

1 Einleitung

1.1 Die Entdeckung der adulten Neurogenese

Chronologie einer wissenschaftlichen Entwicklung

Die Vorstellung, das Gehirn sei nach der Geburt nicht in der Lage neue Nervenzellen zu regenerieren, wurde vor mehr als 100 Jahren von Ramon y Cajal (1913) und His (1904) begründet. Sie stellten in histologischen Untersuchungen an Säugetiergehirnen fest, dass sich die strukturellen Veränderungen des ZNS nach der Geburt ausschließlich auf den Verlust von Nervenzellen beschränken.

Anfang der 60er Jahre kamen erste Zweifel an der Theorie der fehlenden Regenerationsfähigkeit des erwachsenen Gehirns auf. Die Einführung neuer technischer Methoden zur Darstellung sich teilender Zellen ermöglichte die Differenzierung von "alten" und "neuen" Neuronen, d.h. solchen die während der Embryogenese entstehen und solchen die im adulten Organismus hinzukommen. Mit Hilfe von [³H]-Thymidin-Autoradiographie gelang es Joseph Altman erstmals, adulte Neurogenese im Gyrus dentatus (Altman, 1965; Kaplan, 1977) und Bulbus olfactorius (Altman, 1969) der Ratte nachzuweisen. [³H]-Thymidin wird in die DNS sich teilender Zellen eingebaut. Diese Markierung erlaubte es, Ort und Zeitpunkt "neugeborener" Zellen zu bestimmen. Obwohl Altman seine Daten in renommierten Journalen wie dem *Journal of Comparative Neurology*, *Science* und *Nature* veröffentlichte, wurde das von ihm postulierte Konzept der adulten Neurogenese über zwei Jahrzehnte weitgehend ignoriert. Gross (2000) beurteilte dies so: „The neglect of Altman's demonstration of adult neurogenesis is a classic case of a discovery made 'before its time' ". Ein Grund, der zu der geringen Beachtung von Altmans Daten beigetragen haben könnte, war dass mit der angewandten Technik nicht eindeutig demonstriert werden konnte, ob es sich bei den neu entstandenen Zellen wirklich um Neurone oder Gliazellen handelte.

Erst mit Einführung der Elektronenmikroskopie gelang es Kaplan et al. (1977) zu zeigen, dass die mit [³H]-Thymidin-markierten Zellen im Gyrus dentatus und Bulbus olfactorius tatsächlich ultrastrukturelle Charakteristika von Neuronen aufwiesen. Etwas später untersuchten Nottebohm und Mitarbeiter bei Kanarienvögeln den Zusammenhang zwischen der Neubildung von Neuronen und dem Erlernen neuer Lieder. Sie konnten nachweisen, dass die adulte Neurogenese im dorsomedialen

Striatum erwachsener Kanarienvögel mit dem Liederlernen korreliert (Goldmann und Nottebohm, 1983). Die durch Kaplan und Nottebohm wiederentdeckte und wissenschaftlich weitergeführte Theorie der adulten Neurogenese weckte in den darauf folgenden Jahren vermehrt das Interesse anderer Neurowissenschaftler.

Ein Meilenstein in der Erforschung des Phänomens der Neurogenese war die Einführung des synthetisierten Thymidinanalogons BrdU (5-Bromo-3'-Desoxyuridin), welches ähnlich wie [³H]-Thymidin während der S-Phase der Mitose von der Zell-DNA aufgenommen wird (Corotto et al., 1993). Im Gegensatz zu der älteren Markierungstechnik mit [³H]-Thymidin benötigt diese Methode keine Autoradiographie, da die BrdU-markierten Zellen mit Hilfe von Immunhistochemie sichtbar gemacht werden können. Gage und Kollegen waren die ersten, die BrdU und konfokale Mikroskopie nutzten, um die adulte Neurogenese bei Nagetieren genauer untersuchen zu können (Kuhn et al., 1996; Kempermann et al., 1997). Der Vorteil dieser Technik im Vergleich zu den früher angewandten Methoden lag darin, dass mit ihrer Hilfe die neuen Nervenzellen in Hinblick auf die Expression neuronenspezifischer Proteine untersucht werden konnten. Diese Methode erlaubte erstmals quantitative und qualitative Analysen der proliferierenden Vorläuferzellen und den daraus entstehenden reifen neugeborenen Neuronen. Bis heute ist die Markierung sich teilender Zellen mit BrdU und die Immunhistochemie die am weitesten verbreitete Methode zur Darstellung und Erforschung der adulten Neurogenese.

