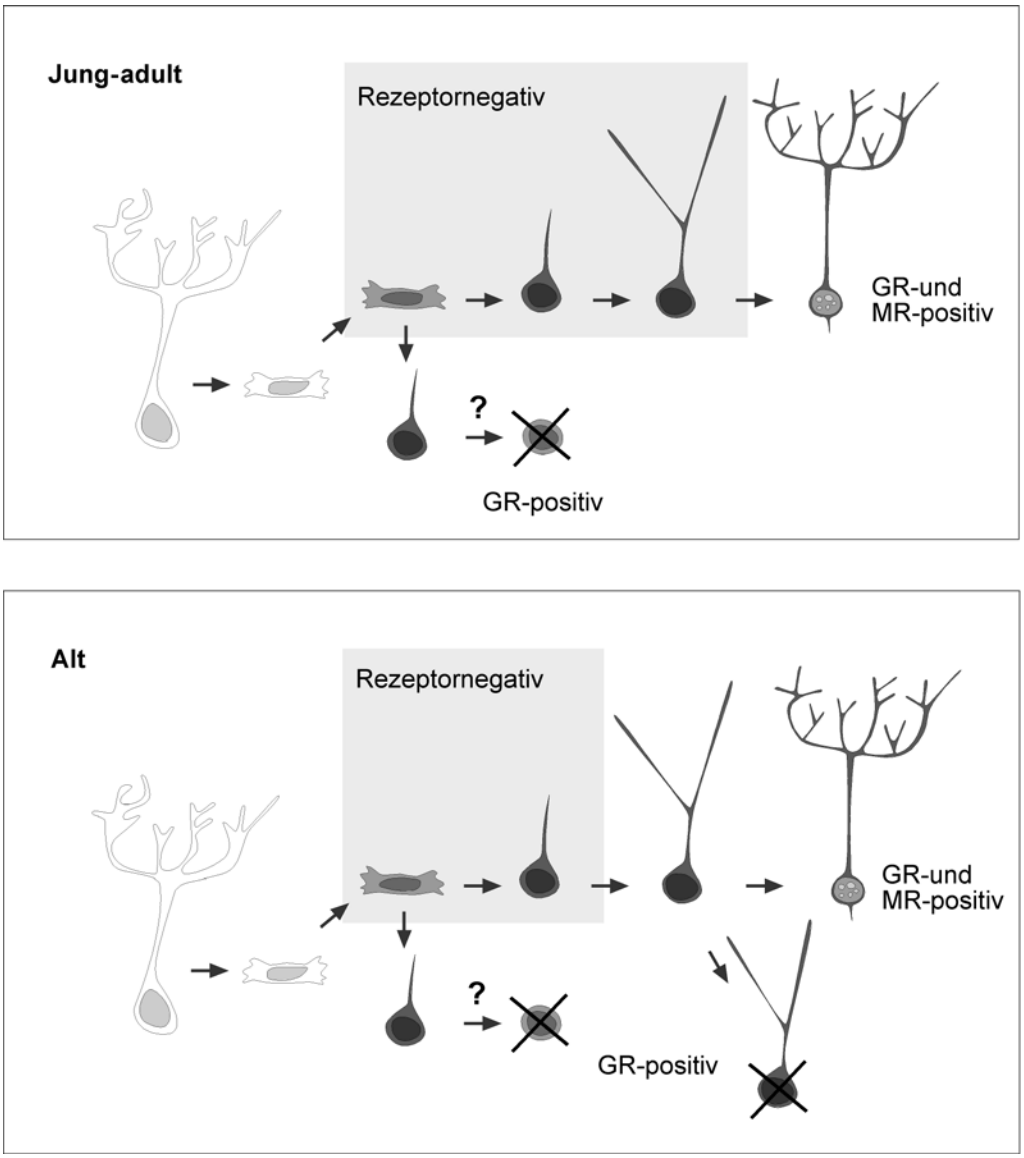

Abb. 19: Die Aktivierung von GR in hippokampalen Vorläuferzellen könnte zur Auslösung von Apoptose führen. In älteren Mäusen ist die Expression von GR im Vergleich zu jüngeren Tieren vermehrt und zusätzlich in ein früheres Stadium verschoben. Dies könnte zu einer erhöhten Vulnerabilität von Vorläuferzellen und auch unreifen Körnerzellen für die Auslösung GR-vermittelter Apoptose führen.

4.3 Einfluss des Alters auf die GR- und MR-Expression in phänotypisierten Zellen der SGZ des Gyrus dentatus

Veränderung der GR und MR Expression im Alter

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die GR-Expression in den untersuchten Vorläuferzellen altersabhängig ist und mit zunehmendem Alter der Tiere ansteigt. Die Expression von MR nahm ebenfalls zu, jedoch nicht im gleichen Maße wie die Expression von GR. Die Bildung von MR verschob sich in ein früheres Stadium der Zellreifung. Während in jung-adulten Tieren die MR-Expression erst in Calbindin-positiven, ausgereiften Körnerzellen zu detektieren war, setzte in alten Tieren die MR-Synthese bereits in einem Teil der zwar postmitotischen, aber noch unreifen Calretinin-positiven Körnerzellen ein. Dennoch war auch hier insgesamt ein ausgeprägterer Anstieg der GR- im Vergleich zur MR-Expression zu beobachten.

Hierzu soll ergänzend erwähnt werden, dass Calretinin-exprimierende Zellen in der SGZ des Gyrus dentatus in alten Mäusen insgesamt in sehr geringer Anzahl vorkamen.

Daten, die sich ausschließlich auf die altersabhängige Veränderung der GR- und MR-Expression in hippokampalen Vorläuferzellen beziehen, existieren bis jetzt noch nicht. Vorhandene Studien untersuchten Veränderungen der Expression im gesamten Hippokampus.

Diese Studien verdeutlichen, dass die Veränderung der hippokampalen GR- und MR-Expression im Alter unter anderem abhängig vom untersuchten Tierstamm ist. So zeigen Brown-Norway Ratten einen GR-Verlust in Hypophyse und Hypothalamus, aber nicht im Hippokampus (van Eekelen *et al.*, 1991), während es sich bei Long Evans Ratten genau andersherum verhält (Issa *et al.*, 1990). Beide Studien bestätigten eine Abnahme der hippokampalen MR-Expression um bis zu 45%. In einer anderen Studie wurde herausgefunden, dass in Ratten die cerebrale Expression von MR mit dem Alter sinkt, während die Expression von GR nicht vom Alter, sondern vom kognitiven Status der Ratten abhängig zu sein scheint und umso niedriger ist, je geringer die kognitive Leistung (Bizon *et al.*, 2001). Hassan et al. fanden sowohl MR- als auch GR-Expression in hippokampalen Zellen im Alter

reduziert und zusätzlich noch die Bindungskapazität dieser Rezeptoren für Corticosteron vermindert (Hassan *et al.*, 1999). Eine der wenigen Studien, die sich in diesem Zusammenhang mit Mäusen beschäftigte, kam zu dem Schluss, dass in 16 Monate alten Mäusen des Stammes C57BL/6, also dem selben wie von uns verwendeten Stamm, die hippokampale GR- und MR-Expression im Vergleich zu Jungtieren unverändert war und ein relativer Hypokortisolismus bestand. Im Gegensatz dazu waren in mittelalten (9 Monate) Mäusen beide Rezeptortypen herunterreguliert und es bestand ein relativer Hyperkortisolismus (Dalm *et al.*, 2005).

Der Wissensstand über den Einfluss des Alters auf hippokampale GR-Expression ist also uneindeutig, während in Bezug auf eine Reduktion der hippokampalen MR-Expression Übereinstimmung zu herrschen scheint. Auch eine Hochregulation einer der beiden Rezeptortypen mit zunehmendem Alter wurde in keiner der Studien beobachtet.

