

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Expression calciumbindender Proteine in neu gebildeten Nervenzellen**

#### ***3.1.1 Hintergrund und Fragestellung***

Wie eingangs erwähnt, werden im adulten Gyrus dentatus zwei verschiedene Zelltypen generiert, Nervenzellen und Astrozyten (Kuhn et al., 1996). Vier Wochen nach der letzten BrdU-Injektion exprimieren ca. 85% der BrdU-markierten Zellen NeuN (**N**euro**n**al **N**uclei), ein nukleäres Protein, das spezifisch in reifen Neuronen exprimiert wird (Mullen et al., 1992).

Zu Beginn der vorliegenden Studie war es das Ziel zu untersuchen, welche anderen Zelltyp-spezifischen Proteine in den Zellen exprimiert werden, die sich vier Wochen zuvor geteilt hatten. Diese Arbeit sollte sich zunächst auf die Gruppe der calciumbindenden Proteine (CBP) beschränken, da im Hippocampus die Expression verschiedener CBP in den Neuronen einen Rückschluss auf den Nervenzelltyp erlaubt.

So haben Körnerzellen, die Zellen, die während der adulten Neurogenese gebildet werden, Calbindin als CBP (Sloviter, 1989). Aber auch Interneurone können durch die Expression verschiedener CBP in unterschiedliche Subtypen klassifiziert werden. Man unterscheidet dabei Calretinin-, Calbindin-, und Parvalbumin-positive Interneurone (Freund and Buzsaki, 1996; Sloviter et al., 2001).

Diese zuletzt genannten CBP sollten auch im Rahmen dieses Experiments im Fokus der Untersuchung stehen.

#### ***3.1.2 Ergebnisse***

Überraschenderweise konnten unter den BrdU-markierten Zellen neben vielen Calbindin-positiven auch einige wenige Zellen gefunden werden (5% der BrdU-markierten Zellen), die sich mit einem Antikörper gegen Calretinin (CR) anfärben ließen (Abb. 1). Diese Zellen waren fast ausschließlich in der subgranulären Zone (SGZ) lokalisiert und morphologisch nicht von den Calbindin-positiven Körnerzellen des Stratum granulosum (SG) und der subgranulären Zone zu unterscheiden. In den wesentlich größeren Parvalbumin exprimierenden Zellen des Gyrus dentatus, konnte hingegen in keinem Fall BrdU nachgewiesen werden.

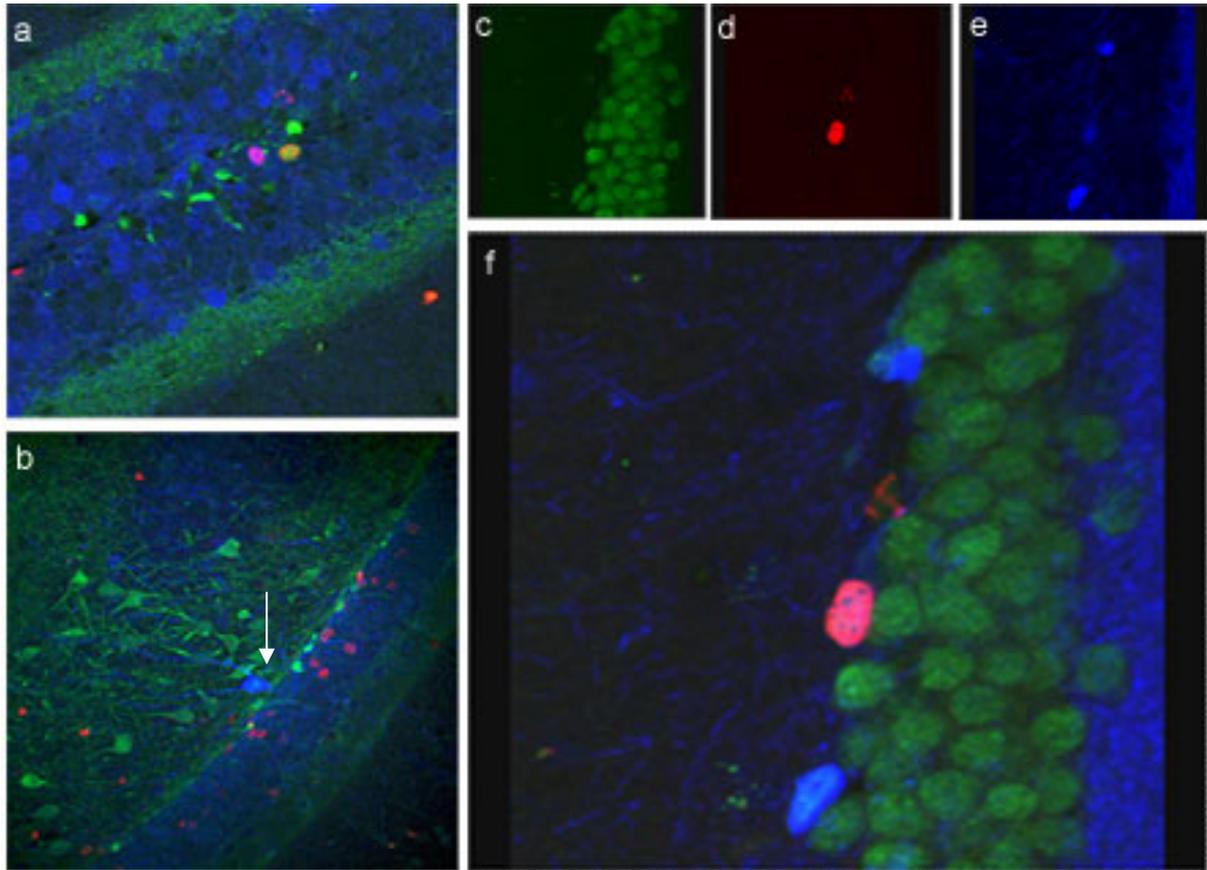


Abb. 7: Expression calciumbindender Proteine im adulten Gyrus dentatus vier Wochen nach der letzten BrdU-Injektion. (a) Im Zentrum des Bildes sind zwei BrdU-markierte Zellen (rot) zu sehen. Die linke Zelle exprimiert Calbindin (blau) und ist daher als neue Körnerzelle zu identifizieren. Die rechte BrdU-markierte Zelle ist CR-positiv (grün) und stellt somit einen bisher unbekanntem teilungsaktiven Zelltyp dar. (b) Der Pfeil markiert eine Parvalbumin (blau) exprimierende Korbzelle. Korbzellen unterscheiden sich morphologisch durch ein größeres Zellsoma und ihrer hilaren Lokalisation von den Körnerzellen des SG. Dieser Zelltyp war in unserem Versuch niemals BrdU (rot) positiv. (c-e) Einzeldarstellung der drei verwendeten AK aus Abbildung f: NeuN (grün), BrdU (rot) und CR (blau). (f) Die gefundenen CR/BrdU doppelmarkierten Zellen exprimieren den neuronalen Marker NeuN.