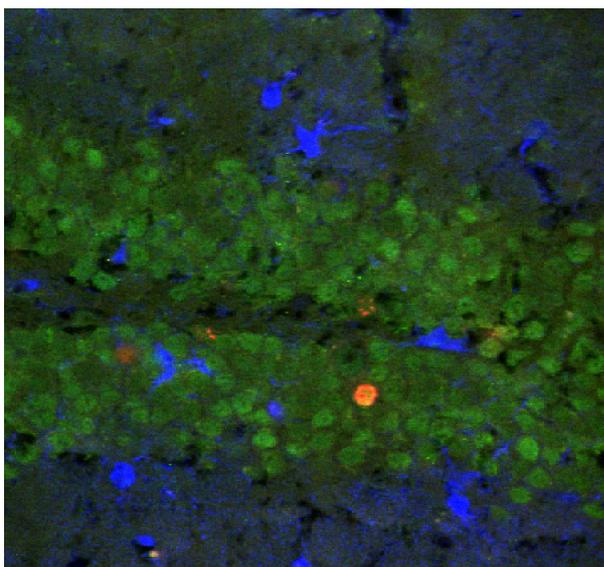


Abb. 1:
Immunfluoreszenzfärbung des Gyrus dentatus einer adulten Maus. Die Aufnahme zeigt eine neugeborene, BrdU-markierte Zelle (rot), die den neuronalen Marker NeuN (grün) exprimiert, nicht aber den glialen Marker S100β (blau). (aus Kempermann et al. 2003)

1.2 Heutiger Wissensstand über die adulte Neurogenese

Seit den neunziger Jahren erlebt die Erforschung der adulten Neurogenese eine Renaissance. Nachdem Altmans und Kaplans erste Berichte aus den 60er und 70er Jahren nicht zu einer allgemeinen Akzeptanz des Phänomens geführt hatten, beschäftigen sich heute viele Forschergruppen mit den Hintergründen und Grundlagen der adulten Neurogenese. Sie beschäftigen sich mit folgenden Fragen der Neurogenese:

- Welche sind und woher kommen die Stammzellen, die im erwachsenen Organismus Neurone bilden?
- Welche Phänotypen von Nervenzellen werden nachgebildet?
- Durch welche Entwicklungsstadien läuft eine Vorläuferzelle, bevor sie ein reifes Neuron wird?
- Welche endo- und exogenen Faktoren beeinflussen die Neurogenese?
- Welche physiologische Funktion hat die kontinuierliche Neubildung von Nervenzellen im adulten Gehirn?

Inzwischen liegen zu wesentlichen Teilen dieser Fragestellungen erste Daten vor. Die für diese Arbeit relevanten Befunde werden in den folgenden Abschnitten zusammengefasst.

1.2.1 Neuronale Stammzellen

Der neuronalen Stammzelle werden drei kennzeichnende Fähigkeiten zugeschrieben:

1. Sie kann neuronales Gewebe bilden.
2. Sie kann sich selbst erneuern.
3. Sie bildet durch asymmetrische Teilung Zellen, die differenzierter sind als sie selbst (Gage 2000).

Das Nervengewebe entsteht im embryonalen und adulten Gehirn aus multipotenten Stammzellen, die wiederum ihren Ursprung in der übergeordneten Population pluripotenter Stammzellen hat. Verfolgt man diesen Stammbaum bis zum Beginn des entstehenden Organismus, steht die Zygote als totipotente Stammzelle am Ursprung. Diese Zelle ist in der Lage, einen gesamten Organismus zu bilden. Die pluripotente

oder auch embryonale Stammzelle, die auch die Fähigkeit besitzt, jede Zelle eines Organismus zu bilden, unterscheidet sich von der totipotenten Zelle durch die Unfähigkeit, Trophoblasten der Plazenta zu generieren. Die meisten Stammzellen eines Organismus gehören zu der Gruppe der multipotenten Stammzellen, wie auch die neuronalen Stammzellen. Charakteristikum dieser Zellen ist, dass sie alle Zellen eines bestimmten Organs bilden können und nur Zellen dieses Organs (Gage, 2000). Nach den bisherigen Erkenntnissen ist es unklar, ob es sich bei den adulten neuronalen Stammzellen um denselben Zelltyp handelt, aus dem während der embryonalen und fetalen Entwicklung das gesamte Nervensystem entsteht. Adulte (multipotente) Stammzellen sind den embryonalen (pluripotenten) Stammzellen hinsichtlich ihres Differenzierungs- und Proliferationspotentials unterlegen.

Eine grundlegende Frage bei der Erforschung der adulten Neurogenese war in den letzten Jahren die Frage nach der Identität der adulten Stammzellen. Die Geburt neuer Neurone findet in zwei Regionen des ZNS des adulten Säugetiers statt: In den Wänden der lateralen Ventrikel, der so genannten subventrikulären Zone (SVZ), und in der subgranulären Zone des Hippocampus (SGZ). *In vivo* generieren Zellen der SVZ Neurone und Vorläuferzellen, welche in den Bulbus olfactorius wandern, um sich dort unter anderem zu Interneuronen zu differenzieren (Luskin, 1993). Darüber hinaus konnten *in vitro* Studien zeigen, dass sich Zellen aus der SVZ isolieren lassen, die nach Kultivierung und Behandlung mit den Wachstumsfaktoren EGF (epidermal growth factor) und/oder FGF (fibroblast growth factor) multipotent waren und sich selbst erneuern konnten, also Stammzeleigenschaften aufwiesen (Gritti et al., 1999; Rietze et al., 2001). Die proliferierenden Zellen dieser neurogenen Region weisen astrozytäre Charakteristika auf, wie die Expression des "glial fibrillary acidic Protein" GFAP, ein helles Cytoplasma und so genannte "gap junctions" (Doetsch et al., 1997). In den Studien von Doetsch et al. (1997 und 1999) zur Beschreibung der Organisation der SVZ, werden die Astrozyten, die in der Lage sind Neurone zu generieren, als Typ B Zellen bezeichnet und als primäre Vorläuferzellen der adulten Neurogenese identifiziert.