Der von uns beobachtete altersabhängige Anstieg der GR- und MR-Expression in hippokampalen Vorläuferzellen steht also im Kontrast zu den Ergebnissen, die sich auf andere hippokampale Regionen beziehen.

Aktivität der HPA-Achse im Alter

Ein Teil der Studien, die sich mit dem Thema der Auswirkung des höheren Alters auf die HPA-Achse und der Höhe des Corticosteron-Serumspiegels beschäftigten, kam zu dem Schluss, dass im Alter der Rückkopplungsmechanismus der HPA-Achse gestört, und konsekutiv der Corticosteron-Blutspiegel erhöht ist. Dies wurde in verschiedenen Organismen nachgewiesen, so zum Beispiel in Nagetieren (Sapolsky *et al.*, 1992) und Menschen (Lupien *et al.*, 1994). Erhöhte Cortisol-Serumspiegel in Menschen konnten nicht nur mit der Verminderung kognitiver Leistung sondern sogar mit abnehmendem Volumen des hippokampalen Systems korreliert werden (Lupien *et al.*, 1998).

Heine et al. konnten in 24 Monate alten Ratten keine erhöhten Corticosteron-Serumspiegel nachweisen. Im Gegenteil, in alten Ratten war im Vergleich zu 12 Monate und 6 Wochen alten Ratten der Corticosteron-Spiegel signifikant vermindert (Heine *et al.*, 2004). Dies war auch bei den von Dalm et al. untersuchten Mäusen des C57BL/6 Stammes der Fall: Die basale Corticosteron-Serumkonzentration war in sehr alten Mäusen ebenfalls niedriger als in jungen und mittelalten Tieren (Dalm *et al.*, 2005).

Wie bei anderen Regelkreisen auch, unterliegt die GR- und MR-Expression einem Rückkopplungsmechanismus, der in erster Linie von der Höhe der Corticosteron-Konzentrationen im Blut abhängig ist. Diese Art der Regulation führt meist dazu, dass bei erhöhten Stresshormonkonzentrationen eine verminderte cerebrale GR- und MR-Expression bewirkt wird (Kalman and Spencer, 2002). Bei erniedrigten Hormonspiegeln würde es demnach zu einer Erhöhung der Rezeptorexpression kommen.

In den von uns untersuchten Tieren wurden die tatsächlichen Corticosteron-Spiegel nicht gemessen. Ginge man von einem erhöhten Corticosteron-Spiegel aus, könnte die gesteigerte Expression von GR und MR in hippokampalen Vorläuferzellen bedeuten, dass die Rückkopplung der HPA-Achse auch auf Ebene der Interaktion von Rezeptor und Ligand gestört ist und ein erhöhter Corticosteron-Spiegel deshalb nicht zu einer verminderten GR- und MR-Expression führt. Zum Beispiel könnte eine altersbedingte verminderte Bindungskapazität dieser Rezeptoren für Corticosteron, wie von Hassan et al. beschrieben, einen solchen Effekt bewirken (Hassan *et al.*, 1999). Orientiert man sich jedoch an den Daten von Heine et al. und Dalm et al., so würde eine Zunahme von GR und MR in Vorläuferzellen als gegenregulatorische Antwort auf verminderte Corticosteron-Blutkonzentrationen im Organismus ebenfalls schlüssig erscheinen (Dalm *et al.*, 2005; Heine *et al.*, 2004).

Das Ausmaß der Wirkung von Corticosteron auf den Organismus ist eng an die Quantität der Steroidrezeptorexpression gekoppelt und korreliert mit dieser in positiver Weise (Vanderbilt *et al.*, 1987).

Demzufolge würde unabhängig von dem umstrittenen Umstand, ob der Corticosteron-Serumspiegel mit dem Alter steigt oder nicht, eine erhöhte GR-

Expression in hippokampalen Vorläuferzellen im Gyrus dentatus eine erhöhte Vulnerabilität dieser Zellen für Corticosteron bedeuten. Betroffen davon wären vor allem die proliferativ aktiven Typ-1 und Typ-2a-Zellen, die nur GR exprimieren. Typ-2b und Typ-3 Zellen ließen sich bezüglich ihrer Immunoreaktivität in alten Tieren für GR und MR nicht ausreichend sicher auswerten, da sie quantitativ nur in sehr geringer Anzahl vertreten waren. Eine Aussage über ihre potentielle Ansprechbarkeit auf direkt vermittelte Corticosteron-Effekte konnte deshalb von uns nicht getroffen werden.

Für die letztendliche Wirkung von Corticosteron auf die Vorläuferzellen spielt zusätzlich vor allem eine Rolle, ob GR und MR selektiv oder koaktiviert werden. Wie in Kapitel 4.2 diskutiert, hat dies insbesondere auf die Auslösung von Apoptose im Gyrus dentatus entscheidenden Einfluss (Kim *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2000; Sousa *et al.*, 1999; Hassan *et al.*, 1996).

Übereinstimmend mit dieser Beobachtung und der Vermutung, dass proliferationsfähige hippokampale Vorläuferzellen im Alter vulnerabler für Corticosteron-vermittelte Effekte sind, da sie mehr Steroidrezeptoren ausbilden, ist die Studie von Simon et al., in der gezeigt werden konnte, dass die Wirkung von chronischem Stress altersabhängig ist: Alte Ratten waren im Vergleich zu jungen Tieren sehr viel empfindlicher für den proliferationshemmenden Einfluss von Stress auf Vorläuferzellen im Gyrus dentatus (Simon *et al.*, 2005).

Eine höhere Wahrscheinlichkeit der Auslösung von Apoptose in diesen Zellen würde auch erklären, warum die absolute Zellzahl dieser Vorläuferzelltypen unseren Untersuchungen nach in alten Mäusen im Vergleich zu jungen Mäusen stark verringert war. Almeida et al. berichten in diesem Zusammenhang, dass *in vivo* hippokampale Körnerzellen in älteren Ratten zwar stärker antiapoptotische Moleküle wie Bcl-2 und Bcl-x(L) exprimieren, aber dennoch eine höhere basale Apoptose-Rate zeigen und anfälliger für durch GR-Aktivierung ausgelöste Apoptose sind (Almeida *et al.*, 2000). Der beobachtete programmierte Zelltod fand vor allem in der SGZ statt, was unsere Daten zur vermehrten GR-Expression von Vorläuferzellen mit zunehmendem Alter in eben dieser Region unterstützt.

Calretinin-positive Zellen in alten Mäusen exprimieren im Gegensatz zu Calretinin-positiven Zellen in jungen Mäusen GR und MR

Es zeigte sich, dass die Expression von GR in alten Mäusen nicht nur in proliferativ aktiven hippokampalen Vorläuferzellen gesteigert war, sondern auch in postmitotischen, unreifen, Calretinin-exprimierenden Körnerzellen. In diesen Calretinin-positiven Zellen war ebenfalls, in geringerem Masse als im Fall von GR, die Expression von MR erhöht. Der Großteil der Steroidrezeptor-exprimierenden Calretinin-Zellen war sowohl für GR und MR immunoreaktiv, von einem geringeren Anteil wurden nur GR exprimiert, aber keine Zellen waren nur MR-positiv.

Da die Wirkung von Corticosteron maßgeblich von der Ratio der Aktivierung von GR und MR abhängt, wäre es im Kontext der anderen Forschungsergebnisse möglich, dass es durch die Einwirkung von Corticosteron auf Calretinin-positive Zellen, die GR und MR gleichzeitig ausbilden, im Gegensatz zu den anderen proliferativ aktiven Zellpopulationen, die nur GR ausbilden, nicht im selben Maße, beziehungsweise gar nicht zur Auslösung von Apoptose kommt. Dies wäre allerdings nicht bei den unreifen Körnerzellen der Fall, die nur GR exprimieren. Insgesamt bestünde in diesem Fall für viele Calretinin-positive Zellen eine erhöhte Vulnerabilität für die Auslösung von programmiertem Zelltod.