### 3.1.3 Interpretation

Wie erwartet, fanden sich im Gyrus dentatus zahlreiche BrdU-markierte Zellen, die Calbindin, das CBP der hippocampalen Körnerzellen, exprimierten. Erstmals konnte in diesem Experiment ein dritter BrdU inkorporierender Zelltyp (neben Calbindin-positiven Körnerzellen und S100 $\beta$ -positiven Astrozyten) nachgewiesen werden, der CR exprimierte und in der SGZ und der Körnerzellschicht lokalisiert war. Dieser Befund warf die Frage auf, ob die CR-Expression der im adulten Gyrus dentatus geborenen Zellen tatsächlich an einen bestimmten Zelltyp gebunden ist, und wenn ja, um welche Zellpopulation es sich handelt.

## 3.2 Welche Zellen im Gyrus Dentatus exprimieren CR?

### 3.2.1 Hintergrund und Fragestellung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass vier Wochen nach BrdU etwa 5% der neuen Zellen CR exprimierten, musste nun die Identität dieser Zellen geklärt werden.

Alle bisherigen Studien beschrieben einheitlich drei verschiedene neuronale Zelltypen, die sich mit einem Antikörper gegen CR anfärben lassen (Sloviter et al., 2001; Freund and Buzsaki al., 1996; Liu et al. 1996):

(1) Mooszellen im Hilus zwischen den beiden Körnerzellschichten, (2) eine Untergruppe hippocampaler Interneurone und (3) Reelin-exprimierende Cajal Retzius Zellen (Abb. 8).

Um den Phänotyp der neugeborenen CR-positiven Nervenzellen zu bestimmen, wurde das Vorhandensein spezifischer Marker für Interneurone bzw. Cajal Retzius Zellen in den BrdU/CR-doppelpositiven Zellen untersucht. Da alle Interneurone des Hippocampus inhibitorisch sind, lassen sie sich mit Antikörpern gegen GABA bzw. GAD (Glutamatdecarboxylase), dem GABA-synthetisierenden Enzym, anfärben (Freund and Buszaki, 1996). Darüber hinaus besitzen vor allem Interneurone in der Körnerzellschicht und der SGZ spezielle GABA-Rezeptoren (GABA-Rezeptor A1 Untereinheit), anhand derer man sie von exzitatorischen Zellen des Gyrus dentatus unterscheiden kann (Bouilleret et al., 2002; Redecker et al., 2000). Um alle Cajal Retzius Zellen sichtbar zu machen, wurde ein Antikörper gegen Reelin benutzt, ein Glykoprotein, das spezifisch von diesen Zellen gebildet wird (D' Arcangelo et al., 1995; Meyer et al. 2000).

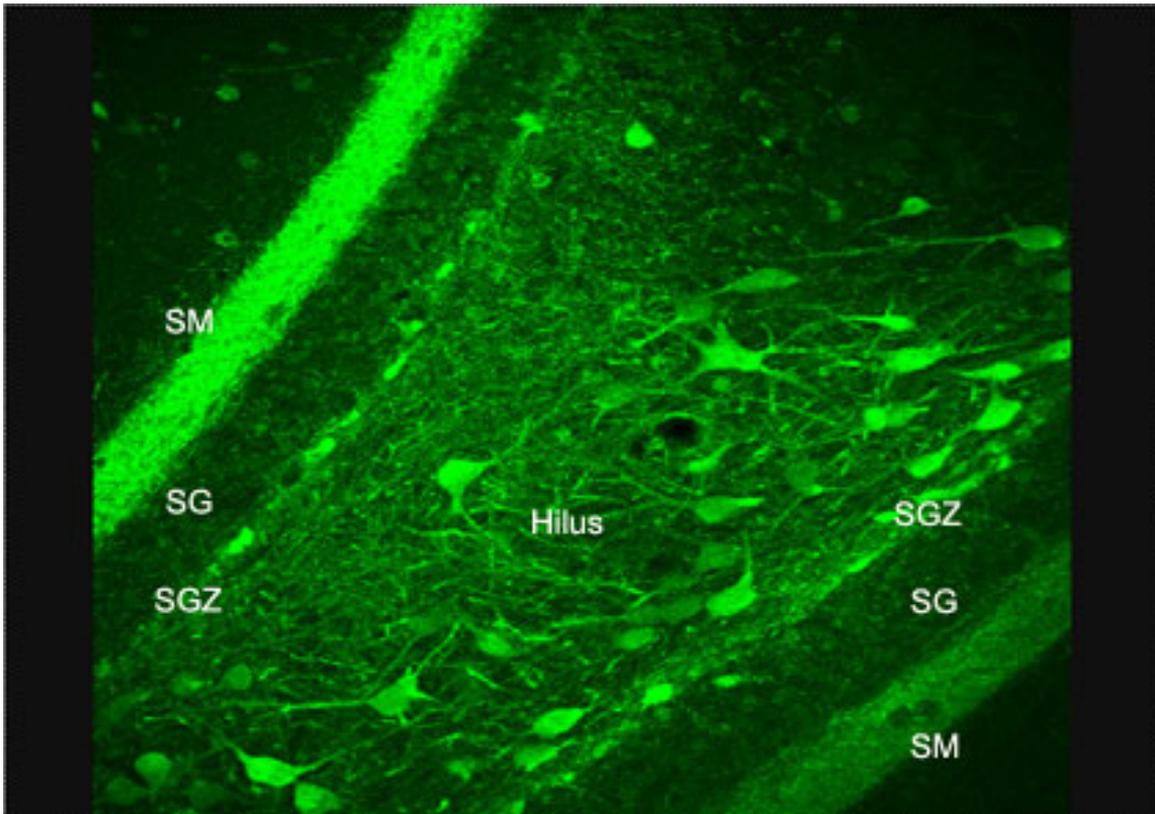


Abb. 8: Übersichtsaufnahme des Gyrus dentatus mit einem AK gegen CR. Im Zentrum des Bildes befindet sich der Hilus mit seinen CR-positiven Mooszellen. Begrenzt wird der Hilus durch die Körnerzellschicht (Stratum granulosum, SG) und dem anschließenden Stratum moleculare (SM), in dessen ersten Drittel die ebenfalls CR-positiven Dendriten der Mooszellen als dichtes Band zu sehen sind. Die subgranuläre Zone (SGZ) beschreibt ein bis zwei Zellschichten zwischen dem Hilus und dem SG. Die in dieser Zone lokalisierten CR-positiven Zellen, wurden bisher als eine Subpopulation hippocampaler Interneurone beschrieben.

### **3.2.2 Ergebnisse**

Bei der Untersuchung mehrerer Serien verschiedener Hirne konnten keine BrdU-markierten, CR-positiven Zellen gefunden werden, die einen der für Interneurone spezifischen Marker exprimierten (Abb. 9). So waren diese Zellen weder GABA-Rezeptor A1-positiv, noch konnte in diesen Zellen der interneuronale Transmitter GABA nachgewiesen werden.

Auch wenn viele BrdU-negative, CR-positive Zellen Reelin coexprimierten, stellten wir fest, dass keine der BrdU-positiven CR-Zellen Reelin-positiv war.

Die CR-positiven Mooszellen konnten anhand ihrer Morphologie und ihrer ausschließlich hilären Lokalisation eindeutig von den in der SGZ gelegenen BrdU-markierten Zellen unterschieden werden.

