

4 Diskussion

Die Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass die Neurogeneserate im erwachsenen Gyrus dentatus einen dynamischen Einfluss auf die Morphologie des Moosfasertraktes hat.

Werden viele neue Körnerzellen in das hippocampale Netzwerk integriert, ist die infrapyramidale Moosfaserprojektion besonders groß. Interessanterweise bestehen korrelative Zusammenhänge zwischen der Größe genau dieser Projektion und dem Verhalten. So schneiden Tiere mit einer großen IMF besonders gut in Tests ab, die das räumliche Erinnerungsvermögen testen. Möglicherweise hat die Kombination aus Integration neuer Nervenzellen mit Eigenschaften verstärkter synaptischer Plastizität und die Projektion dieser Zellen in das infrapyramidale Bündel, wo sie vorwiegend mit den basalen Dendriten der Pyramidenzellen Kontakte bilden, positive Effekte auf die Verarbeitung räumlicher Information.

Im ersten Experiment wurde der Einfluss der reizreichen Lebensumgebung auf die Morphologie des Moosfasertraktes untersucht. Die reizreiche Lebensumgebung ist assoziiert mit hippocampaler Plastizität, die zu verbesserten kognitiven Fähigkeiten und einer verstärkten Neurogenese führt (Kempermann, Kuhn et al. 1997). Entsprechend unserer Annahme hatten Mäuse, die in der reizreichen Umgebung gelebt hatten, auch eine um 20% größere infrapyramidale Moosfaserprojektion.

Die adulte Neurogenese wird durch eine Vielzahl physiologischer Faktoren beeinflusst. Der stärkste Stimulus hippocampaler Neurogenese ist jedoch, in Form von Krampfanfällen, pathologischer Natur (Bengzon, Kokaia et al. 1997; Parent, Yu et al. 1997; Scott, Wang et al. 1998). Im zweiten Experiment wollten wir die Auswirkung einer durch Krampfanfälle maximal stimulierten Neurogenese auf die Morphologie des Moosfasertraktes untersuchen, wieder mit der Annahme, dass eine hohe Neurogeneserate zu einer Größenzunahme

der infrapyramidalen Moosfaserprojektion führt. Die Gabe chemokonvulsiver Substanzen wie Pilocarpin oder Kainat wird angewandt, um die Temporallappenepilepsie (TLE) beim Menschen, welche die häufigste Form der fokalen Epilepsien darstellt (Helmstaedter 2002), zu imitieren. Um die epileptischen Anfälle auszulösen, injizierten wir intraperitoneal den Glutamatagonisten Kainat. Die Ergebnisse früherer Studien bestätigend (Gray and Sundstrom 1998; Nakagawa, Aimi et al. 2000), führte dies in unserem Experiment zu einer mehr als sechsfachen Zunahme der Proliferation sieben Tage nach KA Injektion. Die Proliferationsrate kehrte innerhalb der ersten 15 Tage nach Kainatgabe wieder zum Normalniveau zurück, und es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen 15 und 28 Tage nach Anfall. Dieser Rückgang der Proliferation bis zum zweiten Zeitpunkt 15 Tage nach Kainatgabe erfolgte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer Arbeit von Nakagawa und Kollegen, die einen Rückgang der durch Kainat gesteigerten Proliferationsrate innerhalb von 10 Tagen nach Anfall beschrieben hatten (Nakagawa, Aimi et al. 2000).