Almeida et al. berichten, dass ältere Ratten als Reaktion auf die Aktivierung von MR mehr antiapoptotische Moleküle synthetisieren als jüngere Tiere. Daher sind sie bei basalen Corticosteron-Spiegeln, die nur zu einer Besetzung des MR führen, wahrscheinlich sehr viel sensitiver für MR-vermittelte, neuroprotektive Wirkungen, in Übereinstimmung mit dieser Vermutung ist auch eine verminderte Apoptoserate bei basalen Corticosteronspiegeln zu beobachten. Dennoch reicht dieser gegenregulatorische Mechanismus wahrscheinlich nicht aus, um der durch das Alter erhöhten Empfindlichkeit für GR-ausgelöste Apoptose bei höheren Corticosteron-Spiegeln entgegen-

zuwirken (Almeida *et al.*, 2000). Die Auslösung von Apoptose durch GR-Aktivierung in hippokampalen Vorläuferzellen wäre ein denkbarer, zugrunde liegender Pathomechnismus von Störungen des Verhaltens und der Kognition, wie Depression oder Demenz, die sowohl mit einer erhöhten Corticosteroidsekretion als auch hippokampalem Zellverlust assoziiert sind (Hassan *et al.*, 1999; de Kloet *et al.*, 1998; Lupien *et al.*, 1998; Sapolsky, 1998; Reagan and McEwen, 1997).

Möglich wäre, dass während der proliferativen Vorstufen der Vorläuferzellen, also den Typ-1, Typ-2a und Typ-3 Zellen, auf Grund der erhöhten GR-Expression ohne gleichzeitige Ausbildung von MR mehr selektive Apoptose stattfindet, aber auf Stufe der postmitotischen, Calretinin exprimierenden Zellen die Überlebensrate der neu gebildeten Zellen, zumindest während basaler Corticosteron-Spiegel, auf Grund der gleichzeitig vermehrten MR-Expression gesteigert ist, da wie bereits diskutiert, eine MR-Aktiverung zu einer Erhöhung der Überlebensrate der neu gebildeten Zellen führt. Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, warum trotz potentiell erhöhter Vulnerabilität bestimmter Vorläuferzellen im Alter für Apoptose, die Gesamtzahl der Körnerzellen im Gyrus dentatus und sein Volumen auch im höheren Alter konstant zu bleiben scheinen (Heine *et al.*, 2003; Bondareff and Geinisman, 1976). Auch Bondolfi et al. beobachteten eine altersabhängige Reduktion der Proliferation, nicht jedoch der Überlebensrate der neu gebildeten Zellen (Bondolfi *et al.*, 2004).

Gestützt wird diese Hypothese des Weiteren von der Beobachtung, dass alte Mäuse, die in einer reizreichen Umgebung gehalten werden, trotz erhöhtem Corticosteron-Serumspiegel eine Steigerung des „Survivals“ neu gebildeter Neurone erfahren. (Kempermann *et al.*, 2002; Kempermann *et al.*, 1998). Allerdings ist auch hier denkbar, dass die in Kapitel 4.2 schon erwähnten alternativen Mechanismen, wie zum Beispiel die Induktion der Synthese von BDNF oder GDNF in Neurogenese stimulierenden Umgebungen, durch eine stärkere neurogene Wirkung den antineurogenen Einfluss von Corticosteron aufheben beziehungsweise übersteigen.

5 Zusammenfassung

In der hier vorgelegten Arbeit wurde die Expression von Glukokortikoid-rezeptoren (GR) und Mineralokortikoidrezeptoren (MR) auf hippokampalen Vorläuferzellen im Gyrus dentatus jung-adulter und alter Mäuse untersucht.
Dass proliferativ aktive Zellen im Gyrus dentatus zu einem Teil GR und MR exprimieren war bereits bekannt, es wurde jedoch nicht untersucht, um welche teilungsfähige Subpopulationen von Zellen es sich dabei handelt.
Im ersten Teil der Studie wurde den Tieren im Rahmen einer Zeitreihe der Proliferationsmarker BrdU verabreicht und mit Hilfe immunhistochemischer Methoden und konfokaler Mikroskopie visualisiert. Im zweiten Teil der Untersuchungen wurden proliferativ aktive Zellen in der SGZ des Gyrus dentatus jung-adulter und alter Tiere mit Hilfe zellulärer Marker phänotypisch charakterisiert und ihre GR- und MR-Expressionsmuster untersucht.
Proliferierende Zellen in der hippokampalen SGZ synthetisieren während ihrer teilungsaktiven Phase zu einem Teil GR, in keinem Fall aber MR. MR werden erst von ausgereiften Zellen, die nicht mehr zu Mitose befähigt sind, exprimiert. Dies konnte sowohl für jung-adulte als auch alte Tiere nachgewiesen werden.
Nicht alle der proliferativ aktiven Zellen in der SGZ synthetisieren GR. Zellen, die sich auf dem Scheideweg zur Entwicklung des neuronalen Phänotyps befinden, exprimieren weder GR noch MR. In dieser entscheidenden Phase sind Vorläuferzellen unempfänglich für rezeptorvermittelte Corticosteron-Effekte.
Ein Teil der proliferativ aktiven Zelltypen war GR-positiv. Es ist wahrscheinlich, dass diese Zellen durch GR-vermittelte Apoptose aus dem Prozess der Neurogenese ausselektiert werden.
Calretinin-positive Zellen, die unreife postmitotische Körnerzellen darstellen, sind in jung adulten Tieren ebenfalls GR- und MR-negativ. Auch diese hinsichtlich der Ausreifung zur fertigen Körnerzelle und funktionellen Integration in das bestehende neuronale Netzwerk wichtige Phase findet

unabhängig von der direkten Einwirkung von Corticosteron auf die Zellen statt.

In alten Mäusen wurde im Vergleich zu jung-adulten Mäusen eine Steigerung der GR-Expression beobachtet. Auch war die GR- und MR-Expression in ein früheres Stadium verschoben: Calretinin-positive Zellen waren zu einem großen Teil GR-, zum Teil auch GR- und MR-positiv.

Insgesamt wurde eine starke Reduktion der Vorläuferzell-Populationen festgestellt.

Die erhöhte GR-Expression in älteren Tieren könnte eine ausgeprägtere Vulnerabilität der Vorläuferzellen für GR-ausgelöste Apoptose verursachen. Dies könnte vor allem während Phasen vermehrter, GR-aktivierender Corticosteron-Sekretion, wie zum Beispiel durch Stress, Demenz und Depression verursacht, von pathogenetischer Bedeutung sein.

Diese Arbeit zeigt erstmalig, dass bestimmte Vorläuferzell-Populationen während entscheidender Schritte im Prozess der Neurogenese unabhängig von direkter Corticosteron-Einwirkung sind, während andere teilungsaktive Populationen in der SGZ wahrscheinlich zu einem Teil durch die Aktivierung von Apoptose aus diesem Prozess ausselektiert werden.

Außerdem wurde zum ersten Mal die GR- und MR-Expression in Vorläuferzellen alter Tiere untersucht und eine Steigerung der GR-Expression beschrieben, die eine erhöhte Vulnerabilität dieser Zellen für GR-vermittelte Apoptose bedingen könnte.

Durch diese Untersuchungen der GR- und MR-Expressionsmuster von hippokampalen Vorläuferzellen unter physiologischen Bedingungen werden wertvolle Informationen für pathogenetische Zusammenhänge während Zustände erhöhter Corticosteron-Sekretion, wie zum Beispiel Depression und Demenz, geliefert.