Zu Beginn der Erforschung der neuronalen Entwicklung des ZNS ging man davon aus, dass neuroepitheliale Zellen des Neuralrohres durch Teilung zwei separate Zelllinien bilden: Zum einen gliale Vorläuferzellen und zum anderen neuronale Vorläuferzellen. Diese Überlegung entsprach dem so genannten „oak-tree model“ (Der Stammbaum der Zellentwicklung des ZNS gleicht einer Eiche, deren Stamm

sich früh in zwei Hauptäste verzweigt). Neuere Erkenntnisse lassen vermuten, dass die Entwicklung des Gehirns eher nach dem „pine-tree model“ abläuft. Dieses Model besagt, dass die Stammzellen des Neuralrohres die Basis eines einzigen Stammes darstellen, die sich wiederum in radiäre Glia und Astrozyten weiterentwickeln. Durch asymmetrische Zellteilung sind diese Zellen in der Lage sowohl Neurone als auch Glia zu bilden (Alvarez-Buylla et al., 2001). Nach abgeschlossener Entwicklung des ZNS persistieren diese Astrozyten mit neuronengebenden Eigenschaften in bestimmten Bereichen des Gehirns (SVZ) und produzieren neue Neurone.

Im Unterschied zur SVZ liegt die SGZ nicht an den Grenzen des Gehirns nahe den Ventrikeln, sondern tief im Hippocampus zwischen Stratum granulosum und Hilus. Auch aus dieser Region konnten jedoch Zellen mit multipotenten Eigenschaften isoliert werden (Palmer et al., 1997). Bereits Anfang der neunziger Jahre wurde nachgewiesen, dass sich auch im adulten Hippocampus Astrozyten teilen (Cameron et al., 1993). Es wurde angenommen, dass diese sich teilenden Astrozyten gliale Zellen bilden, welche die neuronale Funktion aufrechterhalten und unterstützen. Wie sich später herausstellte, sind aber auch in der SGZ GFAP-positive Astrozyten in der Lage, Neurone zu bilden, und können als primäre Vorläuferzellen der adulten Neurogenese angesehen werden, da schon kurz nach einer Markierung der sich teilenden Zellen mit BrdU etwa 60 bis 80% der markierten Zellen als Astrozyten identifiziert wurden (Seri et al., 2001; Palmer et al., 2000; Seri et al., 2004). Astrozyten sind eine in Morphologie und Funktion sehr heterogene Zellpopulation. Somit ist es von großer Bedeutung, weitere Marker zu finden, die eine Identifizierung derjenigen Astrozyten ermöglicht, die Stammzeleigenschaften aufweisen.

Identifizierung verschiedener proliferierender Subtypen neuronaler Vorläuferzellen:

Lendahl et al. (1990) identifizierten in neuroepithelialen Stammzellen des Neuralrohres ein Gen namens Nestin, das für ein intermediäres Filamentprotein kodiert und spezifisch für diese Zellen ist. Auch im adulten Hippocampus konnte Nestin nachgewiesen werden (Wei et al., 2002; Kronenberg et al., 2003; Filippov et al., 2003). Kronenberg et al. analysierten mit Hilfe einer transgenen Maus, die das grün fluoreszierende Protein GFP unter dem Promotor von Nestin exprimiert, die Morphologie der Nestin-positiven Zellen und die Expression weiterer Marker in diesen Zellen. Auf diese Weise konnten vier Subtypen proliferierender Zellen unterschieden werden. Typ-1 Zellen besitzen einen dreieckigen Zellkörper mit einem

baumartigen Fortsatz. Sie sind Nestin- und GFAP-positiv und zeigen eine Reihe an astrozytären Eigenschaften, sowohl elektrophysiologisch als auch morphologisch (Kronenberg et al., 2003; Filippov et al., 2003). Entsprechend der Erkenntnisse, dass es sich bei den Stammzellen des adulten Hippocampus um Astrozyten handelt (Seri et al., 2001), werden auch hier diese Typ-1 Zellen als die primären Vorläufer der späteren Neurone gesehen. Interessanterweise sind Typ-1 Zellen negativ für S100- β , ein Protein, das spezifisch von reifen Astrozyten exprimiert wird (Savchenko et al., 2000), und lassen sich daher von den Astrozyten ohne neuronengenerierenden Eigenschaften unterscheiden.

Nestin-positive Zellen, die kein GFAP exprimieren, werden als Typ-2 Zellen bezeichnet. Ihr Zellkörper ist im Gegensatz zu den Typ-1 Zellen kleiner und runder. Die Population der Typ-2 Zellen kann wiederum in Hinsicht auf die Expression des transient exprimierten Vorläufermarkers Doublecortin (DCX) unterteilt werden. So gibt es DCX-negative Typ-2a Zellen und DCX-positive Typ-2b Zellen. Im weiteren Verlauf der Entwicklung entstehen proliferationsfähige Zellen, die nur noch DCX exprimieren, aber nicht mehr Nestin, die Typ-3 Zellen (Kronenberg et al., 2003).

	GFAP	Nestin	DCX
Typ-1	+	+	
Typ-2a		+	
Typ-2b		+	+
Typ-3			+

Abb. 2: Tabellarische Darstellung der immunhistochemischen Eigenschaften der vier proliferativen Vorläuferzell-Subtypen.