Calretinin wird in jungen, noch unreifen Körnerzellen exprimiert (Brandt, Jessberger et al. 2003). Der Anstieg der Zahl Calretinin-positiver Zellen erfolgte ebenso in der ersten Woche nach Kainat-Injektion, nahm in der zweiten Woche noch weiter zu. Ein vergleichbarer Anstieg der Zahl Calretinin-positiver Zellen konnte auch nach Stimulation adulter Neurogenese durch körperliche Aktivität beobachtet werden (Kronenberg, Bick-Sander et al. 2005). 15 Tage nach Kainatinjektion bestand ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Gruppen. Eine Woche nach Kainatinjektion zeigten sich noch keine Veränderungen der Morphologie des Moosfasertraktes. Weder die Größe des Hilus, der SP-MF noch der IMF waren in den beiden Gruppen unterschiedlich. Nach 15 Tagen hingegen zeigte sich eine deutliche Zunahme der Größe des IMF, die auch nach 28 Tagen fortbestand. Dass sich sieben Tage nach Kainatinjektion keine Veränderungen in der Morphologie des Moosfasertraktes zeigen, ist nicht überraschend. Frühere Studien haben beschrieben, dass der Anstieg der Proliferation zwischen drei und fünf Tagen nach Kainatgabe erfolgt (Gray and Sundstrom 1998; Nakagawa, Aimi et al. 2000). Die Reifung zu einer

Körnerzelle, mit der Ausbildung eines Dendritenbaums und dem Aussenden eines Axons zu CA3, dauert während der postnatalen Entwicklung mindestens sieben Tage (Jones, Rahimi et al. 2003). Im adulten Hippokampus erreichen Axone unreifer Körnerzellen zwischen vier und 10 Tagen nach Zellteilung und BrdU Aufnahme die Region CA3 (Hastings and Gould 1999). Die Untersuchung transgener Mäuse, die EGFP (enhanced green fluorescent protein) unter der Kontrolle des Proopiomelanocortin (POMC) Promoters exprimieren, zeigte sich als hilfreiches Werkzeug bei der Untersuchung der morphologischen und auch funktionellen Entwicklung, da hierbei die Visualisierung junger Körnerzellen inklusive deren Fortsätze möglich wird (Overstreet, Hentges et al. 2004; Overstreet-Wadiche, Bensen et al. 2006; Overstreet-Wadiche and Westbrook 2006). Mit Hilfe dieser Methode wurde gezeigt, dass die Entwicklung von Körnerzellen im adulten Hippokampus langsamer als während der postnatalen Entwicklung abläuft (Overstreet-Wadiche, Bensen et al. 2006).

Eine durch Krampfanfälle stimulierte Zunahme adulter Neurogenese führt zu einer zeitlich verzögerten Zunahme der Größe der IMF.

In diesem zweiten Experiment wurden 15 Tage nach Kainatinjektion Veränderungen der Morphologie des Moosfasertraktes festgestellt. Die Axone neu gebildeter Nervenzellen erreichten die IMF und führten zu deren Größenzunahme, sodass ein deutlicher Unterschied in der Größe dieser Struktur zwischen beiden Gruppen bestand ($P = 0,001$). Diese Veränderung bestand auch 28 Tage nach Kainatinjektion. Es ist bisher noch nicht klar, durch welchen Mechanismus Krampfanfälle den starken Effekt auf die Proliferation bewirken. Es wurde gezeigt, dass Depolarisierung einer Vorläuferzelle deren Proliferation anregt (Deisseroth, Singla et al. 2004). Depolarisierende elektrische Aktivität im Rahmen eines Krampfanfalls könnte intrazelluläre Mechanismen in Gang bringen, die zur Zunahme der Proliferation beitragen (Tozuka, Fukuda et al. 2005; Wang, Kempermann et al. 2005). Des Weiteren wird eine Vielzahl von Genen und Wachstumsfaktoren diskutiert, die diesen Effekt vermitteln könnten (siehe Gall et al., 1994; Ferhat et al., 1996;

Opanashuk et al., 1999). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Zelltod eine Induktion der Proliferation bewirkt. Dennoch konnte bisher noch nicht gezeigt werden, dass Zelltod nach epileptischen Anfällen obligatorisch auch zu einer Stimulation der Proliferation führt. Ekdahl beobachtete eine noch deutlichere Induktion der Neurogenese, wenn exzitotoxischer Zelltod verhindert wurde. Zudem wird eine Induktion auch beobachtet, wenn besonders resistente Mäusestämme (z.B.: C57BL/6) verwendet werden, die bei Kainatdosierungen von weniger als 30 mg/kg Körpergewicht kaum Auftreten von Zelltod zeigen (McKhann, Wenzel et al. 2003).