Aber auch unter physiologischen Bedingungen werden wichtige Hinweise für das Verstehen der komplexen Beziehung zwischen dem Hormon Corticosteron und Neurogenese durch diese Arbeit erbracht.

Literaturverzeichnis

Aberg, M.A., Aberg, N.D., Hedbacker, H., Oscarsson, J., Eriksson, P.S. (2000) Peripheral infusion of IGF-I selectively induces hippocampal neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci*, **20 (8)**, 2896-2903.

Adlard, P.A. & Cotman, C.W. (2004) Voluntary exercise protects against stress-induced decreases in brain-derived neurotrophic factor protein expression. *Neuroscience*, **124**, 985-992.

Ahmed, T., Frey, J.U., Korz, V. (2006) Long-term effects of brief acute stress on cellular signaling and hippocampal LTP. *J Neurosci,* **26 (15)**, 3951-8.

Almeida, O.F.X., Conde, G.L., Crochemore, C. Demeneix, B.A., Fischer, D., Hassan, A.H.S., Meyer, M., Holsboer F., Michaelidis, T.M. (2000) Subtle shifts in the ratios between pro-and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate. *FASEB J*, **14**, 779-790.

Altman, J. (1966) Proliferation and migration of undifferentiated precursor cells in the rat during postnatal gliogenesis, *Exp Neurol,* **16**, 263-278.

Altman, J., Bayer, S.A. (1990) Migration and distribution of two populations of hippocampal progenitors during the perinatal and postnatal periods. *J Comp Neurol*, **301**, 365-381.

Altman, J., Das, G.D. (1965b) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*, **124 (3)**, 319-335.

Altman, J., Das, G.D. (1965a) Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature,* **207**, 953-956.

Altman, J., Das, G.D. (1967) Postnatal neurogenesis in the guinea-pig. *Nature,* **214**, 1098-1101.

Alvarez-Buylla, A., Nottebohm F. (1988) Migration of young neurons in adult avian brain. *Nature,* **335**, 353-354.

Alvarez-Buylla, A., Lim, D.A. (2004) For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*, **41**, 683-686.

Amaral, D.G., Witter, M.P (1995) Hippocampal formation: the rat nervous system. Sydney, Australia, *Academic Press*, 443-493.

Arbel, I., Kadar T., Silbermann, M., Levy, A. (1994) The effects of long-term corticosterone administration on hippocampal morphology and cognitive performance of middle-aged rats. *Brain Res*, **657**, 227-235.

Barnea, A., Nottebohm F. (1994) Seasonal recruitments of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 11217-11221.

Barnea, A., Nottebohm, F. (1996) Recruitment and replacement of hippocampal neurons in young and adult chickadees: an addition to the theory of hippocampal learning. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 714-718.

Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G. (1995) Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell*, **83**, 851-857.

Beech, R.D., Cleary, M.A., Treloar, H.B., Eisch, A.J., Harrist, A.V., Zhong, W., Greer, C.A., Duman, R.S., Picciotto, M.R. (2004) Nestin promoter/enhancer directs transgene expression to precursors of adult generated periglomerular neurons. *J Comp Neurol*, **475**, 128–141.

Benaroya-Milshtein, N., Hollander, N., Apter, A., Kukulansky, T., Raz, N., Wilf., A., Yaniv, I., Pick, C.G. (2004) Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *Eur J Neurosci*, **20**, 1341-1347.

Biebl, M., Cooper C.M., Winkler J. & Kuhn H.G. (2000) Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett*, **291**, 17-20.

Bizon, J.L., Helm, K.A., Han J.S., Chun, H.J., Pucilowska, J., Lund, P.K., Gallagher, M. (2001) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and corticosterone receptor expression in behaviourally characterized young and aged Long-Evans Rats. *Eur J Neurosci,* **14(10),** 1739-1751.

Bizon, J.L. & Gallagher, M. (2003) Production of new cells in the rat dentate gyrus over the lifespan: relation to cognitive decline. *Eur J Neurosci*, **18**, 215-219.

Bondareff, W. & Geinisman, Y. (1976) Loss of synapses in the dentate gyrus of the senescent rat. *Am J Anat*, **145**, 129-136.

Bondolfi, L., Ermini F., Long, J.M., Ingram, D.K., Jucker, M. (2004). Impact of age and caloric restriction on neurogenesis in the dentate gyrus of C57BL/6 mice. *Neurobiol Aging,* **25 (3)**, 333-340.

Bonfanti, L., Peretto, P. (2006) Radial glial origin of the adult neural stem cells in the subventricular zone. *Prog Neurobiol*, Dec 28**.**

Brandt, M.D., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G., Reuter, K., Bick-Sander A., Von der Behrens, W. & Kempermann, G. (2003) Transient calretinin-expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci*, **24**, 603-613.

Brezun, J.M. & Daszuta, A. (1999) Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience*, **89**, 999-1002.

Brezun, J.M. & Daszuta, A. (2000**)** Serotonergic reinnervation reverses lesion-induced decreases in PSA-NCAM labeling and proliferation of hippocampal cells in adult rats. *Hippocampus*, **10 (1)**, 37-46.

Brody, M.J., Haywood, J.R., Touw, K.B. (1980) Neural mechanism in hypertension. *Annu Rev Physiol*, **42**, 441-453.

Brown, J.P., Couillard-Despres, S., Cooper-Kuhn, C.M., Winkler, J., Aigner, L., Kuhn, H.G. (2003) Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol*, **467**, 1-10.

Butler, A.K. Uryu, K., Chesselet, M.F. (1998) A role for N-methyl-D-aspartate receptors in the regulation of synaptogenesis and expression of the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule in the developing striatum. *Dev Neurosci*, **20 (2-3)**, 253-62

Cameron, H.A., Woolley, C.S. & Gould, E. (1993) Adrenal receptor immunoreactivity in cells born in the adult rat dentate gyrus. *Brain Res*, **611**, 342-346.

Cameron, H.A., Woolley, C.S., McEwen, B.S., Gould, E. (1993) Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience,* **56**, 337-344.

Cameron, H.A. & Gould, E. (1994) Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience,* **61**, 203-209.

Cameron, H.A., McEwen, B.S. & Gould, E. (1995) Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J Neurosci,* **15**, 4687-4692.

Cameron, H.A. & McKay, R.D. (1999) Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci,* **2**, 894-897.

Cameron, H.A., Tanapat, P. & Gould, E. (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**, 349-354.

Cooper-Kuhn, C.M, Kuhn, H.G. (2002) Is it all DNA-repair? Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain. *Brain Res Dev Brain Res,* **134**, 13-21.

Checkley, S. (1996) The neuroendocrinology of depression and chronic stress. *Br Med Bull*, **52**, 597-617.

Chen, T.L. (2004) Inhibition of growth and differentiation of osteoprogenitors in mouse bone marrow stromal cell cultures by increased donor age and glucocorticoid treatment. *Bone*, **35**, 83-95.

Chou, Y.C., Luttge, W.G., Sumners, C. (1991) Expression of mineralocorticoid type I receptors and glucocorticoid type II receptors in astrocyte glia as a function of time in culture. *Brain Res Dev Brain Res*, **61 (1),** 55-61.

Clark, A.S., Mitre, M.C., Brinckjohnson, T. (1995) Anabolic-androgenic steroid and adrenal steroid effects on hippocampal plasticity. *Brain Res*, **679**, 64-71.

Coe, C.L., Kramer, M., Czeh, B., Gould, E., Reeves, A.J., Kirschbaum, C., Fuchs, E. (2003) Prenatal stress diminishes neurogenesis in the dentate gyrus of juvenile rhesus monkeys. *Biol Psychiatry*, **54**, 1025-1034.