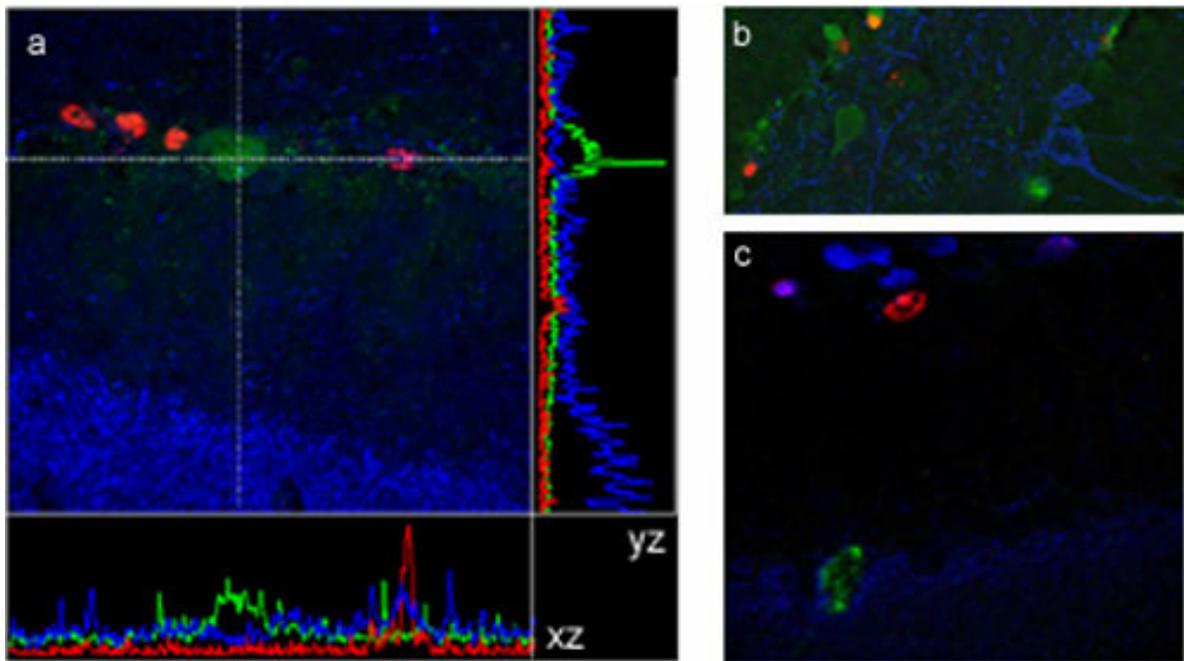


Abb. 9: (a) BrdU-markierte CR-positive Zellen exprimierten weder GABA (grün; BrdU: rot; CR: blau) noch (b) den Interneuron-spezifischen Rezeptor GABA A1 (blau; BrdU: rot; CR: grün). (c) Auch Reelin-positive Zellen (grün) waren in keinen der untersuchten Gewebeproben BrdU-markiert (BrdU: rot; CR: blau).

### **3.2.3 Interpretation**

Dieser negative Befund bedeutet, dass es sich bei den neugebildeten CR exprimierenden Zellen, um keinen der bisher beschriebenen CR-positiven Zelltypen handelt. Sie zeigten weder immunhistochemische Charakteristika von Interneuronen noch von Cajal-Retzius-Zellen.

Nach diesem Ergebnis ergab sich die weiterführende Fragestellung, ob die CR-Expression nicht auf einen bestimmten Zelltyp hinweist, sondern nur ein zeitabhängiges transientes Phänomen der neuentstehenden Nervenzellen ist.

## **3.3 Zeitabhängige Proteinexpression in neu entstandenen Nervenzellen**

### **3.3.1 Hintergrund und Fragestellung**

Um die Expression verschiedener neuronaler Marker in den neu entstandenen Neuronen unterschiedlichen Alters zu bestimmen, wurden 25 Mäuse in fünf Gruppen unterteilt, die alle zum gleichen Zeitpunkt eine einmalige BrdU-Injektion erhielten. Als

Perfusionszeitpunkte nach der BrdU-Markierung (im Folgenden kurz „nach BrdU“ genannt) wurden folgende Zeitintervalle gewählt: ein Tag, drei Tage, eine Woche, zweieinhalb Wochen und vier Wochen nach BrdU. Somit konnte die altersabhängige Expression von CR und anderen Körnerzell- oder Vorläuferzell-spezifischen Proteinen (Prox-1, DCX) in den neugebildeten Nervenzellen, von der Vorläuferzelle bis zum reifen Neuron, untersucht werden.

### 3.3.2 Ergebnisse

Tiere, die einen Tag nach BrdU analysiert wurden, wiesen einen ähnlichen Befund wie die schon zuvor untersuchten Tiere, die vier Wochen nach BrdU getötet wurden, auf. Etwa 5% der BrdU-markierten Zellen im Gyrus dentatus waren immunreaktiv für CR. Im weiteren Verlauf stieg die Zahl der BrdU-markierten Zellen, die CR exprimierten. So waren von den Zellen, die sich drei Tage zuvor geteilt hatten, bereits  $47,3\% \pm 4\%$  CR-positiv. Nach Erreichen des maximalen Wertes von  $76\% \pm 1,1\%$  eine Woche nach BrdU, sank die Zahl der CR-exprimierenden unter den BrdU-positiven Zellen mit steigendem Alter der neu entstandenen Zellen (Abb. 4). Sechs Wochen nach BrdU waren diese Zellen nicht mehr nachweisbar.

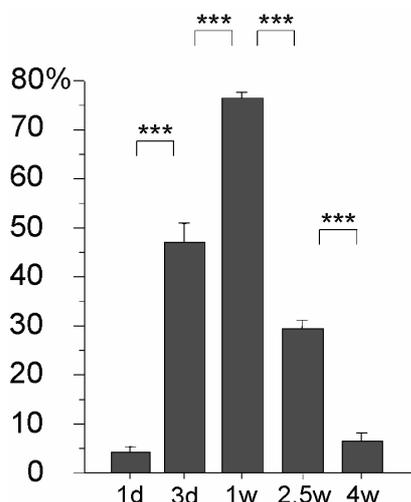


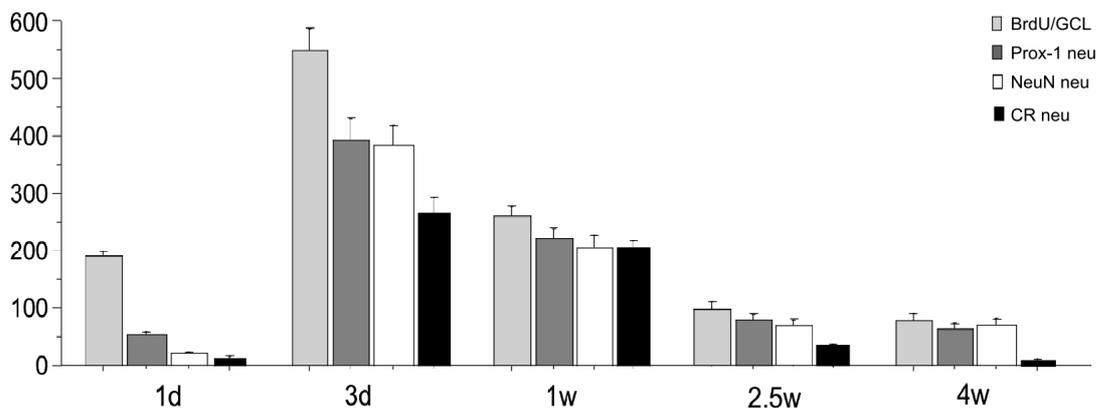
Abb. 10: Zeitabhängige CR Expression zu fünf verschiedenen Zeitpunkten nach einer einzelnen BrdU-Injektion. Die Balken geben den Prozentwert der BrdU-markierten Zellen wieder, die zu dem jeweiligen Zeitpunkt CR-positiv waren. (\*\*\*)  $P < 0,001$

