

Aus dem Centrum für Anatomie
Institut für Integrative Neuroanatomie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Vorkommen und Verteilung peptiderger Neurotransmitter in
hippocampalen Zellkulturen**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Theodor Joachim Thiele

aus Berlin

-
- Gutachterin:
1. PD Dr. med. G. Große
 2. Prof. Dr. med. H. Hörtnagel
 3. Prof. Dr. med. K. Spanel-Borowski

Datum der Promotion: 30.11.2012

Für meine geliebte Familie

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1.1 Hippocampus	1
1.2 Neurotransmitter	2
1.2.1 γ -Amino-Buttersäure (GABA)	2
1.2.2 Peptiderge Neurotransmitter	3
1.2.2.1 Cholecystokinin (CCK)	4
1.2.2.2 Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP)	5
1.2.2.3 Neuropeptid Y (NPY)	6
1.2.2.4 Somatostatin (SS)	7
1.3 Kultur	8
1.4 Experimentelle Beeinflussung der genannten Transmitter	9
1.4.1 Durch Deltamethrin in der hippocampalen Zellkultur der Maus	9
1.4.2 Durch Kindling in Wistar Ratten an in situ-Schnitten	10
2 Ziele der Arbeit	11
3 Material und Methoden	12
3.1 Methoden	12
3.1.1 Hippocampale Primärkulturen	12
3.1.2 Behandlung der Neurone in der Kultur	13
3.1.3 Gekindelte Ratten	14
3.1.4 Immunzytochemie	14
3.1.4.1 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis	14
3.1.4.2 Mikroskopischer Nachweis mittels der DAB/Ni- Technik	16
3.1.5 Quantifizierung und Statistik	17
3.1.5.1 Quantifizierung	17
3.1.5.2 Statistische Auswertung	18
3.1.6 Versuchstiere	19
3.2 Material	19
3.2.1 Geräte	19
3.2.2 Chemikalien	20
3.2.3 Lösungen	23

3.2.3.1	Puffer	23
3.2.3.2	Medien für die Zellkultur	23
3.2.3.3	Fixierungslösungen	23
3.2.3.4	Lösungen zur Immunzytochemie	23
3.2.4	Verwendete Antikörper	24
4	<i>Ergebnisse</i>	26
4.1	GAD als Marker GABAerger Neurone	26
4.2	Peptiderge Neurotransmitter in situ und in hippocampalen Zellkulturen	31
4.2.1	Verteilung cholecystokininerger Neurone in situ und in hippocampalen Zellkulturen	31
4.2.2	Verteilung VIPerger Neurone in situ und in der Kultur	35
4.2.3	Verteilung NPY-positiver Neurone in situ und in der Kultur	39
4.2.4	Verteilung somatostatinerger Neurone in situ und in der hippocampalen Zellkulturkultur	43
4.3	Auswirkungen veränderter Parameter auf Neurone in situ und Kultur	47
4.3.1	Verhalten calbindinhaltiger Neurone in gekindelten Ratten	47
4.3.2	Verhalten NPYerger Neurone in gekindelten Ratten	50
4.3.3	Verhalten somatostatinerger Neurone in gekindelten Ratten	53
4.3.4	Deltamethrin und Neuronensubtypen in der Kultur	57
4.3.5	Deltamethrin und Synapsenverteilung in der Kultur	61
5	<i>Diskussion</i>	63
5.1	Methodik	63
5.2	Glutamatdecarboxylase GAD65/67	63
5.3	Peptiderge Neurotransmitter	63
5.3.1	Cholecystokinin (CCK)	63
5.3.2	Vasointestinales Peptid (VIP)	65
5.3.3	Neuropeptid Y (NPY)	66
5.3.4	Somatostatin (SS)	68
5.3.5	Zusammenfassende Betrachtungen zur Koexpression von GABA und peptidergen Neurotransmittern	68
5.4	Veränderungen der peptidergen Neurotransmitter und Calbindin unter experimentellen Bedingungen	70
5.4.1	Einfluss von progressiver Auslösung und Entwicklung von Anfällen	

	verbunden mit einem epilepsietypischen Erscheinungsbild (Kindling)_____	70
5.4.2	Einfluss von Deltamethrin _____	72
5.4.3	Zusammenfassende Betrachtungen zu Kindling und Deltamethrin _____	74
6	<i>Zusammenfassung / Summary</i> _____	76
7	<i>Literaturverzeichnis</i> _____	79
8	<i>Eigene Veröffentlichungen</i> _____	92
9	<i>Anhang</i> _____	92
9.1	Abbildungsverzeichnis _____	92
9.2	Tabellenverzeichnis _____	94
9.3	Lebenslauf _____	95
9.4	Selbständigkeitserklärung _____	96
9.5	Danksagung _____	97

Abkürzungsverzeichnis

a-CCK	Anti-Cholecystokinin
AChT	Acetylcholintransferase
a-GAD	Anti-Glutamatdecarboxylase
a-KG	alpha-Ketoglutarat
a-Somatostatin	Anti-Somatostatin
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
cAMP	Cyclo-Adenosinmonophosphat
CA1-4	Cornu Ammonis-Gebiet 1-4
CCK	Cholecystokinin
DAB	Diaminobenzidin
DAB/Ni-Technik	Diaminobenzidin/Nickel-Technik
DG	Dentate Gyrus (Gyrus dentatus)
DIV	Tage in vitro
DM	Deltamethrin
EEG	Elektroenzephalogramm
GABA	γ -Amino-Buttersäure
GABA-T	GABA-Transaminase
GAD	Glutamatdecarboxylase (Isoformen: GAD65 und GAD67)
G. dent.	Gyrus dentatus
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
Hil	Hilum
HIPP-Zellen	Zellen im Hilum

Ig G	Immunglobulin G
IL	Interleukin
Kv-Kanäle	Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle
Mf	Moosfasertrakt
mRNA	Messenger RNA (Ribonukleinsäure)
NFP 200	Neurofilament Protein 200
NGS	Normal-Goat-Serum (Ziegenserum)
NGS-Pht	10 % NGS-Pht: 0,3 ml Triton-Stocklösung zu 9,7 ml 10 % NGS, dazu 5 ml Phenylhydrazin
NMRI-Mäuse	Naval Medical Research Institute-Mäuse
NPY	Neuropeptid Y
O-LM-Zellen	Interneurone (CA3) mit Axonen im Stratum lacunosum -moleculare
p	Power aus Student´s t-test
PAG	phosphataktivierte Glutaminase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS-A	PBS-A-Stocklösung (20 mg/ml): 400 mg BSA (Bovine Serum albumine) in 20 ml PBS
pH	Wasserstoffionenexponent (potentia Hydrogenii)
P0-20	Postnatale Tage 0-20
Sg	Stratum granulosum
Sl	Stratum lacunosum
Sm	Stratum moleculare
Sp	Stratum pyramidale
Sr	Stratum radiatum
SS	Somatostatin
SEM	Sekundär Elektronen Mikroskop

SSA	Succinylsäure
SSTR	Somatostatin-Rezeptoren
TEM	Transmissions Elektronen Mikroskop
VACHT	vesikulären Acetylcholintransporter
VGAT	vesikulärer GABA-Transporter
VGlut	vesikulärer Glutamattransporter
VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid
ZNS	Zentrales Nervensystem

Einleitung

1.1 Hippocampus

Der Hippocampus ist Teil des limbischen Systems. Dieser Begriff wurde erstmals von Broca (1878) verwendet, der einen Gürtel (Limbus) von Rindenfeldern, die Basalganglien und Thalamus umgeben, morphologisch beschrieb. Zum limbischen System gehören Corpus amygdaloideum, Hippocampus, Fornix, Corpus mammillare und Gyrus cinguli (MacLean, 1952). Die Hippocampusformation besteht aus dem Cornu ammonis (CA1 - 3) und dem Gyrus dentatus.

Die Hippocampusformation wurde im Mittelalter auf Grund ihrer bizarren morphologischen Struktur mit einem Seepferdchen (lateinisch hippocampus) verglichen. Das Cornu ammonis hat Ähnlichkeit mit den Hörnern des ägyptischen Gottes Amun. Der Gyrus dentatus lässt makroskopisch eine gezähnte Struktur erkennen, deshalb wurde ihm dieser Name zugewiesen.

Die Schichten des Cornu ammonis von außen nach innen:

- Alveus
- Stratum oriens
- Stratum pyramidale
- Stratum radiatum
- Stratum lacunosum-moleculare

Die Schichten des Gyrus dentatus von außen nach innen:

- Stratum moleculare
- Stratum granulosum
- Lamina plexiforme / Hilum

Die Hippocampusformation ist ein assoziatives Zentrum. Sie steht einerseits mit viszeralen und endokrinen Repräsentationsgebieten der Area praeoptica und des Hypothalamus in Verbindung, andererseits mit „kognitiven“ Arealen des Neocortex. Erst durch eine

Schädigung einzelner Areale im limbischen System war es in der Vergangenheit möglich, funktionelle Aspekte anatomischen Strukturen zuzuordnen. Dadurch werden Funktionen wie Affektverhalten, Gedächtnisbildung, Motivation, Orientierung oder vegetative Modulation dem Hippocampus zugeordnet (Duus, 1995).

1.2 Neurotransmitter

Ob ein Neuron erregende oder hemmende Wirkung auf die nachgeschaltete Nervenzelle hat, hängt vom Transmitter ab, der während der synaptischen Erregung in den synaptischen Spalt ausgeschüttet wird (Lloyd, 1946). Die klassischen Neurotransmitter GABA, Glutamat, biogene Amine und Glycin werden sehr schnell ausgeschüttet (<1ms). Ein Aktionspotential reicht dafür aus (Baraban and Tallent, 2004).

Die sogenannten Neuromodulatoren oder peptidergen Neurotransmitter haben eine steuernde, verstärkende oder abschwächende länger anhaltende Wirkung an der Postsynapse. Ihre Ausschüttung erfolgt deutlich langsamer (<50ms) und häufig erst bei länger anhaltenden Depolarisationen mit höheren intrazellulären Ca^{2+} -Spiegeln (Baraban and Tallent, 2004).

1.2.1 γ -Amino-Buttersäure (GABA)

γ -Amino-Buttersäure (GABA) gehört zu den „klassischen“ Neurotransmittern. Obwohl die Wirkung eines Neurotransmitters nur von der rezeptorvermittelten Reaktion abhängt, wird GABA als der wichtigste hemmende Botenstoff im zentralen Nervensystem (ZNS) bezeichnet, da über 90% seiner synaptischen Aktivität hemmend ist (Krnjevic and Schwartz, 1967). 30-40% aller Synapsen verwenden GABA als Botenstoff (Iversen and Bloom, 1972).

GABA wird durch die Decarboxylierung von Glutamat synthetisiert (Abbildung 1). Das Enzym, das diese Reaktion katalysiert, ist die Glutamatdecarboxylase (GAD). Es sind zwei Isoformen dieses Enzyms bekannt: eine Form mit 585 Aminosäuren (65kDa) und die andere mit 593 Aminosäuren (67kDa). Entsprechend werden sie als GAD65 und GAD67 bezeichnet. Die beiden Formen sind in den meisten GABAergen Neuronen des ZNS kolokalisiert. Dabei liegt die 67kDa-Variante eher zytosolisch als so genanntes Holoenzym vor und synthetisiert freies GABA, während die 65kD-Variante eher als Apoenzym mit

Vesikeln und Membranen assoziiert ist. (Abbildung 1).

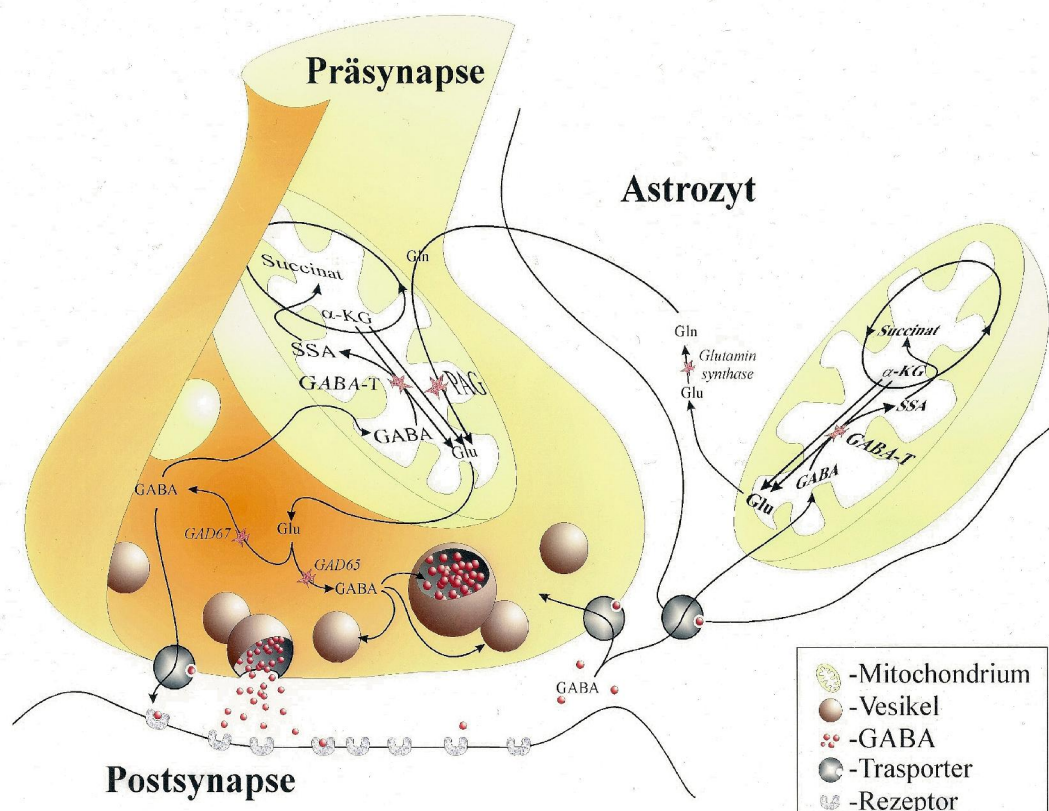


Abbildung 1: **GABA-Synthese/Metabolismus**

Glutamin (Gln), Glutamat (Glu), alpha-Ketoglutarat (α -KG) aus dem Citratzyklus (Kreis im Mitochondrium), phosphataktivierte Glutaminase (PAG), GABA-Transaminase (GABA-T), Succinylsäure (SSA), Schema angefertigt in Anlehnung an Palmada and Centelles (1998) und Behar and Rothman (2001).

1.2.2 Peptiderge Neurotransmitter

Peptiderge Neurotransmitter sind Botenstoffe, deren Wirkung durch die Vermittlung langsamer aber lang anhaltender endo- und parakriner Effekte gekennzeichnet ist.

Über 50 neuroaktive Peptide sind heute bekannt (Schwartz, 2000). Peptiderge Neurotransmitter sind sowohl im ZNS als auch im peripheren vegetativen Nervensystem zu finden. Sie bewirken in der Synapse keine unmittelbare Änderung der Leitfähigkeit, sondern beeinflussen die Intensität und Dauer der Wirkung der klassischen Überträgerstoffe. Sie werden deshalb als Neuromodulatoren bezeichnet. Ihre Ausschüttung erfolgt in der Regel erst bei länger anhaltenden Depolarisationen mit höheren

intrazellulären Ca^{2+} -Spiegeln, wie sie bei häufigen, schnell aufeinander folgenden Aktionspotentialen auftreten.

Peptiderge Neurotransmitter werden in Vorstufen im Soma synthetisiert und durch axonalen Transport in die Präsynapse gebracht. Dort werden sie in dense-core Vesikeln gespeichert.

Der Abbau im synaptischen Spalt erfolgt durch Peptidasen.

1.2.2.1 Cholecystokinin (CCK)

Cholecystokinin (CCK) ist eines der Peptide, die zuerst im Gastrointestinaltrakt entdeckt wurden. Wie 1928 erstmals von Ivy und Oldberg beschrieben, dient dieses Peptid zur Kontraktion der Gallenblase. Somit nannten sie es Cholecystokinin (Ivy and Oldberg, 1928).

Erst 1976 wurde CCK im Gehirn nachgewiesen (Dockray, 1976). Seitdem ist CCK vielfach in verschiedensten Hirnarealen beobachtet worden (Bradwejn and Vasar, 1995).

CCK wird abhängig vom Entwicklungsstadium des Hippocampus ausgeprägt. Untersuchungen an der Ratte zeigen, dass einige CCK-positive Neurone vom Stratum moleculare des Gyrus dentatus in das Stratum granulosum an der Grenze zum Hilum wandern. Andere CCK-positive Neurone erreichen mit dem 20. postnatalen Tag (P20) das Stratum radiatum der CA1-3-Region. Axone CCK-positiver Neurone formen schon am Tag P0 symmetrische Synapsen an Dendriten von Pyramidenneuronen im gesamten Hippocampus. Ab Tag P4 bilden sich erst asymmetrische Synapsen an den Dendriten und Somata der CCK-positiven Zellen. Somit wird CCK schon ausgeschüttet, bevor ein exzitatorischer Input erfolgt. CCK-positive Neurone sind wahrscheinlich die führenden Interneurone, die durch die frühe Innervation von Pyramidenzellendriten an der Entwicklung glutamaterger Transmission einen Hauptanteil haben (Ben-Ari, 2002). Dies geschieht über die GABAerge Depolarisation von Pyramidenzellendriten. CCK-positive Zellen ändern ihre Funktion sobald das glutamaterge Netzwerk zu arbeiten beginnt (Freund and Buzsáki, 1996; Gulyás and Freund, 1996; Acsády et al., 2000; Morozov and Freund, 2003; Mátyás et al., 2004).

CCK wird aus Prä-Procholecystokinin gebildet, einem aus 115 Aminosäuren bestehenden Vorläuferpeptid (Rehfeld and Nielsen, 1995). Es gibt mehrere biologisch aktive Formen von denen die wichtigsten CCK-58, CCK-39, CCK-33, CCK-22, CCK-8, CCK-5 und

CCK-4 sind. Die jeweils nachfolgende Zahl beschreibt die Anzahl der Aminosäuren des Peptids.

Die Freisetzung von CCK ist kalziumabhängig und erfolgt erst nach einer Depolarisationszeit von über 100ms während GABA <1ms braucht (Leenders et al., 1999).

Die Wirkung von CCK ist rezeptorvermittelt. Es existieren im Gehirn zwei bekannte Rezeptorarten für CCK: CCK_A und CCK_B (Innis and Snyder, 1980). Die rezeptorvermittelte Signaltransduktion an der Postsynapse ist noch nicht vollständig verstanden. Die Vermittlung scheint bei beiden bekannten Rezeptortypen über eine Aktivierung von second-messenger-Systemen zu erfolgen. Möglicherweise wird das Phosphoinositol-System verwendet (Noble and Roques, 1999; Noble et al., 1999). Die Wirkung von CCK an der Postsynapse ist exzitatorisch.

Die Kolokalisation von CCK mit klassischen Neurotransmittern ist Gegenstand aktueller Forschung. Eine Koexpression von CCK und GABA/GAD in Interneuronen des Hippocampus wurde erstmals von Somogyi et al. (1984) und Kosaka et al. (1985) beschrieben. Untersuchungen zu Kolokalisationen CCK-positiver Neurone mit GAD in vitro, insbesondere in Unterregionen des Hippocampus, liegen nicht vor.

1.2.2.2 *Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP)*

VIP ist ein aus 14 oder 28 Aminosäuren bestehendes Peptid, das wie auch CCK zuerst im Intestinaltrakt nachgewiesen worden ist. Obwohl ursprünglich als typisches „gastrointestinales Hormon“ kategorisiert, ist sein Vorkommen mittlerweile sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem gesichert. VIP fungiert im Gastrointestinaltrakt als Neurotransmitter in Neuronen und Nervenfasern und bewirkt eine Vasodilatation und eine Relaxation der glatten Muskulatur. Im Immunsystem hemmt es die mitogen-aktivierte Proliferation von T-Zellen durch eine Hemmung der Interleukin-2-Produktion (Laburthe et al., 1993; Said, 1991, 1996). VIP kommt auch im ZNS vor, wo es neurotrophe und neuroprotektive Effekte zeigt. Kultivierte Neurone werden durch VIP vor dem apoptotischen Zelltod, z.B. durch oxidative Schäden oder exotoxische Einflüsse, geschützt (Brenneman and Eiden, 1986; Said, 1996). VIP ist ein potenter Wachstumsfaktor in der Embryogenese (Gressens et al., 1993), verkürzt den Zellzyklus in neuroepithelialen Zellen (Gressens et al., 1998) und fördert die neuronale Differenzierung embryonaler hippocampaler Neurone in der Kultur (Blondel et al., 2000). VIP bindet hochspezifisch an zwei Rezeptoren VPCA1R und VPCA2R (Usdin et al., 1994). Diese Rezeptoren aktivieren

Adenylatcyclase, die die cAMP-Konzentration erhöht, ein second messenger-System. Außerdem kommt es zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Dickson et al., 2006) und Beeinflussung der Phospholipase D-Funktion (McCulloch et al., 2000).

Die Verteilung und synaptische Verschaltung der VIPergen Neurone im Hippocampus ist gut untersucht (Lorén et al., 1979; Köhler, 1982, 1983; Roberts et al., 1984; Leranth et al., 1984; Kosaka et al., 1985; Sloviter and Nilaver, 1987; Acsády et al., 1996a, b; Hájos et al., 1996).

Als rein GABAerg werden VIP-positive Neurone im Hippocampus von einigen Autoren beschrieben (Acsády et al., 1996a, b; Hájos et al., 1996). Kosaka et al. (1985) zeigen, dass nur 50% der VIP-positiven Neurone im Hippocampus auch GABAerg sind. Untersuchungen zur eventuellen Koloalisationen von VIP mit GABA in primären hippocampalen Zellkulturen gibt es bisher nicht. Eine Verteilung dieser Neurone in den verschiedenen Unterregionen des Gyrus dentatus und der CA3-Region sind nicht untersucht.

1.2.2.3 Neuropeptid Y (NPY)

NPY ist ein Peptid aus 36 Aminosäuren, das in peripheren und zentralen Neuronen produziert wird. Es wurde erstmals 1982 im Schweinehirn extrahiert (Tatemoto et al., 1982).

Hippocampale Neurone, die NPY-positiv sind, besitzen ultrastrukturelle Merkmale, die für Interneurone typisch sind. Sie haben ein dickes perinukleäres Zytoplasma. Dies ist reich an Organellen, wie dem rauen endoplasmatischen Retikulum und Golgizystemen. Sie haben eine eingefaltete Kernmembran und symmetrische und asymmetrischen Synapsen auf dem Soma (Freund and Buzsáki, 1996). Lichtmikroskopisch sind NPY-positive Interneurone nicht immer sicher zuzuordnen. Dort wo es möglich ist, entsprechen sie dem Subtyp der HIPP-Zellen, Basket-Zellen oder O-LM-Zellen (Freund and Buzsáki, 1996).

Eine Charakterisierung NPY-exprimierender Neurone auf Grund ihres Gehaltes an weiteren Neurotransmittern ist bisher selten in situ und nicht in vitro durchgeführt worden (Bering et al., 1997; Vega et al., 2010). Häufig wird eine Koexpression von NPY mit Somatostatin und GABA beschrieben (Freund and Buzsáki, 1996; Sperk et al., 2007; Nakamura et al., 2007). Die Koloalisation von Somatostatin mit NPY trifft aber nicht

immer zu (Chronwall et al., 1985; de Quidt and Emson, 1986; Köhler et al., 1986, 1987; Deller and Leranth, 1990; Milner and Veznedaroglu, 1992; Jinno and Kosaka, 2003).

Dem Neuropeptid Y wird unter anderem eine Mitwirkung bei der Regulierung des Blutdrucks, der zirkadianen Rhythmik, der Nozizeption, des Essverhaltens, der Alkoholaufnahme, des Gedächtnisses, des Stressverhaltens, der Depression und bei Anfallsleiden zugeschrieben (Clark et al., 1984; Flood et al., 1987, Heilig et al., 1989; Duggan et al., 1991; Hua et al., 1991; Kalra et al., 1998; Bannon et al., 2000; Harrington and Schak, 2000; Klomp and Woldbye, 2001; Reibel et al., 2001; Morales-Medina et al., 2010). Die Wirkung von NPY ist rezeptorvermittelt (Y1-, Y2-, Y5- Rezeptoren) und findet im Gegensatz zu vielen anderen inhibitorischen Neurotransmittern nur präsynaptisch im Cornu ammonis statt (Colmers et al., 1987; McQuiston and Colmers., 1992; Michel et al., 1998). Über Y1-Rezeptoren, die G-Protein-regulierte einwärtsgerichtete Kaliumkanäle (GIRK) aktivieren, werden durch NPY nahezu die Hälfte aller GABAergen Interneurone im Hilum hyperpolarisiert (Paredes et al., 2003).

Intraventrikuläre Gabe von NPY verringert die Aktivität von motorischen Anfällen und verkürzt die Kainat-induzierte EEG-Veränderung im Gyrus dentatus (Woldbye et al., 1996, 1997). Ebenso fanden Baraban et al. (1997) und Erickson et al. (1996), dass eine intraventrikuläre Gabe von NPY die Epilepsieanfälligkeit bei Mäusen reduzierte.

Die Ergebnisse an verschiedenen Epilepsiemodellen zeigen die mächtigen antikonvulsiven, antiepileptogenen Eigenschaften von NPY (Wu et al., 2004; Wu and Li, 2005).

Eine Untersuchung hippocampaler Primärkulturen unter kontrollierten Bedingungen ist bisher nicht vorgenommen worden. Ebenfalls wurde bisher keine Aufteilung in die Unterregionen Gyrus dentatus und CA3, sowie die speziellen Auswirkungen lokal applizierter Noxen auf diese Neuronensubpopulationen untersucht, wie sie diese Arbeit zeigt.

In situ ist die Verteilung NPYerger Neurone im Hippocampus im Vergleich zu anderen peptidergen Neurotransmittern wenig untersucht.

1.2.2.4 Somatostatin (SS)

Erstmals wurde Somatostatin 1972 als ein hypothalamischer Inhibitor der Wachstumshormonausschüttung aus der Adenohypophyse charakterisiert (Brazeau et al., 1972).

SS liegt entsprechend seiner Aminosäureanzahl in zwei Isoformen vor: SS-28 und SS-14. Antikörper gegen beide Varianten markieren dieselben Zellen (Moyses et al., 1984; Iwanaga et al., 1983). Die Wirkung von SS wird über eine Gruppe G-Protein gekoppelter Rezeptoren vermittelt (Reichlin, 1983; Reisine and Bell, 1995). Die fünf bekannten Subtypen werden SSTR1-5 benannt. Die Rezeptoren binden SS-28 und SS-14 mit unterschiedlicher Affinität. SSTR1-4 haben eine höhere Affinität zu SS-14 während SSTR5 SS-28 bevorzugt (Reichlin, 1983).

SS ist im ZNS weit verbreitet (Johansson et al., 1984). Die Verteilung in nahezu allen Schichten des Hippocampus wurde eingehend von Sloviter and Nilaver (1987) beschrieben.

Die Morphologie und Verteilung entspricht der von Interneuronen. Bei bisherigen Untersuchungen in situ zeigten SS-positive Neurone eine nahezu 100-prozentige Kolo-kalisation mit GABA, GAD oder ihrer mRNA (Somogyi et al., 1984; Kosaka et al., 1988; Esclapez and Houser, 1995). 14% der GABAergen Neurone waren auch für SS positiv. Untersuchungen an Mäusen zeigten vergleichbare Ergebnisse wie bei den Ratten (Jinno and Kosaka, 2000).

Untersuchungen an Zellkulturen liegen bisher nicht vor. Es wurden auch nicht die Auswirkungen lokal applizierter Noxen auf diese Neuronensubpopulation untersucht, wie sie diese Arbeit zeigt.

1.3 Kultur

Die hippocampale Primärkultur wurde in unserer Arbeitsgruppe als Modell zur Untersuchung neuronaler Entwicklung etabliert (Ahnert-Hilger et al., 1995; Grosse et al., 1998, 2000). Es wurde gezeigt, dass sich Kv-Kanäle in der Primärkultur sehr ähnlich wie in der in situ Situation entwickeln (Grosse et al., 2000).

Neurone können unterschiedlich charakterisiert werden. Hippocampale Neurone, wie Körnerzellen, Interneurone und Pyramidenzellen lassen sich morphologisch unterscheiden. Körnerzellen sind klein, haben einen Durchmesser von ca. 8 -10 μm , ein rundliches Soma und sind als glutamaterge Neurone bekannt, die mit ihren Axonen den Moosfasertrakt bilden, der auch in der Zellkultur die typischen großen Moosfasersynapsen bildet (Grosse et al., 1998).

Körnerzellen sind spezifisch für Calbindin anfärbbar. Auch einige Interneurone des Hilums und der CA1-3 Region sind Calbindin-positiv (Abbildung 23) (Grosse et al., 2003). Interneurone sind als GABAerge Neurone bekannt, die kleiner als Pyramidenzellen sind und verschiedene Arten von Co-Transmittern oder Modulatoren exprimieren.

In der Abbildung 2 wird gezeigt, dass sich die Neurone wie zuvor beschrieben markieren lassen. Interneurone sind GAD65-positiv und teilweise für Calbindin gefärbt (Abbildung 2 A Pfeil, B Pfeil und Pfeilspitze). Körnerzellen hatten ein rundliches Soma und ließen sich nur für Calbindin färben (Abbildung 2 A Doppelpfeil).

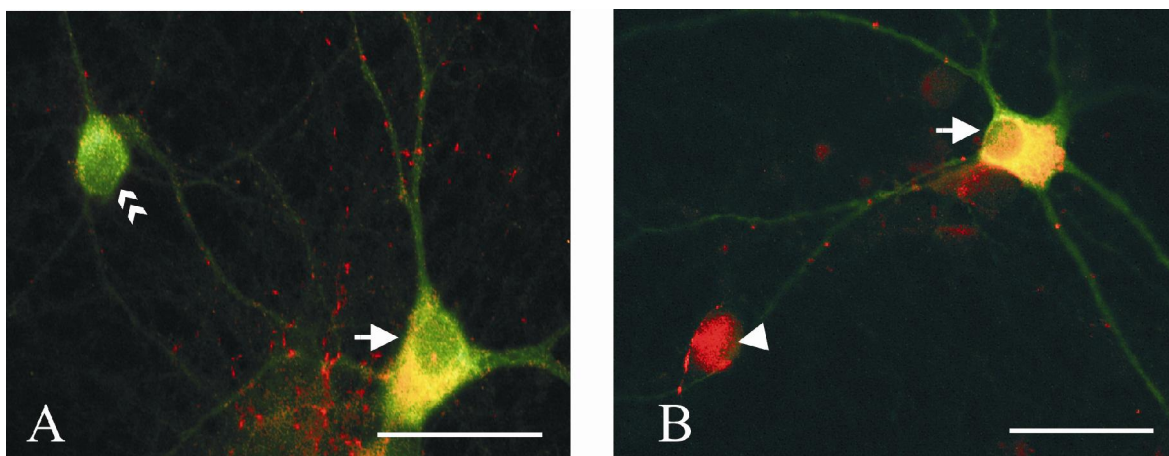


Abbildung 2: Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie Calbindin- (grün) und GAD65- (rot) positiver Neurone in der Hippocampuskultur

Hippocampuskultur: 12 DIV markiert mit Calbindin (grün) und GAD65 (rot). Fig. A zeigt zwei Neurone. Eine Körnerzelle (Doppelpfeilspitzen), die Calbindin-positiv ist (grün) und ein rundliches Soma aufweist und ein Interneuron (Pfeil), das Calbindin- und GAD65-positiv ist. Kolorisation stellt sich gelb dar. Fig. B zeigt zwei Interneurone. Ein Interneuron (Pfeil) ist wie in Fig. A doppelmarkiert mit Calbindin und GAD65 (gelb, durch Überlagerung von rot und grün). Das andere Interneuron (Pfeilspitze) ist nur GAD65-positiv (rot). Maßstab 20µm;

1.4 Experimentelle Beeinflussung der genannten Transmitter

1.4.1 Durch Deltamethrin in der hippocampalen Zellkultur der Maus

Deltamethrin ist ein Typ 2 Pyrethroid. Pyrethroide sind Substanzen, die vorwiegend bei Insektiziden Anwendung finden. Das Nervensystem ist ihr Hauptangriffspunkt bei Säugetieren und Insekten. Sie gelten als sicher, da im Allgemeinen keine pathologischen

Effekte bei Menschen beobachtet wurden. Bisher ist auf zellulärer Ebene bei hohen Konzentrationen um 400 – 600 nM eine Auswirkung auf Natriumkanäle beschrieben worden: der Natriumeinstrom bei Depolarisation wird stark verlängert (Narahashi, 1996). Dieser Effekt tritt bei tetrodotoxinresistenten Natriumkanälen stärker auf als bei tetrodotoxinsensiblen Natriumkanälen (Tarabeau and Narahashi, 1998).

Primärkulturen vom Hippocampus ermöglichen es, die Entwicklung von Neuronen über einen Zeitraum von bis zu drei Wochen zu untersuchen (Ahnert-Hilger et al., 1995; Grosse et al., 1998, 2000). Es wurde gezeigt, dass sich Kv-Kanäle in der Primärkultur sehr ähnlich der in situ Situation entwickeln (Grosse et al., 2000).

Dieses Modell zur Untersuchung bestimmter Neuronensubtypen und ihrer Entwicklung ist bisher nicht zur Kontrolle spezifischer Effekte des Deltamethrins verwendet worden.

1.4.2 Durch Kindling in Wistar Ratten an in situ-Schnitten

„Kindling“ (englisch: anfachend, entzündend) wird definiert als eine fortschreitende Zunahme neuronaler Antworten auf seltene und schwache Hirnstimulationen. Durch einen Anstieg der Dauer und Ausbreitung der Folgeentladungen werden einfach-fokale, komplex-fokale und sekundär generalisierte Anfälle ausgelöst. Ratten, die durch im limbischen System implantierte Elektroden stimuliert wurden (Gloveli et al., 2003), reagieren mit progressiv im Schweregrad zunehmenden Anfällen und einer fortschreitenden Epileptogenese, die der bei komplex-fokalen Anfällen des Menschen entspricht. (Majkowski, 2002)

2 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll das Vorkommen peptiderger Neurotransmitter in hippocampalen Zellkulturen untersucht werden. Es stehen folgende Fragen im Mittelpunkt:

Sind die Unteregionen CA1 bis CA3 und der Gyrus dentatus getrennt kultivierbar und werden die peptidergen Neurotransmitter NPY, VIP, CCK, Somatostatin in unterschiedlichem Maße in den verschiedenen Regionen exprimiert?

Werden alle Neurone, die die peptidergen Neurotransmitter NPY, SS, VIP und CCK exprimieren als GABAerg identifiziert und wie hoch ist dabei der Anteil nicht GABAerger Neurone?

Gibt es Abweichungen zur in situ Situation und wie sind sie interpretierbar?

Werden die peptidergen Neurone durch Gabe von Deltamethrin während ihrer Entwicklung in der Kultur beeinflusst und lassen sich Auswirkungen auf synaptische Kontakte beobachten?

Lassen sich an gekindelten Ratten ähnliche Effekte wie bei Deltamethringabe bei NPY und SS-positiven Neuronen feststellen?

3 Material und Methoden

3.1 Methoden

3.1.1 Hippocampale Primärkulturen

Zum Anlegen von Primärkulturen wird embryonales Hippocampusgewebe benötigt. Um trüchtige Mäuse zu erhalten, wurden adulte NMRI-Mausböcke (Fa. Harlan, Winkelmann, Hannover, Deutschland) 12 Stunden mit weiblichen NMRI-Mäusen gepaart. Bis zum Entnahmetag wurden die trüchtigen Mäuse im Tierstall des Anatomischen Instituts der Charité betreut.