Die Tatsache, dass epileptische Anfälle zu einer solch starken Stimulation der adulten Neurogenese führt, wirft die Frage auf, ob dies ein Versuch oder Mechanismus ist, entstandenen Schaden zu beheben, oder aber ob andererseits die vermehrte Neurogenese zur Entstehung der Epilepsie beiträgt (Parent 2002; Scharfman 2004). Diese spannende Frage konnte bisher noch nicht beantwortet werden.

Die Temporallappenepilepsie ist beim Menschen mit mehreren pathologischen Veränderungen verbunden, darunter Zellverlust in Hilus, CA3 und CA1, hippocampale Sklerose und Aussprossen von Moosfaserkollateralen (mossy fiber sprouting). Es wird angenommen, dass die dadurch verursachten strukturellen Veränderungen der hippocampalen Schaltkreise zur Ausbildung der Epilepsie beitragen (Buckmaster, Strowbridge et al. 1993; Sloviter 1994; Buckmaster and Dudek 1997; Dudek and Spitz 1997; Buckmaster, Zhang et al. 2002).

Auch im Tiermodell der durch Kainat induzierten Temporallappenepilepsie werden viele dieser neuropathologischen Veränderungen hervorgerufen. So wird das Aussprossen von Moosfaserkollateralen auch nach Kainatapplikation beobachtet. Dabei wachsen Moosfaserkollateralen vorwiegend in die innere Molekularschicht ein und bilden Kontakte zu den Dendriten der Körnerzellen (Ben-Ari 2001). Diese Ausbildung einer abnormen rekurrent-exzitatorischen Körnerzell-Körnerzell Verbindung könnte die Basis einer verstärkten Erregbarkeit der Körnerzellen sein (Nadler and Cuthbertson 1980; Wuarin and Dudek 1996; Dudek and Spitz 1997; Kotti, Riekkinen et al. 1997; Okazaki,

Molnar et al. 1999) und einen Pathomechanismus chronischer Epilepsie darstellen. In unserem Experiment wählten wir mit C57Bl/6 einen besonders resistenten Mausestamm. Zudem konnten wir bei den Tieren beider Gruppen keine Unterschiede in der Intensität der Moosfaserfärbung mit Synaptopodin in der Molekularschicht beobachten.

Somit ist es unwahrscheinlich, dass die in Experiment 2 beobachtete Zunahme der IMF auf das Aussprossen bereits bestehender Moosfasern zurückzuführen ist. Es ist anzunehmen, dass die von Represa 1992 beobachtete Zunahme der infrapyramidalen Moosfaserprojektion (Represa and Ben-Ari 1992) auf das Wachstum der Axone neu gebildeter Körnerzellen zurückzuführen ist.

Zusammenhänge zwischen adulter Neurogenese, Morphologie des Hippokampus und Hippokampus-abhängigem Lernen in genetisch verwandten Mäusestämmen.

Eine häufig angewandte Methode, die Funktion eines bestimmten Systems im Gehirn zu untersuchen, ist, durch Manipulation des Systems (z.B. eine Läsion oder pharmakologische Intervention) dessen Funktion zu beeinflussen. Doch das Gleichsetzen der Funktion des Systems mit den Defekten oder Effekten, die durch die Eingriffe verursacht wurden, ist nicht unproblematisch. Ein alternativer Ansatz, die Funktion einer gewissen Hirnstruktur zu verstehen, besteht darin, die natürlich auftretenden interindividuellen Differenzen zu betrachten, denn kein Gehirn ist identisch und auch jedes individuelle Verhalten unterscheidet sich. Durch Korrelationsanalyse werden Zusammenhänge zwischen der interessierenden Region und der Gehirnfunktion untersucht.