Corish, P., Tyler-Smith, C. (1999) Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Eng*, **12**, 1035-1040.

Crochemore, C., Lu, J., Wu, Y., Lipositz, Z., Sousa, N., Holsboer F., Almeida, O.F. (2005) Direct targeting of hippocampal neurons for apoptosis by glucocorticoids is reversible by mineralocorticoid receptor activation. *Mol Psychiatry.* **10(8),** 790-798.

Czéh, B., Welt, T., Fischer, A.K., Erhardt, A., Schmitt, W., Müller, M.B., Toschi, N., Fuchs, E., Keck, M.E. (2002) Chronic psychosocial stress and concomitant repetitive transcranial magnetic stimulation: Effects on stress hormone levels and adult hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry*, **52**, 1057-1065.

Dalm, S., Enthoven, L., Meijer, O.C., van der Mark, M.H., Karssen, A.M., de Kloet, E.R., Oitzl, M.S. (2005) Age-related changes in hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity of male C57BL/6J mice. *Neuroendocrinology*, **81(6),** 372-80.

De Kloet, E.R., Wallach, G., McEwen, B.S. (1975) Differences in corticosterone and dexamethasone binding to rat and pituitary. *Endocrinology*, **96,** 598-609.

De Kloet, E.R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M.S., Joels, M. (1998) Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev*, **19**, 269-301.

De Leon, M.J., McRae, T., Tsai, J.R., George, A.E., Marcus, D.L., Freedman, M., Wolf, A.P., McEwen, B.S. (1988) Abnormal cortisol response in Alzheimer´s disease linked to hippocampal atrophy. *Lancet*, **2**, 391-392.

Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A. (1999) Subventricular zone astrozytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, **97**, 703-716.

Droste, S.K., Gesing, A., Ulbricht, S., Müller, M.B., Linthorst, A.C.E., Reul, J.M.H.M. (2003) Effects of long-term voluntary exercise on the mouse hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrinology*, **144**, 3012-3023.

Eriksson, P.S., Perfilieva, E. Björk-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A. & Gage, F.H. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, **4**, 1313-1317.

Feng, L., Hatten, M.E. Heintz, N. (1994) Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron*, **12**, 895-908.

Filippov, V., Kronenberg, G., Pivneva, T., Reuter, K., Stienr, B., Wang, L.P., Yamaguchi, M., Kettenman, H. & Kempermann, G. (2003) Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci*, **23**, 373-382.

Frotscher, M., Soriano, E., Misgeld, U. (1994) Divergence of hippocampal mossy fibers. *Synapse*, **16**, 148-160.

Fuchs, E., Flugge, G. (1998) Stress, glucocorticoids and structural plasticity of the hippocampus. *Neurosci Biobehav Rev*, **23**, 295-300.

Fukuda, S., Kato F., Tozuka, Y., Yamaguchi, M., Miyamoto, Y., Hisatsune, T. (2003) Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci*, **23**: 9357-9366.

Gaillard, P.J., Voorwinden, L.H., Nielsen, J.L., Ivanov, A., Atsumi, R., Engman, H., Ringbom, C., de Boer, A.G., Breimer, D.D. (2001) Establishment and functional characterization of an in vitro model of the blood-brain barrier, comprising a co-culture of brain capillary endothelial cells and astrocytes. *Eur J Pharm Sci*, **12(3)**, 215-222.

Garcia, A., Steiner, B., Kronenberg, G., Bick-Sander, A., Kempermann, G. (2004) Age-dependent expression of glucocorticoid- and mineralocorticoid receptors on neural precursor cell populations in the adult murine hippocampus. *Aging Cell,* **3,** 363-371.

Gass, P., Kretz, O., Wolfer, D.P., Berger, S., Tronche, F., Reichardt, H., M., Kellendonk, C., Lipp, H.P., Schmid, W., Schütz, G. (2000) Genetic disruption of mineralocorticoid receptor leads to impaired neurogenesis and granule cell degeneration in the hippocampus of adult mice. *EMBO*, **1 (5),** 447-451.

Ge, S., Goh, E.L., Sailor, K.A., Kitabatake, Y., Ming, G.L., Song, H. (2006) GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, **439,** 598-593.

Goldman, S.A., Nottebohm, F. (1983) Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, **80**, 2390-2394.

Gould, E., McEwen, B.S., Tanapat, P. Galea L.A., Fuchs E. (1997) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci,* **17**, 2492-2498.

Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B.S., Flugge, G., Fuchs, E. (1998) Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci USA*,**95**, 3168-3171.

Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A.J., Shors, T.J. (1999) Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci*, **2**, 260-265.

Gould, E., Reeves, A.J., Fallah, M., Tanapat, P., Gross, C.G., Fuchs, E. (1999a) Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc Natl Acad Sci USA,* **96**, 5263-5267.

Gould, E. (1999b) Serotonin and hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology*, **21**, 46-51.

Gratzner, H.G. (1982) Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iodeoxyridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science*, **218**, 474-475.

Han, E.S., Evans, T.R., Shu, J.H., Lee, S., Nelson, J.F. (2001) Food restriction enhances endogenous and corticotropin-induced plasma elevations of free but not total corticosterone throughout life in rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, **56 (9),** B391-397.

Han, F. Ozawa, H., Matsuda, K., Nishi, M., Kawata, M. (2005) Colocalization of mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the hippocampus ad hypothalamus. *Neurosci Res,* **51 (4)**, 371-381.

Hastings, N.B., Gould, E. (1999) Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J Comp Neurol*, **413**, 146-154.

Hassan, A.H.S., von Rosenstiel, P., Patchev, V.K., Holsboer F., Almeida, O.F.X. (1996) Exacerbation of apoptosis in the dentate gyrus of the aged rat by dexamethasone and the protective role of corticosterone. *Exp Neurol*, **140,** 43-52.

Hassan, A.H., Patchev, V.K., von Rosenstiel, P., Holsboer, F., Almeida, O.F. (1999) Plasticity of hippocampal corticosteroid receptors during aging in the rat. *Faseb J*, **13(1)**, 115-22.

Hayes N.L., Nowakowski R.S. (2002) Dynamics of cell proliferation in the adult dentate gyrus of two inbred strains of mice. *Brain Res Dev Brain Res*, **134 (1-2)**, 77-85.

Heine, V.M., Maslam, S., Joels, M. & Lucassen P.J. (2004) Prominent decline of newborn cell proliferation, differentiation, and apoptosis in the aging dentate gyrus, in absence of an age-related hypothalamus-pituitary-adrenal axis activation. *Neurobiol Aging*, **25**, 361-375.

Holmes, M.M., Galea, L.A., Mistlberger, R.E., Kempermann, G. (2004) Adult hippocampal neurogenesis and voluntary running activity: circadian and dose-dependent effects. *J Neurosci Res,* **76**, 216-222.

Huttmann, K., Sadgrove, M., Wallraff, A., Hinterkeuser, S., Kirchhoff, F., Steinhauser, C., Gray., W.P. (2003) Seizures preferentially stimulate proliferation of radial glia-like astrocytes in the adult dentate gyrus: Functional and immunocytochemical analysis. *Eur J Neurosci*, **18,** 2769-2778.

Issa, A.M., Rowe, W., Gauthier, S., Meaney, M.J. (1990) Hypothalamic-pituitary-adrenal activity in aged, cognitively impaired and cognitively unimpaired rats. *J Neurosci,* **10**, 3247-54.

Jacobson, L.,Sapolsky, R. (1991) The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev*, **12**, 118-134.

Joëls, M., De Kloet, E.R. (1989) Effects of glucocorticoids and norepinephrine on the excitability in the hippocampus. *Science,* **245,** 1502–1505.