Die Kulturen wurden vom Hippocampus 17 Tage alter fetaler NMRI-Mäuse angelegt. Die trüchtigen Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und die Embryonen entnommen.

Die weitere Bearbeitung erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die Kopfhaut wurde abpräpariert, die Kalotte entfernt, das Hirn entnommen und die Meningen vorsichtig entfernt. Der Hippocampus ist unter Zuhilfenahme einer Stereolupe mit 16facher Vergrößerung herauspräpariert worden. Danach erfolgte die Präparation der Unterregionen CA3a/CA3b und Gyrus dentatus mit Hilum (G.dent.) nach dem Schema in Abbildung 3. In Teilschema D wurden die Anteile zwischen I und II und die CA1-Region entfernt, so dass sich in den CA3a/CA3b-Stücken keine Körnerzellen befinden. Verwendet wurden die Teilstücke A, C und D.

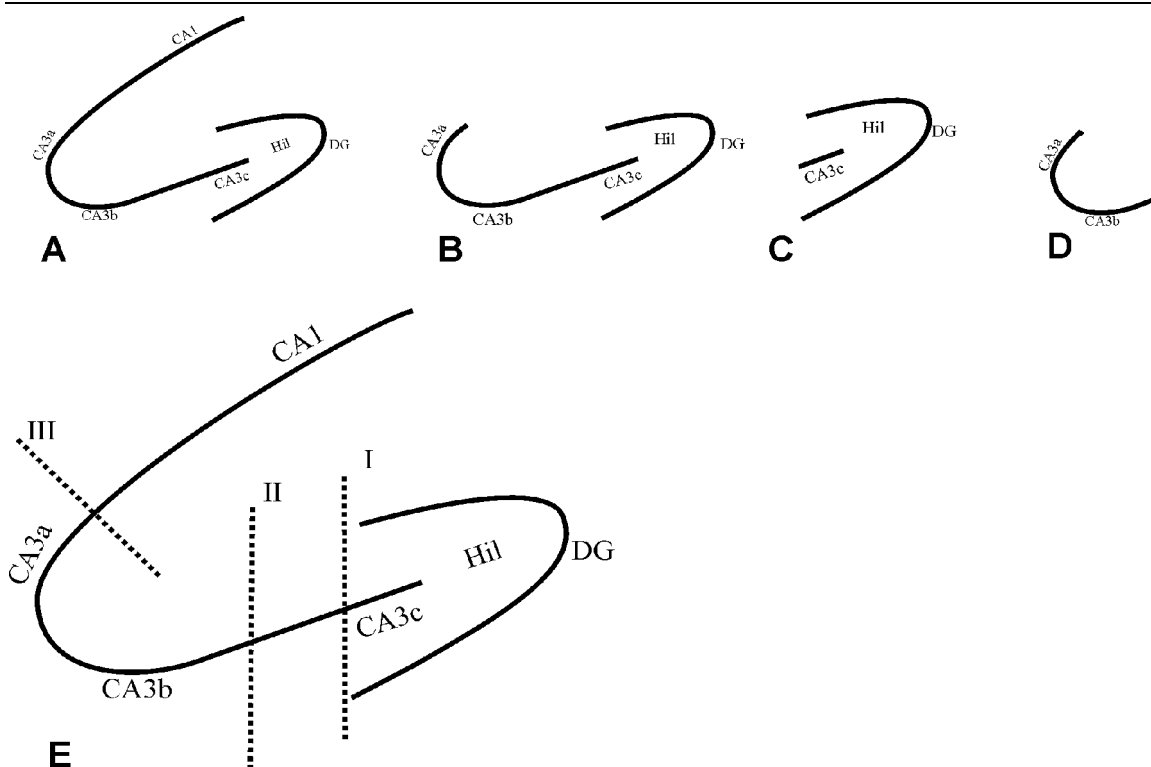


Abbildung 3: **Präparationsschema des Hippocampus für die Kultivierung der Regionen des Hippocampus**

Fig.A: Gesamter Hippocampus; Fig.B: Hippocampus ohne CA1-Region; Fig.C: Gyrus dentatus mit Hilum; Fig.D: CA3a/CA3b-Region für Kultivierung; Fig.E: Zwischen den gestrichelten Linien I und II wird das Material verworfen.

Die so entnommenen Hippocampusstücke (A, C und D) wurden mechanisch dissoziiert, die Zellen bei 900U/min für 9min zentrifugiert und das entstandene Pellet im Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden für die Immunocytochemie auf poly-L-Lysin und Kollagen beschichteten Deckgläschen in 4, 6 und 24 Loch-Kulturplatten ausgesät und bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Die Kulturdauer betrug maximal 21 Days in vitro (DIV). Die Kulturen wurden für die GAD65/67 Markierungen nach 12-21 DIV, für die CCK-, VIP-, NPY-, SS Markierung nach 21 DIV und unter Deltamethrinbehandlung nach 17 DIV fixiert, quantifiziert und photographisch dokumentiert. Das Kulturmedium wurde wöchentlich zur Hälfte erneuert. Zur Untersuchung der Verteilung der Neurone des gesamten Hippocampus und der hippocampalen Regionen wurden Kulturen mit 200.000 Zellen/cm² benutzt.

3.1.2 Behandlung der Neurone in der Kultur

An dem etablierten Modell (Ahnert-Hilger et al., 1995; Grosse et al., 1998, 2000) der

hippocampalen Primärkultur wurde durch Doppelimmunfluoreszenz-Markierungen die Klassifizierung der Neurone nach peptidergen Neurotransmittern, GABA und/oder Calbindin vorgenommen.

Des Weiteren wurden quantitative wie qualitative Veränderungen an diesen Subpopulationen nach Behandlung mit Deltamethrin erfasst. Deltamethrin wurde ab DIV 6 zweimal wöchentlich in 20-, 200- und 2000nM Konzentrationen auf die Kulturen gegeben.

3.1.3 Gekindelte Ratten

Freundlicherweise wurden für diese Arbeit perfundierte, tiefgefrorene Gehirne gekindelter Ratten (Methode siehe Gloveli et al., 2003) von Professor Uwe Heinemann (Johannes-Müller-Institut für Physiologie der Charité, Humboldt Universität zu Berlin) zur Verfügung gestellt.

Dafür wurden adulte Wistar-Ratten als Kindling- und Kontrolltiere verwendet. Bipolare Edelstahlelektroden wurden stereotaktisch unter Ketaminanästhesie (60mg/kg) in die linke basolaterale Amygdala (AP 2.5, L 5, H 8.5; Atlas Paxinos und Watson) implantiert. Nach einer Erholungszeit von 7-10 Tagen wurden die Tiere täglich über die Elektrode stimuliert (0,1ms Pulslänge bei 60Hz über 2s Dauer). Die Pulshöhe wurde so reguliert, dass es zu einem Zucken im gleichseitigen Auge kam. Die Verhaltensänderungen wurden nach der Verhaltenseinstufung nach Racine bewertet. Die Kontrollgruppe wurde nicht stimuliert. Es wurde so lange stimuliert, bis sich 5 konsekutive Kategorie-5 Anfälle zeigten. Die Kindling- und Kontroll-Tiere wurden 24 bis 48 Stunden nach dem letzten Anfall perfundiert und fixiert.

3.1.4 Immunzytochemie

3.1.4.1 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis

Das Verfahren basiert auf dem Einsatz von Primärantikörper, die in einem zweiten Inkubationsschritt von Fluoreszenz-markiertem Immunglobulin G (IgG) visualisiert werden, wobei diese fluorochromierten Antikörper gegen die Wirtsspezies des Primärantikörpers gerichtet sind.

Die Neurone wurden nach 12, 17 und 21 DIV für 30min in Paraformaldehydlösung (4%) fixiert. Für 5min wurden die fixierten Zellen bei Raumtemperatur mittels Triton X-100-

Lösung permeabilisiert. Nach dem Blocken der unspezifischen Bindungen des Zweitantikörpers mittels NGS, erfolgte die Inkubation der Kulturen mit dem primären Antikörper für 24h bei 4°C (Konzentrationen siehe Tabelle 1). Die Zellen wurden anschließend in PBS gewaschen und für 2h mit den entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert. Alle in Rabbit hergestellten Primärantikörper wurden mit Texas red-coupled goat anti-rabbit IgG und alle in Maus hergestellten mit Oregon green-coupled goat anti-mouse IgG markiert, in Konzentrationen wie sie Tabelle 2 angibt. Nach nochmaligem Waschen in PBS wurden die Zellen mit Immuno-Mount auf Objektträgern eingedeckt. Der einmalige Einsatz von Triton X-100 während der Prozedur ist ausreichend, da die Wirkung irreversibel ist. Höhere Anteile als 0,1-1% Triton X-100, wie sie für verschiedene andere immunhistochemische Verfahren eingesetzt werden, können Artefakte wie z.B. Myelinfärbungen erzeugen (Weruaga et al, 1998).

Tabelle 1: Verdünnung der Primärantikörper für die Fluoreszenzhistologie

primäre Antikörper	Verdünnung
Calbindin-D-28K monoklonal, made in mouse	1:1000
Cholecystokinin (CCK), polyklonal, made in rabbit	1:100
GAD 65kDa, monoklonal, made in mouse	1:100
GAD 67kDa, polyklonal, made in rabbit	1:200
Neurofilamentprotein 200 kDa (NFP 200) monoklonal, made in mouse	1:4
Neuropeptid Y (NPY), polyklonal, made in rabbit	1:100
Somatostatin, polyklonal, made in rabbit	1:2000
Synapsin, polyklonal, made in rabbit	1:500

Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP), polyklonal, made in rabbit	1:1000
--	--------

Tabelle 2: Verdünnung der Sekundärantikörper für die Fluoreszenzhistologie

sekundäre Antikörper	Verdünnung
Oregon green-coupled goat anti- mouse IgG	1:200
Texas red-coupled goat anti-rabbit IgG	1:100

3.1.4.2 Mikroskopischer Nachweis mittels der DAB/Ni- Technik

Die immunzytochemische Darstellung der Gewebeschnitte und Neurone erfolgte nach der DAB/Ni-Methode (Veh et al., 1995). Die Darstellung der Proteine erfolgt dabei durch Binden antigenspezifischer Antikörper, die durch Kopplung an biotinylierte Sekundärantikörper die Bildung eines Avidin-Peroxidase-Komplexes ermöglichen. Die Aktivität der Peroxidase kann durch eine chromogene enzymatische Reaktion sichtbar gemacht werden.

Die Fixierung adulter NMRI-Mäuse erfolgte durch kardiale Perfusion mittels Perfusions-Lösung für 15min bei 106mBar sowie weitere 30min bei 26mBar. Die Perfusions-Lösung wurde mit Logasteril ausgewaschen und das Gehirn zur weiteren Fixierung in 1% Paraformaldehyd-Lösung gelegt (12h). Die kompletten Gehirne sind bei -60 bis -75°C in flüssigem Hexan mit Hilfe von Tissue Freezing Medium aufgefroren worden. Am Cryostaten wurden Schnitte der entsprechenden Hirnregion von $40\mu\text{m}$ Dicke angefertigt.

Die Schnitte wurden 15min in 1% Natriumborhydrid reduziert. Um unspezifische Epitope zu blockieren, die endogene Peroxidase zu zerstören und die Zellen zu permeabilisieren, sind sie 30min in 10% NGS-Pht gewaschen worden. Es erfolgte daraufhin eine 36h-Inkubation in einem entsprechend verdünnten Erstantikörper bei 4°C . Nach 1h Blockieren in PBS-A wurden die Schnitte für weitere 24h in der Lösung des biotinylierten Zweitantikörpers inkubiert, entsprechend dem Erstantikörper bei 4°C . In der darauf folgenden 6h-Inkubation mit dem ABC-Peroxidase-Kit 1:1000 in PBS-A erfolgt eine Komplexbildung zwischen dem Biotin des Zweitantikörpers und dem Avidin, an das Peroxidase gekoppelt ist. Die Schnitte wurden dann für 15min mit einer Lösung aus 5%

Tris-Imidazol-Stock und 1% DAB-Stock in H₂O behandelt. Durch Zusatz von 0,015% H₂O₂ startete die enzymatische Reaktion, während 0,3% Ammoniumnickelsulfat das Kontrastverhältnis verbesserte. Unter Beobachtung mit Hilfe eines Mikroskops wurde die Reaktion nach Erreichen der gewünschten Intensität mit PBS abgebrochen. Bevor die Schnitte auf mit Gelatine gekoatete Objektträger aufgezogen wurden, verhinderte einmaliges Waschen mit H₂O die Kristallbildung während der Trocknung. Durch die aufsteigende Alkoholreihe wurden die Schnitte entwässert und anschließend mit Entellan eingedeckt.

Tabelle 3: Verdünnung der Primärantikörper für die DAB/Ni-Methode

primäre Antikörper	Verdünnung
Calbindin-D-28K monoklonal, made in mouse	1:2000
Cholecystokinin (CCK), polyklonal, made in rabbit	1:1000
GAD 65kDa, monoklonal made in mouse	1:1000
GAD 67kDa, polyklonal, made in rabbit	1:2000
Neuropeptid Y (NPY), polyklonal, made in rabbit	1:1000
Somatostatin, polyklonal, made in rabbit	1:5000
Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP), polyklonal, made in rabbit	1:6000

3.1.5 Quantifizierung und Statistik

3.1.5.1 Quantifizierung

Untersucht wurden Neurone in Schnittpräparaten und Zellkulturen und qualitativ

beschrieben. Quantitative Aussagen wurden an den Neuronen der Zellkulturen mit Doppelmarkierungen für GAD und peptidergen Transmittern und nach Deltamethrinbehandlung der Kulturen dokumentiert (Kapitel 4.2 und Kapitel 4.3.4-5). Ebenfalls quantitative Aussagen wurden an Schnittpräparaten gekindelter Wistar-Ratten und der entsprechenden Kontrolltiere in Kapitel 4.3.2-3 getroffen.

Von Zellkulturpräparaten wurden immer ganze Deckgläschen (113mm²) untersucht und alle markierten peptidergen (CCK, VIP, NPY, SS) Neurone gezählt, unterschieden nach ihrem Gehalt an GAD65. Dazu wurde bei jedem als peptid-positiv identifizierten Neuron ein Filterwechsel am Mikroskop vorgenommen, der eine Identifizierung auf einen etwaigen Gehalt an GAD65 möglich macht. Emittierte das Neuron die spezifischen Wellenlängen beider Fluorochrome (Texas red und Oregon Green) wurde es als Neuron mit Kolokalisation von Peptid und GAD65 gewertet. Emittierte das Neuron nur die Wellenlänge des antipeptidgekoppelten Fluoreszenzantikörpers wurde es peptiderg aber GAD65 negativ gewertet.

3.1.5.2 Statistische Auswertung

Für alle Auswertungen gelangten die statistischen Funktionen des Kalkulationsprogramms EXCEL (Microsoft Corporation, Redmond, USA) zum Einsatz, insbesondere die Funktionen arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung (STABW) und Student t-Test. Bei Werten von $p < 0,05$ sind die Unterschiede bei den Ergebnissen als signifikant angenommen worden.

Aufgrund der aufwändigen Präparationen variierte die Anzahl der Versuche und die Anzahl der ausgewerteten Proben für die untersuchten Regionen des Hippocampus.

Für die CCK-Auswertungen wurden 5 Versuche durchgeführt und pro Versuch 4 Deckgläschen aus jeder hippocampalen Unterregion ausgezählt.

Für die VIP-Auswertungen wurden 4 Versuche durchgeführt und pro Versuch 3 Deckgläschen aus jeder hippocampalen Unterregion ausgezählt.

Für die NPY-Auswertungen wurden 6 Versuche durchgeführt und pro Versuch 4 Deckgläschen aus jeder hippocampalen Unterregion ausgezählt.

Für die SS-Auswertungen wurden 3 Versuche durchgeführt und pro Versuch 2 Deckgläschen aus jeder hippocampalen Unterregion ausgezählt.

3.1.6 Versuchstiere

Alle verwendeten Mäuse waren NMRI-Mäuse (Naval Medical Research Institute). Alle verwendeten Ratten waren adulte Wistar-Ratten (2 Monate alt). Für alle Versuche mit kultivierten Neuronen wurden 17 Tage alte NMRI-Mäuse-Feten verwendet. Alle in der Arbeit gezeigten repräsentativen Schnittbilder der Hippocampusregion wurden von adulten, 8 Monate alten weiblichen Mäusen angefertigt.

3.2 Material

3.2.1 Geräte

Acryl-Küvetten, Fa. Sarstedt Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland

Autoklav, Fa. Gössner, Modell GVA4,6-3, Hamburg, Deutschland

Brutschrank, Fa. Heraeus, Modell B5060, Hanau, Deutschland

Cryostat, Frigocut 2800, Fa. Reichert-Jung, Deutschland

Elektronenmikroskop, SEM, Fa. Jeol

- Elektronenmikroskop, TEM, Fa. Zeiss
- Einmalpipetten, Fa. Falcon, 5, 10, 25 ml, Lincoln Park, USA
- Einmalröhrchen, Fa. Falcon, Blue Max, 50 ml, Lincoln Park, USA
- Einmalröhrchen, Fa. Falcon, 10 ml, Lincoln Park, USA
- Einmalspritzen, Fa. Braun, 10 ml, Melsungen, Deutschland
- Kulturschalen, Fa. Nunc, 4, 6, 24 well Multidish, Roskilde, Dänemark
- Laborwaagen, Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland
- Laminar-Flow-Bench, Fa. BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
- Mikroskop, Fa. Zeiss, Axiovert 135 mit Fotoausstattung Ricoh KR-10 M, Oberkochen, Deutschland
- Pasteurpipetten, Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
- pH-Meter, Fa. WTW, Modell 537, Weilheim, Deutschland
- Pipettenspitzen, Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland

- Pipettierhilfe, Fa. Hirschmann, Modell Pipetus-Aku, Eberstadt, Deutschland
- Pipettierhilfen, Fa. Eppendorf, Eppendorf, Deutschland
- Pipettierhilfen, Fa. Labsystems, Modell Finnpipette
- Schlauchpumpe, Fa. ABIMED, Modell Minipuls 2, Langenfeld, Deutschland
- Schüttler, Fa. IKA-Labortechnik, Modell MTS 4, Staufen, Deutschland
- Stereolupe, Fa. Zeiss, Modell SV 11, Oberkochen, Deutschland
- Sterilfilter 150 ml, Fa. Nalgene, Modell 1550020, Hereford, U.K.
- Sterilfilter 500 ml, Fa. Nalgene, Modell 1564020, Hereford, U.K.
- Sterilfilter aufsteckbar, Fa. Schleicher & Schuell, FP 030/3, Dassel, Deutschland
- Tischzentrifuge, Fa. Hettich, Modell Universal, Tuttlingen, Deutschland
- Trockenheißluftsterilisator, VEB MLW Medizinische Geräte, Modell 113-0100, Berlin, DDR
- Ultraschallhomogenisator, Fa. Bandelin, Berlin, Deutschland
- Ultrotom, Fa. Reichert, Modell Ultracut S, Wien, Österreich
- Vortex, Fa. IKA-Labortechnik, Modell G 560 E, Staufen, Deutschland
- Wärmeschrank, VEB MLW Medizinische Geräte, Berlin, DDR

3.2.2 Chemikalien

- ABC-Peroxidase-Kit, Fa. Vector, Burlingame, USA
- Albumin, bovine, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Aprotinin, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Basal Medium Eagle (BME), mit Earles Salts und Glutamax I, Fa. Gibco, Eggenstein, Deutschland
- biotinyliert-goat anti rabbit (IgG, H+L), Fa. Vector, Burlingame, UK
- biotinyliert-horse anti mouse (IgG, H+L), Fa. Vector, Burlingame, UK
- BPST (2-(2'-Benzothiazolyl)-5-Styryl-3-(4'-Phtal-Hydrazidyl)-tetrazolium chloride), Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Calciumchlorid, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Chloralhydrat, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- DAB (Diaminobenzidin), Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland

- Deltamethrin, Institute of Organic Industrial Chemistry, Warschau, Polen
- Dinatriumhydrogenphosphat, Fa. Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
- DMSO (Dimethylsulfoxid), Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure oder Ethylen-dinitrilo-tetra-Essigsäure-di-Natrium-Dihydrat), Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Eagle Medium, Gibco, Life Science, Berlin, Deutschland
- Entellan, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Epon 812, Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
- Epon Accelerator DMP30, Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
- Epon Hardener DDSA, Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
- Epon Hardener MNA, Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
- Ethanol, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Glukose, Fa. Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
- Glutaraldehyd 70 %, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Glycin, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure), Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland
- HPMA (Hydroxypropylmetacrylat), Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
- HRP (Horseradish peroxidase) type II, 200U/mg, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Immuno-Mount, Fa. Shandon, Cleshire, UK
- Kaisers-Glycerin-Gelatine, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Kaliumchlorid, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Longasteril, Fa. Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
- Magnesiumchlorid, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Methanol, Fa. Baker, Deventer, Niederlande
- Na-Pyruvat (100 mM), Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Na-Selenite, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Natriumazid, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumcacodylat, Fa. Fluka, Neu-Ulm, Deutschland

- Natriumchlorid, Fa. Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
- Natriumdihydrogenphosphat, Fa. Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
- Natriumhydroxid, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- NMDA (N-Methyl- D-Aspartate), Fa. Tocris, Bristol, UK
- Osmiumtetroxid, Fa. Plano, Marburg, Deutschland
- Paraformaldehyd, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Pferdeserum (für die Zellkultur), Fa. Gibco, Eggenstein, Deutschland
- Pferdeserum, Fa. Vector, Burlingame, UK
- Poly-D-Lysin, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Ponceau S, Fa. Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
- Saccharose, Fa. Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
- Saccharose, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- β -Mercaptoethanol, Fa. Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
- Steriles Wasser, Tissue cultured tested, Fa. Gibco, Eggenstein, Deutschland
- Synapsin, Fa. Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
- T3 (L-3,3',5-Triiodo-Thyronine oder Trijodthyronin), Fa. Calbiochem, La Jolla, USA
- Texas red Avidin D, Fa. Vector, Burlingame, UK
- Tissue Freezing Medium, Leica, Nussloch, Deutschland
- Trichloressigsäure, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Tris-HCl, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Tris-Hydroxymethylaminomethan, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Triton X-100, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Uranylacetat, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Wasserstoffperoxyd, Fa. Merck Darmstadt Deutschland
- Ziegenserum, Fa. Vector, Burlingame, UK
- Xylol, Fa. Baker, Deventer Holland

3.2.3 Lösungen

3.2.3.1 Puffer

- PBS (0,01 M): $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2,8 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 7,2 mM in Aqua bidest., pH 7,2

- Phosphatpuffer (0,1 M): NaH_2PO_4 33 mM, Na_2HPO_4 67 mM in Aqua bidest., pH 7,4

3.2.3.2 Medien für die Zellkultur

NBM-B27: NBM 485 ml, B27 10 ml, Penicillin / Streptomycin 5 ml, L-Glutamin 1,2 ml

Kulturmedium: Eagle Medium, 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Insulin, 0,1 mg/ml Apo-trasferrin, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin, 30 nM Na-Selenit, 1 mg/ml BSA, 0,1 nM L-3,3',5-Trijodthyronin, 0,25% Glukose (Sigma, München, Deutschland)

3.2.3.3 Fixierungslösungen

Perfusions-Lösung: 4% Paraformaldehyd, 0,05% Glutaraldehyd, 0,2% Picrinsäure in 0,1M Phosphatpuffer, pH 7,4

Paraformaldehydlösung (4 %): 4 g Paraformaldehyd in Phosphatpuffer (0,1 M), pH 7,4

Cacodylatpuffer (200 mM): 200 mM Cacodylatsäure-Natriumsalz in Aqua bidest., pH 7,2

Glutaraldehyd (1 %): 1 ml Glutaraldehyd (70 %) in 70 ml Cacodylatpuffer, pH 7,2

3.2.3.4 Lösungen zur Immunzytochemie

Antikörperverdünner: 0,5 % BSA, 0,05 % NaN_3 in PBS, pH 7,3; bei 4°C zwei Monate haltbar

10% NGS-Pht: 0,3 ml Triton-Stocklösung, 9,7 ml 10% NGS, 5 μl Phenylhydrazin

Triton X-100-Lösung: 0,5 % Triton X-100 in PBS

Serum zum Blocken unspezifischer Bindungen: 2% Normalserum in PBS

DAB-Stammlösung: 50 mg DAB in 1 ml Aqua bidest.

Tris-Stocklösung (1M): 12,2 Tris(hydroxymethyl)aminomethan in 100 ml H_2O , pH 7,6

Imidazol-Stocklösung (1M): 681mg Imidazol in 10 ml H₂O, pH 7.6

Vorinkubationslösung: 500µl Tris-Stocklösung, 100µl Imidazol-Stocklösung, 100µl DAB-Stocklösung, 100µl DAB-Stocklösung, 9,5ml H₂O

Inkubationslösung: 5ml Vorinkubationslösung, 500µl 3% Ammoniumnickelsulfat, 250µl H₂O₂ 3%

3.2.4 Verwendete Antikörper

Tabelle 4: **Primäre Antikörper**

primäre Antikörper	Quelle
Calbindin-D-28K monoklonal, made in mouse	Sigma, Deisenhofen
Cholecystokinin (CCK), polyklonal, made in rabbit	Sigma, Deisenhofen
GAD 65kDa, monoklonal, made in mouse	Chemicon
GAD 67kDa, polyklonal, made in rabbit	Chemicon
Neurofilamentprotein 200 kDa (NFP 200) monoklonal, made in mouse	Chemicon
Neuropeptid Y (NPY), polyklonal, made in rabbit	Amersham
Somatostatin, polyklonal, made in rabbit	DAKO
Synapsin, polyklonal, made in rabbit	Calbiochem, Bad Soden
Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP), polyklonal, made in rabbit	Cambridge Research Biotechnology

Tabelle 5: Sekundäre Antikörper

sekundäre Antikörper	Quelle
Oregon green-coupled goat anti- mouse IgG	Molecular Probes
Texas red-coupled goat anti-rabbit IgG	Dianova

4 Ergebnisse

Bei der Betrachtung der Schnitte waren bei den verschiedenen peptidergen Neuronenpopulationen unterschiedliche Verteilungen in den einzelnen Hippocampusregionen zu erkennen. Um diese Neuronengruppen so genau wie möglich zu charakterisieren, erschien es notwendig, Unterregionen des Hippocampus getrennt voneinander zu kultivieren. Es wurden drei verschiedene Kulturen angelegt: Kulturen des Gyrus dentatus mit dem Hilum und einem kleinen Anteil der CA3c-Region; Kulturen der CA3a/b-Region und Kulturen des gesamten Hippocampus.

4.1 GAD als Marker GABAerger Neurone

Es wurden in situ sowie in vitro GAD65 und GAD67 im Hippocampus untersucht. Für beide bekannte Formen der Glutamatdecarboxylase standen Antikörper zur Verfügung. Für GAD65 wurde ein monoklonaler in Maus und für GAD67 ein polyklonaler im Hasen hergestellter Antikörper verwendet. Dazu sind an 40µm dicken, koronaren Schnitten die GABAergen Neurone näher klassifiziert worden. Es wurde sowohl in vitro als auch in situ auf eventuelle Unterschiede in den Markierungen der beiden Isoformen GAD65 und GAD67 eingegangen.

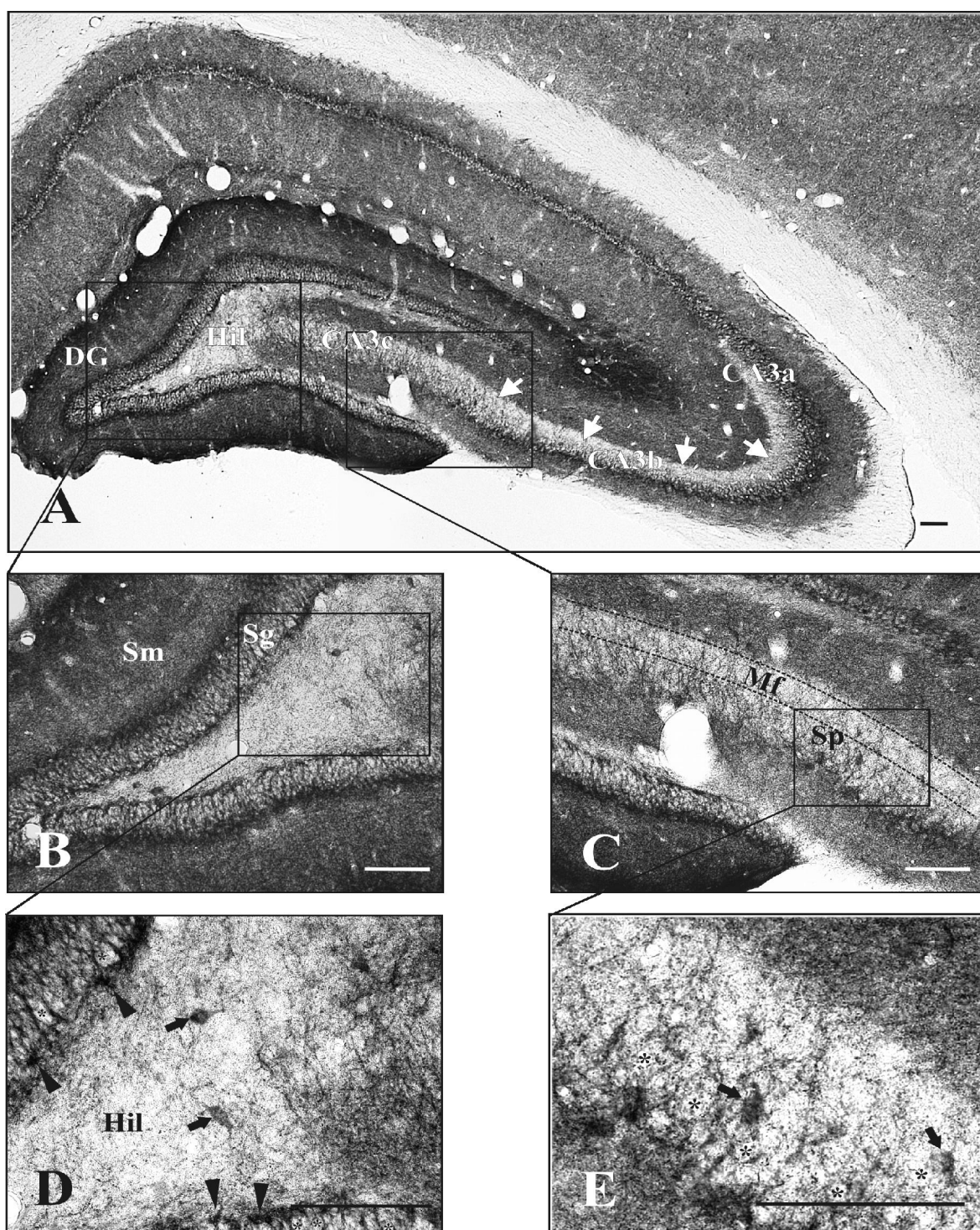


Abbildung 4: Lokalisation von GAD65 (Schnitt adulter Mäusehippocampus)

DAB/Ni-Technik für GAD65, 40µm dicker coronaler Schnitt. Fig. A: Hippocampusregion, in einer Übersicht, Gyrus dentatus (DG). Es sind immunreaktive Interneurone in allen Regionen sowie GAD65-positive Faserschichten zu erkennen. Fig. B zeigt den Gyrus dentatus. Immunreaktivität ist im Stratum granulosum (Sg) und Str. moleculare (Sm) in Interneurone und Fortsätzen zu erkennen, während die GAD65-negativen Körnerzellen im Str. granulosum nur durch die Umrundung ihrer Somata durch GAD65-positive Fortsätze und Synapsen sichtbar werden (Sternchen Fig. D). Fig. D zeigt zwei GAD65-pos. Interneurone im

Hilum (Hil, Pfeile) des Gyrus dentatus sowie entlang der Körnerzellschicht immunreaktive Somata (Pfeilspitzen). Fig. C ist eine Ausschnittsvergrößerung der CA3-Region. Gut zu erkennen ist der immunnegative Moosfasertrakt (Mf) über dem Str. pyramidale (Sp). Fig. E: Im Stratum pyramidale (Sp) sind GAD65-pos. Somata (Pfeile) und Fortsätze von Interneuronen zu erkennen, die GAD-negative Pyramidenzellen umhüllen (Sternchen). Maßstab 100µm.

GABAerge Neurone im Hippocampus der Maus

Körnerzellen im Stratum granulosum sowie die Pyramidenzellen im Stratum pyramidale zeigten keine Immunreaktivität für GAD65 oder GAD67 (Abbildung 4 D und E, Sternchen; Abbildung 5 D, Sternchen; E). Im Gegensatz dazu waren die Perikarya der Interneurone stark immunreaktiv sowohl für GAD65 als auch für GAD67 ohne qualitative Unterschiede (Abbildung 4 D, E, Abbildung 5 D, E; Pfeile und Pfeilspitzen). Sie befanden sich in nahezu allen Schichten des Hippocampus. An der Grenze von Stratum granulosum zu Stratum moleculare war die Markierung GAD67- und GAD65-positiver Neurone identisch (Abbildung 4 B, Abbildung 5 B, gestrichelte Linie).

GABAerge Neurone in der Kultur

Es wurden Doppelmarkierungen mit GAD65 und GAD67 an Kulturen unterschiedlichen Alters vorgenommen. Dabei sind 12 bis 21 Tage alte Kulturen fixiert und die Färbungen der beiden Isoformen untersucht worden.

Jedes Neuron, das GAD67 exprimiert, zeigt auch GAD65. Das heißt, GAD65 und GAD67 waren im Soma immer kolokalisiert (Abbildung 6 Pfeile, Abbildung 7). Häufig wurde auch eine Kolokalisation in Synapsen festgestellt (Abbildung 6 Pfeilspitzen). GAD65 und GAD67 sind also beide als immunzytochemischer Nachweis für GABAerge Neurone zu verwenden. Aufgrund dieser in situ und in vitro gewonnenen Ergebnisse, wurden Doppelmarkierungen mit peptidergen Neurotransmittern und folgende quantitative Auswertungen mit GAD65 als Marker für GABA-erge Neurone vorgenommen.