Betrachtet man die Gesamtzahl der BrdU-positiven Zellen (Abb. 11) im Kontext dieser Zeitreihe, beobachtet man einen Anstieg zwischen Tag eins und Tag drei. Dies spricht dafür, dass in diesem Zeitraum die Teilungsrate dieser Zellen höher ist als die Zahl sterbender Vorläuferzellen. Im Gegensatz dazu unterliegen ab dem dritten Tag mehr BrdU-markierte Zellen dem programmierten Zelltod, auch wenn

davon auszugehen ist, dass auch drei Tage alte Zellen noch proliferieren. Zweieinhalb Wochen nach BrdU erreicht die Zahl der markierten Zellen ein stabiles Niveau, welches sich, wie von Kempermann et al. (2003) nachgewiesen wurde, auch ein Jahr später nicht mehr ändert.

Es wurde nicht nur die Zahl neuer CR-positiver Zellen, sondern auch die Zahl der neuen Zellen, die andere neuronale Marker exprimieren, in Abhängigkeit vom Alter der Zelle quantifiziert (Abb. 11). Wir fanden, dass NeuN als neuronaler Marker ähnlich wie CR, schon ein Tag nach BrdU in einigen wenigen Zellen exprimiert wird. Nach einer Woche waren im Wesentlichen alle neuen CR-Zellen auch positiv für NeuN. Jedoch blieben diese Zellen im Gegensatz zu CR NeuN-positiv und in ihrer Zahl nach zweieinhalb Wochen stabil.

Prox-1 ist ein für Körnerzellen spezifischer Transkriptionsfaktor (Pleasure et al., 2000), der, wie man der Zeitreihe entnehmen kann, schon sehr früh (ein Tag nach BrdU) in den neugebildeten Körnerzellen gebildet wird und somit den Phänotyp der entstehenden Zellen festlegt. Die Gesamtzahl, der neuen Prox-1-positiven Zellen erreicht, wie auch die der neuen CR- und neuen NeuN-positiven Zellen, nach drei Tagen ihr Maximum. Nach zweieinhalb Wochen exprimierten alle neuen Neurone Prox-1.



Gruppe	BrdU/GCL	% CR	CR neu	NeuN neu	Prox-1 neu
1d	190 ± 9	4.5 ± 1.1	9 ± 2	28 ± 2	60 ± 5
3d	550 ± 38	47.3 ± 4	261 ± 26	382 ± 32	392 ± 38
1w	263 ± 18	76.6 ± 1.1	201 ± 12	204 ± 20	223 ± 13
2.5w	96 ± 13	30.9 ± 1.8	29 ± 2	74 ± 10	80 ± 10
4w	79 ± 11	6.5 ± 1.7	6 ± 2	75 ± 10	58 ± 9

Abb. 11: Zeitabhängige Expression Neuronen-spezifischer Marker (Prox-1, NeuN und CR). Die Balken zeigen die Gesamtzahl BrdU-markierter Zellen in der Körnerzellschicht (BrdU/GCL) und die Anzahl der neugebildeten Zellen eines bestimmten Phänotyps (Prox-1 neu, NeuN neu, CR neu).

Doublecortin (DCX), ein Schlüsselmolekül der hippocampalen und cortikalen Entwicklung (des Portes et al., 1998; Corbo et al., 2002), wird auch während der adulten Neurogenese transient von den neu generierten Zellen exprimiert (Kempermann et al., 2003; Rao und Shetty, 2004; Couillard-Despres et al., 2005). Einen Tag nach einwöchiger BrdU-Injektion konnten wir in den neu entstandenen Zellen sowohl DCX, als auch CR nachweisen (Abb. 12). Die Zellen, die sich vier Wochen zuvor geteilt hatten, waren hingegen im Wesentlichen immunnegativ für DCX und CR.

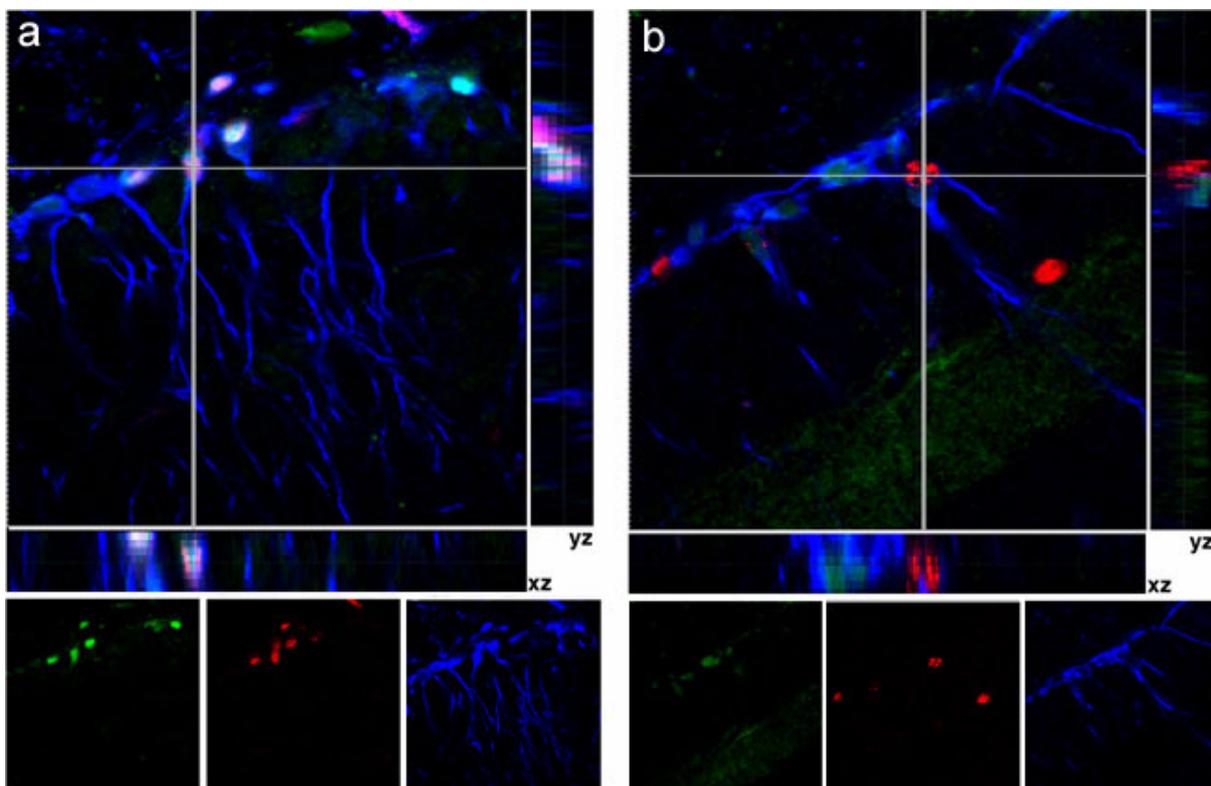


Abb. 12: Transiente Expression von DCX und CR in neugebildeten Nervenzellen. (a) Ein Tag nach einwöchiger BrdU-Gabe exprimierten die meisten neuen Zellen (BrdU: rot) sowohl CR (grün) als auch DCX (blau). (b) Vier Wochen später waren bis auf wenige Ausnahmen die BrdU-markierten Zellen (rot) negativ für DCX (blau) und CR (grün).