Mit Ausnahme weniger Studien, wie beispielsweise der zuletzt genannten, zielten die meisten bisherigen Untersuchungen darauf ab, zwei Schlüsselereignisse im Rahmen der adulten Neurogenese zu analysieren: Die Proliferation und Identifizierung der Stamm- und Vorläuferzellen einerseits und die Phänotypisierung und Quantifizierung der reifen Neurone nach abgeschlossener Differenzierung andererseits. Sehr wenig ist hingegen über die verschiedenen Stadien der neuronalen Entwicklung zwischen diesen beiden Zeitpunkten bekannt. Zu Beginn der hier vorliegenden Studie war unklar, ab welchem Entwicklungsstadium die Zellen die Fähigkeit verlieren, sich selbst nachzubilden, das heißt jede weitere Mitose zu zwei differenzierteren Zellen

führt. Alternativ könnte die weitere Differenzierung in einem postmitotischen Stadium ablaufen. Außerdem war nicht bekannt, ab welchem Stadium die neurale Zelllinie beginnt, ab der die Vorläuferzelle auf die Differenzierung zu einem Neuron beschränkt ist. Um diese Fragen zu beantworten, ist es wichtig, die verschiedenen Entwicklungsstadien der Vorläuferzellen unterscheiden zu können. Ein Ziel der vorliegenden Studie war aus diesem Grund, die Proteinexpression in unreifen Neuronen zu untersuchen, um möglicherweise anhand unterschiedlicher Marker verschiedene Differenzierungsstadien unterscheiden zu können.

1.2.2 Mögliche Funktion der neu gebildeten Neurone

Neben der Phänotypisierung der proliferativen Stamm- und Vorläuferzellen versuchten viele Neurowissenschaftler die Frage zu beantworten, welche Bedeutung und Funktion die adulte Neurogenese als Teil der im Gehirn ablaufenden plastischen Prozesse hat.

Es ist bekannt, dass strukturelle Plastizität eine Rolle bei der Speicherung und Verarbeitung von Gedächtnisinhalten spielt. Welche Funktion dabei die Integration neuer Neurone in ein bereits bestehendes Netzwerk hat, ist bisher unklar. Eine Hypothese ist, dass durch die zusätzlichen Neurone nicht mehr „Speicher“ hinzukommt, sondern diese vielmehr an strategisch wichtigen Stellen als "Pfortner" am Eingang zum Gedächtnis fungieren (Kempermann, 2002). Der Hippocampus wird in dieser Analogie als "Eingang zum Gedächtnis" bezeichnet, durch den alle Gedächtnisinhalte laufen müssen, bevor sie abgerufen werden können. Die anatomische Struktur des Hippocampus bedingt, dass die Information bei diesem Prozess einen Flaschenhals passiert. Der Gyrus dentatus, mit seinen 250000 Körnerzellen (bei der Maus) erhält die Information aus dem entorhinalen Cortex und anderen Regionen. Von dort aus projizieren Moosfasern als Axone der Körnerzellen zu einer noch geringeren Zahl Pyramidenzellen in CA3. Die Axone aus CA3 leiten die Information weiter nach CA1 und von dort aus zurück zu kortikalen Strukturen (Kempermann, 2002). Kempermann postuliert, dass in Analogie zu einem Computer, die Addition neuer Neurone nicht bedeutet, eine neue Festplatte für mehr Speicher zu installieren, sondern eher strategische Änderungen in der Netzwerkarchitektur zu einer Optimierung der Leistungsfähigkeit führen.

Welche Funktion im Einzelnen die neuen Nervenzellen haben, bzw. deren Regeneration, ist experimentell nur schwer zu erforschen. Mäuse, deren Neurogenese durch ein Zytostatikum gehemmt wurde, schnitten bei hippocampusabhängigen Lernaufgaben und Konditionierungen schlechter ab als die Kontrollgruppe ohne Zytostatikum (Shors et al., 2001). Interessanterweise waren hippocampusunabhängige Lernaufgaben unbeeinflusst. Van Praag et al. (1999) konnten zeigen, dass LTP (hippocampale long term potentiation) als elektrophysiologisches Korrelat zum Lernen, bei den Mäusen erhöht war, deren Neurogenese durch physische Aktivität stimuliert worden war. Die Induktionsschwelle für die LTP ist in den jungen Körnerzellen an der inneren Grenze der Körnerzellschicht sehr viel niedriger als in den reifen Körnerzellen im apikalen Bereich der Körnerzellschicht (Wang et al., 2000). Auch wenn diese Studien darauf hinweisen können, dass es einen Zusammenhang zwischen Neurogenese und der Funktion des Hippocampus gibt, bleibt weiterhin offen, welche Rolle die neuen Neurone bei der Verarbeitung von Gedächtnisinhalten spielt.