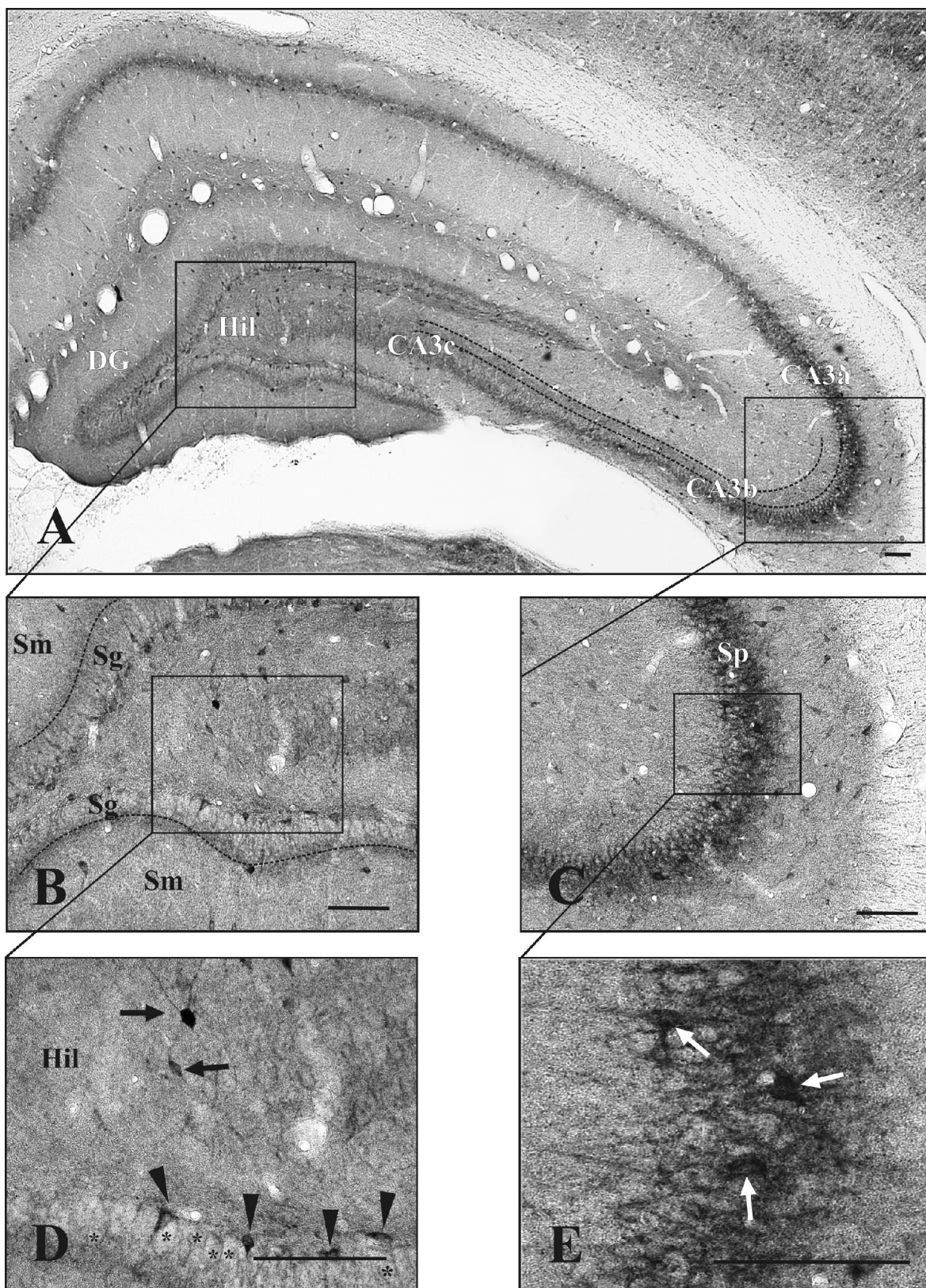


Abbildung 5: Lokalisation von GAD67 (Schnitt adulter Mäusehippocampus)

DAB/Ni-Technik für GAD67, 40µm dicker coronaler Schnitt. Fig. A: Hippocampus in einer Übersicht, Gyrus dentatus (DG). Es sind immunreaktive Interneurone in allen Regionen sowie GAD67-positive Faserschichten zu erkennen. Fig. B zeigt den Gyrus dentatus. Immunreaktive Fasern sind in der Grenzschrift

vom Stratum granulosum (Sg) zum Stratum moleculare (Sm) zu erkennen (gestrichelte Linie). Immunreaktive Interneurone befinden sich an der Grenze vom Hilum (Hil) zum Stratum granulosum. Die GAD67-negativen Körnerzellen im Stratum granulosum werden nur durch die Umrundung ihrer Somata durch GAD67-positive Fortsätze sichtbar (Sternchen Fig. D). Fig. D zeigt GAD67-pos. Interneurone im Hilum (Hil, Pfeile) des Gyrus dentatus sowie entlang der Körnerzellschicht (Pfeilspitzen). Fig. C ist eine Ausschnittsvergrößerung der CA3 Region. Immunreaktivität wird im Stratum pyramidale (Sp) durch GAD67-positive Faserschichten GABAerger Interneurone hervorgerufen. Fig. E: Im Stratum pyramidale sind GAD67-pos. Somata (Pfeile) und Fortsätze von Interneuronen zu erkennen, die die GAD-negativen pyramidalen Somata umüllen. Maßstab 100 μ m.

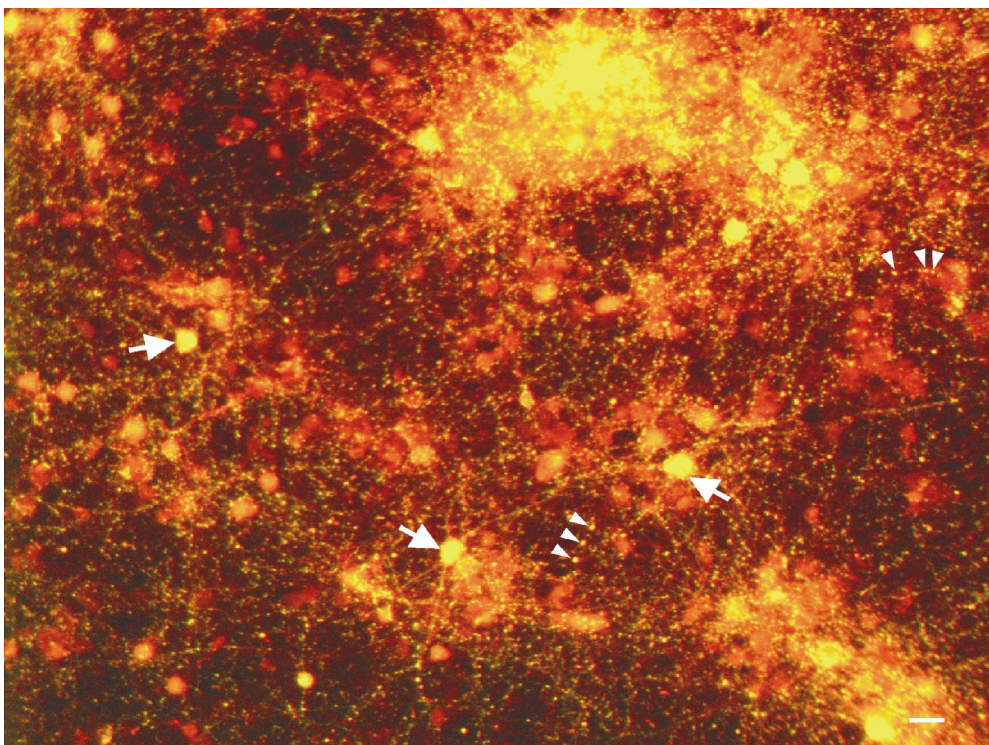


Abbildung 6: **Doppelimmunfluoreszenz von GAD65 und GAD67 in der Kultur 21DIV**

Die beiden Isoformen GAD65 (grün) und GAD67 (rot) sind in jedem GABAergen Neuron vorhanden. Die komplette Kolokalisation (gelb) von beiden Antikörpern kann sowohl in Somata (Pfeile) wie auch in präsynaptischen Endigungen (Pfeilspitzen) beobachtet werden. Maßstab 20 μ m.

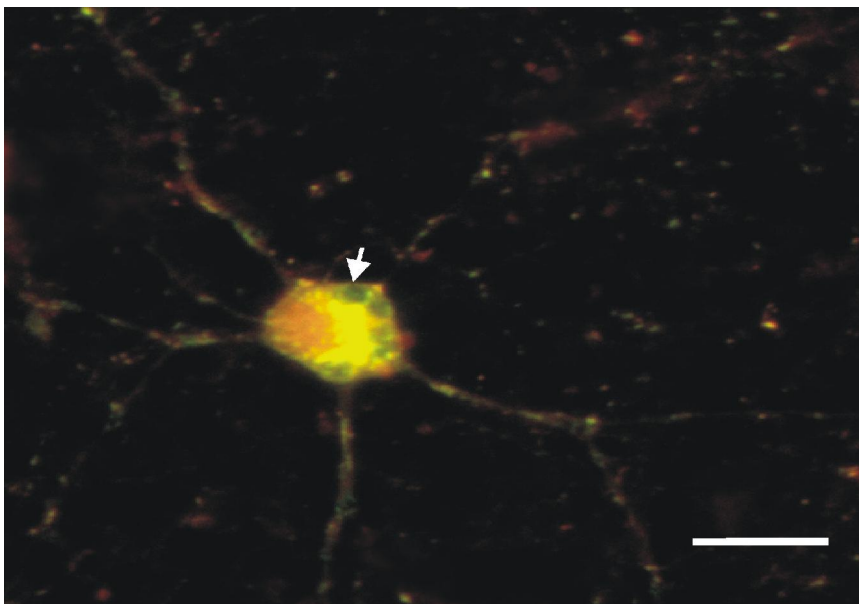


Abbildung 7: **Detailaufnahme eines GABAergen Neurons**

Soma (Pfeil). GAD65 (grün) und GAD67 (rot) gefärbt 21 DIV, Kolokalisation stellt sich gelb dar. Maßstab 20 μm .

4.2 Peptiderge Neurotransmitter in situ und in hippocampalen Zellkulturen

4.2.1 Verteilung cholecystokininerger Neurone in situ und in hippocampalen Zellkulturen

CCKerge Neurone im Hippocampus der Maus

Das Vorkommen von cholecystokininerger Neuronen wurde in situ an Schnitten fixierter Gehirne adulter Mäuse untersucht. Zur Feststellung der Immunreaktivität ist die DAB/Ni-Methode verwendet worden. Es wurde CCK in Somata sowie in Fortsätzen beobachtet (Abbildung 8 D, E). CCK-positive Zellkörper wurden im Hilum und den Strata pyramidale, radiatum, lucidum, oriens und granulosum nachgewiesen (Abbildung 8). Abbildung 8 A zeigt den Hippocampus in einer Übersicht, B eine Vergrößerung des G. dentatus mit Hilumbereich. Im Stratum moleculare waren keine CCK-immunreaktiven Neurone anfärbbar, im Stratum granulosum nur vereinzelt (Abbildung 8 B). Im Hilum (D) und Stratum radiatum (E) waren viele Somata CCK-positiv. Nicht nur die Perikarya sondern auch einige Fortsätze der CCK-positiven Neurone wurden stark gefärbt.

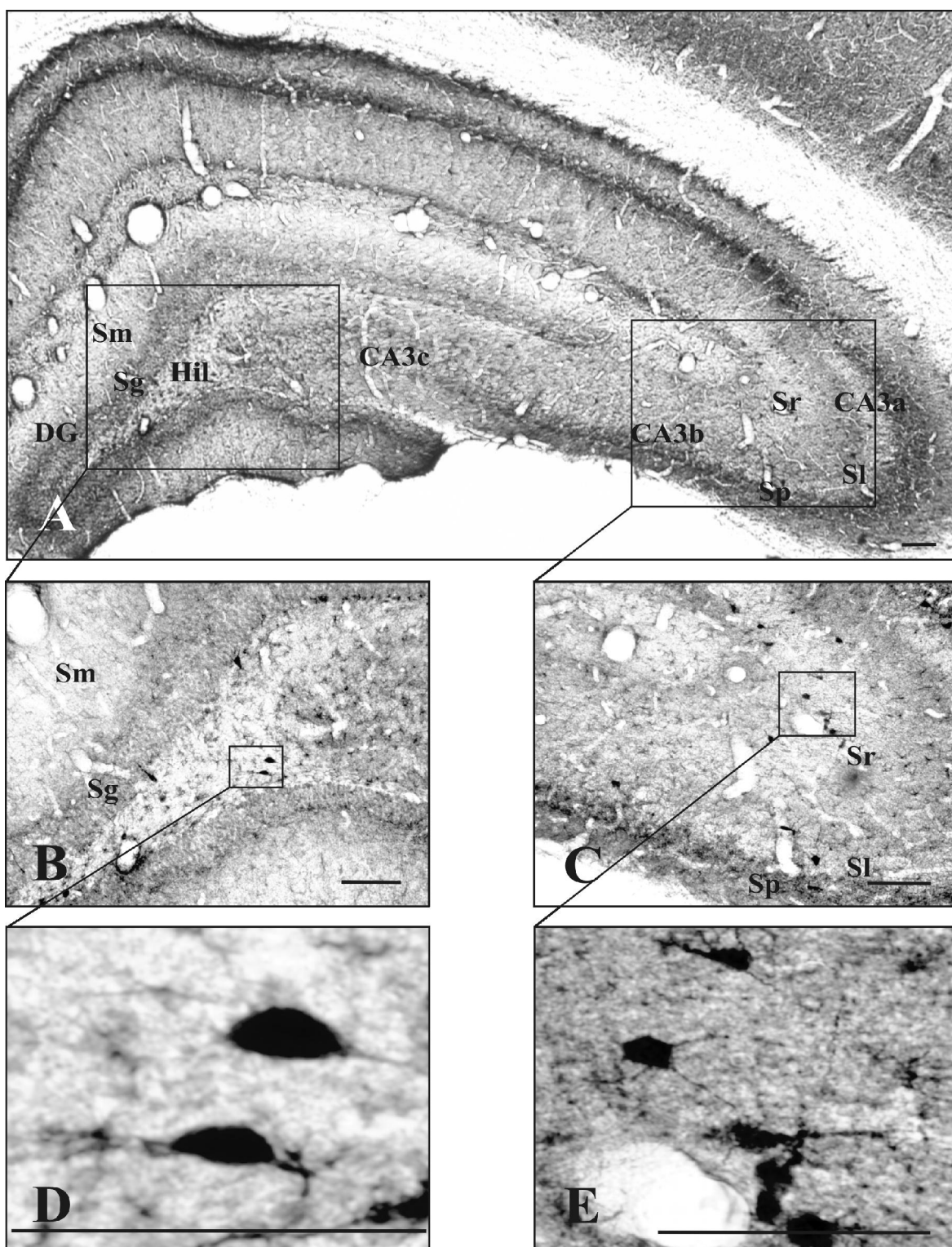


Abbildung 8: Lokalisation von CCK (Schnitt adulter Mäusehippocampus)

DAB/Ni-Technik für CCK. 40µm dicker coronaler Schnitt. Fig. A zeigt die Hippocampusregion in einer Übersicht. Immunreaktivität ist in einigen Zellen des Stratum pyramidale (Sp), des Stratum radiatum (Sr) und des Stratum granulosum (Sg) zu erkennen. In Fig. B ist der Gyrus dentatus (DG) gesondert dargestellt. Fig. C ist eine Ausschnittsvergrößerung der CA3 Region. Fig. D zeigt als Ausschnitt von Fig.B CCK-positive Neurone im Hilum (Hil). Fig. E zeigt als Ausschnitt von Fig.C im Stratum radiatum CCK-positive Somata und Fasern. Maßstab 100µm.

CCKerge Neurone in der Kultur

Die Kulturen wurden für die Fluoreszenzmikroskopie immunzytochemisch mit Antikörpern für GAD65 (grün) und CCK (rot) markiert. Die Neurone wurden auf ihre unterschiedliche Expression der beiden Neurotransmitter untersucht. Es wurden GAD65 positive Neurone gefunden, die nicht für CCK gefärbt waren, GAD65-positive Neurone, die CCK-positiv waren und GAD65-negative Neurone, die eine CCK-positive Immunreaktion zeigten. Es konnten zwei cholezystokininerge Neuronenpopulationen identifiziert werden: 1. cholezystokininerge Neurone, die GABAerg sind (Abbildung 10), und 2. cholezystokininerge Neurone, die nicht GABAerg sind (Abbildung 9).

Diese beiden Populationen wurden quantitativ in den unterschiedlichen Kulturen Hippocampus, Gyrus dentatus und CA3a/CA3b untersucht. Die Auswertungen wurden bei 5 Versuchen mit durchschnittlich 4 Deckgläschen pro Versuch und Region vorgenommen. Dazu wurden immer ganze Deckgläschen (113mm²) untersucht und alle CCKergen Neurone gezählt, unterschieden an ihrem Gehalt an GAD65.

Jedes CCK-positive Neuron wurde auf eine etwaige Kolo-kalisation mit GAD65 bewertet und gezählt. Im gesamten Hippocampus und Gyrus dentatus sind cholezystokininerge GAD-positive und -negative Neurone unterschiedlich verteilt. In der Hippocampuskultur und der Gyrus dentatus Kultur gibt es signifikant mehr CCKerge GAD65-negative Neurone als CCKerge GAD65-positive Neurone. Das Ergebnis, dass es in der Hippocampuskultur im Durchschnitt 82,7% CCK-positive nicht-GABAerge Neurone gibt, aber nur 17,3% GABAerge und CCKerge Neurone, war signifikant ($p=0.015$ Student t-Test). Auch in der G.dent. Kultur waren 63,8% der Neurone nicht GABAerg und 36,2% GABAerg ($p=0,02$ Student t-Test). In der CA3a/CA3b-Kultur sind gleich viele CCK-Neurone GABAerg wie nicht GABAerg. Es gibt signifikant mehr GABAerge CCK-positive Neurone in der CA3a/CA3b-Kultur als in der Hippocampuskultur ($p=0,016$). Es gibt signifikant weniger nicht GABAerge CCK-positive Neurone in der CA3a/CA3b-Kultur als in der Hippocampus- ($p=0,028$) oder Gyrus dentatus- Kultur ($p=0,042$).

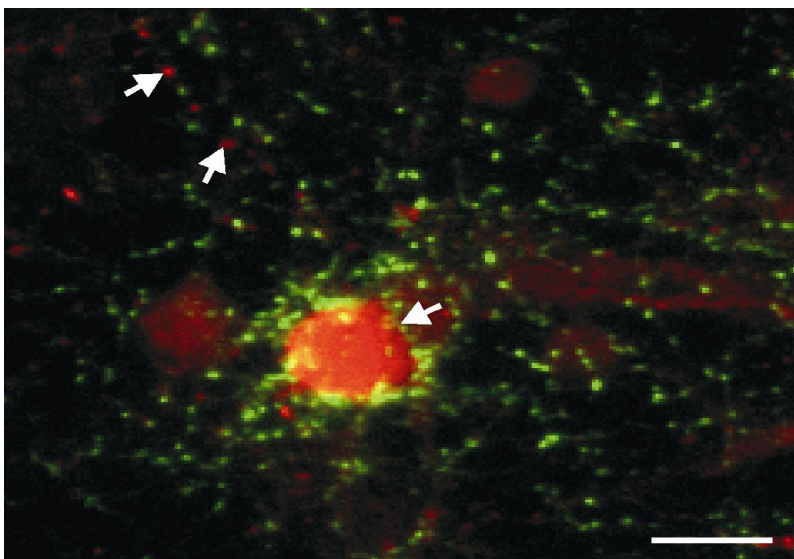


Abbildung 9: CCK-positives, GAD65-negatives Neuron

Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie, gegen CCK (rot) und GAD65 (grün) markiert, 21 DIV, zeigt repräsentatives CCK-positives Neuron mit CCK-positiven Fortsätzen (Pfeile), die nicht GABAerg sind. Es handelt sich in den Fortsätzen um CCK-positive Vesikelhäufungen, wie sie typisch für die Präsynapsen sind. Maßstab 20µm.

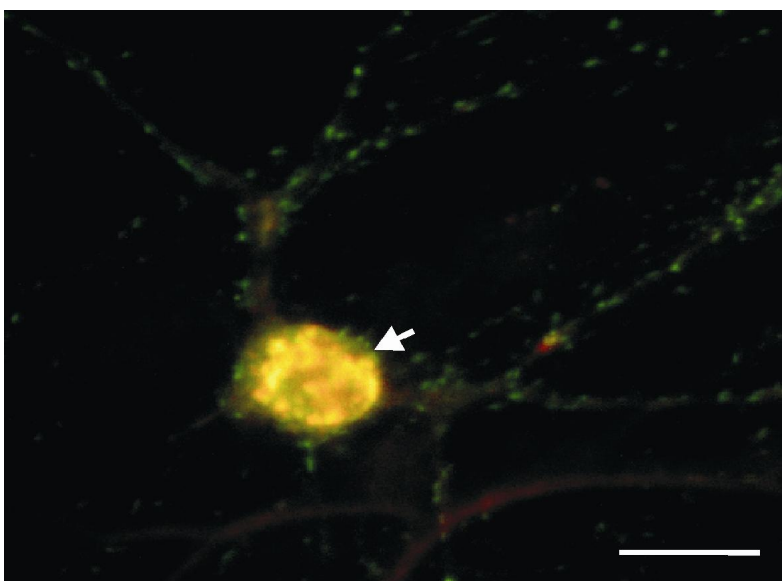


Abbildung 10: CCK-positives, GAD65-positives Neuron

Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie, CCK (rot) und GAD65 (grün) markiert, 21 DIV, zeigt repräsentatives GABAerges CCK-positives Neuron. Im Perikaryon stellt sich die Kolokalisation durch die Überlagerung von rot und grün gelb dar (Pfeil). Maßstab 20µm.

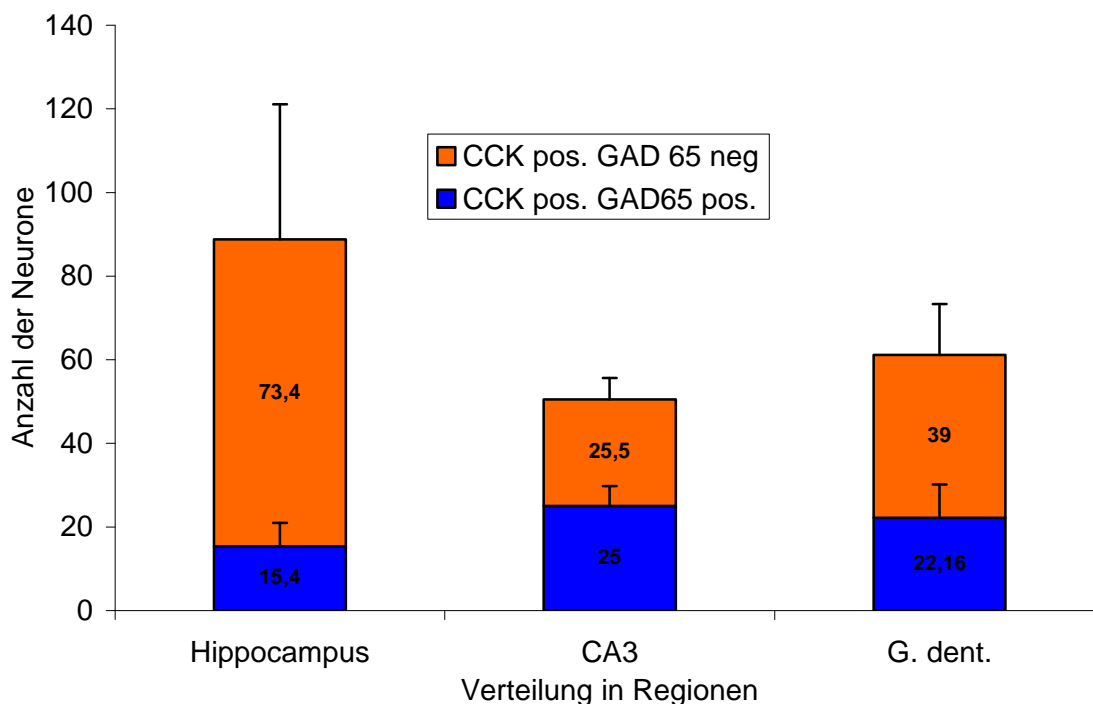


Abbildung 11: **Verteilung GABAerger Neurone in der CCK-Population unterschiedlicher Regionen des Hippocampus**

Doppelimmunofluoreszenz mit α -GAD65 und α -CCK markierten Neuronen. Es wurden ganze Deckgläschen in Kulturen der CA3a/CA3b Region, des Gyrus dentatus sowie des gesamten Hippocampus auf ihre Kolokalisation hin ausgezählt. Die Ergebnisse, dass in den Hippocampuskulturen im Durchschnitt 73,4 CCK-positive Neurone nicht GABAerg sind und nur durchschnittlich 15,4 Neurone GABAerg, war signifikant ($p=0,015$ Student t-Test).

4.2.2 Verteilung VIPerger Neurone in situ und in der Kultur

VIPerge Neurone im Hippocampus der Maus

Das Vorkommen und die Verteilung VIPerger Neurone im Hippocampus wurde mit Hilfe der DAB/Ni-Technik an $40\mu\text{m}$ dicken coronalen Schnitten adulter Mäuse untersucht. Die Immunreaktivität zeigte sich sehr spezifisch in Zellkörpern und Fortsätzen. VIPerge Neurone waren in allen Schichten des Gyrus dentatus (Stratum moleculare, Stratum granulosum, Hilum) zu finden. Sie erschienen häufig in kleinen Gruppen nahe am oder im Stratum granulosum, während sie im Hilum seltener vorhanden waren (Abbildung 12 A, B, D). Im Stratum radiatum, Stratum lacunosum-molekulare und Stratum pyramidale der CA3 Region waren auch VIP-positive Neurone lokalisiert, während es im Stratum lucidum keine positiven Somata gab (Abbildung 12 A, C, E). Die Zellen waren morphologisch sehr heterogen. Es gab sowohl kleine runde bis eiförmige Zellen mit wenig Fortsätzen und ca.

10µm Durchmesser (Abbildung 12 D), als auch lang gestreckte größere Perikarya mit vielen Fortsätzen und ca. 25µm Durchmesser (Abbildung 12 E).

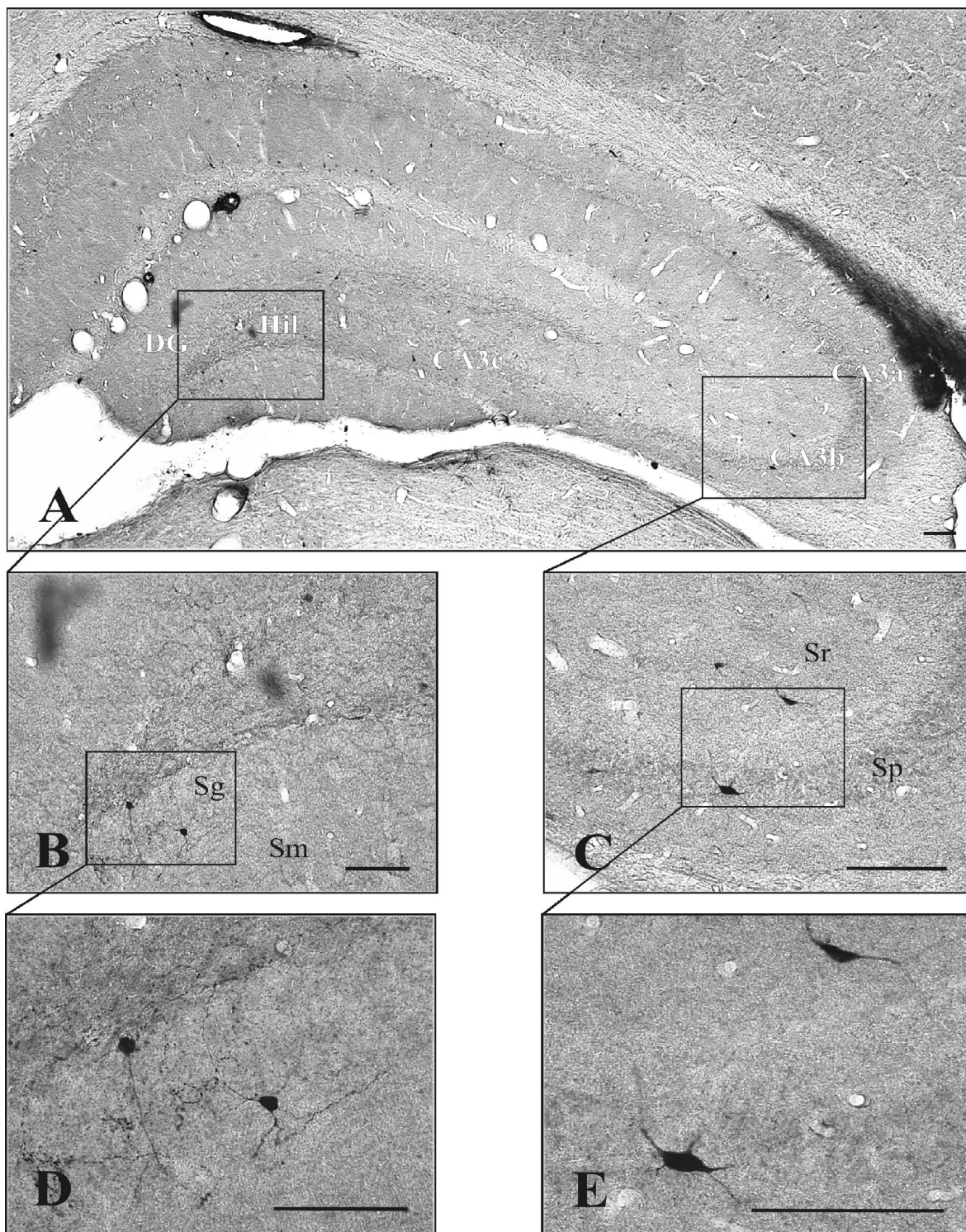


Abbildung 12: Lokalisation von VIP (Schnitt adulter Mäusehippocampus)

DAB/Ni-Technik für VIP. 40µm dicker coronaler Schnitt. Fig. A zeigt die Hippocampusregion in einer Übersicht. Immunreaktivität ist außer in den Somata und Fortsätzen nur sehr schwach im Stratum pyramidale (Sp) und Hilum (Hil) zu erkennen. In Fig. B ist der Gyrus dentatus (DG) gesondert dargestellt. Fig. C ist eine Ausschnittsvergrößerung der CA3 Region. Fig. D zeigt VIP-positive Neurone nahe dem Stratum granulosum

(Sg) des Gyrus dentatus. Fig. E: Im Stratum pyramidale sowie im Stratum radiatum sind VIP-positive Somata zu erkennen. Maßstab 100µm.

VIPerge Neurone in der Kultur

Die Primärkulturen wurden von 17 Tage alten Mäuseföten angelegt. Nach 21 DIV sind die Kulturen fixiert worden und für die Fluoreszenzmikroskopie immunzytochemisch mit Antikörpern für GAD65 (grün) und VIP (rot) markiert worden. Es konnten VIPerge Neurone in der Kultur gefunden werden. Es wurden GAD65-positive Neurone gefunden, die sich nicht mit VIP anfärben ließen, GAD65-positive Neurone, die VIP-positiv waren, und GAD65-negative Neurone, die eine VIP-positive Immunreaktion zeigten. Es wurden nicht-GABAerge (Abbildung 13) und GABAerge (Abbildung 14 A, B) VIP-positive Neurone identifiziert. Bei den VIPergen Neuronen war auch Immunreaktivität in den Fortsätzen zu beobachten.

Es wurden quantitative Auswertungen vorgenommen. Dazu wurden immer ganze Deckgläschen (113mm²) untersucht und alle VIPergen Neurone auf ihren Gehalt an GAD65 hin ausgezählt. Es wurden für die Auswertungen 4 Versuche mit durchschnittlich 3 Deckgläschen pro Versuch und Region vorgenommen. Die Untersuchungen wurden an Kulturen des gesamten Hippocampus und seiner Unterregionen Gyrus dentatus und der CA3a/CA3b-Region vorgenommen. Es gab GABAerge und nicht GABAerge VIP-positive Neurone in allen Regionen. In allen drei Regionen gab es signifikant mehr nicht-GABAerge als GABAerge VIP-positive Neurone (Hil p=0,039; CA3 p=0,00016; G.dent. p=0,046) (Abbildung 15). In der CA3a/CA3b-Region waren signifikant mehr Neurone GAD65-negativ als in der Hippocampus- und Gyrus dentatus-Kultur (CA3 zu Hil p=0,015; CA3 zu G.dent. p=0,008 (Abbildung 15)). In der Gyrus dentatus-Kultur waren mehr VIP-positive Neurone GABAerg als in der CA3a/CA3b-Kultur (p=0,0048). Die Anzahl und Verteilung VIPerger Neurone im Hippocampus und Gyrus dentatus unterscheidet sich nicht signifikant. Die nicht dargestellten prozentualen Verteilungen verdeutlichen die signifikant unterschiedliche Verteilung der CA3a/CA3b-Region (86% GAD-neg.) zum Gyrus dentatus (62% GAD-neg.) und Hippocampus (71% GAD-neg.). Es hat sich gezeigt, dass, obwohl die Kulturen mit gleicher Zelldichte ausgesät worden sind, in der CA3a/CA3b-Region die Anzahl der VIPergen Neurone um 40% höher liegt als in der Hippocampuskultur, während sich die Gyrus dentatus-Kultur nur wenig unterscheidet.

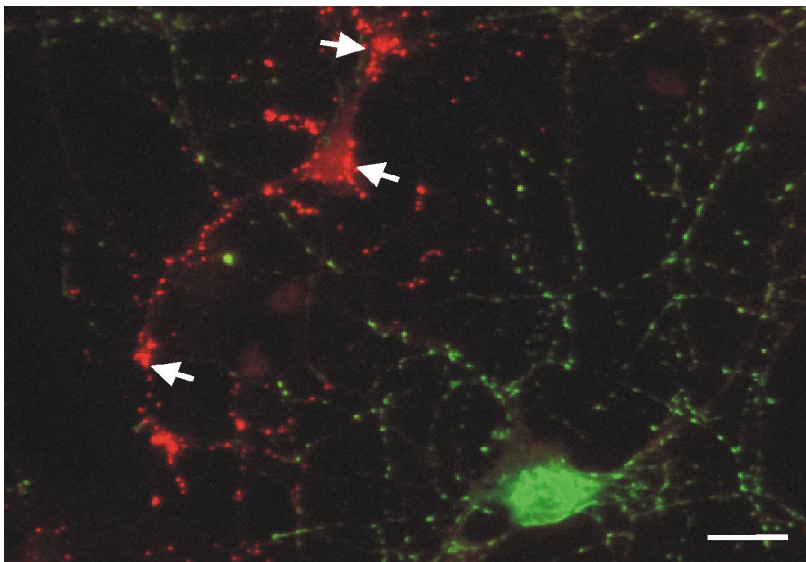


Abbildung 13: VIPerges, GAD65-negatives Neuron

Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie, gefärbt gegen VIP (rot) und GAD65 (grün), 21 DIV. In beiden sichtbaren Neuronen liegt keine Kolo­kalisation vor: jeweils nur VIPerg bzw. GABAerg. In beiden Neuronen sind Perikaryon und Fortsätze (Pfeile) immunreaktiv. Die grünen und roten Punkte in den Fortsätzen stellen teilweise Synapsen sowie axonalen Transport dar. Maßstab 20µm.

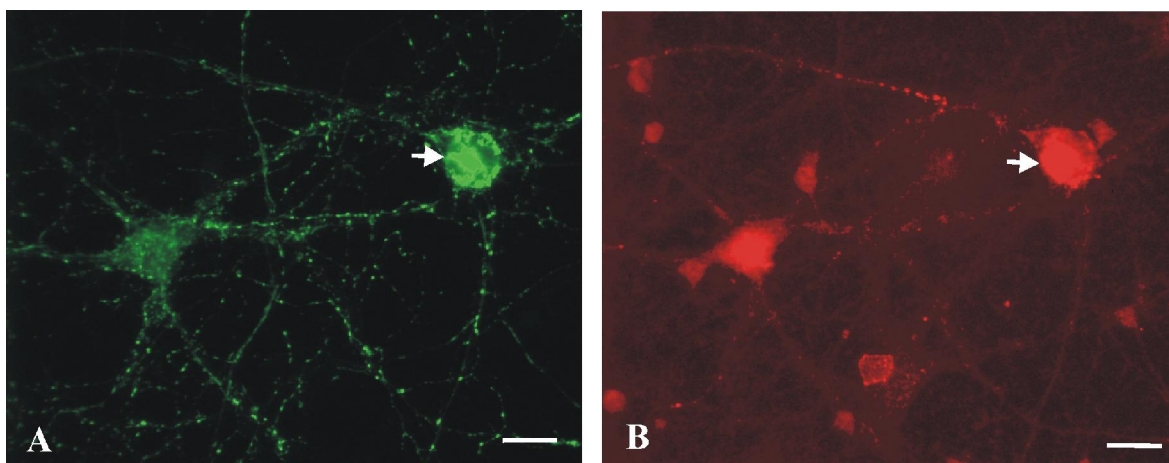


Abbildung 14: VIPerges, GAD65-positives Neuron

Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie, gefärbt gegen VIP (rot) und GAD65 (grün), 21 DIV. Fig. A zeigt ein im Einfachfilter aufgenommenes GABAerges Neuron mit starker Immunreaktivität im Perikaryon (Pfeil). Fig. B zeigt dieses Neuron im Rotfilter, der VIP selektiv darstellt. Das Perikaryon (Pfeil) sowie ein Fortsatz sind immunreaktiv. Es ist ein VIPerges, GABAerges Neuron. Maßstab 20µm.