### 3.3.3 Interpretation

Anhand dieser Ergebnisse konnte die Vermutung bestätigt werden, dass CR in der Tat transient in den neu entstandenen Zellen gebildet wird. Die Expression begann einen Tag nachdem sich die Vorläuferzelle geteilt hatte, erreichte ihr Maximum nach einer Woche und war in den sechs Wochen alten Zellen nicht mehr zu sehen.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass unreife Zellen, die während der adulten Neurogenese entstanden sind, transient CR als CBP exprimierten.

Ein weiteres Argument für die transiente Expression von CR in neugebildeten Nervenzellen während eines unreifen Entwicklungsstadiums ist das gleichzeitige Vorhandensein von DCX in diesen Zellen.

Der ähnliche Expressionsverlauf von CR, NeuN und Prox-1 innerhalb der ersten Woche nach der Zellteilung, lässt die Vermutung zu, dass es sich bei den BrdU-positiven CR-Zellen um unreife Körnerzellen handelt. Diese Vermutung sollte in einem nächsten Experiment überprüft werden.

### **3.4 Nachweis Körnerzell-spezifischer Marker in den neu entstandenen CR-Zellen**

#### ***3.4.1 Hintergrund und Fragestellung***

Um den tatsächlichen Körnerzellphänotyp der neuen CR-Zellen zu überprüfen, wurde die Expression körnerzellspezifischer Marker in diesen Neuronen analysiert.

Körnerzellen sind glutamaterg und exprimieren aus diesem Grund den Aminosäuretransporter EAAT (excitatory amino acid transporter). Außerdem können sie durch die Expression des Homeobox-Transkriptionsfaktor Prox-1 von allen anderen Zellen im Hippocampus unterschieden werden.

#### ***3.4.2 Ergebnisse***

Einen Tag nach einwöchiger BrdU-Gabe besaßen alle neuen CR-Zellen eine Immunreaktivität für Prox-1 (Abb. 13). Darüber hinaus war in einem Großteil der untersuchten Zellen der für glutamaterge Neurone typische Aminosäuretransporter EAAT nachweisbar.

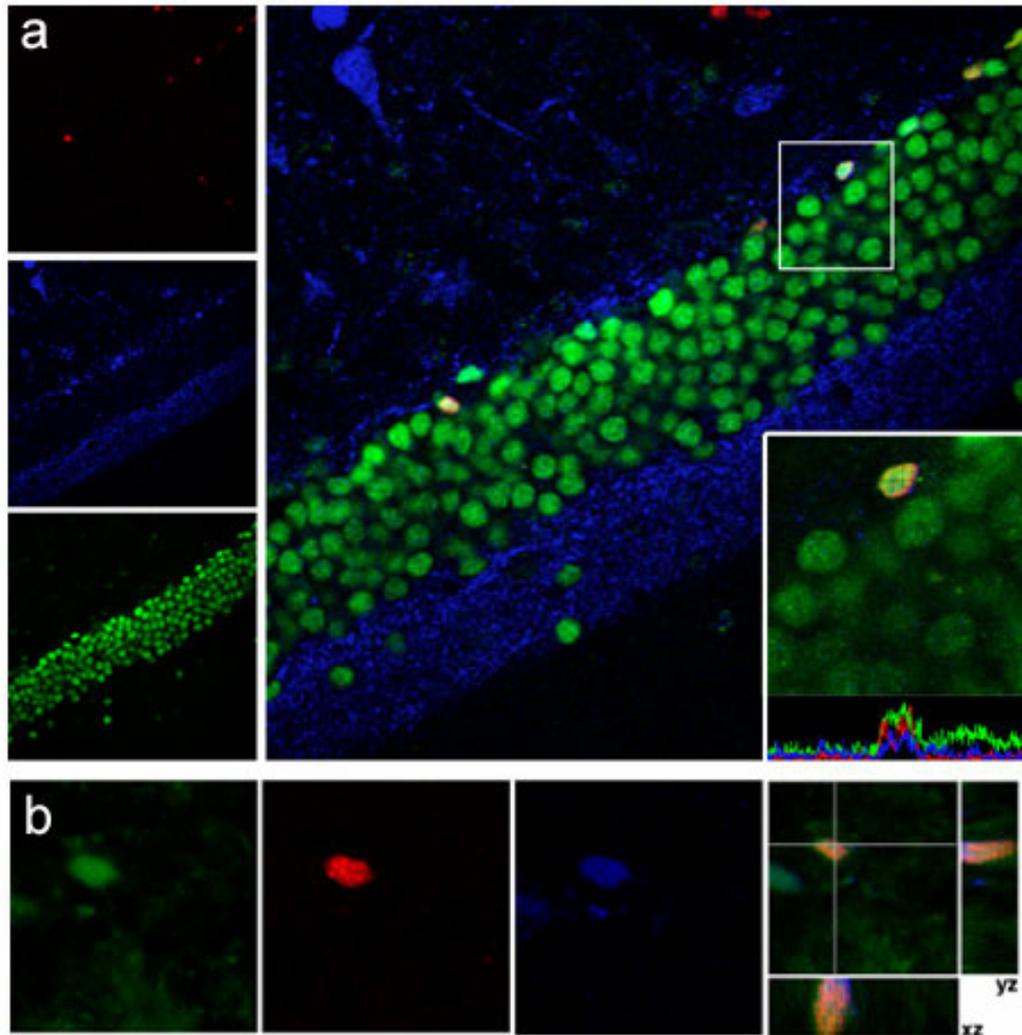


Abb. 13: Phänotypisierung der BrdU/CR-positiven Zellen. (a) Alle untersuchten BrdU-markierten CR-positiven Zellen exprimierten den Körnerzellmarker Prox-1 (BrdU: rot, CR: blau, Prox-1: grün). (b) In einem Großteil der neuen CR-Zellen war der, für exzitatorische Neurone spezifische, Transporter EAAT nachweisbar (BrdU: rot, CR: blau, EAAT: grün).

### 3.4.3 Interpretation

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die unreife Population CR-exprimierender Zellen in der subgranulären Zone, schon in diesem Entwicklungsstadium die selben immunhistochemischen Charakteristika aufweisen wie reife Körnerzellen.