Jongen-Relo, A.L., Pothuizen, H.H., Feldon, J., Pryce, C.R. (2002) Comparison of central corticoid receptor expression in male Lewis and Fischer rats. *Brain Res.* 953 (1-2): 223-31.

Kalman, B.A., Spencer, R.L. (2002) Rapid corticosteroid-dependent regulation of mineralocorticoid receptor protein expression in rat brain. *Endocrinology*, **143**, 4184-4195.

Kaplan, M.S., Hinds, J.W. (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science,* **197**, 1092-1094.

Kawaguchi, A., Miyata, T., Sawamoto, K., Takashita, N., Murayama, A., Akamatsu, W., Ogawa, M., Okabe, M., Tano, Y., Goldman, S.A., Okano, H. (2001) Nestin-EGFP transgenic mice: visualization of the self-renewal and multipotency of CNS stem cells. *Mol Cell Neurosci*, **17**, 259–273.

Kempermann, G., Kuhn, H.G., Gage, F.H. (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, **386**, 493-495.

Kempermann, G., Kuhn, H.G., Gage, F.H. (1997a) Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 10409-10414.

Kempermann, G., Brandon, E.P., Gage, F.H. (1998a) Environmental stimulation of 129/SvJ mice results in increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Curr Biol*, **8**, 939-942.

Kempermann, G., Brandon, E.P., Gage, F.H. (1998b) Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci*, **18**, 3206-3212.

Kempermann, G., Gast, D., Gage, F.H. (2002) Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann Neurol*, **52**, 135-143.

Kempermann G., Jessberger S., Steiner B., Kronenberg, G. (2004) Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci*, **27 (8),** 447-452.

Kempermann, G., Chesler, E.J., Lu, L., Williams, R.W., Gage, F.H. (2006) Natural variation and genetic covariance in adult hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA,* **103 (3)**, 780-785.

Kerr, D.S., Campbell, L.W., Hao, S.-Y., Landfield, P.W. (1989) Corticosteroid modulation of hippocampal potentials: increased effect with aging. *Science*, **245,** 1505–1507.

Kim, J.B., Ju, J.Y., Kim, J.H., Kim, T.Y., Yang, B.H., Lee, Y.S., Son, H. (2004) Dexamethasone inhibits proliferation in adult hippocampal neurogenesis in vivo and in vitro. *Brain Res,* **1027 (1-2),** 1-10.

Kornack, D.R., Rakic, P. (1999) Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci USA,* **96**, 5768-5773.

Kriegstein, A., Götz, M. (2003) Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia*, **43**, 37-43.

Kronenberg, G., Reuter, K., Steiner, B., Brandt, M.D., Jessberger, S., Yamaguchi, M. & Kempermann, G. (2003) Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol*, **467**, 455-463.

Krozowski, Z.S., Funder, J.W. (1983) Renal mineralocorticoid receptors and hippocampal corticosterone binding species have identical intrinsic steroid specifity. *Proc Natl Acad Sci USA,* **80**, 6056-6060.

Kuhn, H.G., Dickinson-Anson,, H. & Gage, F.H. (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci*, **16**, 2027-2033.

Kuhn, H.G., Biebl, M., Wilhelm, D., Li, M., Friedlander, R. M., Winkler, J. (2005) Increased generation of granule cells in adult Bcl-2-overexpressing mice: a role for cell death in continued hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci*, **22 (8)**, 1907-1915.

Kunze, A., Grass, S., Witte, O.W., Yamaguchi, M., Kempermann, G., Redecker, C. (2006) Proliferative response of distinct hippocampal progenitor cell populations after cortical infarcts in the adult brain. *Neurobiol Dis,* **21**, 324-332.

Lee, J. Duan, W., Long, J.M, Ingram, D.K., Mattson, M.P. (2000) Dietary restriction increases survival of newly-generated neural cells and induces BDNF expression in the dentate gyrus of rats. *J Mol Neurosci*, **15**, 99-108.

Lee, J., Duan, W., Mattson, M.P. (2002a) Evidence that BDNF 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**, 1367-1375.

Lee J., Seroogy K. B., Mattson, M.P. (2002b) Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem*, **80**, 539-547.

Lemaire, V., Aurousseau, C., Le Moal, M., Abrous, D.N. (1999) Behavioural trait of reactivity to novelty is related to hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci,* **11**, 4006-4014.

Lemaire, V., Koehl, M., Le Moal, M., Abrous, D.N. (2000) Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 11032-11037.

Lendhal, U., Zimmermann, L.B. & Mc Kay R.D.G. (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, **60**, 585-595.

Lie, D.C., Song, H., Colamarino, S.A., Ming, G.L., Gage, F.H. (2004) Neurogenesis in the adult brain: new strategies or central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **44**, 399-421.

Lin, S.J., Defossez, P.A., Guarente, L. (2000) Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in Saccharomyces cerevisiae. *Science*, **289**, 2126-2128.

Lledo, P.M., Somasundaram, B., Morton, A.J., Emson, P.C., Mason, W.T. (1992) Stable transfection of calbindin-D28k into the GH3 cell line alters calcium currents and intracellular calcium homeostasis. *Neuron*, **9(5),** 943-54.

Lois, C., Alvarez-Buylla, A. (1993) Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci USA,* **90**, 2074.2077.

Lupien, S., Lecours, A., Lussier, I., Schwartz, G., Nair, N., Meaney, M. (1994) Basal cortisol levels and cognitive deficits in human aging. *J Neurosci*, **14**, 2893-2903.

Lupien, S., deLeon, M., deSanti, S., Convit, A., Tarshish, C., Nair, N.P.V., Thakur, M., McEwen, B.S., Hauger,R.L., Meaney, M.J. (1998) Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nat Neurosci,* **1 (1),** 69-73.

Makatsori, A., Duncko, R., Schwendt, M., Moncek, F., Johansson, B.B., Jezova, D. (2003) Voluntary wheel running modulates glutamate receptor subunit gene expression and stress hormone release in Lewis rats. *Psychoneuroendocrinology*, **28**, 702-714.

Malberg, J.E., Eisch A.J., Nestler, E.J., Duman, R.S. (2000) Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in the adult rat hippocampus*. J Neurosci,* **20**, 9104-9110.

Malberg, J.E., Duman, R.S. (2003) Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology*, **28**, 1562-1571.

Margarinos, A.M., McEwen, B.S. (1995) Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience*, **69**, 89-98.

Markakis, E.A., Gage, F.H. (1999) Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J Comp Neurol*, **406**, 449-460.

Mar Sánchez M., Young, L.J., Plotsky, P.M., Insel, T.R. Distribution of corticosteroid receptors in the rhesus brain: relative absence of glucocorticoid receptors in the hippocampal formation. *J Neurosci*, **29 (12)**, 4657-4668.

McConkey, D.J., Nicotera, P., Hartzell., P., Bellomo, G., Wyllie, A.H., Orrenius, S. (1989) Glucocorticoids activate a suisuce process in thymocytes through an elevation of cytosolic Ca2+ concentration. *Arch Biochem Biophys,* **269**, 365-370.

McEwen, B.S., Weiss, J.M., Schwartz, L.S. (1968) Selective retention of corticosterone by limbic structures in rat brain. *Nature*, **220**, 911-912.

McEwen, B.S., Lambdin, L.T., Rainbow, T.C., De Nicola, A.F. (1986) Aldosterone effects on salt appetite in adrenalectomized rats. *Neuroendocrinology*, **43**, 38-43.

McEwen, B.S. (2000) Effects of adverse experiences for brain structure and function. *Biol Psychiatry*, **48**, 721-731.

McEwen, B.S. (2005) Glucocorticoids, depression, and mood disorders: structural remodeling in the brain. *Metabolism*, **54**, 20-23.