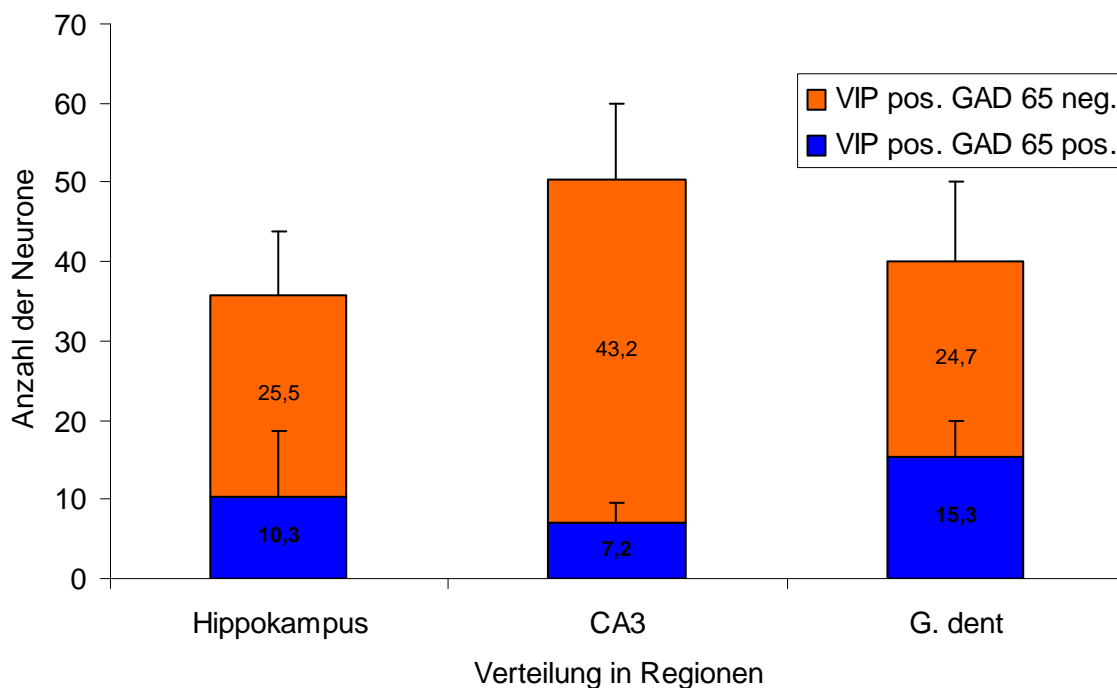


Abbildung 15: **Verteilung VIPerger Neurone in unterschiedlichen Regionen des Hippocampus**

Mit der Doppelimmunfluoreszenz wurden Deckgläschen (113mm²) mit GAD65- und VIP-markierten Neuronen in Kulturen der CA3a/CA3b-Region, des Gyrus dentatus sowie des gesamten Hippocampus auf ihre Kolokalisation hin ausgezählt. Die Mehrzahl VIPerger Neurone stellt sich in allen Regionen als nicht GABAerg dar. Signifikanz $p < 0,05$ Student t-Test.

4.2.3 Verteilung NPY-positiver Neurone in situ und in der Kultur

Neurone im Hippocampus der Maus

Für die Untersuchung NPYerger Neurone im Hippocampus wurde die DAB/Ni-Technik an 40µm dicken Schnitten adulter Mäuse benutzt. Entsprechende Perikarya und Fortsätze zeigten eine spezifische Immunreaktion. Die Abgänge der Fortsätze vom Soma waren gut zu erkennen. NPY-positive Neurone waren in allen Schichten des Hippocampus zu finden. Die Neuronendichte war im Hilum (Hil) (Abbildung 16 A, B, D) und der CA3c-Region am höchsten, während im Stratum moleculare (Sm), Stratum granulosum (Sg) und Stratum lucidum (Sl) die NPY-positiven Neurone sehr dünn gesät waren (Abbildung 16 A, C, E). Im Stratum pyramidale gab es nur vereinzelt NPY-positive Zellen (Abbildung 16 C, E).

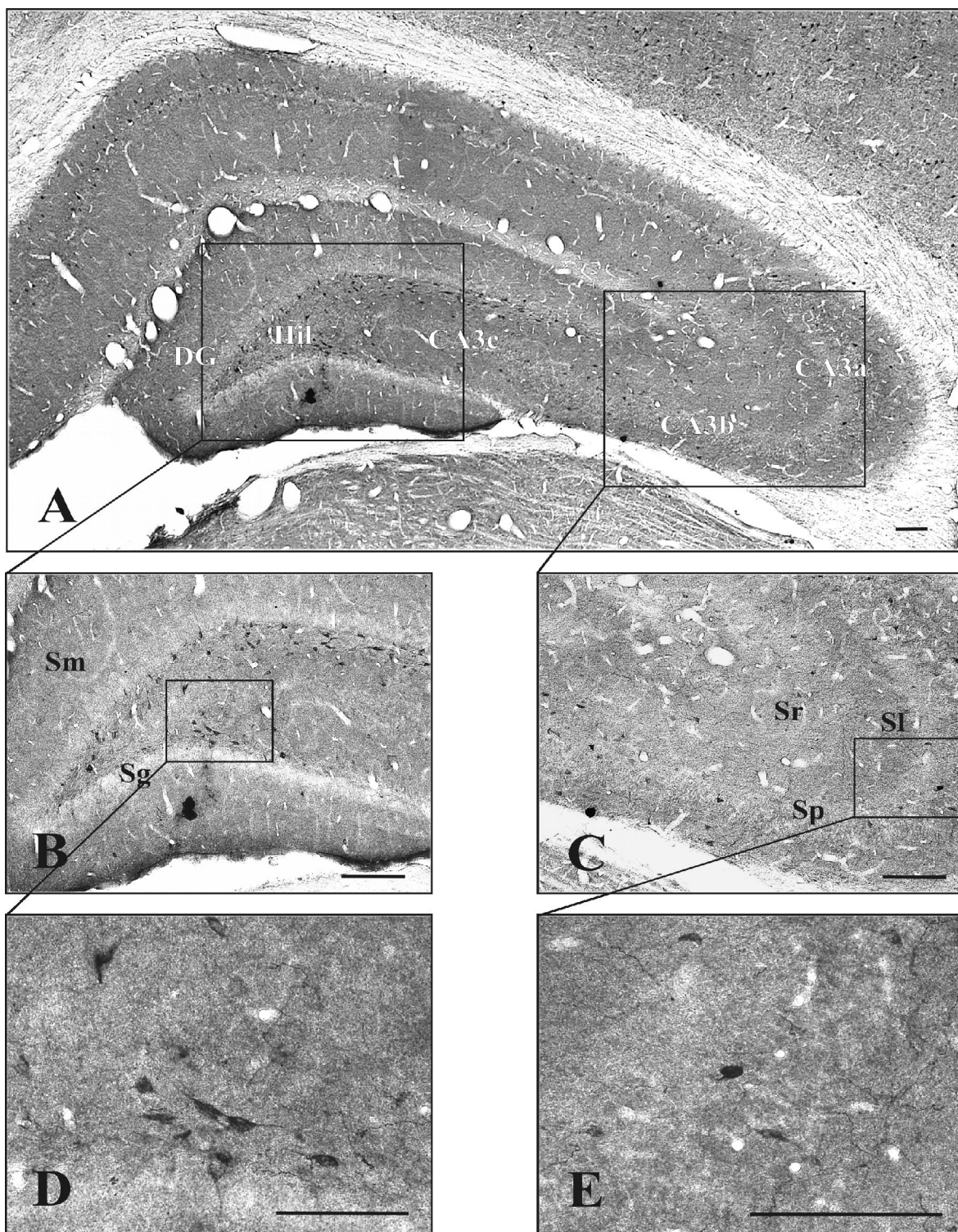


Abbildung 16: Lokalisation von NPY (Schnitt adulter Mäusehippocampus)

DAB/Ni-Technik für NPY. 40µm dicker coronaler Schnitt. Fig. A zeigt die Hippocampusregion in einer Übersicht. Immunreaktivität wird fast ausschließlich in den Somata und Fortsätzen kleinerer Zellen beobachtet. In Fig. B ist der Gyrus dentatus (DG) gesondert dargestellt. Fig. C ist eine Ausschnittsvergrößerung der CA3-Region. Fig. D zeigt NPY-positive Neurone im Hilum (Hil). Fig. E: Im Stratum pyramidale (Sp) sowie im Stratum radiatum (Sr) sind NPY-positive Somata zu erkennen. Maßstab 100µm.

NPYerge Neurone in der Kultur

Die Kulturen wurden angelegt, behandelt und mit Antikörpern für NPY (rot) und GAD65 (grün) markiert. Es wurden NPYerge Neurone in allen Kulturen gefunden. Mit Hilfe der Doppelmarkierungen war es möglich, Neurone auf ihre unterschiedliche Expression von NPY und GAD65 zu untersuchen. NPY und GAD65 wurden in Somata und Fortsätzen markiert. Bei den NPYergen Neuronen konnten GAD65-positive und GAD65-negative Neurone identifiziert werden (Abbildung 17). Es wurden Kollokalisierungen von NPY und GAD65 in Perikarya und Fortsätzen beobachtet (Abbildung 18). Bei NPYergen, nicht-GABAergen Neuronen wurden weder das Soma noch die Fortsätze mit GAD65 markiert sondern nur mit NPY (Abbildung 17 (Pfeile)).

Es wurden quantitative Auswertungen bei 6 Versuchen mit durchschnittlich 4 Deckgläschen pro Versuch und Region vorgenommen. Dazu wurden immer ganze Deckgläschen (113mm²) untersucht und alle NPYergen Neurone gezählt, unterschieden an ihrem Gehalt an GAD65.

Die Untersuchungen sind an Kulturen des gesamten Hippocampus und seiner Unterregionen Gyrus dentatus und der CA3A/CA3B-Region vorgenommen worden. Es gab GABAerge und nicht GABAerge NPY-positive Neurone in allen untersuchten Kulturen. Es gibt Unterschiede in der Verteilung der beiden Neuronenarten in den Kulturen. In der Hippocampus- und Gyrus dentatus-Kultur gibt es weniger nicht-GABAerge als GABAerge NPY-positive Neurone. Der Anteil GABAerger Neurone ist mit 84% in der Hippocampuskultur ($p=0,013$) dem der Gyrus dentatus-Kultur mit 93% ($p=0,037$) vergleichbar hoch, wobei sich die absoluten Neuronenzahlen nicht signifikant unterscheiden (Abbildung 19). In der CA3A/CA3B-Kultur sind GABAerge und nicht GABAerge NPY-positive Neurone gleich verteilt. Die absolute Anzahl GABAerger NPY-positiver Neurone in der CA3A/CA3B-Kultur ist signifikant niedriger gegenüber der, der Hippocampus- und Gyrus dentatus-Kultur (Hi. $p=0,045$; G. dent. $p=0,040$). Im Gegensatz dazu gibt es bei allen drei untersuchten Kulturen keine signifikanten Unterschiede in den Neuronenzahlen der nicht-GABAergen Neurone (Abbildung 19). Es wird deutlich, dass es trotz gleicher Zelldichte in den Kulturen unterschiedlich viele NPY-positive Neurone in den unterschiedlichen Regionen gibt.

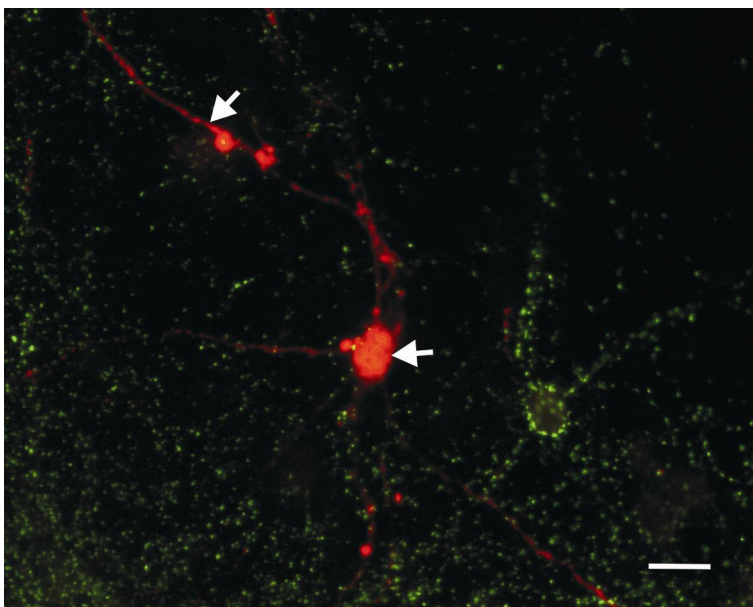


Abbildung 17: **NPY-positives, GAD65-negatives Neuron**

Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie, gefärbt gegen NPY (rot) und GAD65 (grün), 21 DIV. NPY-positives Perikaryon (Pfeil) und Fortsätze stellen sich als GAD65-negativ dar. Maßstab 20µm.

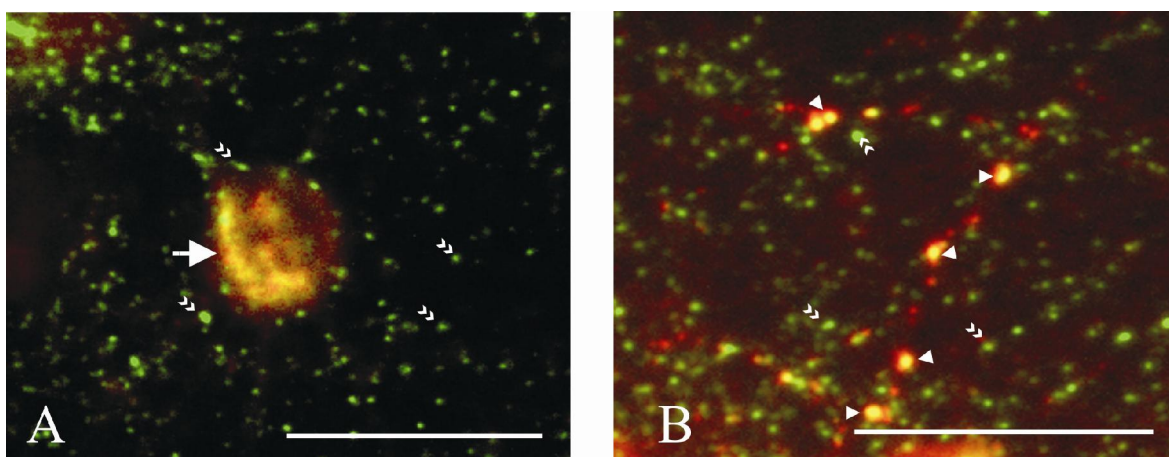


Abbildung 18: **NPY-positives, GAD65-positives Neuron und Fortsätze**

Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie, gefärbt gegen NPY (rot) und GAD65 (grün), 21 DIV. Fig. A: Kolokalisation (gelb) von NPY und GAD65 im Perikaryon (Pfeil) und ausschließlich GAD65-positiv Synapsen (Doppelpfeilspitzen), Fig. B: Kolokalisation von NPY und GAD65 (gelb) in mehreren Synapsen (Pfeilspitzen) und nur GAD65-positiv Synapsen (Doppelpfeilspitzen). Maßstab 20 µm.

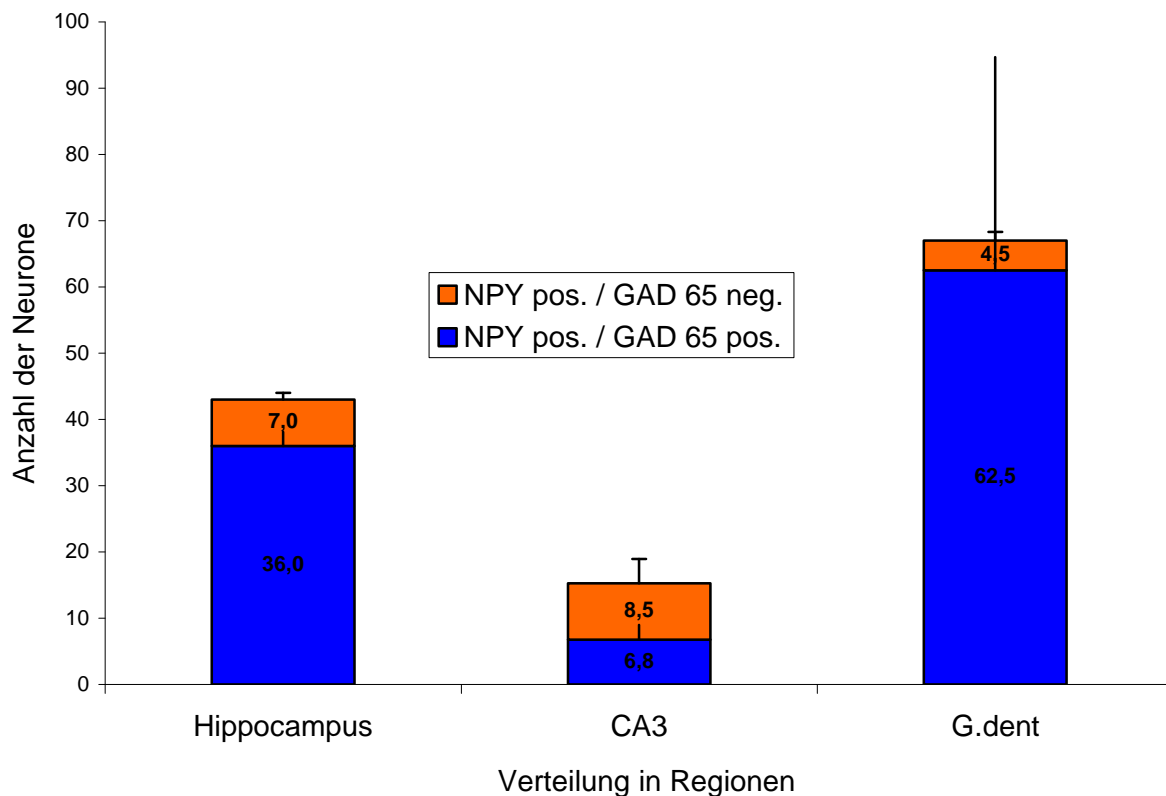


Abbildung 19: **Verteilung GABAerger Neurone in der NPY-Population unterschiedlicher Regionen des Hippocampus**

Mit der Doppelimmunfluoreszenz wurden Deckgläschen (113mm²) mit GAD65- und NPY-markierten Neuronen in Kulturen der CA3a/CA3b-Region, des Gyrus dentatus sowie des gesamten Hippocampus auf ihre Kolokalisation hin ausgezählt. Die Mehrzahl NPYerger Neurone stellt sich in der Hippocampus- und Gyrus dentatus-Kultur als GABAerg dar. Signifikanz $p < 0,05$ Student t-Test.

4.2.4 Verteilung somatostatinerger Neurone in situ und in der hippocampalen Zellkulturkultur

Somatostatinerge Neurone im Hippocampus der Maus

Das Vorkommen von somatostatinerger Neuronen wurde in situ an Schnitten fixierter Gehirne adulter Mäuse untersucht. Zur Feststellung der Immunreaktivität ist die DAB/Ni-Methode verwandt worden (siehe Methodenteil). Es wurde Somatostatin (SS) in Somata und sehr schwach in Fortsätzen beobachtet (Abbildung 20 D, E). Abbildung 20 A zeigt den Hippocampus in einer Übersicht, B eine Vergrößerung des G. dent. und Hilums. Im Gyrus

dentatus finden sich immunreaktive Zellkörper nur im Hilum (Abbildung 20 B, D). Im Stratum moleculare und seltener im Stratum granulosum waren nur Somatostatin-immunreaktive Fortsätze erkennbar. Somatostatin-positive Zellkörper wurden außerdem im Stratum radiatum, pyramidale und oriens der CA3-Region beobachtet (Abbildung 20 C, E).

Somatostatinerge Neurone in der Kultur

Es wurden Primärkulturen des Hippocampus von 17 Tage alten Mäuseföten mit einer Zelldichte von $1 \times 10^5 / \text{cm}^2$ angelegt und für 21 Tage kultiviert (21 DIV). Die Kulturen wurden für die Fluoreszenzmikroskopie immunzytochemisch mit Antikörpern für GAD65 (grün) und Somatostatin (rot) markiert. Die Neurone wurden auf ihre unterschiedliche Exprimierung der beiden Neurotransmitter untersucht. Es wurden GAD65-positive Neurone gefunden, die nicht für SS gefärbt waren, und GAD65-positive Neurone, die SS-positiv waren. Das heißt, es wurde immunhistochemisch eine somatostatinerge Neuronenpopulationen identifiziert. Alle somatostatinergen Neurone in der Kultur sind GABAerg (Abbildung 22, Abbildung 21 (Pfeile)). Es konnten auch SS-markierte Fortsätze beobachtet werden. Im Gegensatz zur in situ Situation waren sie häufiger zurückverfolgbar und stellenweise mit GAD65 kolokalisiert wie in Abbildung 21 (Pfeile).

Diese Population wurde quantitativ in der gesamten Kultur des Hippocampus untersucht. Die Auswertungen wurden bei 3 Versuchen mit durchschnittlich 2 Deckgläschen pro Versuch vorgenommen. Dazu wurden immer ganze Deckgläschen (113mm^2) untersucht und alle SSergen Neurone gezählt.

Jedes SS-positive Neuron wurde auf eine etwaige Kolokalisation mit GAD65 untersucht und gezählt. Alle somatostatinergen Neurone waren GABAerg, es wurde deshalb nur der gesamte Hippocampus in der Kultur ausgewertet.

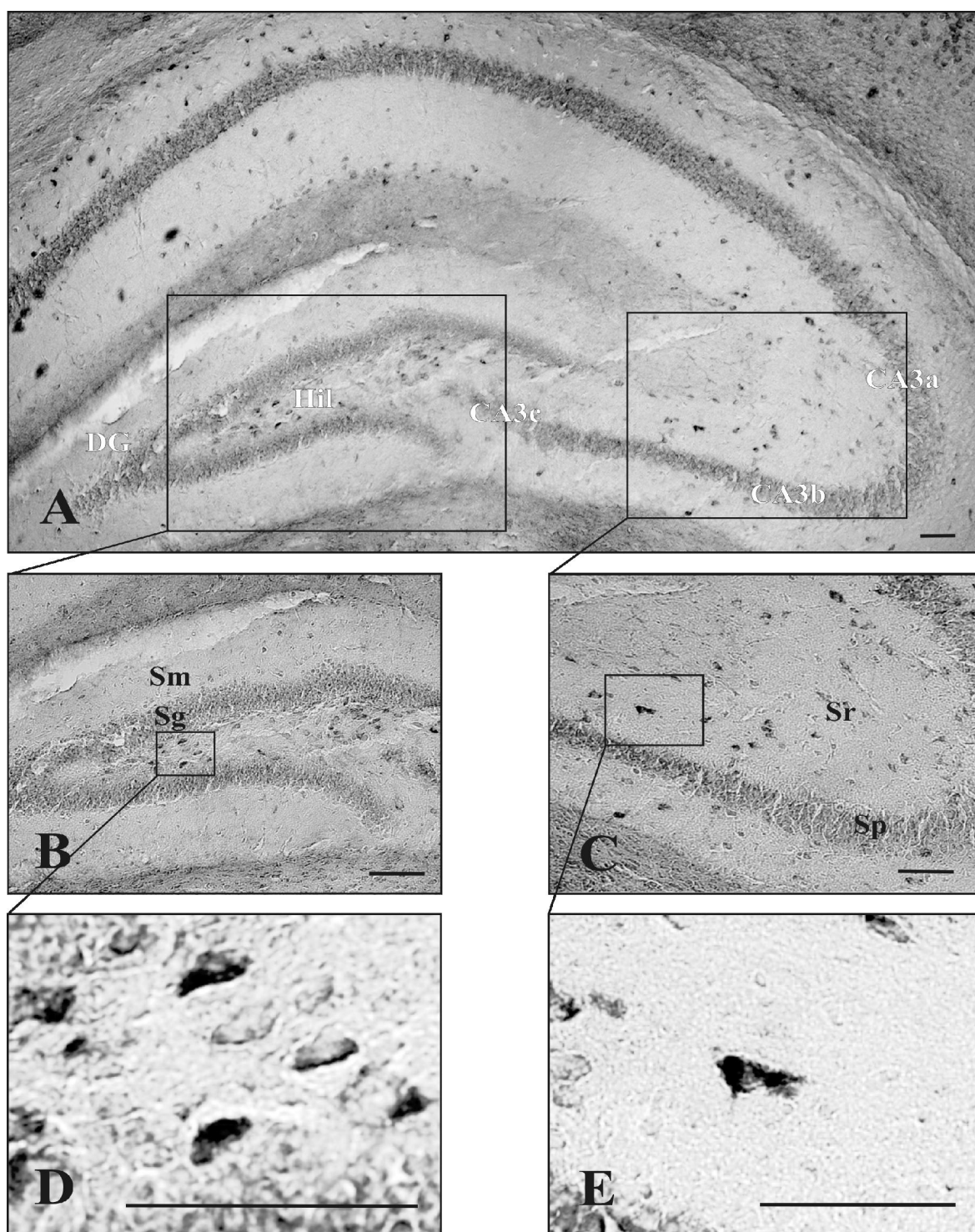


Abbildung 20: Lokalisation von Somatostatin (Schnitt adulter Mäusehippocampus)

DAB/Ni-Technik für Somatostatin (SS). 40µm dicker coronaler Schnitt einer adulten Maus. Fig. A zeigt die Hippocampusregion in einer Übersicht. Immunreaktivität ist außer in den Somata nur sehr schwach im Stratum pyramidale (Sp) und Stratum granulosum (Sg) jeweils als Fasermarkierung zu erkennen. Die SSerge Neurone liegen hauptsächlich im Hilum (Hil) und Stratum radiatum (Sr). In Fig. B ist der Gyrus dentatus (DG) gesondert dargestellt. Fig. C ist eine Ausschnittsvergrößerung der CA3-Region. Fig. D zeigt SS-positive Neurone im Hilum (Hil). Fig. E: Im Stratum radiatum (Sr) sind SSerge Somata zu erkennen. Maßstab 100µm.

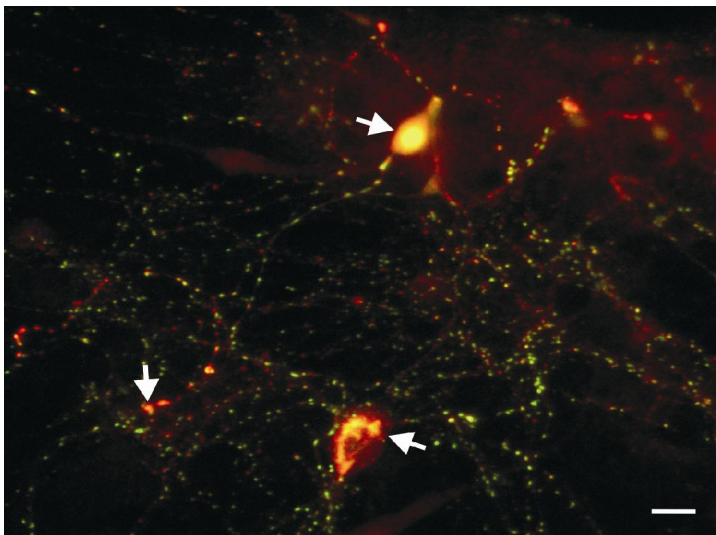


Abbildung 21: **Übersichtsaufnahme einer gegen Somatostatin und GAD65 gefärbten Kultur**

Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie, gegen Somatostatin und GAD65 gefärbt, 21 DIV. Kolokalisationen von Somatostatin und GAD65 liegen in Perikarya und Präsynapsen vor (Pfeile). Maßstab 20 μm .

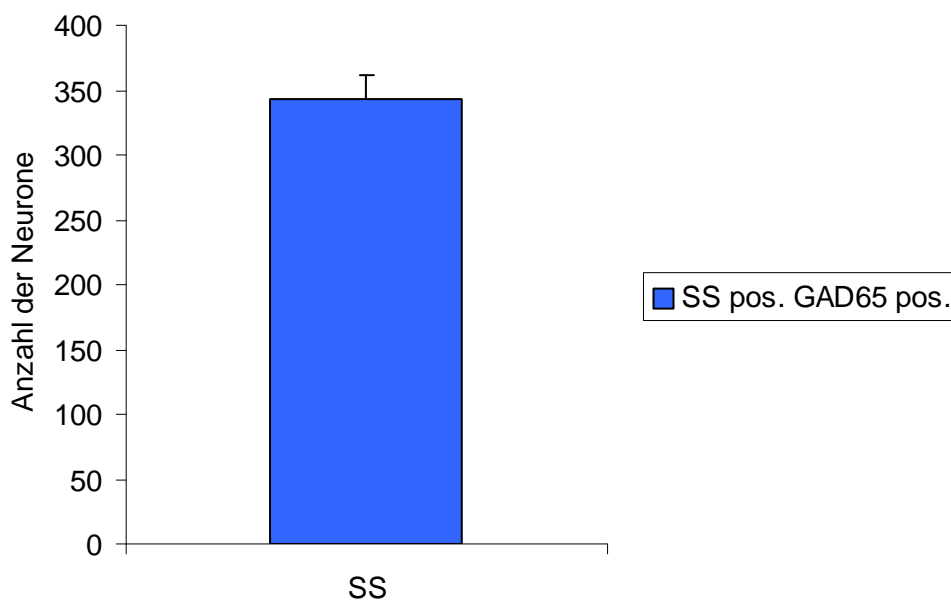


Abbildung 22: **GABAerge Neurone in der Somatostatin-Population des Hippocampus**

Unter Zuhilfenahme der Doppelimmunfluoreszenz wurden ganze Deckgläschen mit α -GAD65 und α -Somatostatin markierten Neuronen auf ihre Kolokalisation hin untersucht und ausgezählt. Alle somatostatineren Neurone sind als GABAerg identifiziert worden. 6 Versuche 4 Deckgläschen

4.3 Auswirkungen veränderter Parameter auf Neurone in situ und Kultur

4.3.1 Verhalten calbindinhaltiger Neurone in gekindelten Ratten

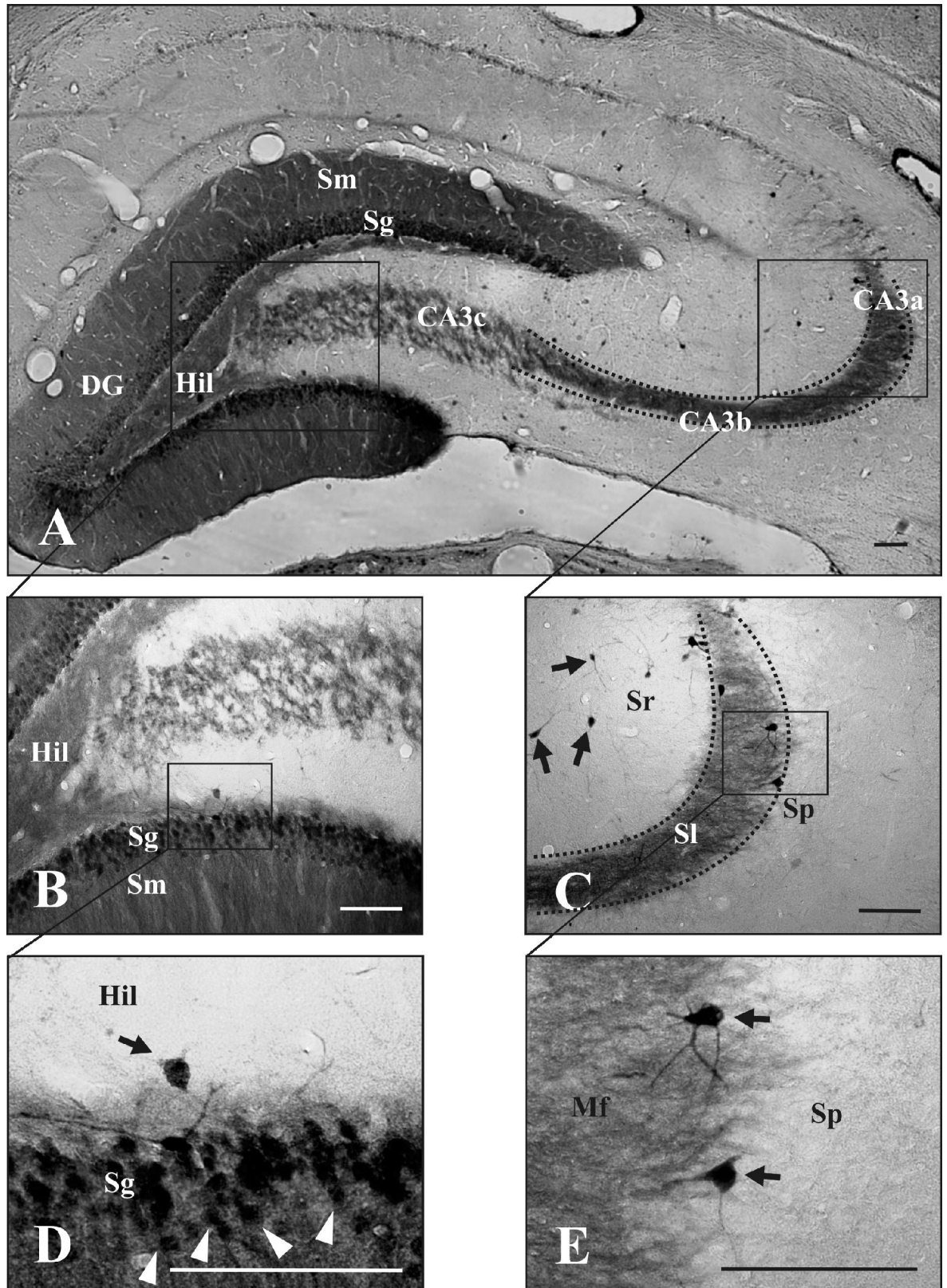


Abbildung 23: Lokalisation von Calbindin (Schnitt: adulter Rattenhippocampus)

DAB/Ni-Technik für Calbindin, 40µm dicker coronaler Schnitt. Fig. A: Hippocampusregion in einer

Übersicht. Der Gyrus dentatus (DG) mit seinen Schichten, dem Stratum moleculare (Sm), granulosum (Sg) und dem Hilum (Hil), ist stark für Calbindin gefärbt. Der Moosfasertrakt (gestrichelte Linien) ist ebenso immunreaktiv. Fig. B zeigt einen Ausschnitt des Gyrus dentatus. Während im Str. moleculare Immunreaktivität vorwiegend in Fortsätzen zu erkennen ist, sind im Str. granulosum auch Perikarya markiert. Fig. D zeigt ein Calbindin-positives Interneuron im Hilum (Hil, Pfeil) des Gyrus dentatus. Im Str. granulosum ist gut zu erkennen, dass jede Körnerzelle für Calbindin immunreaktiv ist (exemplarisch Pfeilspitzen). Fig. C ist eine Ausschnittsvergrößerung der CA3-Region. Gut zu erkennen ist der immunreaktive Moosfasertrakt (gestrichelte Linien) im Str. lucidum (Sl) über dem Str. pyramidale (Sp). Im Str. radiatum sind Calbindin-positive Interneurone zu erkennen (Pfeile). Fig. E: Im Str. lucidum sind nur Interneurone (Pfeile) Calbindin-positiv. Der Moosfasertrakt (Mf), der von den Axonen der Körnerzellen gebildet wird, ist gut zu erkennen. Maßstab 100µm.