Dieser Ansatz wurde auch hier verwendet, um Zusammenhänge zwischen der Morphologie des Moosfasertraktes und der Leistung im „Morris Wasserlabyrinthtest“ zu untersuchen. Dabei konnten die Ergebnisse früherer Studien, die Zusammenhänge zwischen der Größe der IMF und der Leistung in Tests des räumlichen Gedächtnisses, bestätigt werden. Tiere mit größerer IMF schwammen im Durchschnitt auf einem direkteren Weg zu der Plattform und benötigen dadurch weniger Zeit, um dem Wasser zu entkommen. Zusätzlich

konnte gezeigt werden, dass die Größe der IMF mit der Zahl neu gebildeter Nervenzellen korreliert. Die Gesamtzahl der Körnerzellen hatte keinen Einfluss auf die Verteilung der Moosfasern.

Wie lässt sich erklären, dass Tiere mit einer großer IMF besser in Tests des räumlichen Gedächtnisses abschneiden ?

Der Gyrus dentatus ist ein Kontrolltor. Information erreicht die Körnerzellschicht und durchläuft dann den Moosfasertrakt, der eine Engstelle im trisynaptischen Kreislauf darstellt. Körnerzellen haben über den Moosfasertrakt bedeutenden Einfluss auf die Aktivität der Pyramidenzellen in CA3. Um eine Information durch Verarbeitung im Hippokampus im Langzeitgedächtnis zu speichern (zu lernen) muss die Information für einige Zeiten stabil im Hippokampus bestehen. Zu dieser Stabilität scheint die IMF beizutragen, und Variationen der Moosfaserverteilung beeinflussen die Art und Weise, wie Pyramidenzellen erregt werden. So beschreibt Lipp, dass die Informationsverarbeitung bei Tieren mit kleinen IMF Moosfaserprojektionen vulnerabler sein (Lipp, Schwegler et al. 1989) und leichter durch sensorische Stimuli oder Veränderungen der Motivation durchbrochen werden kann. Tiere mit kleinen IMF schneiden besonders gut beim „two-way avoidance Test“ ab (Lipp, Schwegler et al. 1988; Lipp, Schwegler et al. 1989). Bei diesem Test, bei dem auch Tiere mit Hippokampusläsionen gut abschneiden, ist es vorteilhaft, möglichst schnell zu reagieren und weniger Informationen zu memorieren. Dies könnte auch eine Erklärung liefern für die in dieser Arbeit beobachtete Korrelation zwischen Schwimgeschwindigkeit und Größe der IMF. Tiere mit kleineren IMF Projektionen schwammen tendenziell schneller, wählten jedoch keinen direkten Weg zur Plattform. Tiere mit großen IMF hatten es jedoch leichter, räumliche Information zu verarbeiten und auch zu speichern (Crusio and Schwegler 1987). Die Effekte der großen IMF könnten darauf beruhen, dass nicht die apikalen, sondern die basalen Dendriten der Pyramidenzellen kontaktiert werden. In CA1 konnte gezeigt werden, dass aus elektrophysiologischer Sicht Unterschiede zwischen den Effekten apikaler oder basaler Inputs bestehen.