Mellodew, K., Suhr, R., Uwanogho, D.A., Reuter, I., Lendahl, U., Hodges, H., Price, J. (2004) Nestin expression is lost in a neural stem cell line through a mechanism involving the proteasome and Notch signalling. *Brain Res Dev Brain Res*, **151 (1/2),** 13-23.

Mignone, J.L., Kukekov, V., Chiang, A.S., Steindler, D., Enikolopov, G. (2004) Neural stem and progenitor cells in nestin-GFP transgenic mice. *J Comp Neurol*, **469**, 311–324.

Ming, G.L., Song, H. (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Ann Rev Neurosci,* **28**, 223-250.

Mirescu, C., Peters, J.D., Noiman, L., Gould, E. (2006) Sleep deprivation inhibits adult neurogenesis in the hippocampus by elevating glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci USA,* **103 (50)**, 19170-19175.

Mirescu, C., Gould, E. (2006) Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus*, **16 (3)**, 233-238.

Moncek, F., Duncko, R., Johansson, B.B., Jezova, D. (2004) Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. *J Neuroendocrinol*, **16**, 423-431.

Montaron, M.F., Petry, K.G., Rodriguez, J.J., Marinelli, M., Aurousseau, C., Rougon, G., Le Moal, M. & Abrous D.N. (1999) Adrenalectomy increases neurogenesis but not PSA-NCAM-expression in aged dentate gyrus. *Eur J Neurosci*, **11**, 1479-1485.

Montaron, M.F., Piazza, P.V., Aurousseau, C., Urani, A., Le Moal, M. & Abrous, D.N. (2003) Implication of corticosteroid receptors in the regulation of hippocampal structural plasticity. *Eur J Neurosci*, **18**, 3105-3111.

Nacher J., Rosell, D.R., Alonso-Llosa, G., McEwen, B.S. (2001) NMDA receptor antagonist treatment induces a long-lasting increase in the number of proliferating cells, PSA-NCAM-immunoreactive granule neurons and radial glia in the adult rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci* **13 (3)**, 512-20.

Nacher, J., Gomez-Climent. M.A., McEwen, B. (2004) Chronic non-invasive glucocorticoid administration decreases polysialylated neural cell adhesion molecule expression in the rat dentate gyrus. *Neurosci Lett,* **370 (1)**, 40-44.

Nemeroff, C.B., Vale, W.W. (2005) The neurobiology of depression: inroads to treatment and new drug discovery. *J Clin Psychiatry*, **66**, 5-13.

Nowakowski, R.S., Lewin, S.B., Miller, M.W. (1989) Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J Neurocytol*, **18**, 311-318.

Nilsson, M., Perflilieva, E., Johansson, U., Orwar, O., Eriksson, P. (1999) Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J Neurobiol*, **39**, 569-578.

Palmer, T.D., Willhoite, A.R., Gage, F.H. (2000) Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol*, **425(4)**, 479-94.

Patel, A., Bulloch, K. (2003) Type II Glucocorticoid receptor Immunoreactivity in the mossy cells of the rat and the mouse hippocampus. *Hippocampus* **13**, 59-66.

Patel, N.V., Finch, C.E. (2002) The glucocorticoid paradox of caloric restriction in slowing brain aging. *Neurobiol Aging*, **23 (5)**, 707-717.

Pham, K., Nacher, J., Hof, P.R., McEwen, B.S. (2003) Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci*, **17 (4),** 879-886.

Plümpe, T., Ehninger, D., Steiner, B., Klempin, F., Jessberger, S., Brandt, M., Römer, B., Ramirez Rodriguez, G., Kronenberg, G., Kempermann, G. (2006) Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of regulation of precursor cell proliferation. *BMC Neurosci*, **7,** 77.

Rakic, P. (2002) Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. *Nat Rev Neursci*, **3**, 65-71.

Reagan, L.P., McEwen, B.S. (1997) Controversies surrounding glucocorticoid-mediated cell death in the hippocampus. *J Chem Neuroanat*, **13**, 149-167.

Reul, J.M.H.M., De Kloet, E.R. (1985) Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, **117**, 2505-2511.

Ribak, C.E., Seress, L., Amaral, D.G. (1985) The development, ultrastructure and synaptic connections of the ossy cells of the dentate gyrus. *J Neurocytol*, **14**, 835-857.

Rodriguez, J.J., Montaron, M.F., Petry, K.G., Aurousseau, C., Marinelli, M., Premier, S., Rougon, G., Le Moal, M., Abrous, D.N. (1998) Complex regulation of the expression of the polysialylated form of the neuronal cell adhesion molecule by glucocorticoids in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci*, **10**, 2994-3006.

Sabatino, F., Masoro, E.J., McMahan, C.A., Kuhn, R.W. (1991) Assessment of the role of the glucocorticoid system in aging processes and in the action of food restriction. *J Gerontol*, **46 (5)**, B171-9.

Sairanen, M., Lucas G., Ernfors, P., Castrén, M., Castrén, E. (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),** 1089-1094.

Sapolsky, R.M. (1992) Do glucocorticoid concentrations rise with age in the rat? *Neurobiol Aging*, **13**, 171-174.

Sapolsky, R.M. (1996) Stress, glucocorticoids and damage to the nervous system: the current state of confusion. *Stress*, **1**, 1-19.

Sapolsky, R.M. (2000) The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death. *Biol Psychiatry*, **48**, 755-765.

Schmidt-Hieber, C., Jonas, P. & Bischofberger, J. (2004) Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature,* **429,** 184-187.

Seri, B., Garcia-Verdugo, J.M., McEwen, B.S., Alvarez-Buylla, A. (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci*, **21**, 7153-7160.

Seri, B., Garcia-Verdugo, J.M., Collado-Morente, L., McEwen, B.S., Alvarez-Buylla, A. (2004) Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neuro*, **478**, 359.

Shors, T.J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T., Gould, E. (2001) Neurogenesis in the adult is involved in the formation in trace memories. *Nature,* **410**, 372-376.

Simon, M., Czeh, B., Fuchs E. (2005) Age-dependent susceptibility of hippocampal cell proliferation to chronic psychosocial stress. *Brain Res,* **1049 (2),** 244-248.

Sloviter, R.S. (1989) Calcium-binding protein (calbindin-D28k) and parvalbumin immunocytochemistry: localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity**.** *J Comp Neuro*, **280**, 183-96.

Song, L., Che, W., Min-Wei, W., Murakami, Y., Matsumoto, K. (2006) Impairment of the spatial learning and memory induced by learned helplessness and chronic mild stress. *Pharmacol Biochem Behav*, **83, (2)**, 186-193.

Soriano, E., Frotscher, M. (1994) Mossy cells of the fascia dentate are glutamate-immunoreactive. *Hippocampus*, **4**, 65-69.

Sousa, N., Paula-Barbosa, M.M., Almeida, O.F.X. (1999) Ligand and subfield specificity of corticoid-induced neuronal loss in the rat hippocampal formation. *Neuroscience.* **89,** 1079-1087.

Stanfield, B.B., Trice, J.E. (1988) Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp Brain Res*, **72**, 399-406.

Steiner, B., Kronenberg, G., Jessberger, S., Brandt, M. D., Reuter, K., Kempermann, G. (2004) Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia,* **46**, 41-52.

Steiner, B., Klempin, F., Wang, L., Kott, M., Kettenmann, H., Kempermann, G. (2006) Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia*, **54**, 805-814.

Storm-Mathisen, J., Leknes, A.K., Bore, A.T.,Vaaland, J.L, Edminson, P., Haug, F.M., Ottersen, O.P. (1983) First visualization of glutamate and GABA in neurons by immunocytochemistry. *Nature*, **301**, 517-520.