Kontrolltiere

Die Abbildung 23 zeigt die Verteilung calbindinerner Neurone in situ adulter Rattenhippocampi. Dargestellt wurden die Neurone mit Hilfe der DAB/Ni-Technik an 40µm dicken coronalen Schnitten. Gut zu erkennen ist die typische, kräftige Markierung des Gyrus dentatus (DG) und des Moosfasertraktes durch calbindinerge Fortsätze und Perikarya der Körnerzellen (Abbildung 23 A). Im Stratum granulosum (Sg) sind die Somata der Körnerzellen zu erkennen (Abbildung 23 B, D Pfeile). Das gefärbte Stratum moleculare (Sm) stellt die Dendriten der Körnerzellen dar (Abbildung 23 B, D Pfeilköpfe). Die Axone der Körnerzellen stellen den Hauptanteil der für die Färbung des Hilums und Moosfasertraktes. Es wurden auch Neurone gefunden, bei denen eine klare morphologische Identifikation nicht möglich war. Sie befanden sich hauptsächlich im Stratum radiatum und pyramidale (Sr, Sp) der CA3-Region (Abbildung 23 C). Besser noch als bei den Körnerzellen waren bei diesen Neuronen die Abgänge der Fortsätze gut zu erkennen und, soweit in der Schnittebene liegend, gut verfolgbar (Abbildung 23 E).

Gekindelte Tiere

Die Schnitte der gekindelten Tiere wurden gleich denen der Kontrolltiere behandelt. Im Vergleich zur Kontrolle fällt sofort die sehr schwach bis gar nicht ausgeprägte Färbung des Gyrus dentatus (DG) und Moosfasertraktes auf (Abbildung 24 A). Im Stratum granulosum (Sg) stellen sich die Somata der Körnerzellen nur als Umriss dar. Man würde es nicht als spezifische Immunreaktion bezeichnen. Fortsätze sind nicht zu erkennen. Auch das Stratum moleculare (Sm) ist frei von Immunreaktivität. Vereinzelt stellen sich wie in der Kontrolle (Abbildung 23 D) im Hilum immunreaktive Perikarya mit Fortsätzen dar (Abbildung 24 D). Auch im Stratum radiatum und pyramidale (Sr, Sp) sind spezifisch calbindinerge Neurone wie in der Kontrolle vorhanden und die Fortsätze sind ebenfalls gut

zu erkennen (Abbildung 23 C, E; Abbildung 24 C, E). Diese Eindeutigkeit der Markierung zeigt, dass es sich bei den beschriebenen Unterschieden nicht um einen Methodenfehler handeln kann.

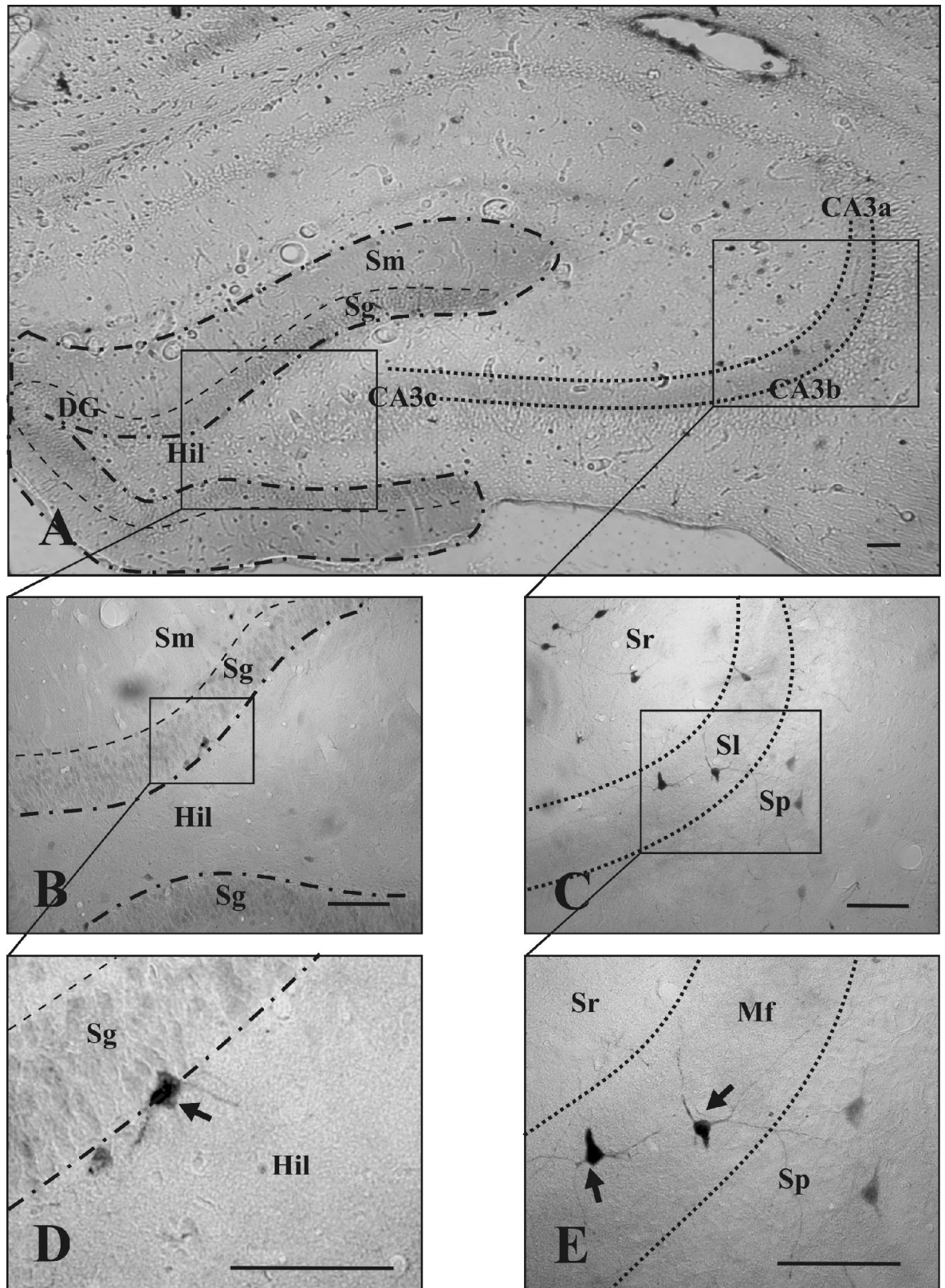


Abbildung 24: Lokalisation von Calbindin (Schnitt Hippocampus gekindelter Ratten)

DAB/Ni-Technik für Calbindin, 40µm dicker coronaler Schnitt einer adulten gekindelten Ratte. Fig. A Hippocampusregion in einer Übersicht. Es ist keine Immunreaktivität in den für Calbindin typischen immunreaktiven Faserschichten des Gyrus dentatus (DG) mit seinen Schichten, dem Stratum moleculare (Sm), granulosum (Sg) und dem Hilum (Hil), zu erkennen. Der Moosfasertrakt (gestrichelte Linien) ist nicht immunreaktiv. Fig. B zeigt eine Ausschnittsvergrößerung des Gyrus dentatus. Str. granulosum, Str. moleculare und das Hilum zeigen keine typische Immunreaktivität der Körnerzellen. Fig. D zeigt ein Calbindin-positives Interneuron (Pfeil) an der Grenze von Hilum zum Str. granulosum des Gyrus dentatus. Fig. C ist eine Ausschnittsvergrößerung der CA3-Region. Eine Abgrenzung des Moosfasertraktes im Str. lucidum (Sl, gestrichelte Linien) ist nicht möglich. Calbindin-positive Interneurone sind im Str. radiatum (Sr), im Str. lucidum (Sl) und Str. pyramidale (Sp) zu finden. Fig. E: Interneurone sind mit ihren Fortsätzen stark markiert (Pfeile). Maßstab 100µm.

4.3.2 Verhalten NPYerger Neurone in gekindelten Ratten

Kontrolltiere

Für die vergleichende Untersuchung NPYerger Neurone im Hippocampus wurde die DAB/Ni-Technik an 40µm dicken coronalen Schnitten adulter Ratten benutzt. Entsprechende Perikarya und Fortsätze zeigten eine spezifische Immunreaktion. Die Neuronendichte war im Hilum (Hil) (Abbildung 25 A, B, D) und der CA3c-Region am höchsten, während es im Stratum moleculare (Sm), Stratum granulosum (Sg) und Stratum radiatum (Sr) kaum NPY-positive Neurone gab (Abbildung 25 A, C, E). Im Stratum pyramidale gab es nur vereinzelt NPY-positive Zellen (Abbildung 25 C, E).

Gekindelte Tiere

Die Schnitte der gekindelten Tiere wurden gleich denen der Kontrolltiere behandelt. Wie in der Kontrolle wurden Zellkörper und Fortsätze markiert. Im Gegensatz zur Kontrolle fiel eine diffuse Färbung des Moosfasertraktes auf (Abbildung 26 A).

NPY-positive Neurone liegen in allen Schichten des Hippocampus (Abbildung 26). Um Unterschiede zwischen Kontroll- und gekindelten Tieren zu quantifizieren, wurden die in den Schnitten markierten Neurone gezählt. Es wurde dabei zwischen Gyrus dentatus und der CA3-Region unterschieden und diese getrennt quantifiziert (Abbildung 29). Es wurden dabei jeweils 8 Schnitte blind ausgewertet. Wie schon an den Schnitten ersichtlich, verdoppelte sich die NPY-positive Neuronendichte in der CA3-Region, während sie sich in der Gyrus dentatus -Region um ein Drittel reduzierte. Diese Ergebnisse waren signifikant

(p-Wert <0,05).

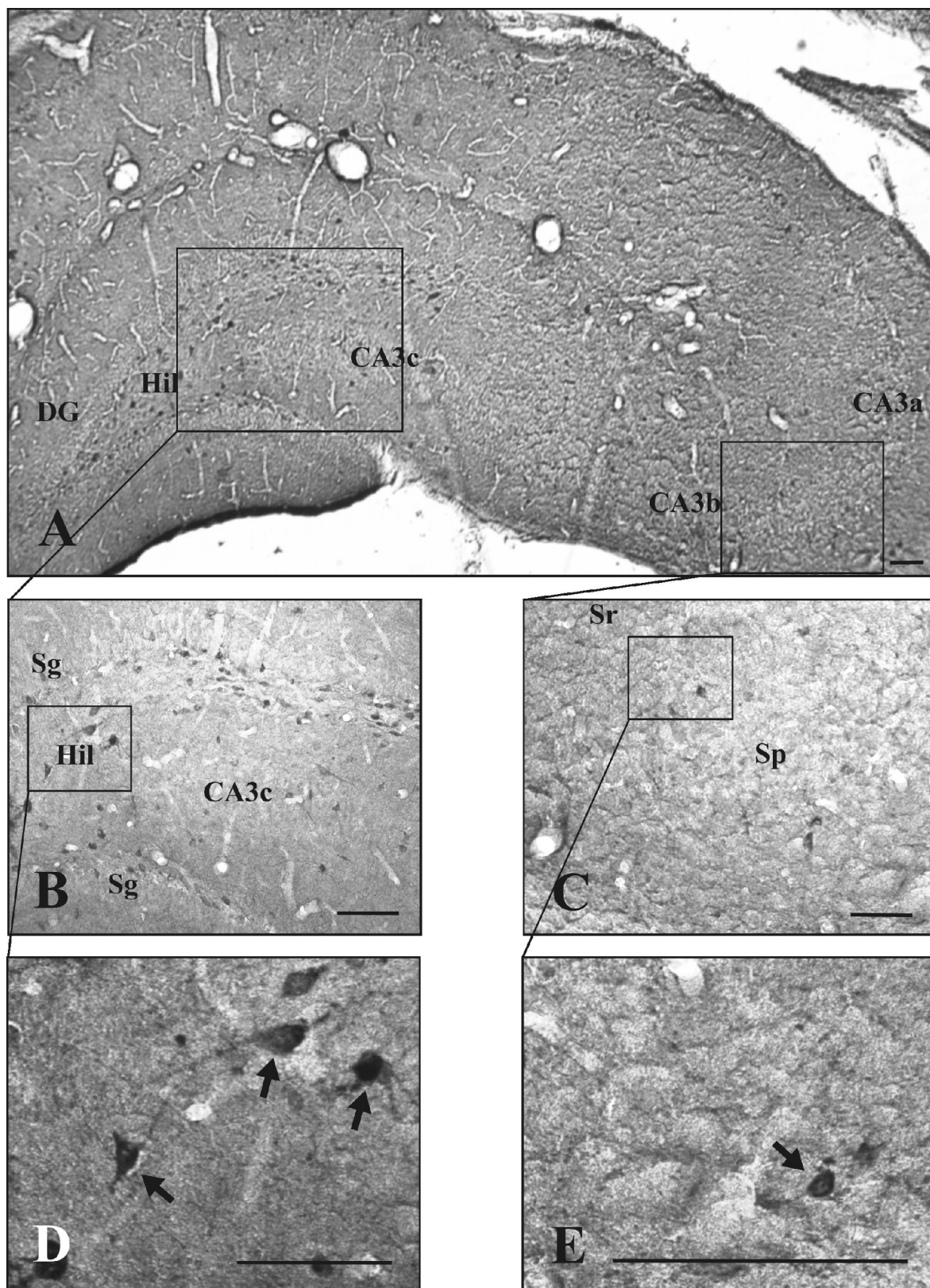


Abbildung 25: Lokalisation von NPY (Schnitt: adulter Rattenhippocampus)

DAB/Ni-Technik für NPY, 40µm dicker coronaler Schnitt einer adulten Ratte. Fig. A Hippocampusregion in einer Übersicht. Fig. B zeigt den Gyrus dentatus gesondert, immunreaktive Neurone befinden sich hauptsächlich im Hilum (Hil). Körnerzellen im Str. granulosum sind nicht NPY-positiv. Fig. D zeigt drei

NPY-positive Interneurone des Hilums mit ihren somatanahen Fortsätzen (Pfeile). Fig. C ist eine Ausschnittsvergrößerung der CA3-Region, mit Str. pyramidale (Sp) und Str. radiatum (Sr), in denen vereinzelt NPY-positive Neurone liegen. Fig. E zeigt ein NPY-positives Interneuron im Stratum radiatum (Pfeil). Maßstab 100µm.

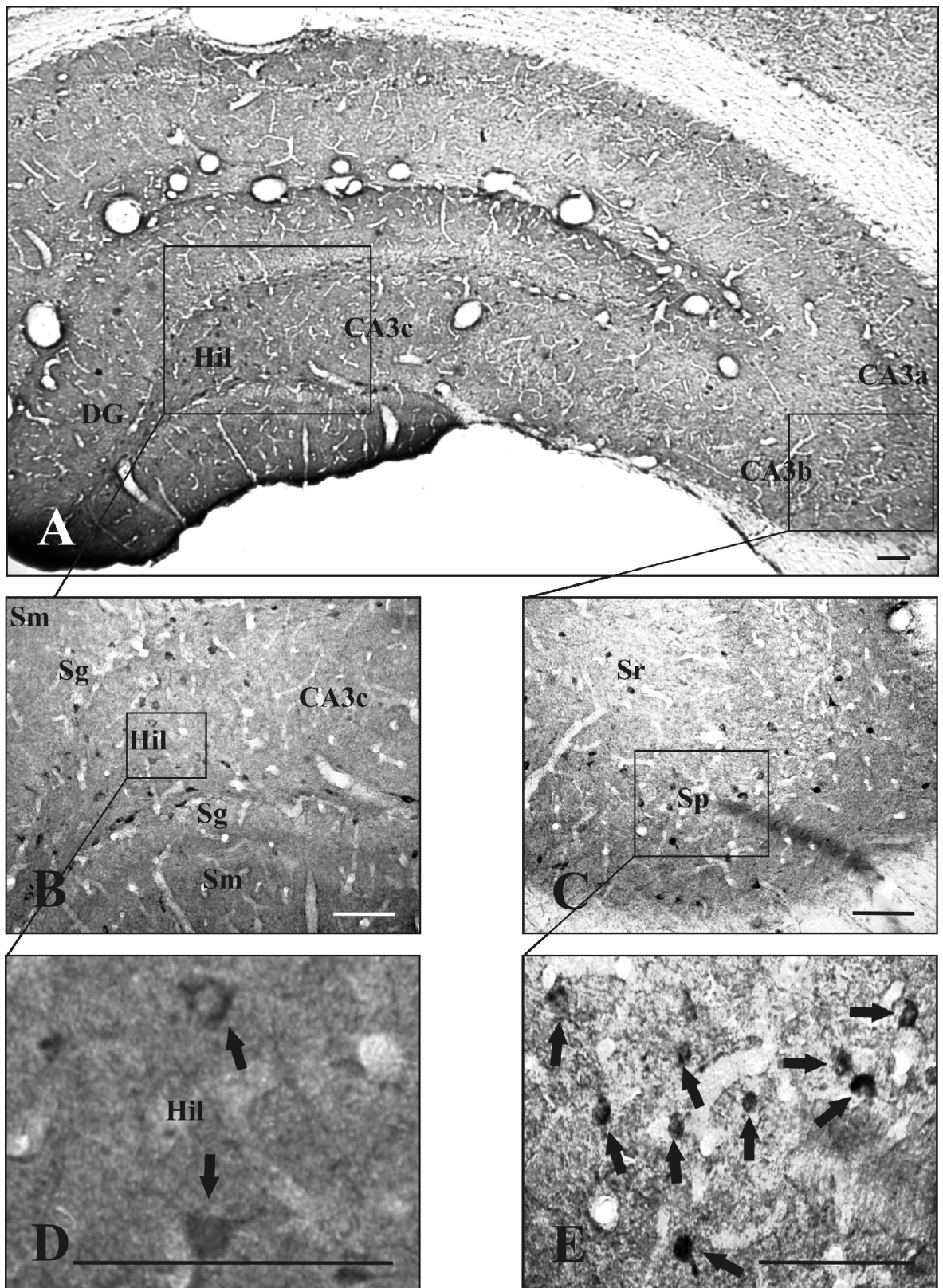


Abbildung 26: Lokalisation von NPY (Schnitt Hippocampus gekindelter Ratten)

DAB/Ni-Technik für NPY, 40µm dicker coronaler Schnitt einer adulten gekindelten Ratte. Fig. A Die Hippocampusregion in einer Übersicht zeigt im Bereich der Beschriftung CA3a eine diffuse Markierung des Moosfasertraktes. Fig. B zeigt den Gyrus dentatus gesondert, immunreaktive Neurone befinden sich hauptsächlich im Hilum (Hil). Körnerzellen im Str. granulosum sind nicht NPY-positiv. Fig. D zeigt zwei NPY-positive Interneurone des Hilums (Pfeile). Fig. C ist eine Ausschnittsvergrößerung der CA3-Region, mit Str. pyramidale (Sp) und Str. radiatum (Sr), in denen viele NPY-positive Neurone liegen. Fig. E zeigt eine große Anzahl NPY-positiver Neurone im Stratum pyramidale (Pfeile). Maßstab 100µm.

4.3.3 Verhalten somatostatinerger Neurone in gekindelten Ratten

Kontrolltiere

Das Vorkommen von somatostatinerger Neuronen wurde in situ an Schnitten fixierter Gehirne adulter Ratten untersucht. Zur Feststellung der Immunreaktivität ist die DAB/Ni-Methode verwendet worden (siehe Methodenteil). Es wurde Somatostatin (SS) in den Somata und sehr schwach in Fortsätzen beobachtet (Abbildung 27 D, E). Abbildung 27 A zeigt den Hippocampus in einer Übersicht, B eine Vergrößerung des G. dent. und Hilums. Im Gyrus dentatus finden sich immunreaktive Zellkörper nur im Hilum (Abbildung 27 B, D). Im Stratum moleculare und seltener granulosum waren nur Somatostatin-immunreaktive Fortsätze erkennbar. Somatostatin-positive Zellkörper wurden außerdem in den Strata radiatum, pyramidale und lacunosum der CA3-Region beobachtet (Abbildung 27 C, E).

Gekindelte Tiere

Die Schnitte der gekindelten Tiere wurden gleich denen der Kontrolltiere behandelt. Wie in der Kontrolle wurden Zellkörper und Fortsätze markiert. Somatostatinerger Neurone liegen in allen Schichten des Hippocampus (Abbildung 28). Um eventuelle Unterschiede zwischen Kontroll- und gekindelten Tieren zu quantifizieren, wurden die in den Schnitten markierten Neurone gezählt. Es wurde dabei zwischen Gyrus dentatus und der CA3-Region unterschieden und diese getrennt quantifiziert (Abbildung 29). Es wurden dabei jeweils 8 Schnitte blind ausgewertet. Im Gegensatz zur NPY-Markierung veränderte sich das Verhältnis somatostatinerger Neurone zwischen gekindelten Tieren und der Kontrollgruppe weder im Gyrus dentatus noch in der CA3-Region signifikant. Während somatostatinerger Neurone in der CA3-Region abnahmen (p-Wert 0,52 Student t-Test) erhöhte sich ihre Anzahl im Gyrus dentatus (p-Wert 0,48 Student t-Test).

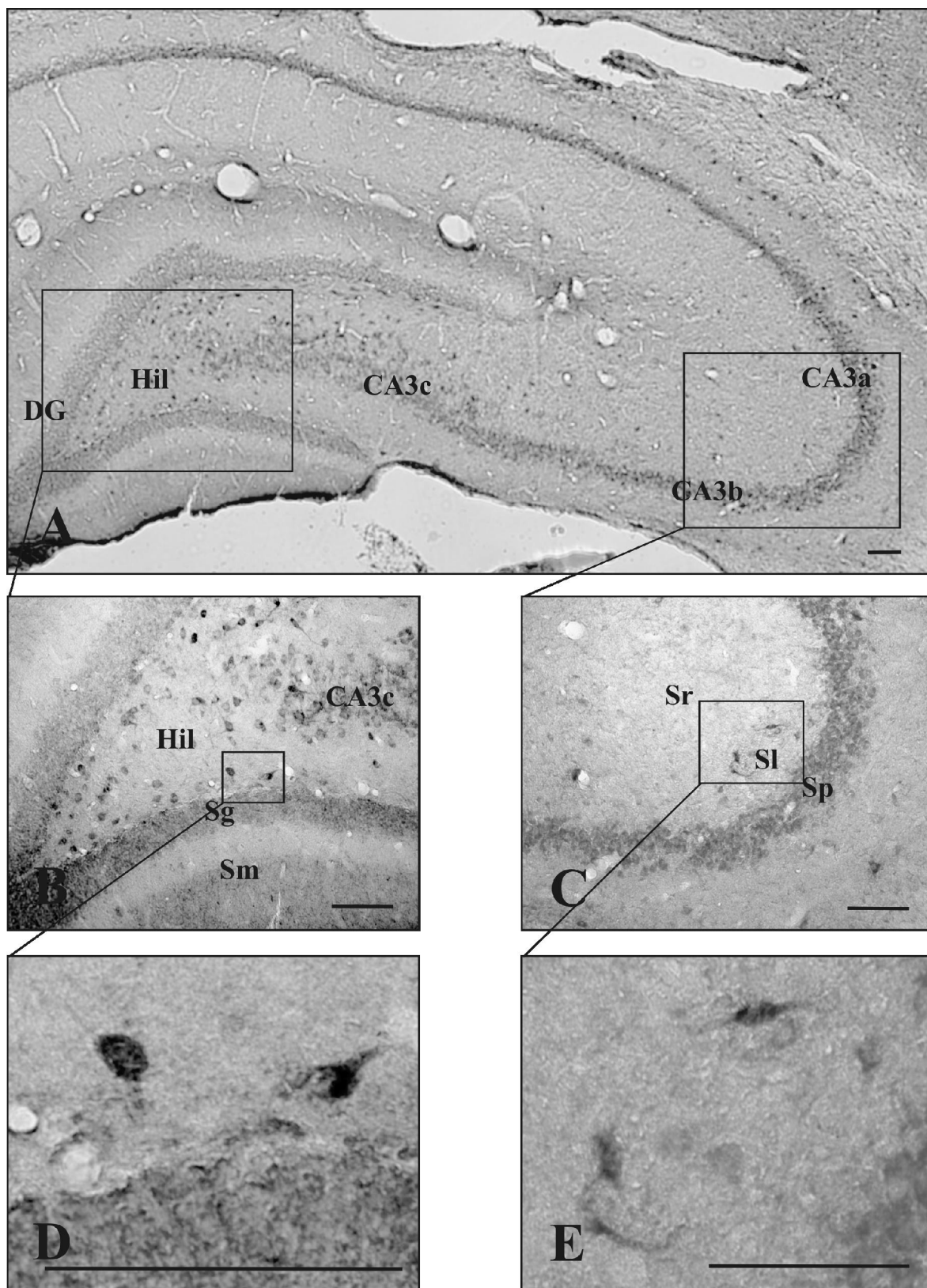


Abbildung 27: Lokalisation von Somatostatin (Schnitt adulter Rattenhippocampus)

DAB/Ni-Technik für Somatostatin (SS). 40µm dicker coronaler Schnitt einer adulten Ratte. Fig. A zeigt die Hippocampusregion in einer Übersicht. Immunreaktivität ist außer in den Somata nur sehr schwach im Stratum pyramidale (Sp) und Stratum granulosum (Sg) zu erkennen. Die SSergen Neurone liegen

hauptsächlich im Hilum (Hil) und Stratum radiatum (Sr). In Fig. B ist der Gyrus dentatus (DG) gesondert dargestellt. Fig. C ist eine Ausschnittsvergrößerung der CA3-Region. Fig. D zeigt SS-positive Neurone im Hilum (Hil). Fig. E: Im Stratum lucidum (Sl) sind SSerge Somata zu erkennen. Maßstab 100µm.

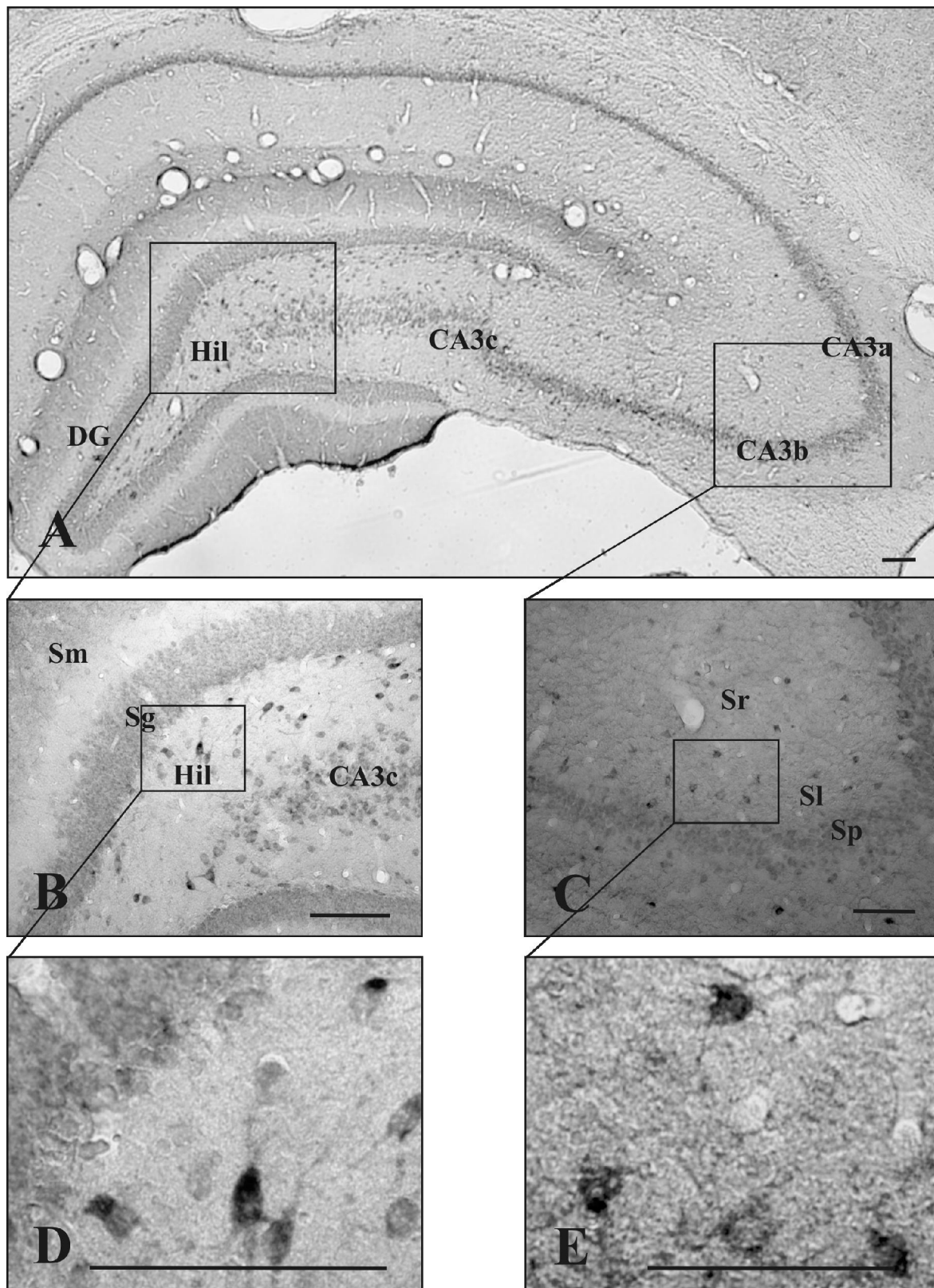


Abbildung 28: Lokalisation von Somatostatin (Schnitt: Hippocampus gekindelter Ratten)

DAB/Ni-Technik für Somatostatin (SS). 40µm dicker coronaler Schnitt einer adulten gekindelten Ratte. Fig. A zeigt die Hippocampusregion in einer Übersicht. Immunreaktivität ist außer in den Somata nur sehr schwach im Stratum pyramidale (Sp) und Stratum granulosum (Sg) zu erkennen. Die SSergen Neurone liegen hauptsächlich im Hilum (Hil) und Stratum radiatum (Sr) sowie vereinzelt im Stratum lucidum. In Fig. B ist der Gyrus dentatus (DG) gesondert dargestellt. Fig. C ist eine Ausschnittsvergrößerung der CA3-Region. Fig. D zeigt SS-positive Neurone im Hilum (Hil). Fig. E: Im Stratum lacunosum (Sl) sind SSerge Somata zu erkennen. Maßstab 100µm.

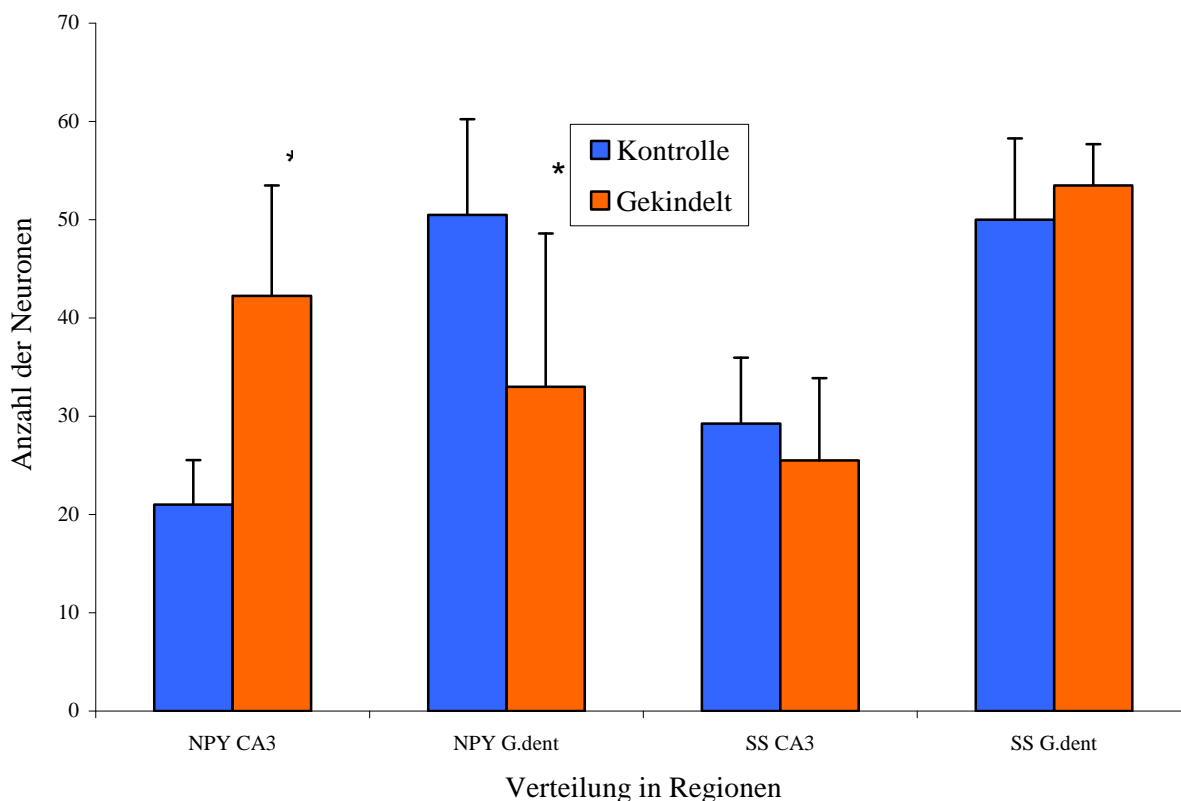


Abbildung 29: **Verteilung NPYerger und SSerger Neurone in Regionen des Hippocampus gekindelter Ratten und Kontrolltieren**

Es wurden jeweils 8 Schnitte des Hippocampus gegen NPY oder Somatostatin gefärbt. Die Schnittdicke betrug 40µm. Es wurden Schnitte von Kontrolltieren und gekindelten Tieren verwendet. Unterschieden nach den Regionen Gyrus dentatus inklusive Hilum sowie CA3-Region sind immunreaktive Neurone verblindet gezählt worden. Die ausgezählten Rechtecke waren jeweils 100µm x 100µm groß. Die Veränderungen bei NPY waren nach Student t-Test signifikant (p -Wert < 0,05). Bei Somatostatin waren die gezählten Unterschiede nicht signifikant.

4.3.4 Deltamethrin und Neuronensubtypen in der Kultur

Hippocampale Neurone wurden bis DIV 17 kultiviert. Um die Effekte von Deltamethrin zu messen, wurden außer der Kontrollgruppe, den Kulturen ab DIV 6 zweimal wöchentlich Konzentrationen von 2nM – 200nM an Deltamethrin gegeben. Nach der Fixierung sind die Kulturen mit Antikörpern gegen Calbindin, Neuropeptid Y und Somatostatin gefärbt worden. Es sind immunreaktive Neurone auf den gesamten Deckgläschen von jeweils 113mm² Fläche ausgezählt worden. Von Calbindin und Neuropeptid Y wurden für jede Gruppe drei Deckgläschen untersucht. Bei Somatostatin wurden für die Kontrollgruppe neun Deckgläschen ausgezählt.

Deltamethringaben beeinflussten die Expression unserer unterschiedlichen Marker nicht einheitlich.

Calbindin wird von Körnerzellen, Pyramidenzellen und Interneuronen exprimiert. Unter Deltamethringabe reduzierte sich die Expression von Calbindin in Körnerzellen signifikant, während Interneurone unverändert blieben (Abbildung 30 A, B). Eine signifikante Abnahme der Neuronendichte um ca. 70% (2nM DM) war bei Calbindin (p-Wert <0.0002 für 2nM DM und <0.002 für 200nM DM) festzustellen.

Somatostatin als Marker von Interneuronen veränderte unter unterschiedlichen Deltamethrinkonzentrationen die Intensität des Signals trotz scheinbar unveränderter Morphologie (Abbildung 30 B, C), während nahezu unabhängig von den eingesetzten Konzentrationen die Anzahl somatostatinerger Neurone sich signifikant (p-Wert <0.002 bei 20nM DM und <0.001 für 200nM DM) um ca. 60% reduzierte (Abbildung 31).