### **3.5 CR-Expression charakterisiert ein postmitotisches Entwicklungsstadium unreifer Körnerzellen**

#### ***3.5.1 Hintergrund und Fragestellung***

Nach der Phänotypisierung und der Untersuchung der altersabhängigen CR-Expression der neugebildeten Nervenzellen, blieb die wichtige Frage offen, in welchem Entwicklungsstadium die neuen Zellen dieses CBP bilden, und welche Unterschiede zum Expressionsverlauf des ebenfalls transienten Markers DCX bestehen.

Die Entwicklung neuer Nervenzellen im Rahmen adulter Neurogenese, angefangen von der Stammzelle bis zum reifen Neuron, kann in zwei charakteristische Phasen unterteilt werden. Die Proliferation, im Sinne einer teilungsaktiven Phase der Stammzelle und die Differenzierung, im Sinne einer Reifung nicht mehr teilungsfähiger Vorläuferzellen. Folglich kann man unreife Zellen in eine prae- und eine postmitotische Population unterteilen. Teilungsaktive Zellen exprimieren während des Zellzyklus ein Antigen namens mKi-67 (Scholzen und Gerdes, 2000). Mit Hilfe des Antikörpers Ki-67 (gegen das Antigen mKi-67) lassen sich mitotische von postmitotischen Zellen unterscheiden.

#### ***3.5.2 Ergebnisse***

Beim Vergleich des Expressionsmusters von mKi-67 im Kontext CR-positiver Zellen, stellten wir fest, dass keine CR-Zelle im Gyrus dentatus diesen Zellzyklusmarker exprimierte. (Abb. 14).

Im Rahmen des im vorherigen Abschnitt beschriebenen Zeitreihenexperiments, wurde zusätzlich die CR-Expression vier Stunden nach BrdU untersucht. Es konnte keine Zelle gefunden werden, die schon vier Stunden nach Durchlaufen der S-Phase CR-positiv war. Dies bedeutet, dass CR frühestens nach Abschluss der letzten Mitose in der Zelle exprimiert wird.

In einem zweiten Schritt wurde die Ki-67-Positivität der DCX-positiven Vorläuferzellen untersucht. Im Gegensatz zu den CR-Zellen war ein Teil dieser Zellpopulation Ki-67-positiv.

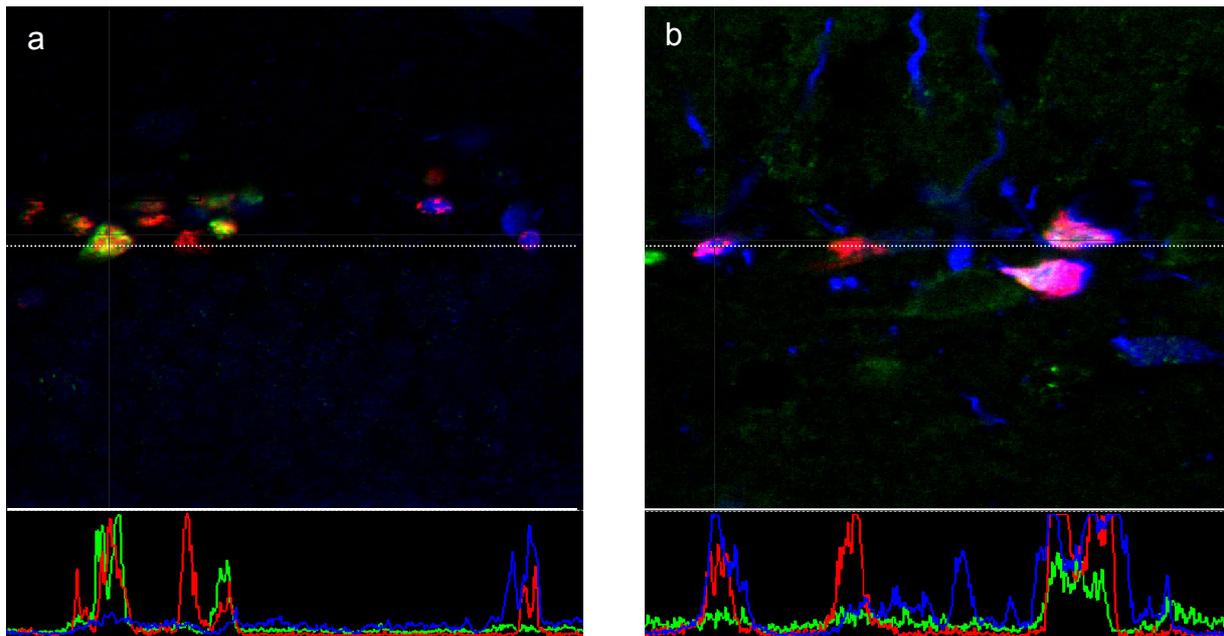


Abb. 14: Untersuchung der mitotischen Aktivität CR- bzw. DCX-positiver Zellen einen Tag nach einwöchiger BrdU-Gabe. (a) CR-positive Zellen (blau), die sich in der Woche zuvor geteilt haben und somit BrdU (rot) aufgenommen hatten, waren niemals Ki-67-positiv (grün). (b) Wohingegen DCX- positive Zellen (blau, BrdU: rot) den Zellezyklusmarker Ki-67 (grün) exprimierten.

### 3.5.3 Interpretation

Das Fehlen von mKi-67 in den neuen CR-positiven Zellen bei gleichzeitiger transientser Positivität in BrdU-positiven Zellen, erlaubt die Annahme, dass alle Vorläuferzellen, die das Stadium der CR-Expression erreicht haben, postmitotisch sind, also die Fähigkeit sich zu teilen, verloren haben.

Dagegen ist zumindest eine Subpopulation DCX exprimierender Zellen (Typ-2b und Typ-3 Zellen) Ki67-positiv und besitzt somit die Möglichkeit zu proliferieren.

Diese Ergebnisse erlauben zwei wichtige Aussagen:

- 1) Die CR-Expression charakterisiert die postmitotische Phase der Körnerzellreifung während adulter hippocampaler Neurogenese. Somit ist CR der früheste und bisher einzige Marker für unreife Körnerzellen, die sich jedoch nicht mehr im Proliferationsstadium befinden.
- 2) DCX hingegen ist sowohl in prae- als auch in postmitotischen unreifen Zellen nachweisbar. Diese, hinsichtlich ihrer Teilungsfähigkeit heterogene Zellpopulation DCX-positiver Zellen, kann nun in CR-negative, das heißt teilungsaktive, und CR-positive, postmitotische Zellen unterteilt werden.

## **3.6 Findet während der neuronalen Reifung ein sichtbarer Wechsel des CBP statt?**

### ***3.6.1 Hintergrund und Fragestellung***

Reife Körnerzellen exprimieren Calbindin als CBP (Sloviter, 1989). So wurde in einigen Studien, die sich mit adulter Neurogenese beschäftigten, Calbindin als Marker für reife Körnerzellen verwendet, um den Phänotyp der neugebildeten Neurone zu bestimmen. Vier Wochen nach BrdU sind fast alle neuen Nervenzellen Calbindin-positiv (Kempermann et al., 1997b). Nach unseren bisherigen Ergebnissen musste angenommen werden, dass heranreifende Körnerzellen zuerst transient CR exprimieren, dann aber nach abgeschlossener Entwicklung ihr CBP wechseln und Calbindin produzieren. Um diesen Wechsel zu überprüfen, wurden BrdU-markierte Körnerzellen ein Tag und vier Wochen nach der letzten BrdU-Injektion hinsichtlich der Expression dieser beiden CBP analysiert.