Mehrere Faktoren könnten eine Erklärung hierfür liefern. Zum einen wäre denkbar, dass die Verteilung und somit das Verhältnis von Rezeptoren auf apikalen und basalen Dendriten unterschiedlich ist. Zum anderen könnten unterschiedliche passive elektrophysiologische Eigenschaften aufgrund von Unterschieden der Morphologie eine Erklärung liefern. Die basalen Dendriten sind kürzer (Pyapali, Sik et al. 1998) und dünner (Megias, Emri et al. 2001) als die apikalen Dendriten. Enoki et al. benutzten das NEURON Modell, einen Nervenzellsimulator, um den Einfluss der Morphologie zu klären, und fanden, dass die Stimulation basaler Dendriten wesentlich deutlichere Effekte auf die stimulierte Pyramidenzelle hat als die Stimulation apikaler Dendriten (Enoki, Kiuchi et al. 2004). In CA3 konnte gezeigt werden dass „thorny excrescences“ (dornige Auswüchse), die meist in Clustern organisierten postsynaptische Komponenten oder Synapsen zwischen Moosfaser und Dendriten der CA3 Pyramidenzelle, sich beim Kontakt mit basalen Dendriten um 50% näher am Soma befinden (Gonzales, DeLeon Galvan et al. 2001). Die unterschiedlichen Effekte basaler und apikaler Stimulation auf Pyramidenzellen der CA3 Region wurden bisher noch nicht untersucht. Es ist aber denkbar, dass die Axone der IMF über die basalen Dendriten die Aktivität der Pyramidenzellen von CA3 so beeinflussen, dass dies zu den beobachteten Auswirkungen auf die Verarbeitung von Information und Verhalten beiträgt. Die hier beobachtete Korrelation zwischen der Größe der IMF und der Neurogeneserate lässt sich auch aus Beobachtungen der Entwicklung des Moosfasertraktes während der postnatalen Neurogenese bestätigen. Am Postnataltag 4 ist die Ausdehnung der IMF extrem lang. Während der postnatalen Entwicklung nimmt die Größe aber stetig ab und bleibt ab dem Postnataltag 45 stabil. Der Moosfasertrakt ist eine der zuletzt ausgebildeten Projektionen des Gehirns. Die peri- und postnatale Neurogenese im Gyrus dentatus hat ihren Höhepunkt während der ersten postnatalen Woche. Dies zeigt auch die Tendenz junger Neurone, infrapyramidal zu projizieren.

Die molekularen Mechanismen, die ein Axon zur „richtigen“ Stelle führen, werden noch nicht voll verstanden. Da die Größe der IMF während der

postnatalen Entwicklung nicht in ihrer größten Ausdehnung stabil bleibt, zeigt sich, dass eine Vielzahl der Projektionen nur temporär besteht. Möglicherweise spielt eine Art axonale Konkurrenz während dieser Phase eine Rolle. Nur erfolgreiche Verknüpfungen bleiben bestehen. Es wurde auch beschrieben, dass sich entwickelnde Axone verzweigen und Seitenäste aussenden. Eine Vielzahl dieser Seitenäste wird aber später wieder gestutzt und nur ein Teil der initialen Projektionen bleibt bestehen. Die Ausbildung von Verzweigungen und die Führung des auswachsenden Axons wird von einer Vielzahl molekularer Faktoren kontrolliert. Zu diesen gehören Mitglieder der Netrin, Semaphorin, Slit und Ephrin Familie (Tessier-Lavigne and Goodman 1996; Chedotal, Del Rio et al. 1998; Chen, Bagri et al. 2000; Bagri, Cheng et al. 2003). Bagri und Mitarbeiter haben mit Hilfe von transgenen Mäusen den Einfluss dieser Faktoren auf die postnatale Entwicklung untersucht. Interessanterweise konnten sie beobachten, dass die Mitglieder der Semaphorin Familie Sema 3A und 3F, die beide in vitro Axone von Körnerzellen abstoßen, von großer Bedeutung für die Ausbildung der Moosfaserprojektion sind. Mäuse mit Mutationen an Genen, die für Neuropilin-2 (einem Sema3F-Rezeptor) und Plexin-A3 (einem Transduktor des Sema3A und 3F Signals) codieren, zeigen nicht die übliche postnatale Verkürzung der IMF. Diese Axone erhalten von Sema3F nicht die Aufforderung sich zurückzuziehen. Des Weiteren untersuchten sie in den Körnerzellen des Gyrus dentatus das Expressionsmuster unterschiedlicher Plexine, wie Plexin-A2, -A3 und -A4. Sie fanden, dass im inneren Drittel des Gyrus dentatus, wo sich die jungen Körnerzellen befinden, vorwiegend Plexin-A3 exprimiert wird. Die jungen Körnerzellen scheinen während einer frühen Phase ihrer Entwicklung oder ihrer Reife besonders empfindlich für die abstoßenden Signale von Sema3A und 3F zu sein (Bagri, Cheng et al. 2003). Diese Mechanismen des Auswachsens der Axonkollateralen in einem frühen Stadium neuronaler Entwicklung und des späteren Stützens dieser Kollateralen und der Elimination synaptischer Kontakte besonders ab dem 20. postnatalen Tag wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie im Detail beschrieben (Liu, Low et al. 2005).