Neuropeptid Y-Markierungen zeigten ein komplett unterschiedliches Verhalten. In Abbildung 30 (E, F) wird exemplarisch die verstärkte Zeichnung von NPY-positiven Zellen und Fortsätzen unter Deltamethringabe demonstriert. Ebenfalls nahm die Neuropeptid Y-Population um das ca. 2,8fache zu (p-Wert <0.005 bei 2nM DM und <0.02 für 200nM DM) (Abbildung 31). Der Unterschied der Neuronendichte bei SS und NPY war unabhängig von den eingesetzten Konzentrationen des Deltamethrins.

Die Abbildung 31 (DM) zeigt das unterschiedliche Verhalten der Neuronensubtypen auf Deltamethringabe. Eine signifikante Abnahme der Calbindin- und Somatostatin-haltigen Neurone war bei Calbindin (p-Wert <0.0002 für 2nM DM und <0.002 für 200nM DM) und Somatostatin (p-Wert <0.002 bei 20nM DM und <0.001 für 200nM DM) festzustellen. Während sich calbindinerge Neurone auf 30% reduzierten (2nM), waren es bei

Somatostatin 40% (20nM). Im Gegensatz dazu nahm die Neuropeptid Y-Population um das ca. 2,8fache zu (p-Wert <0.005 bei 2nM DM und <0.02 für 200nM DM). Bemerkenswert ist, dass der Unterschied der Neuronendichte bei SS und NPY unabhängig von den eingesetzten Konzentrationen des Deltamethrins war.

Es zeigte sich eine unterschiedliche Empfindlichkeit und Reaktion von Calbindin-, Somatostatin- und NPY-exprimierenden Neuronensubtypen auf Deltamethrin.

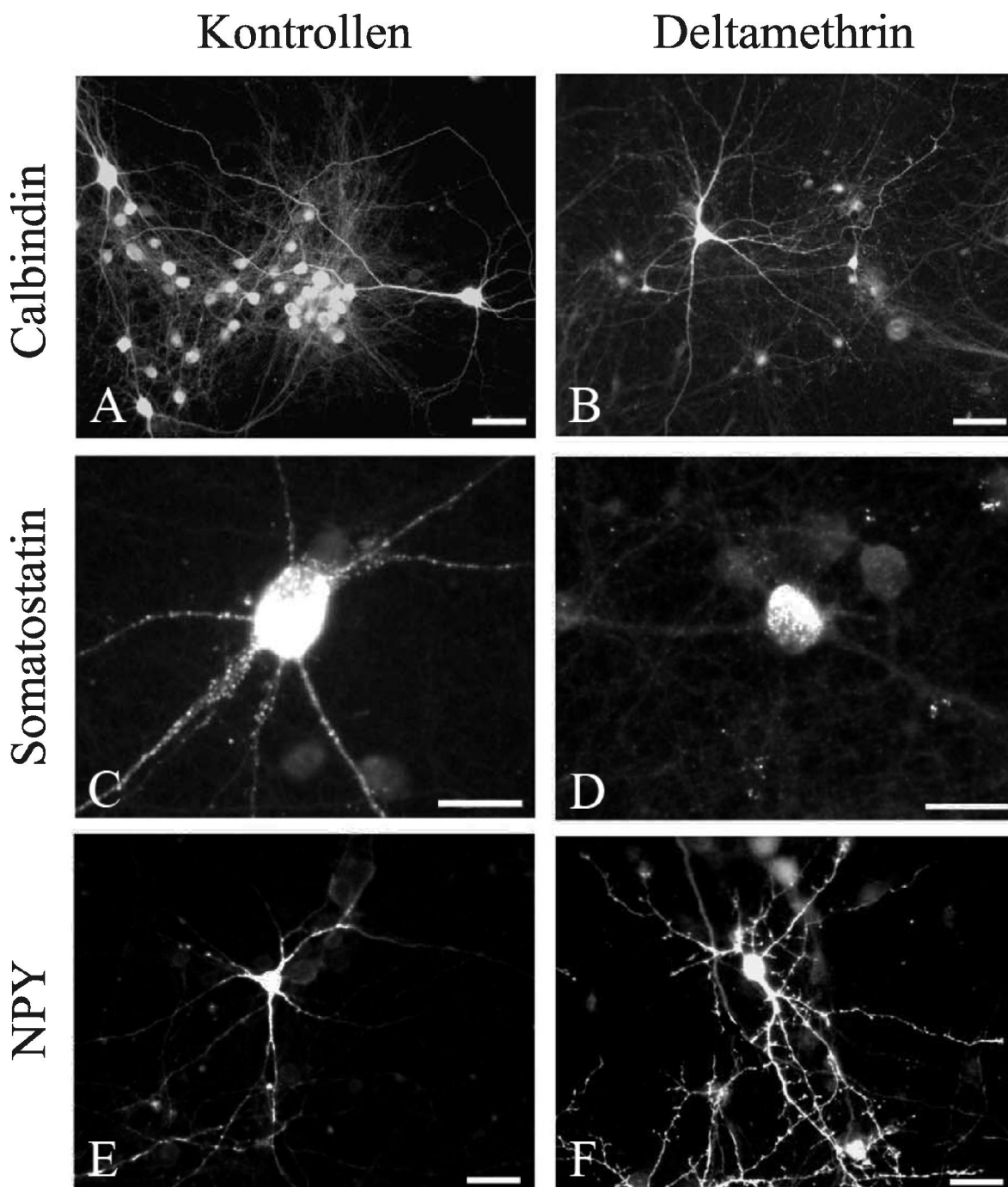


Abbildung 30: **Auswirkungen von Deltamethrin auf unterschiedliche Neuronenpopulationen des Hippocampus (vorab veröffentlicht in Grosse, Thiele et al., 2002)**

Hippocampale Neurone wurden bis DIV 17 kultiviert und außer in der Kontrollgruppe (A, C, E) ab DIV 6 zweimal wöchentlich mit 200nM Deltamethrin behandelt (B, D, F). Die Neurone wurden mit Antikörpern gegen Calbindin (A, B); Somatostatin (B, C) und NPY (E, F) markiert. Die Deltamethrinbehandlung verringerte signifikant die Calbindinexpression in Körnerzellen aber nicht in Interneuronen. Somatostatinerge Neurone wurden signifikant weniger. NPY-positive Neurone zeigten eine vermehrte Zeichnung ihrer Fortsätze. Maßstab 20µm Somatostatin, 40µm NPY und Calbindin

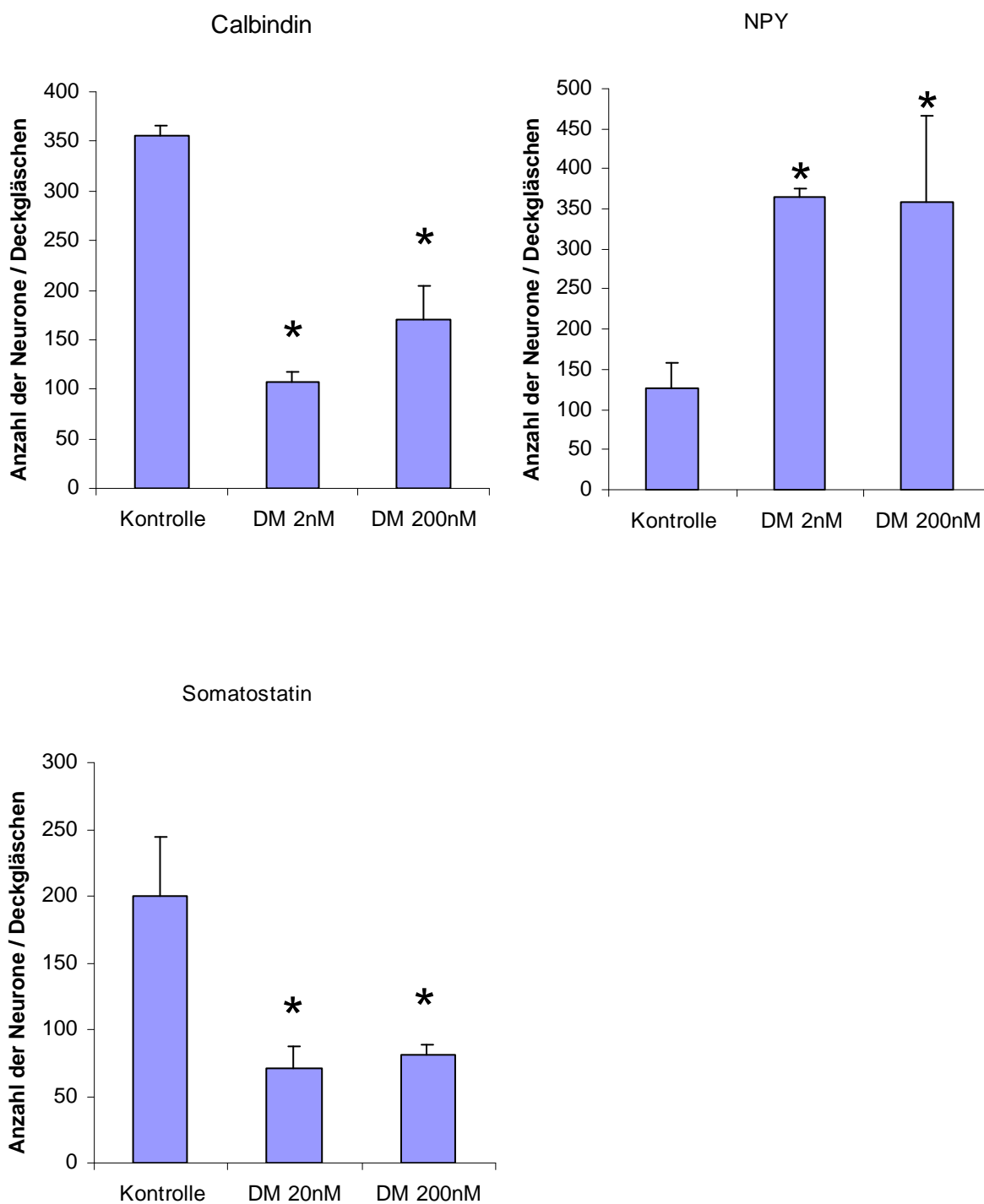


Abbildung 31: **Auswirkungen von Deltamethrin auf Neuronensubtypen des Hippocampus in der Kultur (vorab veröffentlicht in Grosse, Thiele et al., 2002)**

Hippocampale Neurone wurden bis DIV 17 kultiviert. Außer in der Kontrolle wurde zweimal pro Woche ab DIV 6 die angegebene Konzentration an Deltamethrin verabreicht. Die Neurone wurden fixiert und gegen Calbindin, Somatostatin und NPY fluoreszenzmarkiert. Die immunreaktiven Neurone wurden jeweils auf

drei verschiedenen Deckgläschen (113 cm²) ausgezählt, im Falle Somatostatins auf neun. Das Signifikanzniveau wurde mit dem Student t-Test überprüft ($p < 0,002$).

4.3.5 Deltamethrin und Synapsenverteilung in der Kultur

Hippocampale Neurone wurden bis DIV 17 kultiviert. Um die Effekte von Deltamethrin zu messen, wurden außer der Kontrollgruppe den Kulturen ab DIV 6 zweimal wöchentlich 200nM Deltamethrin gegeben. Nach der Fixierung sind die Kulturen mit Antikörpern gegen Synapsin und Neurofilament Protein 200kD (NFP200) gefärbt worden. Die Untersuchungen wurden mit Hilfe der Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Synapsin ist ein Protein, das mit synaptischen Vesikeln assoziiert ist. NFP200 wurde zur Visualisierung neuronaler Strukturen, Perikarya und Fortsätze, eingesetzt. Zur Quantifizierung sind aus der Kontrollgruppe elf und aus der mit Deltamethrin behandelten 16 individuelle Neurone pyramidenzellartiger Morphologie mit mindestens fünf Fortsätzen untersucht worden. Gezählt wurden synaptische Kontakte auf den Perikarya und 20µm entlang ihrer Fortsätze ausgehend vom Soma (Abbildung 32).

Synaptische Kontakte waren trotz Deltamethrinbehandlung vorhanden. 200nM Deltamethrin verringerte die Anzahl synaptischer Kontakte im Vergleich zur Kontrollgruppe um 60% (Abbildung 32 Pfeilspitzen, Abbildung 33). Dieses Ergebnis war signifikant ($p\text{-Wert} < 1 \cdot 10^{-6}$). Bemerkenswerterweise waren auch bei sehr hohen Konzentrationen Deltamethrins (bis 2000nM) synaptische Kontakte noch vorhanden (nicht dargestellt).

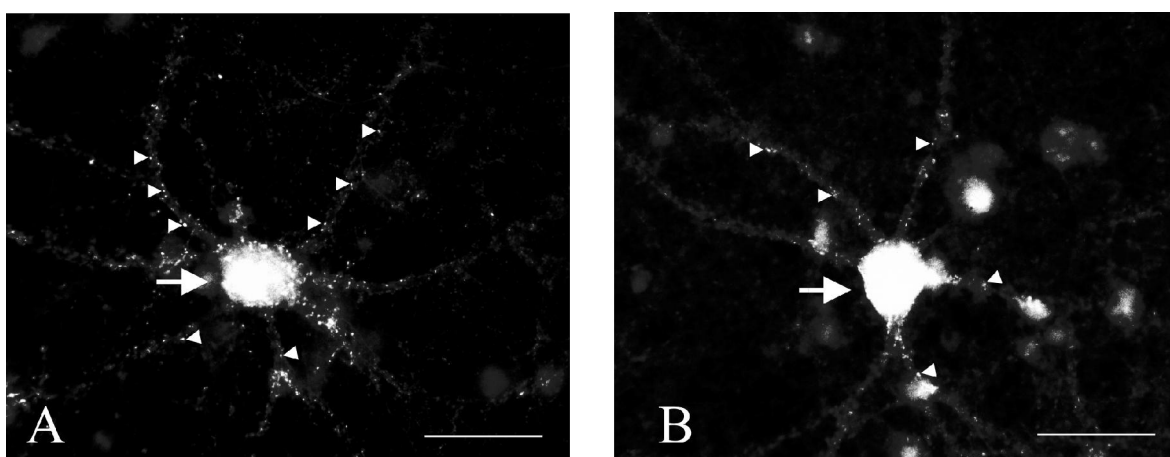


Abbildung 32: Auswirkungen von Deltamethrin auf Synapsen

Hippocampale Neurone wurden bis DIV 17 kultiviert und außer in der Kontrollgruppe (A) ab DIV 6 zweimal wöchentlich mit 200nM Deltamethrin behandelt (B). Synapsen wurden durch den Antikörper Synapsin markiert, die Perikaria und Dendriten durch Neurofilamentprotein 200kDa (NFP 200). Zur Quantifizierung wurden nur synaptische Kontakte auf Neuronen mit pyramidenzellartiger Morphologie und mindestens 5 Fortsätzen gezählt. Dort jeweils auf den Perikarya und 20µm entlang jeden Fortsatzes abgehend vom Soma.

Fig. A, Kontrollgruppe, zeigt ein repräsentatives Neuron pyramidenzellartiger Morphologie (Pfeil) und seine zahlreichen synaptischen Kontakte (Pfeilspitzen).

Fig. B, Deltamethrinbehandlung 200nM, zeigt ein repräsentatives Neuron pyramidenzellartiger Morphologie (Pfeil). Zu beachten ist, dass trotz DM-Behandlung synaptische Kontakte (Pfeilspitzen) vorhanden sind. Maßstab 20µm.

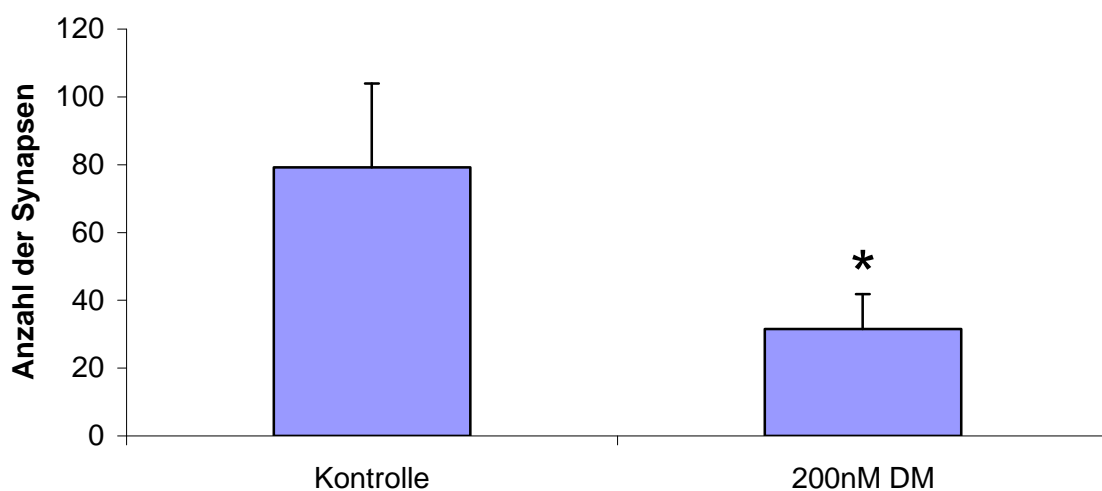


Abbildung 33: **Auswirkungen der Deltamethringabe (200nM) auf die Häufigkeit synaptischer Kontakte**

Synaptische Kontakte wurden in der Hippocampuskultur mit einem polyklonalen Antikörper gegen Synapsin markiert, sowie Perikarya und Dendriten mit NFP200-Antikörpern sichtbar gemacht. Es wurden synaptische Kontakte auf Zellen gezählt, die eine pyramidenzellartige Morphologie mit mindestens 5 Abgängen aufwiesen. Gezählt wurden jeweils alle Synapsen auf dem Soma und auf den vom Perikaryon abgehenden Dendriten bis zu einer Entfernung von 20µm vom Soma. Die Abnahme der Synapsen unter Deltamethrin war signifikant (p-Wert $<1 \cdot 10^{-6}$).

5 Diskussion

5.1 Methodik

Es wurden die primäre embryonale Zellkultur und zum Vergleich Schnitte von adulten Mäusen und Ratten verwendet. Für Vergleichsbefunde zum intakten embryonalen Hippocampus fehlten die technischen Lösungen.

Die primäre hippocampale Zellkultur stellt ein nahezu ideales System dar, um Vorkommen, entwicklungsabhängige Ausprägung und Vergleiche zur in-vivo-Situation verschiedenster neuronaler Charakteristika zu untersuchen (Grosse et al., 1998; 2000; 2003). Ebenfalls gibt sie die Möglichkeit durch kontrollierte Veränderung einzelner Parameter, wie Deltamethrinvergiftungen, deren Auswirkungen isoliert anhand von Kontrollgruppenvergleiche nachvollziehen zu können (Grosse, Thiele et al., 2002).

5.2 Glutamatdecarboxylase GAD65/67

Die gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass in den Hippocampuskulturen GAD65 und GAD67 im Soma von Interneuronen exprimiert werden.

Aufgrund dieser in vitro gewonnenen Ergebnisse, wurden Doppelmarkierungen mit peptidergen Neurotransmittern und GAD65 oder GAD67 durchgeführt und quantitative Auswertungen zur Anzahl der Neruone mit diesen Doppelmarkierungen vorgenommen.

5.3 Peptiderge Neurotransmitter

5.3.1 Cholecystokinin (CCK)

In dieser Arbeit wurden in situ CCKerge Neurone in allen Schichten des Hippocampus gefunden. Das deckt sich mit den Ergebnissen von Kosaka et al. (1985) und Sloviter und Nilaver (1987). CCKerge Neurone werden morphologisch als Korbzellen klassifiziert (Harris et al., 1985; Seay-Lowe and Claiborne, 1992).

Die Verteilung CCKerger Neurone im Hippocampus verändert sich postnatal zwischen P0

und P20 (Morozov and Freund, 2003) durch eine Migration dieser Zellen.

Nahezu alle CCKergen Neurone im Hippocampus werden in der Literatur als GABAerg beschrieben (Kosaka et al., 1985). Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse der Arbeit signifikant, dass der größere Anteil der CCKergen Neurone in der beschriebenen Kultur nicht GABAerg ist. Die weiteren Untersuchungen zeigen unterschiedliche Verhältnisse GABAerger und nicht-GABAerger CCK-positiver Neurone, die in den Unterregionen CA3a/CA3b (ca. 50/50%) und Gyrus dentatus (36/74%) gezählt wurden.

CCK wird im Hippocampus in situ in zwei Unterformen von Korbzellen (Interneurone) beschrieben (Sloviter and Nilaver, 1987; Freund and Buzsáki, 1996). Circa 27% der CCKergen Neurone im Hippocampus koexprimieren in situ den vesikulären Glutamatransporter 3 (VGLUT3) (Somogyi et al., 2004). Dieser ist außerhalb des Hippocampus auch in serotoninerger und glutamaterger Interneuronen nachgewiesen worden. In der CA1-Region wird er in synaptischen Boutons kolokalisiert mit CCK und Serotonin, aber nicht mit GAD vorgefunden. VGLUT3 wird in vielen nicht-glutamatergen Synapsen im ZNS identifiziert. Es wird angenommen, dass eine Abgabe von Glutamat aus GABAergen oder glycinergen Synapsen erfolgt (Fremeau et al., 2002; Gras et al., 2002; Boulland et al., 2004; Herzog et al., 2004; Gabellec et al., 2007).

In Purkinje-Zellen des Kleinhirns gibt es diese Koexpression nur während der Entwicklungsphase (Gras et al., 2005). Die Glutamatfreisetzung während eines definierten Zeitraums in der Entwicklung inhibitorischer Neurone lässt vermuten, dass sie für die Plastizität oder das Finetuning der neuronalen Netzwerke nötig ist. Ein VGLUT3-Knockoutmodell unterstützt diese Hypothese (Ahnert-Hilger und Jahn, 2008).

Den Hippocampus innervieren Axone aus dem supramammilären Nucleus, die Glutamat und GABA aus dem gleichen Terminal freisetzen können (Boulland et al., 2009).

Das klassische Bild von entweder nur exzitatorischen oder nur inhibitorischen Transmittern in einem Neuron gilt nicht mehr. Die gleichzeitige Expression unterschiedlicher Neurotransmitter (Gutiérrez and Heinemann, 2001; Nabekura et al., 2004; Gutiérrez, 2005, Uchigashima et al. 2007, Zander et al., 2010) oder deren Auftreten in verschiedenen Entwicklungsstadien zeigt, wie plastisch oder variabel sich die Neurone verhalten können, was die Ergebnisse dieser Arbeit belegen. Neurone, die aus ihrem Netzwerk herausgenommen und kultiviert werden, könnten zu unterschiedlichen Zeiten in unterschiedlichem Maße verschiedene Neurotransmitter exprimieren.

Die als Korbzellen beschriebenen CCK-positiven Zellen des Gyrus dentatus erhalten

Afferenzen aus dem Tractus perforans und den lokalen Moosfaser-Kollateralen (Freund and Buzsáki, 1996). Die Afferenzen aus dem Tractus perforans fehlen in der Kultur und können der Grund für Veränderungen der gezeigten Kolokalisationen der GABAergen und peptidergen Transmitter sein.

5.3.2 Vasointestinales Peptid (VIP)

Die Verteilung VIPerger Neurone im Hippocampus von Säugetieren wurde ausgiebig untersucht (Lorén et al., 1979; Sloviter and Nilaver, 1987; Hájos et al., 1996). VIPerge Neurone kommen in allen Schichten des Hippocampus ungleichmäßig verteilt vor.

VIPerge Neurone in Primärkulturen des Hippocampus, insbesondere in seinen Unterregionen, waren bisher nicht Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen gewesen.

Kolokalisationen klassischer Neurotransmitter mit VIP wurden ebenfalls nur an Schnitten untersucht. Die Aussagen zum Anteil GABAerger Kolokalisation in der VIP-Population variieren von 50% (Kosaka et al., 1985) bis zu 100% (Acsády et al., 1996 a, b; Hájos et al., 1996).

Nicht alle Interneurone des Hippocampus sind GABAerg. Untersuchungen von Frotscher et al. (1986) haben cholinerge Interneurone in allen Schichten des Hippocampus nachgewiesen, Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Freund and Buzsáki (1996) zeigen cholinerge Interneurone in zwanzigfach höherer Anzahl, als von Frotscher et al. (1986) angenommen wurde.

Die in vitro-Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Mehrzahl der VIPergen Neurone im Hippocampus und seinen Unterregionen nicht GABAerg ist. Dieses Ergebnis ist hoch signifikant.

Aus den Untersuchungen von Chédotal et al. (1994) ist bekannt, dass Kolokalisationen von cholinergen Neuronen mit VIP im Neocortex vorkommen. Bayraktar et al. (1997) beschreiben cholinerge VIP-positive Neurone des cerebralen Kortex, die auch GABAerg sind. Ob es eine Reifungs- oder Zeitabhängigkeit in dieser Koexpression von GABA, VIP und Acetylcholintransferase (AChT) gibt, wie bei Glutamat, GABA und CCK, ist nicht bekannt. Gleichwertige Untersuchungen mit Dreifachmarkierungen im Hippocampus sind bisher nicht erfolgt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die Abwesenheit von GABA in ca. 70% aller VIP-

positiven Neurone. Eine Koexpression mit AChT erscheint aufgrund der oben erläuterten Zusammenhänge möglich.

Im Gyrus dentatus werden VIPerge CCK-positive und VIPerge CCK-negative Neurone beschrieben. Sie werden zu den Korbzellen gezählt (Freund and Buzsáki 1996). Im Cornu ammonis liegen die VIPergen Neurone unter anderem im Stratum lacunosum-molekulare, in das Afferenzen des entorhinalen Cortex führen. Das Fehlen von diesen afferenten Projektionen in der Kultur kann zum Fehlen von GABA in cholinergen VIP-positiven Interneuronen geführt haben. Eine Dreifachmarkierung sollte bei Vorliegen von entsprechenden Antikörpern in vitro und in situ erfolgen, um die bisher gewonnenen Erkenntnisse zu unterstützen und um das klassische Verständnis von VIPergen Interneuronen, die bisher nur als GABAerg angenommen wurden, zu erweitern.

5.3.3 Neuropeptid Y (NPY)

In situ ist die Verteilung NPYerger Neurone im Hippocampus im Vergleich zu anderen peptidergen Neurotransmittern wenig untersucht.

Aktuell wird aufgrund der Morphologie und der Kolo-kalisation mit Somatostatin eine GABAerge Natur NPYerger Neurone angenommen. Sie werden als Interneurone beschrieben. Nur in humanen Präparaten wurde bis jetzt eine Expression von NPY auch in Körnerzellen beobachtet (Sperk et al., 2007).

Wie in dem repräsentativen Schnittbild ersichtlich (Abbildung 16), verteilen sich NPYerge Neurone, wie die SSergen Neurone, in nahezu allen Schichten des Hippocampus, mit zahlenmäßiger Überlegenheit im Gyrus dentatus.

Die Kulturergebnisse zeigen, entgegen den bisherigen Veröffentlichungen, in jeder untersuchten Region einen unterschiedlichen Anteil auch nicht-GABAerger Neurone.

Während der Entwicklung des Gyrus dentatus kommt es zur zweizeitigen Migration von Körnerzellen und deren Vorläufern aus dem Neuroepithel. Sie beginnt in der Maus um den 14. Embryonaltag. Selbst postnatal kommt es zur Ansiedelung von Vorläuferzellen in der subgranulären Zone und des Hilums. Diese Vorläuferzellen der zweiten Migrationsphase besitzen die Möglichkeit, sich zeitlebens zu Neuronen zu differenzieren (Pleasure et al., 2000; Jones et al., 2003).

Diese aktive Neurogenese findet sich nur in zwei Regionen des adulten Gehirns: im Gyrus dentatus und im lateralen Ventrikel. Die proliferativen Eigenschaften dieser Zellen sind

nicht nur genetisch gesteuert, sondern auch abhängig von den Signalen der Umgebung, wie z.B. Neurotransmittern oder unterschiedlichen Umgebungsvariablen wie z.B. Epilepsie (Seri et al., 2001; Ming and Song, 2005; Lledo et al., 2006).

Diese Ergebnisse lassen sich auf zwei mögliche Arten interpretieren.

Erstens, es gibt eine noch unbekannte Neuronenpopulation *in vivo*, die NPY exprimiert, aber nicht GABAerg ist.

Zweitens, unter Kulturbedingungen kommt es aufgrund der proliferativen Eigenschaft von Vorläuferzellen zur Ausbildung von NPYergen nicht-GABAergen Neuronen, die sich durch die Andersartigkeit der *in vitro*-Situation gegenüber der *in situ*-Situation (andere Neuromodulatorenkonzentration, unterschiedliche Schaltkreise) erklären lässt. Diese Population besitzt nicht die klassischen Merkmale von Körnerzellen.

Im Hilum werden bis zu 70% der NPYergen Neurone als somatostatinerge HIPP-Zellen beschrieben, 20% als Korbzellen und 7% als multipolare Zellen. Die NPY-positiven Zellen, die sich von den HIPP-Zellen unterscheiden, gleichen CCK-positiven Korbzellen, welche vom Tractus perforans innerviert werden (Deller and Leranth, 1990; Freund and Buzsáki, 1996).

Bis zu 60% der NPY-positiven Neurone in der CA1 Region sind somatostatinerger (Köhler et al., 1987). Afferenzen für NPY-positive SS-negative pyramidenzellartigen Neurone entstammen dem entorhinalen Cortex.

Afferenzen des Hippocampus z.B. aus dem entorhinalen Cortex fehlen in der Kultur. Interneurone mit lokalen Dendritenbäumen wie die HIPP-Zellen sind wahrscheinlich in der Kultur GABAerg. Die Interneurone, die *in situ* extrahippocampale Afferenzen besitzen wie die SS-negativen pyramidenzellartigen Neurone und die 7% multipolaren Zellen des Hilums, scheinen die Kandidaten für die NPY-positiven nicht-GABAergen Neurone der Kultur zu sein.

Für beide Ansätze spricht die Tatsache, dass auch glutamaterge Körnerzellen NPY exprimieren können. Aus den gleichen Vorläuferzellen werden auch Interneurone gebildet. Somit ist prinzipiell eine GABAerge Natur von hippocampalen Interneuronen nicht zwingend festgelegt. Andererseits könnten nur die speziellen Kulturbedingungen eine Proliferation von nicht-GABAergen NPY-positiven Neuronen aus Vorläuferzellen ermöglichen.

Das heißt, dass die späte Differenzierung mit allen heute bekannten Möglichkeiten und

Formen der Vorläuferzellen eine Erklärung für die gefundenen, bisher unbekanntes signifikante Ergebnisse bereithält. Dies ist hinsichtlich der Übertragung auf die in situ Verhältnisse, wie auch als spezielles Ergebnis der in vitro-Situation möglich.

Für beide Ansätze sind weitere Studien mit Doppelmarkierungen von NPY mit GABA/GAD in situ und AChT/Glycin mit NPY anzustreben.

5.3.4 Somatostatin (SS)

Wie in den durchgeführten DAB/Ni-Färbungen exemplarisch dargestellt, verteilen sich somatostatinerge Neurone in situ auf nahezu alle Schichten des Hippocampus. Dies bestätigt die Ergebnisse von Köhler and Chan-Palay, 1982; Morrison et al., 1982; Sloviter and Nilaver, 1987; Nitsch et al., 1990.

Die entwicklungsabhängige Expression von Somatostatin mit einem Maximum um P10 wird in der Maus beschrieben (Naus et al., 1988).

Aufgrund ihrer Morphologie und Verteilung werden SSerge Neurone zu den Interneuronen gezählt. Alle SSergen Neurone werden als HIPP-Zellen beschrieben. Diese besitzen lokal begrenzte Dendritenbäume (Leranth et al., 1990; Blasco-Ibanez and Freund, 1995). Ihre Afferenzen erhalten sie durch lokale Pyramidenzellen in Form einer Feedbackhemmung (Blasco-Ibanez and Freund, 1995). Bisherige Untersuchungen in situ haben eine komplette Kollokalisierung mit GAD oder ihrer mRNA ergeben (Somogyi et al., 1984; Kosaka et al., 1988; Esclapez and Houser, 1995).

In den Kulturen waren alle somatostatinerge Neurone GABAerg. Somit sind die somatostatinerge Neurone wahrscheinlich nicht auf extrahippocampale Afferenzen bei ihrer Neurotransmitterbereitstellung angewiesen.

Durch die Übereinstimmung der in vitro-Situation mit der bekannten Natur somatostatinerger GABAerger Neurone in vivo wird die hippocampale Primärkultur als ein Modell zur weiteren Erforschung der Funktion und Modulation somatostatinerger GABAerger Neurone verwendungsfähig.

5.3.5 Zusammenfassende Betrachtungen zur Koexpression von GABA und peptidergen Neurotransmittern

Es zeigt sich, dass in den Kulturen die peptidergen Neurotransmitter NPY, VIP, CCK und Somatostatin exprimiert werden. Sie sind in unterschiedlichem Maße in den Kulturen vom

gesamten Hippokampus, der CA3a/CA3b Region und des Gyrus dentatus vorhanden.

Im Gegensatz zu Somatostatin waren NPY-, CCK- und VIP-positive Neurone nicht alle, wie zuvor angenommen, GABAerg. Bei NPY wurde nur ein kleiner Prozentsatz nicht GABAerger Neurone in der Kultur identifiziert. In den untersuchten VIP und CCK Populationen überwog der Anteil nicht GABAerger Neurone in den Kulturen.

Die Ergebnisse dieses Kultursystems stehen der Vorstellung einer nur GABAergen Natur hippocampaler Interneurone entgegen.

Die Bedingungen der Kultur, verglichen mit den in-situ Verhältnissen, führen zu diesen bemerkenswerten Ergebnissen. Diese Besonderheiten sind durch das Fehlen jeglicher Afferenzen außerhalb des präparierten Areals gegeben. Weiterhin fehlt bedingt durch die Methodik der Einzelzellkultivierung die laminäre Schichtung. Ein Gegenbeispiel wären die somatostatinergeren HIPP-Zellen des Hilums. Sie zeigen die gleiche Transmitterausstattung in der Kultur wie in situ. Hipp-Zellen bekommen nur Afferenzen von nahe gelegenen Pyramidenzellen, die in den präparierten Arealen enthalten sind.

Die CCKergen und VIPergen Neurone werden zu den Korbzellen gezählt. Diese erhalten in vivo Afferenzen aus dem Tractus perforans und dem entohinalen Cortex. Diese Afferenzen fehlen in der Kultur.

In vivo wichtige GABAerge Neurone, die HUB-Zellen (auch „superconnected nodes“ genannt Bonifazi et al., 2009), können in vitro nicht ihre Axonbäume über weitere Strecken als die Präparationsgrenzen hinweg von der CA3-Region her ausbreiten. Sie können nicht zur Reifung und Synchronisation des neuronalen Netzwerks durch komplexe excitatorische Kurzschluß-Hemmung in vitro beitragen (Ben-Ari et al., 2007). Diese Unterschiede können zu den beobachteten Ergebnissen in der NPY-, VIP- und CCK-Population, gegenüber den in-situ Verhältnissen führen. Sie bestätigen, dass die Ausprägung bestimmter Neurotransmitterkombinationen einzelner Neuronensubtypen massiv durch die Afferenzen gesteuert wird.