Neueste Untersuchungen weisen darauf hin, dass die im adulten Hippocampus generierten Neurone insbesondere für die Verarbeitung und Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses und des hippocampusabhängigen räumlichen Gedächtnisses essentiell sind. Mit Hilfe eines sehr intelligenten Versuchsaufbaus zeigten Snyder et al. (2005), dass die „Blockierung“ der Neurogenese durch niedrig dosierte radioaktive Bestrahlung nur dann das Abschneiden der Tiere im *Morris-Water-Maze-Test* (Versuchsausrüstung zur Untersuchung des räumlichen Lernens und Gedächtnis) beeinflusste, wenn die Neurogenese während der Trainingsphase „ausgeschaltet“ wurde. Eine Bestrahlung vor oder nach der Lernphase des *Morris-Water-Maze-Tests* hatte keinen Einfluss auf das im Verfahren getestete räumliche Gedächtnis.

Grundlegende Voraussetzung für die oben genannten Überlegungen war der Beweis, dass die im adulten Gehirn generierten Neurone überhaupt funktionell in das bestehende Netzwerk eingebaut werden. Van Praag et al. (2002) konnten mit Hilfe eines retroviralen Vektors, der das grün fluoreszierende Protein GFP exprimiert, sowohl morphologische als auch elektrophysiologische Analysen sich teilender Zellen in lebenden hippocampalen Gewebeproben vornehmen. Diese Methode ermöglichte erstmals den Beweis, dass die neu gebildeten Neurone die selben morphologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften aufweisen wie reife Nervenzellen, und offenbar funktionell in das hippocampale Netzwerk integriert

werden. Dass dies nicht nur für einzelne neugeborene Neurone gilt, sondern für den Großteil der neu entstandenen Nervenzellen, konnte in unserem Labor gezeigt werden. Neue Neurone exprimieren vier Wochen nach der initialen Zellteilung aktivitätsabhängige Gene (so genannte immediate early genes (IEG)). IEG werden nach hippocampusabhängigen Lernaufgaben und epileptischen Anfällen sowohl von den „alten“ als auch von den „neuen“ Körnerzellen exprimiert (Jessberger und Kempermann, 2003).

Schmidt-Hieber et al. (2004) untersuchten die elektrophysiologischen Membraneigenschaften junger (ein bis drei Wochen nach der letzten Mitose) und alter Körnerzellen und stellten dabei entscheidende Unterschiede fest. Die auf jungen Körnerzellen exprimierte Calcium-Kanäle vom T-Typ generieren spezifische Aktionspotentiale, die ihrerseits zur Induktion synaptischer Plastizität führen. In diesem Zusammenhang kann LTP in jungen Neuronen leichter ausgelöst werden als in alten Zellen. Diese Entdeckung ist insofern von großer Bedeutung, als man nun davon ausgehen kann, dass die neu gebildeten Neurone als funktionelle Einheit synaptische Plastizität erleichtern, und ihnen somit eine entscheidende Rolle bei der Verarbeitung neuer Gedächtnisinhalte zukommt.

1.2.3 Regulationsmechanismen der adulten Neurogenese

Die Neubildung von Neuronen im erwachsenen Hippocampus ist kein statischer Prozess, sondern kann durch verschiedene Stimuli beeinflusst werden. In unterschiedlichen Experimenten wurde gezeigt, dass zum einen physiologische Faktoren wie Lernen (Gould et al., 1999), physische Aktivität (Van Praag et al., 1999) und das Leben in einer reizreichen Umgebung (Kempermann et al., 1997), und zum anderen pathologische Faktoren wie Epilepsie (Parent et al., 1997) und Ischämie (Liu et al., 1998; Arvidsson et al., 2002) einen Einfluss auf die adulte Neurogenese haben. Die Quantifizierung der neugeborenen Neurone beruht in den meisten Studien auf der Analyse BrdU-markierter Zellen, die neuronale Marker wie NeuN oder Calbindin, das calciumbindende Protein (CBP) der hippocampalen Körnerzellen, exprimieren. Im Fokus dieser quantitativen Analysen standen zum einen das Maß der Proliferation und zum anderen die Zahl der überlebenden neu gebildeten Zellen vier Wochen nach der BrdU-Injektion. Die Bestimmung der Gesamtzahl der überlebenden Neurone zu diesem Zeitpunkt wird auch als Netto-

Neurogenese bezeichnet, da man davon ausgeht, dass die neuronalen Vorläuferzellen nach etwa vier Wochen zu reifen Neuronen differenziert sind und die Zahl BrdU-positiver Zellen ab diesem Zeitpunkt stabil bleibt (Kempermann et al., 2003). Sowohl die Proliferation als auch die Netto-Neurogenese werden durch die verschiedenen Stimuli in unterschiedlichem Maß beeinflusst. Dieser Befund ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass diese Stimuli die adulte Neurogenese zu unterschiedlichen Zeitpunkten der neuronalen Entwicklung regulieren.

Um die Frage zu klären, ob die verschiedenen neurogenesestimulierenden Faktoren einen unterschiedlichen Einfluss auf eine bestimmte Entwicklungsphase der neuen Neurone haben, wurden in der vorliegenden Arbeit drei Regulationsparadigmen genauer untersucht:

Leben in einer reizreichen Umgebung, physische Aktivität und epileptische Anfälle.