Strasser, A., Skalicky, M., Hansalik, M., Viidik, A. (2006) The impact of environment in comparison with moderate physical exercise and dietary restriction on BDNF in the cerebral parietotemporal cortex of aged Sprague-Dawley rats. *Gerontology*, **52 (6)**, 377-381.

Takahashi, T., Nowakowski, R.S., Caviness, V.S. Jr. (1992) BUdR as an S-phase marker for quantitative studies of cytokinetic behaviour in the murine cerebral ventricular zone. *J Neurocytol,* **21**, 185-197.

Tanapat, P., Hastings, N.B., Reeves, A.J., Gould, E. (1999) Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci*, **19 (14)**, 5792-5801.

te Pas, M.F., de Jong, P.R., Verburg, F.J. (2000) Glucocorticoid inhibition of C2C12 proliferation rate and differentiation capacity in relation to mRNA levels of the MRF gene family. *Mol Biol Rep*, **27**, 87-98.

Thomas, R.M., Hotzenpiller, G., Peterson, D.A. (2007) Acute psychosocial stress reduces cell survival in adult hippocampal neurogenesis without altering proliferation. *J Neurosci*, **27 (11)**, 2734-2743.

Tozuka, Y., Fukuda, S., Namba, T., Seki, T., Hisatsune, T. (2005) GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron*, **47**, 803-815.

Vallee, S.M., Grill, C.A., Gonzalez, S., Cosen-Binker, L., De Kloet, E.R., McEwen, B.S., De Nicola, A.F. (1995) Further studies in deoxycorticosterone acetate treated rats: brain content of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors and effect of steroid antagonists on salt intake. *Neuroendocrinology*, **61**, 117-124.

Vanderbilt, J.N. Miesfeld, R., Maler, B.A., Yamamoto, K.R. (1987) Intracellular receptor concentration limits glucocorticoid-dependent enhancer activity. *Mol Endocrinol*, **1**, 68-74.

van Eekelen, J.A. Jiang, W., De Kloet, E.R., Bohn, M.C. (1988) Distribution of the mineralocorticoid and the glucocorticoid receptor mRNAs in the rat hippocampus. *J Neurosci Res*, **21**, 88-94.

van Eekelen J.A., Rots, N.Y., Sutanto, W., Oitzl, M.S., de Kloet, E.R. (1991) Brain corticoid receptor gene expression and neuroendocrine dynamics during aging. *J Steroid Biochem Mol Biol* **40(4-6)**, 679-83.

van Praag, H., Christie, B.R., Sejnowski, T.J., Gage, F.H. (1999a) Running enhances neurogenesis, learning and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA,* **96**, 13427-13431.

van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.H. (1999b) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci,* **2**, 266-270.

van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.H. (2000) Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci*, **1(3),** 191-198.

van Praag, H., Schinder, A.F., Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D., Gage, F.H. (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature,* **415**, 1030-1034.

Veldhuis, H.D., Van Koppen, C., Van Ittersum, M., De Kloet, E.R. (1982) Specifity of the adrenal steroid receptor system in the rat hippocampus. *Endocrinology*, **110,** 2044-2051.

Verkhusha, V.V., Kuznetsova, I.M., Stepanenko, O.V., Zaraisky, A.G., Shavlovsky, M.M, Turoverov, K.K., Uversky, V.N. (2003) High stability of Discosoma DsRed as compared to Aequorea EGFP. *Biochemistry*, **42,** 7879-7884.

Vielkind, U, Walencewicz, A., Levine, J.M., Bohn, M.C. (1990) Type II glucocorticoid receptors are expressed in oligodendrocytes and astrocytes. *J Neurosci Res*, **27 (3)**, 360-373.

Wang, S., Scott, B.W. & Wojtowicz, J.M. (2000) Heterogenous properties of dentate granule neurons in the adult rat. *J Neurobiol,* **42,** 248-257.

Wang, L.P., Kempermann, G., Kettenmann, H. (2005) A subpopulation of precursor cells in the mouse dentate gyrus receives synaptic GABAergic input. *Mol Cell Neurosci,* **29,** 181-189.

Watanabe, Y., Gould, E., McEwen, B.S. (1992) Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res*, **558**, 341-344.

Weindruch, R., Sohal R.S. (1997) Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Caloric intake and aging. *N Engl J Med*, **337**, 986-994.

Wimer, C., Wimer R.E., Wimer, J.S. (1983) An association between granule cell density in the dentate gyrus and two-way avoidance conditioning in the house mouse. *Behav Neurosci,* **97**, 844-856.

Wong, E.Y., Herbert, J. (2005) Roles of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the regulation of progenitor proliferation in the adult hippocampus. *Eur J Neurosci*, **22**, 785-792.

Woolley, C.S., Gould, E., McEwen, B.S. (1990) Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res*, **531**, 225-231.

Woolley, C.S., Gould, E., Sakai, R.R., Spencer, R.L., McEwen, B.S. (1991) Effects of aldosterone or RU28362 treatment on adrenalectomy-induced cell death in the dentate gyrus of the adult rat. *Brain Res*, **554**, 312-315.

Yamaguchi, M., Saito, H., Suzuki, M. & Mori, K. (2000) Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-GFP transgenic mice. *Neuroreport*, **11**, 1991-1996.

Yamaguchi, M. (2005) Analysis of neurogenesis using transgenic mice expressing GFP with nestin gene regulatory regions. *Chem Senses,* **30**, Suppl 1:i117-i118.

Young, D., Lawlor, P.A., Leone, P., Dragunow, M., During, M.J. (1999) Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nat Med*, **5(4),** 448-53.

Yu, I.T., Lee, S.H., Lee, Y.S., Son, H. (2004) Differential effects of corticosterone and dexamethasone on hippocampal neurogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, **317(2)**, 484-490.

Zhao, C., Teng, E.M., Summers, R.G. Jr, Ming, G.L., Gage, F.H. (2006) Dinstinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocapmus. *J Neurosci*, **26(1)**, 3-11.

Zhao, S., Chai, X., Frotscher, M. (2007) Balance between neurogenesis and gliogenesis in the adult hippocapmus: role for reelin. *Dev Neurosci*, **29 (1-2),** 84-90.

Zimmerman, L., Lendahl, U., Cunningham, M., McKay, R., Parr, B., Gavin, B., Mann, J., Vassileva, G., McMahon, A. (1994) Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron*, **12**, 11–24.

Zupanc, G.K., Horschke, I. (1995) Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: a quantitative mapping study. *J Comp Neurol*, **353**, 213-233.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Gerd Kempermann, ohne dessen stetige und sehr engagierte Betreuung und Unterstützung das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.
Desweiteren möchte ich mich herzlichst bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Neuronale Stammzellen“ am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin bedanken, die mir in methodischen und inhaltlichen Fragen helfend zur Seite gestanden haben. Insbesondere gilt dies für Irene Thun, Dr. Anika Bick-Sander und Dr. Barbara Steiner.
Ausserdem danke ich von Herzen Christian Friedel, der mir bei der Erstellung der Grafiken sehr geholfen hat.
Das Graduiertenkolleg „Neuropsychologie und Psychiatrie des Alters“ hat in seiner interdiszplinären Vorgehensweise und die Deutsche Forschungsgemeinschaft durch ihre finanzielle Unterstützung dieser Arbeit einen Rahmen gegeben, der für ihr Entstehen sehr fruchtbar war und mir zudem ermöglicht hat, mit vielen anderen wissenschaftlich interessierten und sehr sympathischen Menschen in Kontakt zu kommen. Diese Erfahrung möchte ich keinesfalls missen und mich für diese Möglichkeit herzlich bedanken.

Erklärung

Ich, Ana Micaela García, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Expression von Glukokortikoid- und Mineralokortikoid-rezeptoren auf neuronalen Vorläuferzellen im murinen Gyrus dentatus“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum Unterschrift

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.