Dies ist nicht nur eine Fähigkeit junger Neurone, sondern die plastische Möglichkeit auch adulter Neurone. Das Beispiel der Ausschüttung von NPY aus den als glutamterg bekannten Körnerzellen über den Moosfasertrakt unter exzitatorischen Bedingungen der Epilepsie und des Kindlings zeigt ebenfalls eine Plastizität der Neurone, angepasst an umgebene Stimuli. Ein neuronales Netzwerk kann also sehr variabel in der Entwicklung und im adulten Zustand Neurotransmitter exprimieren. Nicht nur die peptidergen Neurotransmitter, sondern auch die klassischen Botenstoffe wie GABA werden sehr

unterschiedlich exprimiert. Zander et al. (2010) zeigten in Moosfasersynapsen des Hippocampus das gleichzeitige Vorkommen des vesikulären GABA-Transporters VGAT und der vesikulären Glutamatttransporter VGLUT 1 und 2. Gras et al. (2008) beobachtete in cholinergen Neuronen außer dem vesikulären Acetylcholintransporter auch vesikulären Glutamatttransporter (VGLUT3).

Um die oben ungeklärten Fragen zu beantworten, könnten Doppelmarkierungsexperimente der peptidergen Neurotransmittern (CCK, VIP und NPY) mit den vesikulären Glutamatttransportern VGLUT1, 2 und dem vesikulären Acetylcholintransporter VACHT in vitro wie auch in situ durchgeführt werden. Außerdem sollte der Hippocampus älterer Embryonalstadien und früher postpartaler Stadien aufgeschnitten werden um die entsprechenden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen durchzuführen.

5.4 Veränderungen der peptidergen Neurotransmitter und Calbindin unter experimentellen Bedingungen

5.4.1 Einfluss von progressiver Auslösung und Entwicklung von Anfällen verbunden mit einem epilepsietypischen Erscheinungsbild (Kindling)

1989 wurde erstmals über ausgedehnte Veränderungen NPY- und somatostatinerner Zellen in menschlichen Gehirnen von Patienten mit Temporallappenepilepsie berichtet (de Lanerolle et al., 1989). Es wurde damals der Begriff einer Reorganisation benutzt, da die Veränderungen vielfältiger Natur waren.

Eine Vielzahl von Arbeiten beschäftigt sich mit der Rolle von NPY in der Entwicklung epileptiformer Anfälle (Vezzani et al., 1999a). Generell wird eine Veränderung der NPY abhängigen Neurotransmission durch epileptiforme Anfälle angenommen, ebenso eine neuroprotektive, antiepileptische Eigenschaft postuliert. Dies betrifft in besonderem die Anfälle hippocampalen Ursprungs (Reibel et al., 2001). Applikation von NPY auf hippocampale in vitro-Vibratonschnitte reduzierte die exzitatorische synaptische Übertragung (Klapstein und Colmers, 1997). Intrazerebrale Applikation in vivo reduzierte hippocampale Erregbarkeit und verhinderte die Ausbildung konvulsiver Anfälle (Woldbye et al., 1996, 1997; Reibel et al., 2001). NPY-knock-out Mausmodelle haben nach Kainic-Säure induzierten Anfällen eine signifikant erhöhte Mortalität (bis zu 93%) im Gegensatz zu den Kontrolltieren (Erickson et al., 1996; Baraban et al., 1997; DePrato Primeaux et al., 2000; Vezzani et al., 2002).

Während des Kindlings wurden noch vor dem Auftreten von generalisierten Anfällen auch auf der nicht stimulierten Gehirnhälfte Veränderungen in der Peptidexpression beschrieben (Vezzani et al., 1996). Dies legt nahe, dass dies nicht unspezifische Reaktionen auf elektrische Stimuli oder generalisierte Anfälle sind, sondern ein Teil der von de Lanerolle (1989) als Reorganisation bezeichneten plastischen Modifikation synaptischer Transmission.

In der angeführten Literatur wurde eine Veränderung der Neuronendichte in den einzelnen Unterregionen, speziell im Gyrus dentatus und der CA3-Region des Hippocampus nicht beschrieben. In dieser Arbeit wurde das Kindlingmodell zur Epileptogenese benutzt. Dabei wurden die Auswirkungen mit Hilfe der DAB/Ni-Färbung gegen NPY, Somatostatin und Calbindin an 40µm dicken Schnitten des Hippocampus untersucht.

Unter extremen exzitotoxischen Bedingungen findet die irreversible Schädigung von Hauptzellen und Interneuronen in einer bestimmten Reihenfolge statt. Bei Hauptzellen werden in absteigender Vulnerabilität die Mossyzellen - CA3c-Pyramidenzellen - CA3a- und CA3b-Pyramidenzellen zerstört, während bei den Interneuronen die Reihenfolge Calretinin-positive Interneurone im Hilum und Stratum lucidum der CA3-Region - somatostatin-positive Hilumzellen - andere Typen von Interneuronen mit radial orientierten Dendritenbäumen ist; (Freund and Maglóczy, 1993; Hsu and Buzsáki, 1993). Der Gehalt an peptidergen Neurotransmittern wie NPY, CCK oder VIP lässt keinen Schluss auf die Widerstandsfähigkeit der Neurone zu.

Die vulnerabelsten Neurone waren die Calretinin- und Somatostatin-positiven Hilumneurone, Mossyzellen sowie Interneurone.

Die Vulnerabilität ist nicht abhängig vom Gehalt calziumbindender Proteine (Freund et al., 1990; Johansen et al., 1990; Freund et al., 1992; Freund and Maglóczy, 1993; Hsu and Buzsáki, 1993).

In den untersuchten gekindelten Ratten gibt es im Gyrus dentatus eine signifikant verringerte NPY-positive Neuronendichte. In der CA3-Region kommt es dagegen zu einem signifikanten Anstieg NPY-positiver Neurone um mehr als 100%. Diese Veränderungen scheinen Ausdruck von kindlinginduzierten Modifikationen in peptidexprimierenden Zellen zu sein. Der Moosfasertrakt ist in den gekindelten Ratten im Gegensatz zur Kontrollgruppe mit NPY markiert. Dies kann auf eine Synthese von NPY in den Körnerzellen zurückgeführt werden, wie sie auch bei epileptischen Anfällen im Rattenhirn beschrieben sind (Sperk et al., 2007). Der Anstieg der Neuronenzahl in der

CA3-Region könnte als Aktivierung peptiderger Interneurone verstanden werden, die eine Kontrolle über die Aktivität von Pyramidenzellen und deren efferente Projektionen haben. Dies wird durch ultrastrukturelle Untersuchungen über die symmetrische Natur synaptischer Kontakte peptidhaltiger Boutons an Somata und Dendriten von Pyramidenzellen gestützt (Köhler et al., 1986; Milner and Bacon, 1989; Deller and Leranth, 1990).

Ob die Überexpression von NPY eine inhibitorische oder exzitatorische Wirkung hat, ist abhängig von der Art der vermittelnden Rezeptoren (Brooks et al., 1987; Monnet et al., 1992; Greber et al., 1994; Woldbye et al., 2005). Die NPY1- und NPY2-Rezeptoren sind nach Kindling verstärkt auf Moosfasern exprimiert (Röder et al., 1996; Vezzani et al., 2000). NPY2-Rezeptoren werden präsynaptisch exprimiert und vermitteln eine Unterdrückung der Glutamatfreisetzung. Das bedeutet, dass die Wirkung von NPY nach Kindling verstärkt inhibitorischer Natur auf glutamaterge Neurotransmission ist (Colmers et al., 1991; Greber et al., 1994). Diese Wirkung wäre protektiv zu verstehen, da sie die weitere Erregungsausbreitung vermindert. NPY besitzt weiterhin neuroproliferative Eigenschaften, indem es Progenitorzellen der subgranulären Zone zur Neubildung von Körnerzellen anregt, vermittelt über den NPY1-Rezeptor (Sperk et al., 2007). Diese tragen mit ihrer de novo NPY-Ausschüttung über den Moosfasertrakt weiter zur Protektion bei, durch den o.g. präsynaptischen NPY2 Rezeptor.

Dass die Wirkung von NPY rezeptorabhängig ist, stellt eine hervorragende Möglichkeit einer pharmakologischen Intervention in der Epilepsietherapie dar.

5.4.2 Einfluss von Deltamethrin

Deltamethrin ist ein Typ II-Pyrethroid und findet vornehmlich in Insektiziden Verwendung. Die genaue Wirkungsweise ist noch nicht endgültig geklärt. Mit der primären Zellkultur hippocampaler Neurone wurde ein Modell geschaffen, um Neuronensubtypen und die Auswirkungen auf diese isoliert beobachten zu können. Es wurde gezeigt, dass verschiedene peptiderge Neurotransmitter wie Somatostatin und NPY und calziumbindende Proteine wie Calbindin in der Kultur exprimiert werden: Somatostatin und NPY von Interneuronen; Calbindin in Körnerzellen und Interneuronen. Körnerzellen sind morphologisch zu erkennen. Gleichzeitig bilden sich in der Kultur neuronale Netzwerke aus, von denen synaptische Kontakte mit Antikörpern gegen Synapsin markiert wurden. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme somatostatinerger

Neurone auf ca. 40%, während NPY-positive Neurone signifikant um das 2,8fache zunahm, unabhängig von der eingesetzten Deltamethrinkingonzentration. Calbindinerge Neurone reduzierten sich auf ca. 30% des Kontrollwertes. Deltamethrin verändert drastisch das Verhältnis unterschiedlicher Neuronenpopulationen zueinander, obwohl die Gesamtneuronenzahl sich nur um 16% erniedrigt. Synaptische Kontakte auf Neuronen mit pyramidenzellartiger Morphologie reduzierten sich bei 200nM um ca. 60% und waren selbst bei sehr hohen Konzentrationen (2000nM) immer noch vorhanden.

Die Überexpression von NPY und die Reduzierung von Somatostatin, insbesondere die Reduzierung der Calbindinexpression in Körnerzellen, zeigt Ähnlichkeiten zum Kindling (Tønder et al., 1994b), elektrokonvulsiven Schocks (Tønder et al., 1994a; Mikkelsen and Woldbye, 2006) und Kainic-Säure-induzierten Anfällen (Yang et al., 1997; Silva et al., 2005). Selbst Behandlungen mit Kainic-Säure in Konzentrationen, die unter der Auslöseschwelle von epileptischen Anfällen liegen, führen zu Expressionsänderungen, die mit den hier beobachteten Veränderungen vergleichbar sind.

Die Hochregulation der NPY-Expression scheint ein Schutzmechanismus hippocampaler Neurone zu sein (Xapelli et al., 2007), der schon vor der Ausprägung epileptiformer Anfälle auftritt. Unterstützt wird diese These von NPY-knock-out Mausmodellen, welche nach Kainic-Säure-induzierten Anfällen eine signifikant erhöhte Mortalität (bis zu 93%), gegenüber den Kontrolltieren hatten (Baraban et al., 1997; DePrato Primeaux et al., 2000).

Deltamethringaben, die in vivo direkt appliziert wurden und zur Apoptose von Neuronen führten (Wu and Liu, 2000; Wu et al., 2000), können nicht mit den gewonnenen Daten verglichen werden. Die eingesetzten Konzentrationen lagen weit über den in dieser Arbeit verwendeten. Sie sind in der Humantoxikologie irrelevant. Es zeigte sich aber ein ähnliches Schema in der Affektion auf Subpopulationen von Neuronen, wie sie hier beobachtet wurden.

Die Annahme, dass die Deltamethrinwirkung nur durch Aktivität von Natriumkanälen vermittelt wird, ist unzureichend, da Deltamethrinkingonzentrationen von 2nM eine signifikante Änderung calbindinerner Neurone und NPY-positiver Neurone bewirkt, aber für Effekte an Natriumkanälen zu niedrig ist.

Ein weiterer Ansatz, die komplexe Wirkung von Deltamethrin zu erklären, wird von Chen et al. (2007) geliefert, die eine Membranpotentialänderung an Mitochondrien mit der erniedrigten Expression von Cytochrom c und der damit verbundenen niedrigeren Aktivität von Cytochrom c Oxidase feststellten.

5.4.3 Zusammenfassende Betrachtungen zu Kindling und Deltamethrin

NPY moduliert Afferenzen und Efferenzen über den präsynaptischen NPY2 Rezeptor an Körnerzellen und Interneuronen. Dieser Mechanismus führt in den gekindelten Tieren zur Inhibition glutamaterger Übererregung. In den Deltamethrinexperimenten ist eine signifikante Zunahme der NPY positiven Zellen zu beobachten. Möglicherweise führt nicht das Deltamethrin direkt, sondern diese vermehrte NPY-Ausschüttung zur beobachteten Herunterregulation der gesamten synaptischen Aktivität und damit evtl. zur geringeren Expression von Somatostatin. Die Reduzierung der Synapsen auf pyramidenzellartigen Somata kann als plastischer Umbau auf die veränderten Bedingungen durch präsynaptische NPY Inhibition über den NPY2 Rezeptor interpretiert werden. Das zwischen den eingesetzten hohen und niedrigen Deltamethrinkonzentrationen die somatostatinerge Zellzahl nahezu konstant blieb, deckt sich mit dem schützenden Effekt NPY bei Kindling- und Epilepsieexperimenten. Diese Schutzfunktion wird über die NPY1- und NPY2-Rezeptoren vermittelt, wie es aus Studien mit Rezeptorantagonisten bekannt ist (Xapelli et al., 2007). Eine Inhibition, das heißt eine Herunterregulation der synaptischen Aktivität führt wahrscheinlich in den gekindelten Tieren, wie auch in den mit Deltamethrin vergifteten Kulturen zum Schutz der Neurone durch NPY.

Calbindin wird in Kontrolltieren in Körnerzellen, Pyramidenzellen und Interneuronen exprimiert. In den gekindelten Tieren fehlt die Markierung in den Körnerzellen und im Moosfasertrakt. Die Interneurone scheinen nicht betroffen zu sein. Durch Deltamethrinbehandlung reduzieren sich calbindinerge Neurone auf ca. 30% des Ausgangswertes. Dabei ist nicht sicher zu unterscheiden ob Calbindin weniger stark exprimiert wird oder calbindinerge Neurone zu Grunde gehen.

Deltamethrin führt in den Kulturen zu ähnlichen Veränderungen wie bei Zuständen erhöhter Erregbarkeit durch Epilepsie, Kindling- oder Kainic-Säure-Experimenten. Deltamethrin kann Natriumkanäle beeinflussen, doch die hier eingesetzten Konzentrationen von 2nM Deltamethrin sind für eine Aktivierung von Natriumkanälen um mindestens eine Zehnerpotenz zu gering (Tarabeau and Narahashi, 1998). Das bedeutet, dass die oben beschriebenen Auswirkungen durch andere Effekte gesteuert werden müssen.

Der Brain derived neurotrophic factor (BDNF) mit bekannt hoher Konzentration im Hippocampus hat einen Einfluss auf die Differenzierung und Plastizität neuronaler

Netzwerke (Nawa et al., 1995; Huang and Reichardt, 2001; Poo 2001; Huang and Reichardt, 2003; Scharfman et al., 2005). BDNF wird bei Übererregung durch Pyramiden- und Körnerzellen verstärkt ausgeschüttet unabhängig davon ob Epilepsie, Kindling oder Kainic-Säure zur Übererregung führten (Humpel et al., 1993; Conner et al., 1997; Vezzani et al., 1999b). Durch BDNF wird NPY verstärkt exprimiert und werden Körnerzellen neu gebildet (Vezzani et al., 1999b; Reibel et al., 2000). Intrahippocampale BDNF Applikation in vivo kann Anfälle induzieren (Scharfman et al., 2002). Generell steigert BDNF die Erregbarkeit des neuronalen Netzwerkes. Die Wirkung von Deltamethrin ähnelt der von BDNF.

Es gibt nachfolgende Möglichkeiten, wie diese Ähnlichkeit vermittelt werden kann:

- Deltamethrin wirkt an BDNF-Rezeptoren.
- Deltamethrin veranlasst BDNF-Ausschüttung durch Übererregung des neuronalen Netzwerkes.
- Deltamethrin schädigt das neuronale Netzwerk wie eine Ischämie oder Verletzung und damit folgt entweder BDNF-Anstieg (Lindvall et al., 1994) und/ oder eine vermehrte BDNF-Rezeptor-Produktion (Merlio et al., 1993).

Weiterführend wären Untersuchungen zur Deltamethrinwirkung unter Blockade von BDNF Rezeptoren sinnvoll. Ein elektrophysiologisches Monitoring einzelner Neurone durch patch-clamp Elektroden bei Deltamethringabe ist ebenfalls denkbar.

6 Zusammenfassung / Summary

Die innere Struktur des Hippocampus, insbesondere der Aufbau von Neuronenschaltkreisen, ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Die hippocampale Primärkultur stellt ein geeignetes Modell zur Untersuchung der neuronalen Entwicklung sowie der Auswirkung isolierter Reize und Noxen dar. Schwerpunkt der nachfolgenden Betrachtungen sind die Neurone des Hippocampus, insbesondere die peptidergen Neurotransmitter Somatostatin (SS), Neuropeptid Y (NPY), Vasoaktives intestinales Peptid (VIP) und Cholecystokinin (CCK).

Durch den Gehalt an peptidergen Neurotransmittern lassen sich Interneurone subklassifizieren. Untersuchungen zur Ausprägung peptiderger Neurotransmitter in Interneuronen embryonaler Primärkulturen des Hippocampus liegen bisher nicht vor. In dieser Arbeit wurde das Modell der hippocampalen, embryonalen Primärkultur auf die peptidergen Neurotransmitter ausgeweitet.

1. Die Unterregionen Gyrus dentatus (G.dent) und CA3a/CA3b wurden getrennt kultiviert. Die vorhandenen Neurone wurden in situ wie in vitro auf ihren Gehalt an peptidergen Neurotransmittern SS, NPY, VIP und CCK analysiert und miteinander verglichen. Zusätzlich wurden in den Kulturen diese Neurotransmitter auf Kolokalisation mit Glutamatdecarboxylase (GAD65), einem Marker GABAerger Neurone überprüft.

2. Es zeigt sich, dass in den Kulturen die peptidergen Neurotransmitter NPY, VIP, CCK und SS exprimiert werden. Sie werden in unterschiedlichem Maße in den Kulturen vom gesamten Hippokampus, der CA3a/CA3b und des G.dent. ausgeprägt. Die Experimente belegen, dass entgegen der weithin angenommenen GABAergen Natur hippocampaler Interneurone ein signifikanter Anteil NPY-, VIP- und CCKerger Neurone nicht GABAerg sind. Bei SS gibt es diese Abweichung nicht. Bei NPY wurde nur ein kleiner Prozentsatz nicht GABAerger Neurone in der Hippocampus- (16,3%) und G.dent.-Kultur (6,7%) identifiziert. In den untersuchten VIP- und CCK-Populationen überwiegt der Anteil nicht GABAerger Neurone in der Hippocampus- (71,3% VIP; 82,7% CCK) und G.dent.-Kultur (61,7% VIP; 63,8% CCK) bei VIP auch in der CA3a/CA3b-Kultur (85,8%). Die fehlenden Afferenzen und die nicht vorhandene laminäre Schichtung in der Zellkultur sind für diese Unterschiede gegenüber den in-situ Verhältnissen verantwortlich.

3. An gekindelten Ratten und Kontrolltieren wurden markierte NPY- und SSerge Neurone verglichen. Bei NPYergen Neuronen zeigt sich eine signifikante Zunahme in der

Neuronendichte der CA3-Region und eine signifikante Abnahme im Gyrus dentatus.

4. Es wurde untersucht, ob in der Kultur bei Deltamethringabe ähnliche Effekte zu beobachten sind wie an gekindelten Ratten. An der Kultur ist die Auswirkung unterschiedlicher Konzentrationen von Deltamethrin auf die Neuronensubpopulationen analysiert worden. Dabei wurden zum ersten Mal Konzentrationen von Deltamethrin eingesetzt, die für die Humantoxikologie relevant sind. Die Untersuchungen zeigen eine ähnliche Veränderung der peptidergen Interneurone unter Deltamethringabe wie beim Kindling. Die NPY-Expression wurde massiv gesteigert, während SS-positive Interneurone sich signifikant verringerten. Es ist eine signifikante Abnahme von synaptischen Kontakten an Pyramidenzellen festzustellen. Deltamethrin wirkt in den verwendeten Konzentrationen nicht an Natriumkanälen. Deltamethrin führt in den Kulturen zu ähnlichen Veränderungen, wie bei Zuständen erhöhter Erregbarkeit durch Epilepsie, Kindling- oder Kainic-Säure-Experimenten.

Diese Arbeit zeigt, wie variabel ein neuronales Netzwerk in der Entwicklung und im adulten Zustand Neurotransmitter exprimiert und wie stark es dabei auf Afferenzen und laminäre Schichtung angewiesen ist. Es wird ebenfalls gezeigt, wie plastisch der Hippocampus in situ und Kultur auf veränderte Bedingungen wie beim Kindling und der Deltamethrinbehandlung die Neurotransmittersubsets (Ausprägungen) anpaßt.

Summary

The internal structure of the hippocampus, especially the development of neuronal circuits, is the subject of current research. The hippocampal primary culture represents a suitable model to study neuronal development and the impact of isolated stimuli and noxious. Focus of the following considerations are the neurons of the hippocampus, especially the peptidergic neurotransmitters somatostatin (SS), neuropeptide Y (NPY), vasoactive intestinal peptide (VIP) and cholecystokinin (CCK).

By using the content of peptidergic neurotransmitters interneurons can be sub-classified. Studies on the expression of peptidergic neurotransmitters in interneurons of primary cultures of the hippocampus are not yet available. In this work the model of hippocampal embryonic primary culture was expanded on the peptidergic neurotransmitters. The sub-regions of the dentate gyrus (G.dent) and CA3a/CA3b were cultured separately. The existing neurons were analyzed and compared in situ as in vitro for their content of peptidergic neurotransmitters like SS, NPY, CCK and VIP. In addition, the cultures were

checked to see if these neurotransmitters were in colocalization with glutamate decarboxylase (GAD65), a marker of GABAergic neurons. It turns out that in the cultures the peptidergic neurotransmitters NPY, VIP, CCK, and SS are expressed. They are present in varying degrees in the cultures of the entire hippocampus, the CA3a/CA3b and G.dent. The experiments show that, contrary to the widely accepted nature of hippocampal GABAergic interneurons, a significant proportion of NPY-, VIP- and CCK neurons are not GABAergic. In SS, there was no such deviation. Only a small percentage of NPY-positive neurons in the hippocampus- and G.dent. culture were not identified as GABAergic neurons. In the investigated VIP- and CCK-populations, non GABAergic Neurons were predominant in the hippocampus- and G.dent. culture, VIP was also present in the CA3a/CA3b-culture. Perhaps, the absence of foreign afferents from results.

In kindled rats and control animals labeled NPY-positive- and SS-positive neurons were compared. With NPYergic neurons, a significant increase in the density of neurons in the CA3 region and a significant decrease in the dentate gyrus was shown. Furthermore, it was tested whether Deltamethrin application affects the culture similarly to kindled rats. In culture, the effect of different concentrations of deltamethrin was examined on the subpopulations of neurons. It was the first time that deltamethrin concentrations that are relevant to human toxicology has been used. This study showed a similar change of peptidergic interneurons under the application of deltamethrin as with kindling. The NPY expression increased massively, while SS-positive interneurons were significantly reduced. Deltamethrin application shows a significant decrease of synaptic contacts on pyramidal cells. In the concentrations used deltamethrin does not affect sodium channels. Deltamethrin leads to similar changes in the cultures, as seen in conditions of increased excitability for example in epilepsy, kindling or Kainic acid experiments.

This work shows the variable expression of neurotransmitters in the development and adult state of a neuronal network and its dependency on afferents and lamina layers. It also shows how plastic the hippocampus in vivo and cultures adapt their neurotransmitter subsets to changing conditions of kindling and the application of deltamethrin.

Schlagwörter: primäre hippocampale Zellkultur, peptiderge Neurotransmitter, NPY; VIP; CCK, SS, Deltamethrin, Kindling,

Keywords: hippocampal primary culture, peptidergic neurotransmitters, NPY, VIP, CCK, SS, deltamethrin, kindling

7 Literaturverzeichnis

- Acsády et al., 1996a: Acsády L, Arabadzisz D, Freund TF. Correlated morphological and neurochemical features identify different subsets of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons in rat hippocampus. *Neuroscience*. 1996; 73(2), S.299-315.
- Acsády et al., 1996b: Acsády L, Görcs TJ, Freund TF. Different populations of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons are specialized to control pyramidal cells or interneurons in the hippocampus. *Neuroscience*. 1996; 73(2), S.317-334.
- Acsády et al., 2000: Acsády L, Katona I, Martinez-Guijarro FJ, Buzsáki G, Freund TF. Unusual target selectivity of perisomatic inhibitory cells in the hilar region of the rat hippocampus. *J Neurosci*. 2000; 20, S.6907-6919.
- Ahnert-Hilger and Jahn, 2008: Ahnert-Hilger G, Jahn R. Into great silence without VGLUT3. *Neuron*. 2008; 57(2), S.173-174.
- Ahnert-Hilger et al., 1995: Ahnert-Hilger G, Schäfer T, Spicher K, Grund C, Schultz G, Wiedenmann B. Detection of G-protein heterotrimers on large dense core and small synaptic vesicles of neuroendocrine and neuronal cells. 1995; 65(1), S.26-38.
- Bannon et al., 2000: Bannon AW, Seda J, Carmouche M, Francis JM, Norman MH, Karbon B, McCaleb ML. Behavioral characterization of neuropeptide Y knockout mice. *Brain Res*. 2000; 868(1), S.79-87.
- Baraban and Tallent, 2004: Baraban SC, Tallent MK. Interneuron diversity series: Interneuronal neuropeptides - endogenous regulators of neuronal excitability. *Trends Neurosci*. 2004; 27(3), S.135-142.
- Baraban et al., 1997: Baraban SC, Hollopeter G, Erickson JC, Schwartzkroin PA, Palmiter RD. Knock-out mice reveal a critical antiepileptic role for neuropeptide Y. *J Neurosci*. 1997; 17(23), S.8927-8936.
- Bayraktar et al., 1997: Bayraktar T, Staiger JF, Acsády L, Cozzari C, Freund TF, Zilles K. Co-localization of vasoactive intestinal polypeptide, gamma-aminobutyric acid and choline acetyltransferase in neocortical interneurons of the adult rat. *Brain Res*. 1997; 757(2), S.209-217.
- Behar and Rothman, 2001: Behar KL, Rothman DL. In vivo nuclear magnetic resonance studies of glutamate-g-aminobutyric acid-glutamine cycling in rodent and human cortex: the central role of glutamine. *J Nutr*. 2001; 131(9 Suppl), S.2498S-2404S; discussion 2523S-2524S.
- Ben-Ari, 2002: Ben-Ari Y. Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci*. 2002; 3, S.728-739.
- Ben-Ari et al., 2007: Ben-Ari Y, Gaiarsa JL, Tyrzio R, Khasipov R. GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev*. 2007; 87(4), S.1215-1284.

- Bering et al., 1997: Bering R, Draguhn A, Diemer NH, Johansen FF. Ischemia changes the coexpression of somatostatin and neuropeptide Y in hippocampal interneurons. *Exp Brain Res.* 1997; *115(3)*, S.423-429.
- Blasco-Ibanez and Freund, 1995: Blasco-Ibanez JM, Freund TF. Synaptic input of horizontal interneurons in stratum oriens of the hippocampal CA1 subfield: structural basis of feed-back activation. *Eur J Neurosci.* 1995; *7(10)*, S.2170-2180.
- Blondel et al., 2000: Blondel O, Collin C, McCarran WJ, Zhu S, Zamostiano R, Gozes I, Brenneman DE, McKay RD. A glia-derived signal regulating neuronal differentiation. *J Neurosci.* 2000; *20(21)*, S.8012-8020.
- Bonifazi et al., 2009: Bonifazi P, Goldin M, Picardo MA, Jorquera I, Cattani A, Bianconi G, Represa A, Ben-Ari Y, Cossart R. GABAergic hub neurons orchestrate synchrony in developing hippocampal networks. *Science.* 2009; *326(5958)*, S.1419-1424.
- Boulland et al., 2004: Boulland JL, Qureshi T, Seal RP, Rafiki A, Gundersen V, Bergersen LH, Fermeau RT Jr, Edwards RH, Strom-Mathisen J, Chaudhry FA. Expression of the vesicular glutamate transporters during development indicates the widespread corelease of multiple neurotransmitters. *J Comp Neurol.* 2004; *480(3)*, S.264-280.
- Boulland et al., 2009: Boulland JL, Jenstad M, Boekel AJ, Wouterlood FG, Edwards RH, Strom-Mathisen J, Chaudhry FA. Vesicular glutamate and ABA transporters sort to distinct sets of vesicles in a population of presynaptic terminals. *Cereb Cortex.* 2009; *19(1)*, S.241-248.
- Bradwejn and Vasar, 1995: Hrsg.: Bradwejn J, Vasar E: Cholecystokinin and anxiety: From neuron to behavior. New York, NY, Springer.
- Brazeau et al., 1972: Brazeau P Jr, Saucier R, Husain SM. Activities of hypothalamic HL-STH, of hypophyseal STH and of mimetic STH of plasma in adult and immature rats treated with enovid. *Can J Physiol Pharmacol.* 1972; *50(10)*, S.967-970.
- Brenneman and Eiden, 1986: Brenneman DE, Eiden LE. Vasoactive intestinal peptide and electrical activity influence neuronal survival. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; *83*, S.1159-1162.
- Broca, 1878: Broca P. Anatomie comparée des circonvolutions cérébrales: le grand lobe limbique. *Rev. Anthropol.* 1878; *1*, S.385-498.
- Brooks et al., 1987: Brooks PA, Kelly JS, Allen JM, Smith DA, Stone TW. Direct excitatory effects of neuropeptide Y (NPY) on rat hippocampal neurons in vitro. *Brain Res.* 1987; *408(1-2)*, S.295-298.
- Chédotal et al., 1994: Chédotal A, Cozzari C, Faure MP, Hartman BK, Hamel E. Distinct choline acetyltransferase (ChAT) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) bipolar neurons project to local blood vessels in the rat cerebral cortex. *Brain Res.* 1994; *646(2)*, S.181-193.
- Chen et al., 2007: Chen D, Huang X, Liu L, Shi N. Deltamethrin induces mitochondrial membrane permeability and altered expression of cytochrome C in rat brain. *J Appl Toxicol.* 2007; *27(4)*, S.368-372.

- Chronwall et al., 1985: Chronwall BM, DiMaggio DA, Massari VJ, Pickel VM, Riggiero DA, O'Donohue TL. The anatomy of neuropeptide-Y-containing neurons in rat brain. *Neuroscience*. 1985; *15*, S.1159-1181.
- Clark et al., 1984: Clark JT, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP. Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology*. 1984; *115(1)*, S.427-429.
- Colmers et al., 1987: Colmers WF, Lukowiak K, Pittman QJ. Presynaptic action of neuropeptide Y area CA1 of the rat hippocampal slice. *J Physiol*. 1987; *383*, S.143-150.
- Colmers et al., 1991: Colmers WF, Klapstein GJ, Fournier A, St-Pierre S, Treherne KA. Presynaptic inhibition by neuropeptide Y in rat hippocampal slice in vitro is mediated by a Y2 receptor. *Br J Pharmacol*. 1991; *102(1)*, S.41-44.
- Conner et al., 1997: Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S. Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci*. 1997; *17*, S.2295-2313.
- de Lanerolle et al., 1989: de Lanerolle NC, Kim JH, Robbins RJ, Spencer DD. Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. *Brain Res*. 1989; *495(2)*, S.387-395.
- de Quidt and Emson, 1986: de Quidt ME, Emson PC. Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the rat central nervous system-11. Immunohistochemical analysis. *Neuroscience*. 1986; *18*, S.545-618.
- Deller and Leranth, 1990: Deller T, Leranth C. Synaptic connections of neuropeptide Y (NPY) immunoreactive neurons in the hilar area of the rat hippocampus. *J Comp Neurol*. 1990; *300(3)*, S.433-447.
- DePrato Primeaux et al., 2000: DePrato Primeaux S, Holmes PV, Martin RJ, Dean RG, Edwards GL. Experimentally induced attenuation of neuropeptide Y gene expression in transgenic mice increases mortality rate following seizures. *Neurosci Lett*. 2000; *287(1)*, S.61-64.
- Dickson et al., 2006: Dickson L, Aramori I, McCulloch J, Sharkey J, Finlayson K. A systemic comparison of intracellular cyclic AMP and calcium signaling highlights complexities in human VPAC/PAC receptor pharmacology. *Neuropharmacology*. 2006; *51(6)*, S.1086-1098.
- Dockray, 1976: Dockray GJ. Immunohistochemical evidence of cholecystokinin-like peptides in brain. *Nature*. 1976; *264*, S.568-570.
- Duggan et al., 1991: Duggan AW, Hope PJ, Lang CW. Microinjection of neuropeptide Y into the superficial dorsal horn reduces stimulus-evoked release of immunoreactive substance P in the anaesthetized cat. *Neuroscience*. 1991; *44(3)*, S.733-740.
- Duus, 1995: Duus P. *Neurologisch-topische Diagnostik*. Thieme. 1995.
- Erickson et al., 1996: Erickson JC, Clegg KE, Palmiter RD. Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature*. 1996; *381(6581)*, S.415-421.

- Esclapez and Houser, 1995: Esclapez M, Houser CR. Somatostatin neurons are a subpopulation of GABA neurons in the rat dentate gyrus: evidence from colocalization of pre-prosomatostatin and glutamate decarboxylase messenger RNAs. *Neuroscience*. 1995; *64*(2), S.339-355.
- Fermeau et al., 2002: Fermeau RT Jr, Burman J, Qureshi T, Tran CH, Proctor J, Johanson J, Zhang H, Sulzer D, Copenhagen DR, Strom-Mathisen J, Reimer RJ, Chaudhry FA, Edwards RH. The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; *99*(22), S.14488-14493.
- Flood et al., 1987: Flood JF, Hernandez EN, Morley JE. Modulation of memory processing by neuropeptide Y. *Brain Res*. 1987; *421*(1-2), S.280-290.
- Freund and Maglóczy, 1993: Freund TF, Maglóczy Z. Early degeneration of calretinin-containing neurons in the rat hippocampus after ischemia. *Neuroscience*. 1993; *56*(3), S.581-596.
- Freund et al., 1990: Freund TF, Buzsáki G, Leon A, Baimbridge KG, Somogyi P. Relationship of neuronal vulnerability and calcium binding protein immunoreactivity in ischemia. *Exp Brain Res*. 1990; *83*, S.55-66.
- Freund et al., 1992: Freund TF, Ylinen A, Miettinen R, Pitkanen A, Lahtinen H, Baimbridge KG, Riekkinen PJ. Pattern of neuronal death in the rat hippocampus after status epilepticus. Relationship to calcium binding protein content and ischemic vulnerability. *Brain Res Bull*. 1992; S.2827-2838.
- Freund and Buzsáki, 1996: Freund TF, Buzsáki G. Interneurons of the Hippocampus. *Hippocampus*. 1996; *6*, S.347-470.
- Frotscher et al., 1986: Frotscher M, Schlander M, Léránth C. Cholinergic neurons in the hippocampus. A combined light- and electron-microscopic immunocytochemical study in the rat. *Cell Tissue Res*. 1986; *246*(2), S.293-301.
- Gabellec et al., 2007: Gabellec MM, Panzanelli P, Sassoè-Pognetto M, Lledo PM. Synapse-specific localization of vesicular glutamate transporters in the rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci*. 2007; *25*(5), S.1373-1383.
- Gloveli et al., 2003: Gloveli T, Behr J, Dugladze T, Kokaia Z, Kokaia M, Heinemann U. Kindling alters entorhinal cortex-hippocampal interaction by increased efficacy of presynaptic GABA(B) autoreceptors in layer III of the entorhinal cortex. *Neurobiol Dis*. 2003; *13*(3), S.203-212.
- Gras et al., 2002: Gras C, Herzog E, Belenchi GC, Bernard V, Ravassard P, Pohl M, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S. A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci*. 2002; *22*(13), S.5442-5451.
- Gras et al., 2005: Gras C, Vinatier J, Amilhon B, Guerci A, Christov C, Ravassard P, Giros B, El Mestikawy S. Developmentally regulated expression of VGLUT3 during early post-natal life. *Neuropharmacology*. 2005; *49*(6), S.901-911.
- Gras et al., 2008: Gras C, Amilhon B, Lepicard B, Poirel O, Vinatier J, Herbin M, Dumas S, Tzavara ET, Wade MR, Nomikos GG, Hanoun N, Saurini F, Kemel ML, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S.