1.2.3.1. Beeinflussung der Neurogenese durch eine reizreiche Umgebung

Donald O. Hebb postulierte 1949 die Plastizität von Synapsen und eröffnete damit ein neues Konzept der Hirnfunktion. Er schlug vor, dass repetitive Exzitation eines Neurons durch ein anderes Neuron, Veränderungen in einer oder beiden Zellen insofern bewirken könnte, als sich ihre Übertragungseigenschaften ändern und ihre funktionale Effizienz steigen würde (Hebb, 1949). In den darauffolgenden Jahrzehnten wurde der Begriff der Plastizität erweitert und beschreibt heute plastische Veränderungen der Synapsen, Neuriten und sogar ganzer Neurone. In diesem Zusammenhang machte Hebb eine Zufallsentdeckung: Versuchsratten, die er als Haustiere mit zu sich nach Hause nahm, und die somit aus den monotonen Lebensbedingungen im Labor in eine reizreiche Lebensumgebung kamen, zeigten veränderte Verhaltensweisen und verbesserte Problemlösungsfähigkeiten als ihre Artgenossen, die im Labor verblieben waren (Hebb, 1947). Aus dieser Entdeckung entwickelte sich das wissenschaftliche Konzept der reizreichen Lebensumgebung (*enriched environment*). Rosenzweig et al. erforschten in einer Reihe von Studien die strukturellen Veränderungen im Hirn von Mäusen, die einer reizreichen Umgebung exponiert waren, und fanden die ersten biologisch organischen Grundlagen zu Hebb's Verhaltensforschungen. Tiere, die durch das "*enriched environment*" mehr Stimuli ausgesetzt waren als die Kontrolltiere, hatten ein höheres Hirngewicht (Bennett et al. 1964), einen dickeren Cortex, Veränderungen der neuronalen Dichte

im Cortex (Diamond et al., 1966) und einen veränderten Gehalt an Acetylcholinesterase im Gehirn (Bennett et al., 1964).

In all diesen Studien wurde ein ähnlicher Versuchsaufbau gewählt, der auch heute noch in der Plastizität- und Gedächtnisforschung oft Verwendung findet und unter dem Namen "*enriched environment*" zu einem feststehenden Begriff tierexperimenteller Studien geworden ist. Die reizreiche Lebensumgebung unterscheidet sich zu den Lebensbedingungen im "normalen" Laborkäfig durch einen größeren Käfig, in denen mehr Tiere gehalten werden, die einerseits die Möglichkeit für komplexere soziale Interaktionen haben, und andererseits durch diverse Hilfsmittel wie Tunnelsysteme, Klettergerüst und Nestbaumaterial einen größeren Anreiz haben, ihre Umwelt zu explorieren. Durch einen wöchentlichen Wechsel dieser Hilfsmittel (neu angeordnete Tunnelsysteme) kann dieser Reiz noch gesteigert werden.

Ende der neunziger Jahre wurde erstmals ein möglicher Zusammenhang zwischen einer stimulusbereicherten Lebensumgebung ("*enriched environment*") und adulter Neurogenese untersucht, aufbauend auf den Ergebnissen von Joseph Altman, der zeigen konnte, dass das *enriched environment* einen Effekt auf die Gliogenese ausübt (Altman et al., 1964). Kempermann et al. (1997) berichteten, dass Mäuse, die für 40 Tage in einer reizreichen Umgebung lebten, signifikant mehr neue Nervenzellen im Gyrus dentatus bildeten, und das Volumen des Hippocampus zunahm. Interessanterweise war die gesteigerte Netto-Neurogenese, das heißt die Zahl der maturierten neuentstandenen Zellen, nicht auf eine erhöhte Proliferation der Stammzellen zurückzuführen, sondern dieser Stimulus beeinflusste lediglich das Überleben der neugeborenen Zellen positiv (Kempermann et al., 1997). Darüber hinaus verbesserten sich die Lerneigenschaften der untersuchten Tiere (Kempermann et al., 1997; Wainwright et al., 1993). In diesem Zusammenhang ist auch zu erwähnen, dass im umgekehrten Fall Lernaufgaben unterschiedliche Effekte auf die Neurogenese ausüben. Gould et al. (1999) zeigten, dass hippocampusabhängige Lernaufgaben (*Morris Water Maze*) die Zahl der neuen Neurone im Gyrus dentatus steigert. Spätere Studien lassen aber vermuten, dass der Zusammenhang zwischen adulter Neurogenese und hippocampusabhängiger Lernaufgaben weitaus komplexer ist, als zunächst angenommen. Es ist wahrscheinlich, dass Lernaufgaben das Überleben der neuen Zellen in Abhängigkeit

ihres Alters (Reifestadium der Zelle) in unterschiedlicher Weise beeinflussen, bzw. frühe und späte Lernphase differenzierte Effekte ausüben (Dobrossy et al., 2003). So steigt durch das Lernen die Zahl der neuen Neurone, die während der späten Phase der Lernaufgabe gebildet wurden, jedoch senkt diese späte Lernphase die Zahl der neu gebildeten Neurone, die während der frühen Phase des Lernens entstanden sind (Dobrossy et al. 2003).

Welches Reifestadium die neuen Zellen erreicht haben müssen, um von einem dieser Effekte beeinflusst werden zu können, sei es eine Lernaufgabe oder das *enriched environment*, ist bisher nicht detailliert untersucht (siehe auch Kapitel 1.2.2). Ein Weg dies herauszufinden, wäre eine quantitative Analyse der unreifen Zellen mittels spezifischer Vorläuferzellmarker. Voraussetzung hierfür ist natürlich, geeignete Marker unreifer Körnerzellen zu finden und deren Expressionszeitraum während der Entwicklung zu bestimmen.