### ***3.6.2 Ergebnisse***

Ein Tag nach einwöchiger BrdU-Gabe waren viele der Zellen, die sich in der Woche zuvor geteilt hatten, CR-positiv (ca. 30%), jedoch (noch) keine Calbindin-positiv (Abb. 15). Im Gegensatz dazu exprimierten beinahe alle vier Wochen alten Neurone Calbindin und nur noch etwa 5% CR.

Im Rahmen dieser Auswertung wurden nur drei von mehreren hundert untersuchten Zellen gefunden, die gleichzeitig sowohl CR- als auch Calbindin-positiv waren. Ein sichtbarer Wechsel des CBP fand somit nur in einer vernachlässigbar kleinen Zahl neuer Körnerzellen statt.

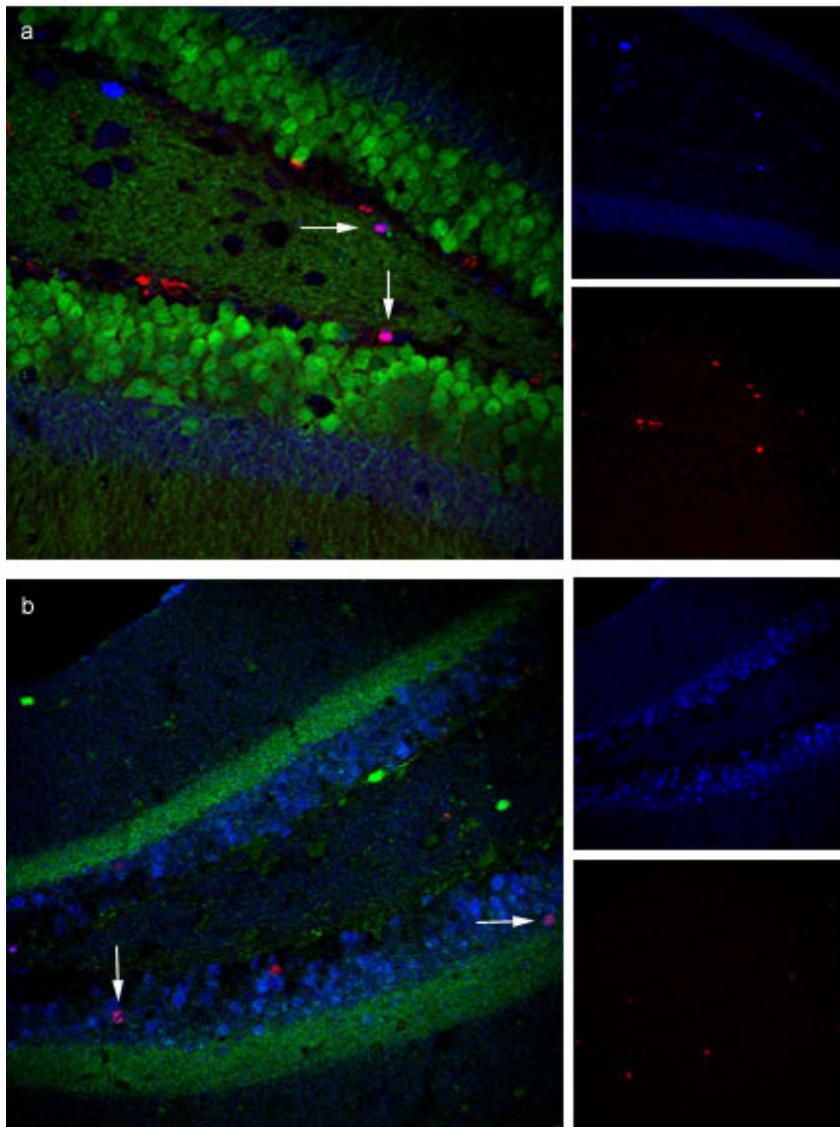


Abb. 15: Expression calciumbindender Proteine in BrdU-markierten Zellen unterschiedlichen Alters.

a) Eine Woche nach BrdU ist der Großteil der BrdU (rot) markierten Zellen CR (blau) positiv und Calbindin (grün) negativ.

b) Drei Wochen später sind die meisten BrdU (rot) markierten Zellen Calbindin (blau) positiv (Calretinin: grün).

### 3.6.3 Interpretation

Dies erlaubt drei alternative Erklärungen:

- (1) Die Zelle vollzieht den Wechsel des CBP extrem schnell. Aus diesem Grund sind zum Zeitpunkt der Perfusion nur sehr wenige Zellen sichtbar, die eine Positivität für CR und Calbindin zeigen.
- (2) Zu Beginn der Calbindin-Expression ist die Produktion von CR in der Zelle schon soweit heruntergefahren, dass dieses CBP mit Hilfe der Immunhistochemie nicht mehr detektierbar ist.
- (3) Die Körnerzelle durchläuft während ihrer Entwicklung ein Stadium während dem sie vor dem Wechsel keins der beiden CBP exprimiert.

Auf der Grundlage der hier angewandten Methoden kann der genauere Zusammenhang noch nicht abschließend geklärt werden.

### **3.7 Körnerzellreifung im adulten Gyrus dentatus spiegelt die Situation der postnatalen Entwicklung wider**

#### ***3.7.1 Hintergrund und Fragestellung***

Um zu untersuchen, ob die in diesem Projekt gewonnenen Erkenntnisse über die Expression CBP in unreifen Körnerzellen vergleichbar mit der Situation während der postnatalen hippocampalen Entwicklung sind, wurde die CR-Expression in unreifen Körnerzellen am siebten postnatalen Tag (P7) analysiert.

Zu diesem Zweck wurden entsprechend junge Hirngewebschnitte mit Antikörpern gegen Prox-1, NeuN und CR inkubiert. Das Expressionsmuster dieser Proteine in dem sich noch entwickelnden Gyrus dentatus sollte Aufschluss über die Unterschiede bzw. Vergleichbarkeit der adulten und postnatalen Neurogenese geben.