- The vesicular glutamate transporter VGLUT3 synergizes striatal acetylcholine tone. *Nat Neurosci.* 2008; *11(3)*, S.292-300.
- Greber et al., 1994: Greber S, Schwarzer C, Sperk G. Neuropeptide Y inhibits potassium-stimulated glutamate release through Y2 receptors in rat hippocampal slices in vitro. *Br J Pharmacol.* 1994; *113(3)*, S.737-740.
- Gressens et al., 1993: Gressens P, Hill JM, Gozes I, Fridkin M, Brenneman DE. Growth factor function of vasoactive intestinal peptide in whole cultured mouse embryos. *Nature.* 1993; *362(6416)*, S.155-158.
- Gressens et al., 1998: Gressens P, Paindaveine B, Hill JM, Evrard P, Brenneman DE. Vasoactive intestinal peptide shortens both G1 and S phases of neural cell cycle in whole postimplantation cultured mouse embryos. *Eur J Neurosci.* 1998; *10(5)*, S.1734-1742.
- Grosse et al., 1998: Grosse G, Tapp R, Wartenberg M, Sauer H, Fox PA, Grosse J, Gratzl M, Bermann M. Prenatal hippocampal granule cells in primary cell culture from mossy fiber boutons at pyramidal cell dendrites. *J Neurosci Res.* 1998; *51(5)*, S.602-611.
- Grosse et al., 2000: Grosse G, Draguhn A, Höhne L, Tapp R, Veh RW, Ahnert-Hilger G. Expression of Kv1 potassium channels in mouse hippocampal primary cultures: development and activity-dependent regulation. *J Neurosci.* 2000; *20(5)*, S.1869-1882.
- Grosse et al., 2003: Grosse G, Eulitz D, Thiele T, Pahner I, Schröter S, Takamori S, Grosse J, Wickman K, Tapp R, Veh RW, Ottersen OP, Ahnert-Hilger G. Axonal sorting of Kir3.3 defines a GABA-containing neuron in the CA3 region of rodent hippocampus. *Mol Cell Neurosci.* 2003; *24(3)*, S.709-724.
- Grosse, Thiele et al., 2002: Grosse G, Thiele T, Heukendorf E, Schopp E, Merder S, Pickert G, Ahnert-Hilger G. Deltamethrin differentially affects neuronal subtypes in hippocampal primary culture. *Neuroscience.* 2002; *122(1)*, S.233-241.
- Gulyás and Freund, 1996: Gulyás AI, Freund TF. Pyramidal cell dendrites are the primary targets of calbindin D28k-immunoreactive interneurons in the hippocampus. *Hippocampus.* 1996; *6*, S.525-534.
- Gutiérrez, 2005: Gutiérrez R. The dual glutamatergic-GABAergic phenotype of hippocampal granule cells. *Trends Neurosci.* 2005; *28(6)*, S.297-303.
- Gutiérrez and Heinemann, 2001: Gutiérrez R, Heinemann U. Kindling induces transient fast inhibition in the dentate gyrus-CA3 projection. *Eur J Neurosci.* 2001; *13(7)*, S.1371-1379.
- Hájos et al., 1996: Hájos N, Acsády L, Freund TF. Target selectivity and neurochemical characteristics of VIP-immunoreactive interneurons in the rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci.* 1996; *8(7)*, S.1415-1431.
- Harrington and Schak, 2000: Harrington ME, Schak KM. Neuropeptide Y phase advances the in vitro hamster circadian clock during the subjective day with no effect on phase during the subjective night. *Can J Physiol Pharmacol.* 2000; *78(2)*, S.87-92.

- Harris et al., 1985: Harris KM, Marshall PE, Landis DM. Ultrastructural study of cholecystokinin-immunoreactive cells and processes in area CA1 of the rat hippocampus. *J Comp Neurol.* 1985; 233(2), S.147-158.
- Heilig et al., 1989: Heilig M, Soderpalm B, Engel JA, Widerlov E. Centrally administered neuropeptide Y (NPY) produces anxiolytic-like effects in animal anxiety models. *Psychopharmacology.* 1989; 98(4), S.524-529.
- Herzog et al., 2004: Herzog E, Gilchrist J, Gras C, Muzerelle A, Ravassard P, Giros B, Gaspar P El Mestikawy S. Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. *Neuroscience.* 2004; 123(4), S.983-1002.
- Hsu and Buzsáki, 1993: Hsu M, Buzsáki G. Vulnerability of mossy fiber targets in the rat hippocampus to forebrain ischemia. *J Neurosci.* 1993; 13(9), S.3964-3979.
- Hua et al., 1991: Hua XY, Boublik JH, Spicer MA, Rivier JE, Broen MR, Yaksh TL. The antinociceptive effects of spinally administered neuropeptide Y in the rat: systematic studies on structure-activity relationship. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991; 258(1), S.243-248.
- Huang and Reichardt, 2001: Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 2001; 24, S.677-736.
- Huang and Reichardt, 2003: Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 2003; 72, S.609-642.
- Humpel et al., 1993: Humpel C, Wetmore C, Olson L. Regulation of brain-derived neurotrophic factor messenger RNA and protein at the cellular level in pentylenetetrazol-induced epileptic seizures. *Neuroscience.* 1993; 53, S.909-918.
- Innis and Snyder, 1980: Innis RB, Snyder SH. Cholecystokinin receptor binding in brain and pancreas: Regulation of pancreatic binding by cyclic and acyclic guanine nucleotides. *European Journal of Pharmacology.* 1980; 65, S.123-124.
- Iversen and Bloom, 1972: Iversen LL, Bloom FE. Studies of the uptake of ³H-GABA and (3H)glycine in slices and homogenates of the rat brain and spinal cord by electron microscopic autoradiography. *Brain Res.* 1972; 41(1), S.131-143.
- Ivy and Oldberg, 1928: Ivy AC, Oldberg E. A hormone mechanism for gallbladder contraction and evacuation. *American Journal of Physiology.* 1928; 86, S.599-613.
- Iwanaga et al., 1983: Iwanaga T, Ito S, Yamada Y, Fujita T. Cytochemical demonstration of somatostatin 28-(1-14)-like immunoreactivity in the rat hypothalamus and gastro-entero-pancreatic endocrine system. *Endocrinology.* 1983; 113(5), S.1839-1844.
- Jinno and Kosaka, 2000: Jinno S, Kosaka T. Colocalization of parvalbumin and somatostatin-like immunoreactivity in the mouse hippocampus: quantitative analysis with optical dissector. *J Comp Neurol.* 2000; 428(3), S.337-388.

- Jinno and Kosaka, 2003: Jinno S, Kosaka T. Patterns of expression of neuropeptides in GABAergic nonprincipal neurons in the mouse hippocampus: Quantitative analysis with optical disector. *J Comp Neurol.* 2003; *461*(3), S.333-349.
- Johansen et al., 1990: Johansen FF, Tønder N, Zimmer J, Baimbridge KG, Diemer NH. Short-term changes of parvalbumin and calbindin immunoreactivity in the rat hippocampus following cerebral ischemia. *Neurosci Lett.* 1990; *120*, S.171-174.
- Johansson et al., 1984: Johansson O, Hökfelt T, Elde RP. Immunohistochemical distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the central nervous system of the adult rat. *Neuroscience.* 1984; *13*(2), S.265-339.
- Jones et al., 2003: Jones SP, Rahimi O, O'Boyle MP, Diaz DL, Claiborne BJ. Maturation of granule cell dendrites after mossy fiber arrival in hippocampal field CA3. *Hippocampus.* 2003; *13*(3), S.413-427.
- Kalra et al., 1998: Kalra SP, Xu B, Dube MG, Moldawer LL, Martin D, Kalra PS. Leptin and ciliary neurotropic factor (CNTF) inhibit fasting-induced suppression of luteinizing hormone release in rats: role of neuropeptide Y. *Neurosci Lett.* 1998; *240*(1), S.45-49.
- Klapstein and Colmers, 1997: Klapstein GJ, Colmers WF. Neuropeptide Y suppresses epileptiform activity in rat hippocampus in vitro. *J Neurophysiol.* 1997; *78*(3), S.1651-1661.
- Klemp and Woldbye, 2001: Klemp K, Woldbye DP. Repeated inhibitory effects of NPY on hippocampal CA3 seizures and wet dog shakes. *Peptides.* 2001; *22*(3), S.523-527.
- Köhler, 1982: Köhler C. Distribution and morphology of vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactive neurons in region superior of the rat hippocampal formation. *Neurosci Lett.* 1982; *33*, S.265-270.
- Köhler, 1983: Köhler C. Morphological analysis of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-like immunoreactive neurons in the area dentate of the rat brain. *J Comp Neurol.* 1983; *221*, S.247-262.
- Köhler and Chan-Palay, 1982: Köhler C, Chan-Palay V. Somatostatin-like immunoreactive neurons in the hippocampus: an immunocytochemical study in the rat. *Neurosci Lett.* 1982; *34*(3), S.259-264.
- Köhler et al., 1986: Köhler C, Eriksson L, Davies S, Chan-Palay V. Neuropeptide Y innervation of the hippocampal region in the rat and monkey brain. *J Comp Neurol.* 1986; *244*, S.384-400.
- Köhler et al., 1987: Köhler C, Eriksson LG, Davies S, Chan-Palay V. Co-localization of neuropeptide tyrosine and somatostatin immunoreactivity in neurons of individual subfields of the rat hippocampal region. *Neurosci Lett.* 1987; *78*, S.1-6.
- Kosaka et al., 1985: Kosaka T, Kosaka K, Tateishi K, Hamaoka Y, Yanaihara N, Wu JY, Hama K. GABAergic neurons containing CCK-8-like and/or VIP-like immunoreactivities in the rat hippocampus and dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 1985; *239*(4), S.420-430.
- Kosaka et al., 1988: Kosaka T, Wu JY, Benoit R. GABAergic neurons containing somatostatin-like immunoreactivity in the rat hippocampus and dentate gyrus. *Exp Brain Res.* 1988; *71*(2), S.388-398.

- Krnjevic and Schwartz, 1967: Krnjevic K, Schwartz S. The action of gamma-aminobutyric acid on cortical neurons. *Exp Brain Res.* 1967; 3(4), S.320-336.
- Laburthe et al., 1993: Laburthe M, Kitabgi P, Couvineau A, Amiranoff B. Peptide receptors and signal transduction in the digestive tract. *Handbook of Experimental Pharmacology.* Berlin, Springer-Verlag. 1993.
- Leenders et al., 1999: Leenders AGM, Scholtern G, Wiegant VM, Lopes da Silva FH, Ghijsen WEJM. Activity-dependent neurotransmitter release kinetics: Correlation with changes in morphological distributions of small and large vesicles in central nerve terminals. *European Journal of Neuroscience.* 1999; 11, S.4269-4277.
- Leranth et al., 1984: Leranth C, Frotscher M, Tombol T, Palkovits M. Ultrastructure and synaptic connections of vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactive non-pyramidal neurons and axon terminals in the rat hippocampus. *Neuroscience.* 1984; 12, S.531-542.
- Leranth et al., 1990: Leranth C, Malcolm AJ, Frotscher M. Afferent and efferent synaptic connections of somatostatin-immunoreactive neurons in the rat fascia dentata. *J Comp Neurol.* 1990; 295(1), S.111-122.
- Lindvall et al., 1994: Lindvall O, Kokaia Z, Bengzon J, Elmer E, Kokaia M. Neurotrophins and brain insults. *Trends Neurosci.* 1994; 17, S.490-496.
- Lledo et al., 2006: Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7(3), S.179-193.
- Lloyd, 1946: Lloyd DP. Facilitation and inhibition of spinal motoneurons. *J Neurophysiol.* 1946; 9(6), S.421-438.
- Lorén et al., 1979: Lorén I, Emson PC, Fahrenkrug J, Björklund A, Alumets J, Hakanson R, Sundler F. Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat and mouse brain. *Neuroscience.* 1979; 4(12), S.1953-1976.
- MacLean, 1952: MacLean, PD. Some psychiatric implications of physiological studies on frontotemporal portion of limbic system(visceral brain). *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology.* 1952; 4(4), S.407-418.
- Majkowski, 2002: Majkowski J. Das Kindling-Modell und seine klinischen Anwendungen. *Nervenheilkunde.* 2002; 21, S.467-470.
- Mátyás et al., 2004: Mátyás F, Freund TF, Gulyás AI. Convergence of excitatory and inhibitory inputs onto CCK-containing basket cells in the CA1 area of the rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience.* 2004; 19, S.1243-1256.
- McCulloch et al., 2000: McCulloch DA, Lutz EM, Johnson MS, MacKenzie CJ, Mitchell R. Differential activation of phospholipase D by VPAC and PAC1 receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 921, S.175-185.

- McQuiston and Colmers, 1992: McQuiston AR, Colmers WF. Neuropeptide Y does not alter NMDA conductances in CA3 pyramidal neurons: a slice-patch study. *Neurosci Lett.* 1992; *138*, S.261-264.
- Merlio et al., 1993: Merlio JP, Ernfors P, Kokaia Z, Middlemas DS, Bengzon J, Kokaia M, Smith ML, Siesjö BK, Hunter T, Lindvall O. Increased production of the Trk protein tyrosine kinase receptor after brain insults. *Neuron.* 1993; *10*, S.151-164.
- Michel et al., 1998: Michel MC, Beck-Sickinger AG, Cox H, Doods HN, Herzog H, Larjammar D, Quirion R, Schwartz T, Westfall T. XVI International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacol Rev.* 1998; *50*, S.143-150.
- Mikkelsen and Woldbye, 2006: Mikkelsen JD, Woldbye DP. Accumulated increase in neuropeptide Y and somatostatin gene expression of the rat in response to repeated electroconvulsive stimulation. *J Psychiatr Res.* 2006; *40(2)*, S.153-159.
- Milner and Bacon, 1989: Milner TA, Bacon CE. Ultrastructural localization of somatostatin-like immunoreactivity in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 1989; *290*, S.544-560.
- Milner and Veznedaroglu, 1992: Milner TA, Veznedaroglu E. Ultrastructural localization of neuropeptide-Y-like-immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *Hippocampus.* 1992; *2*, S.107-126.
- Ming and Song, 2005: Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 2005; *28*, S.223-250.
- Monnet et al., 1992: Monnet FP, Fournier A, Debonnel G, de Montigny C. Neuropeptide Y potentiates selectively the N-methyl-D-aspartate response in the rat CA3 dorsal hippocampus. I. Involvement of an atypical neuropeptide Y receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992; *263(3)*, S.1212-1218.
- Morales-Medina et al., 2010: Morales-Medina JC, Dumont Y, Quirion R. A possible role of neuropeptide Y in depression and stress. *Brain Res.* 2010; *1314*, S.194-205.
- Morozov and Freund, 2003: Morozov YM, Freund TF. Postnatal development and migration of cholecystokinin-immunoreactive interneurons in rat hippocampus. *Neuroscience.* 2003; *120(4)*, S.923-939.
- Morrison et al., 1982: Morrison JH, Benoit R, Magistretti PJ, Ling N, Bloom FE. Immunohistochemical distribution of pro-somatostatin-related peptides in hippocampus. *Neurosci Lett.* 1982; *34(2)*, S.137-142.
- Moyse et al., 1984: Moyse E, Benoit R, Enjalbert A, Gautron JP, Kordon C, Ling N, Epelbaum J. Subcellular distribution of somatostatin-14, somatostatin-28 and somatostatin-28 (1-12) in rat brain cortex and comparison of their respective binding sites in brain and pituitary. *Regul Pept.* 1984; *9(1-2)*, S.129-137.
- Nabekura et al., 2004: Nabekura J, Katsurabayashi S, Kakazu Y, Shibata S, Matsubara A, Jinno S, Mizoguchi Y, Sasaki A, Ishibashi H. Development switch from GABA to glycine release in single central terminals. *Nat Neurosci.* 2004; *7(1)*, S.17-23.

- Nakamura et al., 2007: Nakamura NH, Akama KT, Yuen GS, McEwen BS. Thinking outside the pyramidal cell: unexplored contributions of interneurons and neuropeptide Y to estrogen-induced synapse formation in the hippocampus. *Rev Neurosci.* 2007; *18(1)*, S.1-13.
- Narahashi, 1996: Narahashi T. Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacol Toxicol.* 1996; *78*, S.1-14.
- Naus et al., 1988: Naus CC, Morrison JH, Bloom FE. Development of somatostatin-containing neurons and fibers in the rat hippocampus. *Brain Res.* 1988; *468(1)*, S.113-121.
- Nawa et al., 1995: Nawa H, Carnahan J, Gall C. BDNF protein measured by a novel enzyme immunoassay in normal brain and after seizure: partial disagreement with mRNA levels. *Eur J Neurosci.* 1995; *7*, S.1527-1535.
- Nitsch et al., 1990: Nitsch R, Leranth C, Frotscher M. Most somatostatin-immunoreactive neurons in the rat fascia dentata do not contain the calcium-binding protein parvalbumin. *Brain Res.* 1990; *528(2)*, S.327-329.
- Noble and Roques, 1999: Noble F, Roques BP. CCK-B receptor: chemistry, molecular biology, biochemistry and pharmacology. *Prog Neurobiol.* 1999; *58(4)*, S.349-379.
- Noble et al., 1999: Noble F, Wank SA, Crawley JN, Bradwejn J, Seroogy KB, Hamon M, Roques BP. International Union of Pharmacology. XXI. Structure, distribution, and functions of cholecystokinin receptors. *Pharmacol Rev.* 1999; *51(4)*, S.745-781.
- Palmada and Centelles, 1998: Palmada M, Centelles JJ. Excitatory amino acid neurotransmission. Pathways for metabolism, storage and reuptake of glutamate in brain. *Frontiers in Bioscience.* 1998; *3*, S.d701-718.
- Paredes et al., 2003: Paredes MF, Greenwood J, Baraban SC. Neuropeptide Y modulates a G protein-coupled inwardly rectifying potassium current in the mouse hippocampus. *Neurosci Lett.* 2003; *340*, S.9-12.
- Pleasure et al., 2000: Pleasure SJ, Anderson S, Hevner R, Bagri A, Marin O, Lowenstein DH, Rubenstein JL. Cell migration from the ganglionic eminences is required for the development of hippocampal GABAergic interneurons. *Neuron.* 2000; *28(3)*, S.727-740.
- Poo, 2001: Poo MM. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci.* 2001; *2*, S.24-32.
- Rehfeld and Nielsen, 1995: Rehfeld JF, Nielsen FC. Molecular forms and regional distribution of cholecystokinin in the central nervous system. Hrsg.: Bradwejn J, Vasar E: Cholecystokinin and anxiety: From neuron to behavior. New York, NY, Springer. 1995. S.33-56.
- Reibel et al., 2001: Reibel S, Nadi S, Benmaamar R, Larmet Y, Carnahan J, Marescaux C, Depaulis A. Neuropeptide Y and epilepsy: varying effects according to seizure type and receptor activation. *Peptides.* 2001; *22(3)*, S.529-39.
- Reichlin, 1983: Reichlin S. Somatostatin. *N Engl J Med.* 1983; *309*, S.1495-1501, 1556-1563.
- Reisine and Bell, 1995: Reisine T, Bell GI. Molecular biology of somatostatin receptors. *Endo Rev.* 1995; *16*, S.427-442.

- Roberts et al., 1984: Roberts GW, Woodhams PL, Polak JM, Crow TJ. Distribution of neuropeptides in the limbic system of the rat: the hippocampus. *Neuroscience*. 1984; *11*, S.35-77.
- Röder et al., 1996: Röder C, Schwarzer C, Vezzani A, Gobbi M, Mennini T, Sperk G. Autoradiographic analysis of neuropeptide Y receptor binding sites in the rat hippocampus after kainic acid-induced limbic seizures. *Neuroscience*. 1996; *70(1)*, S.47-55.
- Said, 1991: Said SI. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in lung function and disease. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi*. 1991; *29(12)*, S.1525-1531.
- Said, 1996: Said SI. Vasoactive intestinal peptide and nitric oxide: divergent roles in relationship to tissue injury. *Ann NY Acad Sci*. 1996; *805*, S.379-388.
- Scharfman et al., 2002: Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL, Croll SD. Spontaneous limbic seizures after intrahippocampal infusion of brain-derived neurotrophic factor. *Exp Neurol*. 2002; *174*, S.201-214.
- Scharfman et al., 2005: Scharfman H, Goodman J, Macleod A, Phani S, Antonelli C, Croll S. Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Exp Neurol*. 2005; *192(2)*, S.348-356.
- Schwartz, 2000: Schwartz JH. Neurotransmitters. Hrsg.: Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM: Principles of neural science. 4, New York, NY, McGraw-Hill. 2000. S.280-297.
- Seay-Lowe and Claiborne, 1992: Seay-Lowe SL, Claiborne BJ. Morphology of intracellularly labeled interneurons in the dentate gyrus of the immature rat. *J Comp Neurol*. 1992; *324(1)*, S.23-36.
- Seri et al., 2001: Seri B, García-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci*. 2001; *21(18)*, S.7153-7160.
- Silva et al., 2005: Silva AP, Xapelli S, Pinheiro PS, Ferreira R, Lourenco J, Cristóvão A, Grouzman E, Cavadas C, Oliveira CR, Malva JO. Up-regulation of neuropeptide Y levels and modulation of glutamate release through neuropeptide Y receptors in the hippocampus of kainate-induced epileptic rats. *J Neurochem*. 2005; *93(1)*, S.163-170.
- Sloviter and Nilaver, 1987: Sloviter RS, Nilaver G. Immunocytochemical localization of GABA-, cholecystokinin-, vasoactive intestinal polypeptide-, and somatostatin-like immunoreactivity in the area dentata and hippocampus of the rat. *J Comp Neurol*. 1987; *256(1)*, S.42-60.
- Somogyi et al., 1984: Somogyi P, Hodgson AJ, Smith AD, Nunzi MG, Gorio A, Wu JY. Different populations of GABAergic neurons in the visual cortex and hippocampus of cat contain somatostatin- or cholecystokinin-immunoreactive material. *J Neurosci*. 1984; *4(10)*, S.2590-2603.
- Somogyi et al., 2004: Somogyi J, Baude A, Omori Y, Shimizu H, El Mestikawy S, Fukaya M, Shigemoto R, Watanabe M, Somogyi P. GABAergic basket cells expressing cholecystokinin contain vesicular glutamate transporter type 3 (VGLUT3) in their synaptic terminals in hippocampus and isocortex of the rat. *Eur J Neurosci*. 2004; *19(3)*, S.552-569.
- Sperk et al., 2007: Sperk G, Hamilton T, Colmers WF. Neuropeptide Y in the dentate gyrus. *Prog Brain Res*. 2007; *163*, S.285-297.

- Spiess et al., 1979: Spiess I, Rivier JE, Rodkey JA, Bennett CD, Vale W. Isolation and characterization of somatostatin from pigeon pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76, S.2974-2978.
- Tarabean and Narahashi, 1998: Tarabean IV, Narahashi T. Potent modulation of tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels by the type II pyrethroid deltamethrin. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998; 284, S.958-965.
- Tatemoto et al., 1982: Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V. Neuropeptide Y – a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature*. 1982; 296(5858), S.659-660.
- Tønder et al., 1994a: Tønder N, Kragh J, Finsen BR, Bolwig TG, Zimmer J. Kindling induces transient changes in neuronal expression of somatostatin, neuropeptide Y, and calbindin in adult rat hippocampus and fascia dentata. *Epilepsia*. 1994; 35(6), S.1299-1308.
- Tønder et al., 1994b: Tønder N, Kragh J, Bolwig T, Zimmer J. Transient decrease in calbindin immunoreactivity of the rat fascia dentata granule cells after repeated electroconvulsive shocks. *Hippocampus*. 1994; 4(1), S.79-83.
- Uchigashima et al., 2007: Uchigashima M, Fukaya MM, Watanabe M, Kamiya H. Evidence against GABA release from glutamatergic mossy fiber terminals in the developing hippocampus. *J Neurosci*. 2007; 27(30), S.8088-8100.
- Usdin et al., 1994: Usdin TB, Bonner TI, Mezey E. 2 Receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions. *Endocrinology*. 1994; 135, S.2662-2680.
- Vega et al., 2010: Vega A, Luther JA, Birren SJ, Morales MA. Segregation of the classical transmitters norepinephrin and acetylcholine and the neuropeptide Y in sympathetic neurons: modulation by ciliary neurotrophic factor or prolonged growth in culture. *Dev Neurobiol*. 2010; 70(4), S.913-928.
- Veh et al., 1995: Veh RW, Lichtinghagen R, Sewing S, Wunder F, Grumbach IM, Pongs O. Immunohistochemical localization of five members of the Kv1 channel subunits: contrasting subcellular locations and neuron-specific co-localizations in rat brain. *Eur J Neurosci*. 1995; 7(11), S.2189-2205.
- Vezzani et al., 1996: Vezzani A, Schwarzzer C, Lothman EW, Williamson J, Sperk G. Functional changes in somatostatin and neuropeptide Y containing neurons in the rat hippocampus in chronic models of limbic seizures. *Epilepsy Res*. 1996; 26(1), S.267-279.
- Vezzani et al., 1999a: Vezzani A, Sperk G, Colmers WF. Neuropeptide Y: emerging evidence for a functional role in seizure modulation. *Trends Neurosci*. 1999; 22(1), S.25-30.
- Vezzani et al., 1999b: Vezzani A, Ravizza T, Moneta D, Conti M, Borroni A, Rizzi M, Samanin R, Maj R. Brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity in the limbic system of rats after acute seizures and during spontaneous convulsions: temporal evolution of changes as compared to neuropeptide Y. *Neuroscience*. 1999; 90, S.1445-1461.

- Vezzani et al., 2000: Vezzani A, Moneta D, Mulé F, Ravizza T, Gobbi M, French-Mullen J. Plastic changes in neuropeptide Y receptor subtypes in experimental models of limbic seizures. *Epilepsia*. 2000; *41 Suppl 6*, S.S115-121.
- Vezzani et al., 2002: Vezzani A, Michalkiewicz M, Michalkiewicz T, Moneta D, Ravizza T, Richichi C, Aliprandi M, Mulé F, Pirona L, Gobbi M, Schwarzer C, Sperk G. Seizure susceptibility and epileptogenesis are decreased in transgenic rats overexpressing neuropeptide Y. *Neuroscience*. 2002; *110(2)*, S.237-243.
- Weruaga et al., 1998: Weruaga E, Alonso JR, Porteros A, Crespo C, Arévalo R, Brinón JG, Velasco A, Aijón J. Nonspecific labeling of myelin with secondary antisera and high concentrations of Triton X-100. *J Histochem Cytochem*. 1998; *46(1)*, S.109-118.
- Woldbye et al., 1996: Woldbye DP, Madsen TM, Larsen PJ, Mikkelsen JD, Bolwig TG. Neuropeptide Y inhibits hippocampal seizures and wet dog shakes. *Brain Res*. 1996; *737(1-2)*, S.162-168.
- Woldbye et al., 1997: Woldbye DP, Larsen PJ, Mikkelsen JD, Klemp K, Madsen TM, Bolwig TG. Powerful inhibition of kainic acid seizures by neuropeptide Y via Y5-like receptors. *Nat Med*. 1997; *3(7)*, S.761-764.
- Woldbye et al., 2005: Woldbye DP, Nanobashvili A, Sorensen AT, Husum H, Bolwig TG, Sorensen G, Ernfors P, Kokaia M. Differential suppression of seizures via Y2 and Y5 neuropeptide Y receptors. *Neurobiol Dis*. 2005; *20(3)*, S.760-772.
- Wu and Li, 2005: Wu YF, Li SB. Neuropeptide Y expression in mouse hippocampus and its role in neuronal excitotoxicity. *Acta Pharmacol Sin*. 2005; *26(1)*, S.63-68.
- Wu and Liu, 2000: Wu A, Liu Y. Apoptotic cell death in rat brain following deltamethrin treatment. *Neurosci Lett*. 2000; *279(2)*, S.85-88.
- Wu et al., 2000: Wu A, Ren T, Hu Q, Liu Y. Deltamethrin induces altered expression of P53, Bax and Bcl-2 in rat brain. *Neurosci Lett*. 2000; *284(1-2)*, S.29-32.
- Wu et al., 2004: Wu Y, Zhang D, Lou D, Fan Y, Aronow B, Xu M, Zhang J. C-fos regulates neuropeptide Y expression in mouse dentate gyrus. *Neurosci Lett*. 2004; *363(1)*, S.6-10.
- Xapelli et al., 2007: Xapelli S, Silva AP, Ferreira R, Malva JO. Neuropeptide Y can rescue neurons from cell death following the application of an excitotoxic insult with kainate in rat organotypic hippocampal slice cultures. *Peptides*. 2007; *28(2)*, S.288-294.
- Yang et al., 1997: Yang Q, Wang S, Hamberger A, Celio MR, Haglid KG. Delayed decrease of calbindin immunoreactivity in the granule cell-mossy fibers after kainic acid-induced seizures. *Brain Res Bull*. 1997; *43(6)*, S.551-559.
- Zander et al., 2010: Zander JF, Münster-Wandowski A, Brunk I, Pahner I, Gómez-Lira G, Heinemann U, Gutiérrez R, Laube G, Ahnert-Hilger G. Synaptic and vesicular coexistence of VGLUT and VGAT in selected excitatory and inhibitory synapses. *J Neurosci*. 2010; *30(22)*, S.7634-7645.

8 Eigene Veröffentlichungen

Th. Thiele, E. Schopp, G. Ahnert-Hilger and G. Große

“Diversity of peptidergic neurons of hippocampus is maintained in primary cell cultures“

17. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft Würzburg Sep. 2000

G. Grosse, T. Thiele, E. Heuckendorf, E. Schopp, S. Merder, G. Pickert and G. Ahnert-Hilger

“Deltamethrin differentially affects neuronal subtypes in hippocampal primary culture“

Neuroscience, Volume 112, Issue 1, 12 June 2002, Pages 233-241

Gisela Grosse, Dirk Eulitz, Theodor Thiele, Ingrid Pahner, Sascha Schröter, Shigeo Takamori, Johannes Grosse, Kevin Wickman, Rosemarie Tapp, Rüdiger W. Veh

“Axonal sorting of Kir3.3 defines a GABA-containing neuron in the CA3 region of rodent hippocampus“

Molecular and Cellular Neuroscience, Volume 24, Issue 3, November 2003, Pages 709-724

B. Fleiner, T. Thiele

3D-Planung: High end oder Standard

59. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie Wien Juni 2009

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: GABA-Synthese/Metabolismus</i>	3
<i>Abbildung 2: Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie Calbindin- (grün) und GAD65- (rot) positiver Neurone in der Hippocampuskultur</i>	9
<i>Abbildung 3: Präparationsschema des Hippocampus für die Kultivierung der Regionen des Hippocampus</i>	13
<i>Abbildung 4: Lokalisation von GAD65 (Schnitt adulter Mäusehippocampus)</i>	27
<i>Abbildung 5: Lokalisation von GAD67 (Schnitt adulter Mäusehippocampus)</i>	29
<i>Abbildung 6: Doppelimmunfluoreszenz von GAD65 und GAD67 in der Kultur 21DIV</i> .	30
<i>Abbildung 7: Detailaufnahme eines GABAergen Neurons</i>	31
<i>Abbildung 8: Lokalisation von CCK (Schnitt adulter Mäusehippocampus)</i>	32
<i>Abbildung 9: CCK-positives, GAD65-negatives Neuron</i>	34
<i>Abbildung 10: CCK-positives, GAD65-positives Neuron</i>	34

Abbildung 11: Verteilung GABAerger Neurone in der CCK-Population unterschiedlicher Regionen des Hippocampus	35
Abbildung 12: Lokalisation von VIP (Schnitt adulter Mäusehippocampus)	36
Abbildung 13: VIPerges, GAD65-negatives Neuron	38
Abbildung 14: VIPerges, GAD65-positives Neuron	38
Abbildung 15: Verteilung VIPerger Neurone in unterschiedlichen Regionen des Hippocampus	39
Abbildung 16: Lokalisation von NPY (Schnitt adulter Mäusehippocampus)	40
Abbildung 17: NPY-positives, GAD65-negatives Neuron	42
Abbildung 18: NPY-positives, GAD65-positives Neuron und Fortsätze	42
Abbildung 19: Verteilung GABAerger Neurone in der NPY-Population unterschiedlicher Regionen des Hippocampus	43
Abbildung 20: Lokalisation von Somatostatin (Schnitt adulter Mäusehippocampus)	45
Abbildung 21: Übersichtsaufnahme einer gegen Somatostatin und GAD65 gefärbten Kultur	46
Abbildung 22: GABAerge Neurone in der Somatostatin-Population des Hippocampus	46
Abbildung 23: Lokalisation von Calbindin (Schnitt: adulter Rattenhippocampus)	47
Abbildung 24: Lokalisation von Calbindin (Schnitt Hippocampus gekindelter Ratten)	50
Abbildung 25: Lokalisation von NPY (Schnitt: adulter Rattenhippocampus)	51
Abbildung 26: Lokalisation von NPY (Schnitt Hippocampus gekindelter Ratten)	52
Abbildung 27: Lokalisation von Somatostatin (Schnitt adulter Rattenhippocampus)	54
Abbildung 28: Lokalisation von Somatostatin (Schnitt: Hippocampus gekindelter Ratten)	55
Abbildung 29: Verteilung NPYerger und SSerger Neurone in Regionen des Hippocampus gekindelter Ratten und Kontrolltieren	56
Abbildung 30: Auswirkungen von Deltamethrin auf unterschiedliche Neuronenpopulationen des Hippocampus (vorab veröffentlicht in Grosse, Thiele et al., 2002)	59
Abbildung 31: Auswirkungen von Deltamethrin auf Neuronensubtypen des Hippocampus in der Kultur (vorab veröffentlicht in Grosse, Thiele et al., 2002)	60
Abbildung 32: Auswirkungen von Deltamethrin auf Synapsen	61
Abbildung 33: Auswirkungen der Deltamethringabe (200nM) auf die Häufigkeit synaptischer Kontakte	62

9.2 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Verdünnung der Primärantikörper für die Fluoreszenzhistologie</i>	15
<i>Tabelle 2: Verdünnung der Sekundärantikörper für die Fluoreszenzhistologie</i>	16
<i>Tabelle 3: Verdünnung der Primärantikörper für die DAB/Ni-Methode</i>	17
<i>Tabelle 4: Primäre Antikörper</i>	24
<i>Tabelle 5: Sekundäre Antikörper</i>	25

9.3 Lebenslauf

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

9.4 Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Theodor Thiele, dass die hier vorliegende Arbeit von mir selbständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

Theodor Thiele

Augsburg, den 14.10.2011

9.5 Danksagung

Meinen Dank möchte ich als erstes Frau PD Dr. G. Große aussprechen, die es mir ermöglicht hat, diese Dissertation zu erstellen. Die Zusammenarbeit mit ihr war von Vertrauen und einem hohem Engagement geprägt. Frau Prof. Dr. G. Ahnert-Hilger danke ich für die zahlreichen Anregungen und die konstruktive Kritik. Meinen Kollegen im Institut gilt mein Dank für die vielfältige Unterstützung und das gute Arbeitsklima, namentlich seien Evelyn, Sascha, Sandra, Falko, Markus, Thomas und vor allem Evi erwähnt.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre stete Unterstützung und Ermutigung bedanken.

Danke Valeska für deine Liebe, Kritik und Geduld.