Dass die Aktivität des Hippokampus bei der Integration neuer Nervenzellen und deren Axone eine entscheidende Rolle spielt, wird durch die Tatsache belegt, dass eine Beeinflussung der synaptischen Aktivität durch Lernaufgaben oder das Leben in einer reizreichen Lebensumgebung zu einer Zunahme der Integration neuer Nervenzellen führt. Zusätzlich zu dieser strukturellen Plastizität zeigen junge Körnerzellen auch Besonderheiten hinsichtlich ihrer funktionellen Eigenschaften. Elektrophysiologische Untersuchungen zeigten, dass sich neu gebildete, unreife Körnerzellen in ihren Membraneigenschaften und in ihrer synaptischen Plastizität deutlich von reifen Körnerzellen unterscheiden. In jungen Nervenzellen lässt sich leichter als in reifen assoziative Langzeitpotenzierung induzieren (Schmidt-Hieber, Jonas et al. 2004). Dieser Mechanismus, der die synaptische Plastizität verstärkt, könnte von Bedeutung für die Bildung neuer Gedächtnisinhalte sein. Während ihrer Entwicklung durchlaufen die im adulten Gehirn geborenen Zellen Entwicklungsstadien, die der postnatalen Entwicklung weitgehend entsprechen. Dabei konnte gezeigt werden, dass der späteren glutamatergen Aktivität eine frühere GABAerge Aktivität vorausgeht. Junge Zellen sind in somit im Vergleich zu reifen für andere Transmittersubstanzen empfänglich und auch in ihrer Funktion beeinflussbar (Esposito, Piatti et al. 2005; Wang, Kempermann et al. 2005).

In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass an Moosfaser-CA3 Synapsen Information nicht nur durch die Zahl und zeitliche Abfolge von Aktionspotentialen sondern zusätzlich auch durch analoge Mechanismen codiert wird. Die Kombination von Aktionspotential-abhängigen- und analogen Mechanismen könnte eine Erklärung der beeindruckenden Kapazität zur Informationsverarbeitung des hippokampalen Netzwerks liefern (Alle and Geiger 2006). Die Untersuchung der spezifischen Eigenschaften junger Nervenzellen hinsichtlich dieser analogen Mechanismen könnte möglicherweise weitere Erkenntnisse über die funktionellen Besonderheiten junger Nervenzellen liefern.

Die funktionelle Besonderheit der IMF könnte darauf zurückzuführen sein, dass sie aus Axonen gerade dieser jungen Nervenzellen besteht, die auch funktionell besondere Eigenschaften aufweisen. Außerdem wird angenommen, dass sich gerade in dieser Zeit der verstärkten synaptischen Plastizität entscheidet, ob die Zelle für zukünftige Aufgaben im neuronalen Netzwerk rekrutiert wird und dadurch zur Adaption beiträgt (Wiskott, Rasch et al. 2006). Somit könnte das IMF im erwachsenen Gehirn als eine Art Indikatorfeld dienen, welches Auskunft über die Zahl neu gebildeter Nervenzellen und somit über zelluläre und funktionelle neuronale Plastizität gibt.