1.2.3.2 Beeinflussung der Neurogenese durch körperliche Aktivität

Nachdem bekannt war, dass das im vorigen Kapitel beschriebene *enriched environment* einen positiven Einfluss auf die Neubildung von Nervenzellen im erwachsenen Hippocampus hat, versuchten Gage und Kollegen am Salk Institute die verschiedenen Stimuli einer reizreichen Lebensumgebung aufzuschlüsseln und deren Effekte einzeln zu erforschen. Da in den damals angewandten Versuchsaufbauten die Tiere im *enriched environment* Zugang zu einem Laufrad hatten, untersuchte man zwei Hauptstimuli: Den Einfluss der physischen Aktivität (Laufrad im *enriched environment*) und den Effekt von Lernaufgaben (Exploration der Lebensumgebung im *enriched environment*) auf die adulte Neurogenese.

Tiere, die während des Lerntrainings (*Morris-Water-Maze*) BrdU injiziert bekamen, hatten nicht mehr neue Nervenzellen (vgl. auch 2.3.1). Wohingegen sich bei den Mäusen, die Zugang zu einem Laufrad hatten (Runner), die Zahl der BrdU-markierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen ohne Laufrad vier Wochen nach BrdU nahezu verdoppelt hatte (van Praag et al., 1999a). Es war nicht nur die Gesamtzahl BrdU-positiver Zellen erhöht, sondern zusätzlich auch spezifisch die BrdU-Zellen, die NeuN-positiv waren, d.h. die Zahl neuer Neurone (Kontrollen: 81,5% der BrdU-positiven Zellen hatten einen neuronalen Phänotyp; Runner: 92,8% der BrdU-markierten Zellen hatten einen neuronalen Phänotyp). Physische Aktivität

scheint aber nicht nur die Proliferation der adulten Stamm- bzw. Vorläuferzellen zu beeinflussen. Tiere, die Zugang zu einem Laufrad hatten, wiesen Verbesserungen der räumlichen Navigation im Morris-Water-Maze-Test auf und hatten eine erhöhte LTP (hippocampale long term potentiation, ein physiologisches Korrelat der synaptischen Plastizität). Somit beeinflusst dieser Stimulus nicht nur die adulte Neurogenese, sondern verbessert auch das hippocampusabhängige Lernen der räumlichen Orientierung und die synaptische Plastizität (van Praag et al., 1999b).

Auch wenn man davon ausgehen muss, dass physische Aktivität als physiologischer und sehr allgemeiner Reiz viele Organsysteme beeinflusst, ist es doch überraschend, dass der Effekt auf die adulte Neurogenese nur im Gyrus dentatus zu beobachten ist, nicht aber in anderen neurogenen Regionen wie der SVZ oder dem Bulbus olfactorius (Brown et al., 2003). Interessanterweise gibt es auch teilungsaktive Zellen im Cortex, deren Zahl sich in spezifischen Schichten des Cortex durch physische Aktivität erhöht (Ehninger und Kempermann, 2003). Im Gegensatz zum Hippocampus handelte es sich bei diesen Zellen aber hauptsächlich um Microglia und nicht um Neurone.

Noch ist es unklar über welchen Mechanismus physische Aktivität die Zellproliferation stimuliert. Es ist bekannt, dass dieses Paradigma die Expression verschiedener Wachstumsfaktoren, wie BDNF, IGF-1, FGF-2 und GDNF induziert (Neeper et al., 1995; Gomez-Pinilla et al., 1997; Carro et al., 2000; Gomez-Pinilla et al., 2002). Andere Studien halten eine Anregung der Vaskularisierung im Hippocampus nach physischer Aktivität für möglich, was zu einer Steigerung der Neurogenese führen könnte (Palmer et al., 2000). Außerdem wird diskutiert, dass die Aktivierung bestimmter NMDA-Rezeptoren für den proliferationssteigernden Effekt verantwortlich ist (Kitamura et al., 2003).

1.2.3.3 Beeinflussung der Neurogenese durch Kainat-induzierte Anfälle

Neuronale Plastizität wird nicht nur durch physiologische Faktoren wie Lernen oder dem oben beschriebenen *enriched environment* induziert, sondern auch durch pathologische Prozesse wie bei der Epilepsie. Temporallappenanfälle führen bei erwachsenen Nagetieren zu axonaler Reorganisation, Aktivierung von Astrozyten, Umstrukturierung der Dendriten und Dispersion der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus (Parent et al., 1997). Als neuentdeckter plastischer Prozess ist auch eine

gesteigerte Neurogenese hinzuzufügen. Durch Pilocarpin oder Tractus perforans Stimulation ausgelöste Stati epileptici führten zu einer Steigerung der Körnerzellneurogenese (Parent et al., 1997; Bengzon et al., 1997). Auch nach epileptischen Anfällen, die durch den Glutamatrezeptor-Agonisten Kainat ausgelöst wurden, zeigten die untersuchten Tiere eine Steigerung der Zellteilungsrate im Gyrus dentatus um das 6-fache (Gray and Sundstorm, 1998).

Man könnte annehmen, dass die bei einem Anfall ausgelöste bzw. den Anfall auslösende elektrische Aktivität direkt die mitotische Aktivität und damit die Proliferation stimuliert. Außerdem scheint jedoch die Differenzierung der neuen Zellen durch erhöhte exzitatorische Aktivität beeinflusst zu sein. Die Exzitation der auf den Vorläuferzellen exprimierten NMDA-Rezeptoren führt zu einer Expression des Proteins NeuroD, welches eine entscheidende Rolle bei der neuronalen Differenzierung der Vorläuferzellen spielt (Deisseroth et al., 2004). Da aber bekannt ist, dass es nach Anfällen auch zu einem Neuronenverlust in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus kommt (Sloviter et al., 1996; Bengzon et al., 1997), könnte die Neurogenese bei diesem Stimulus auch indirekt Apoptose-assoziiert induziert sein. Studien zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Zelltod und daraus resultierender Neurogenese unterstützen diese Hypothese. So konnte nicht nur im Gyrus dentatus und Bulbus olfaktorius von Nagetieren (Gould und McEwen, 1993; Biebl et al., 2000), sondern auch bei adulten Singvögeln (Scharff et al., 2000) dieser Zusammenhang beobachtet werden.

Es ist jedoch wahrscheinlich, dass mehrere Faktoren zu einer gesteigerten Proliferation der adulten Stamm- und Vorläuferzellen führt. Dazu könnte auch die, durch einen Anfall induzierte Expression bestimmter Wachstumsfaktoren gehören (Riva et al., 1992; Humpel et al., 1993; Gall et al., 1994; Opanashuk et al., 1999).

Unklar ist bisher, welche Vorläuferzellen durch die epileptische Aktivität zur Zellteilung angeregt werden. Dies könnten entweder bisher ruhende Vorläuferzellen, die für den Proliferationszyklus rekrutiert werden, oder aber bereits mitotisch aktive Zellen sein (Parent, 2002). Um diese Frage beantworten zu können, ist es wichtig die verschiedenen Vorläuferzellpopulationen zu charakterisieren und teilungsaktive von bereits postmitotischen Zellen zu differenzieren. Diese Charakterisierung sollte Ziel der vorliegenden Arbeit sein.

1.3 Problemstellung und Versuchsaufbau

Während in den letzten zehn Jahren insbesondere die Identität und das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Stammzellen einerseits und die Funktion der reifen neugebildeten Neurone andererseits erforscht wurde, ist relativ wenig über verschiedenen Entwicklungsstadien der neuronalen Vorläuferzellen zwischen initialer Zellteilung und abgeschlossener Differenzierung bekannt. Welche Entwicklungsstufen können während der Genese unterschieden werden? Ab wann beginnt die neuronale Differenzierung der Vorläuferzelle und wann verliert sie die Fähigkeit sich zu teilen? Können diese verschiedenen Stadien der Entwicklung anhand unterschiedlicher Proteinexpression voneinander abgegrenzt werden?

Die vorliegende Arbeit untersucht das Expressionsmuster verschiedener Proteine (insbesondere calciumbindende-Proteine (CBP)) in den Vorläuferzellen der subgranulären Zone (SGZ) des Mäusegehirns, um eventuell vorhandene Expressionsunterschiede in Abhängigkeit des Reifestadiums der Neurone aufdecken zu können.

In Vorversuchen wurden einige wenige vier Wochen alte Neurone gefunden, die nicht wie erwartet das für Körnerzellen typische CBP Calbindin, sondern Calretinin exprimierten. Calretinin (CR) galt bisher als CBP einer Subpopulation hippocampaler Interneurone. Die ursprüngliche Überlegung, es könne sich um neuentstandene Interneurone handeln, bestätigte sich nicht (vgl. Resultate) und führte zu der Haupthypothese dieser Arbeit:

Exprimieren neue Neurone während ihrer Entwicklung phasenspezifisch unterschiedliche calciumbindende Proteine?

In zwei anschließenden Versuchen sollte zusätzlich untersucht werden, ob 1) reifeabhängige Expressionsunterschiede sowohl während der embryonalen als auch während der adulten Neurogenese auftreten, und ob 2) neurogenesestimulierende Faktoren die Zahl der unreifen Neurone eines bestimmten Entwicklungsstadiums beeinflusst.

Es wurde folgender Versuchsaufbau gewählt: Zur Darstellung der neugeborenen Zellen bekamen alle Mäuse BrdU injiziert und wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Injektion getötet. Mittels Immunhistochemie konnten die neuentstandenen Zellen sowohl quantitativ als auch qualitativ hinsichtlich der Expression bestimmter Proteine untersucht werden. Die Mäuse, deren Neurogenese durch

spezifische Faktoren stimuliert werden sollten, lebten entweder in einer reizreichen Umgebung (*enriched environment*), oder hatten Zugang zu einem Laufrad (Runner), oder wurden mit Kainat behandelt, um bei ihnen epileptische Anfälle auszulösen (siehe auch Material und Methoden).

Mit Hilfe der quantitativen Analysen neuer (BrdU-positiver) Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der BrdU-Injektion und der Bestimmung der immunhistochemischen Phänotypen dieser Zellen sollte die Differenzierung verschiedener Entwicklungsstadien anhand unterschiedlicher Marker möglich gemacht werden (Brandt et al., 2003).