#### ***3.7.2 Ergebnisse***

An P7 erscheint das Stratum granulosum schon in etwa in der Form, wie es uns von den adulten Tieren bekannt ist. Die Prox-1-positiven Körnerzellen bilden, wenn auch noch nicht so dicht gepackt wie bei einem erwachsenen Gehirn, eine erkennbare Körnerzellschicht. Zu diesem Entwicklungszeitpunkt exprimieren nur die im äußeren Drittel lokalisierten Körnerzellen NeuN. CR-positive Zellen waren nur in den inneren zwei Dritteln des SG zu beobachten. Dieser Teil der Körnerzellschicht zeigte darüber hinaus eine diffusere Zellverteilung, als der schon offensichtlich weiter entwickelte äußere Teil des SG (Abb. 16)

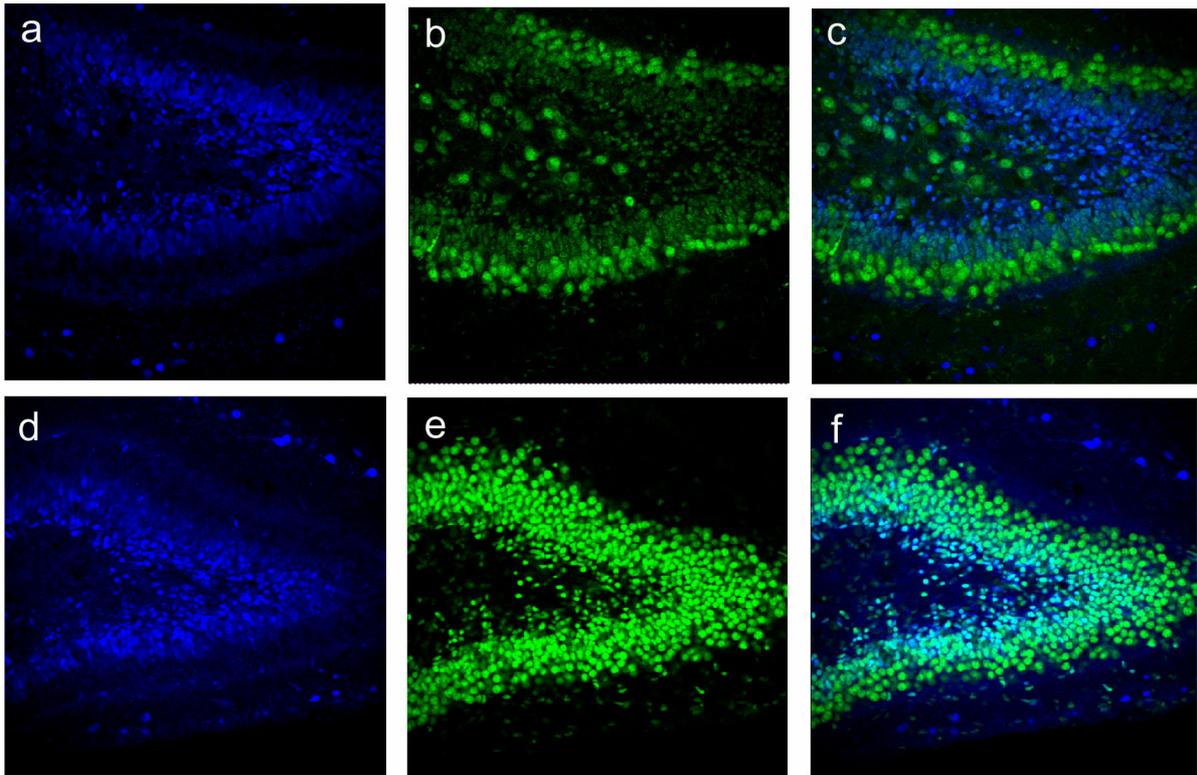


Abb. 16: Übersichtsaufnahme des Gyrus dentatus am siebten postnatalen Tag (P7). (a-c) Immunfluoreszenzfärbung des Gyrus dentatus mit Antikörpern gegen CR (blau) und NeuN (grün). (d-f) Färbung mit Antikörpern gegen CR (blau) und Prox-1 (grün).

### **3.7.3 Interpretation**

Der hohe Anteil CR-exprimierender Prox-1-positiver Zellen spricht dafür, dass CR auch während der postnatalen Entwicklung des Gyrus dentatus eine Rolle spielt. Während Prox-1 am Tag P7 in allen Zellen des SG detektierbar ist, zeigt das Expressionsmuster von CR und NeuN eine Aufteilung der Körnerzellschicht in ein inneres (CR) und ein äußeres (NeuN) Band. Diese Schichtung unreifer und reifer Neurone lässt sich durch die von innen (unreife Zellen) nach außen (bereits ausdifferenzierte Neurone) stattfindende Entwicklung und Reifung des Gyrus dentatus erklären.

## **3.8 Die Reifung neuer Körnerzellen wird durch physiologische und pathologische Faktoren beeinflusst**

### ***3.8.1 Hintergrund und Fragestellung***

Adulte Neurogenese kann durch verschiedene physiologische und pathologische Stimuli beeinflusst werden. Im Kontext dieser Arbeit wurden drei experimentelle Stimuli der Neurogenese zur Anwendung gebracht, deren Effekt auf die Neubildung hippocampaler Neurone bereits genauer untersucht wurde.

So haben (1) das Leben in einer reizreichen Umgebung, (2) physische Aktivität und (3) durch Kainat induzierte epileptische Anfälle einen positiven Effekt auf die adulte Neurogenese (Kempermann et al., 1997, van Praag et al., 1999; Parent et al., 1997). (siehe auch Einleitung)

Ausgehend von diesen Erkenntnissen bezüglich der Stimulierung adulter Neurogenese, untersuchten wir den Effekt der erwähnten Paradigmen auf die Zahl CR-exprimierender Zellen. In diesem Zusammenhang, analysierten wir unter den jeweiligen Bedingungen die Zahl neuer Zellen (BrdU-positiv), die Gesamtzahl CR exprimierender Zellen und die Zahl neugeborener Zellen, die NeuN-positiv bzw. CR-positiv waren, zu zwei verschiedenen Zeitpunkten nach der BrdU-Applikation. Der frühere der gewählten Zeitpunkte (ein Tag nach einwöchiger BrdU-Gabe) schätzt das Maß der Zellproliferation, der spätere (vier Wochen nach einwöchiger BrdU-Gabe) die Zahl der überlebenden Zellen, also die "Netto-Neurogenese" (Die quantitative Auswertung der Mäuse in reizreicher Umgebung, wurde nur zum späten Zeitpunkt durchgeführt).

### ***3.8.2 Ergebnisse: Vier Wochen nach BrdU***

#### ***3.8.2.1 Quantitative Analysen nach physischer Aktivität***

Die Untersuchung ergab, dass Mäuse, die in ihrem Käfig Zugang zu einem Laufrad hatten (*Runner*), vier Wochen nach der BrdU-Injektion mehr als doppelt so viele BrdU-markierte Zellen im Gyrus dentatus aufwiesen als die entsprechende Kontrollgruppe (Kontrolle:  $1580 \pm 412$ ; *Runner*:  $3495 \pm 266$ ;  $P < 0,01$ ). Entsprechend den Erkenntnissen aus der van Praag Studie unterschieden sich *Runner* und Kontrollen auch hinsichtlich des prozentualen Anteils NeuN-positiver Zellen unter den BrdU-markierten Zellen. Während bei den Kontrolltieren 83,8% der neugebildeten

Zellen zu Neuronen differenzierten, waren es bei den Tieren nach vierwöchiger freiwilliger körperlicher Aktivität 90,3% ( $P < 0,05$ ).

Der in diesem Experiment erstmals untersuchte Aspekt war die Quantifizierung aller in der SGZ lokalisierten CR-exprimierenden Zellen. Auch hier zeigte sich ein Anstieg der Zellzahl nach Stimulierung der Neurogenese durch körperliche Aktivität (Kontrolle:  $3284 \pm 364$ ; Runner:  $4612 \pm 407$ ;  $P < 0,05$ ). Der prozentuale Anteil der BrdU-markierten Zellen, die CR exprimierten, wurde durch den Stimulus nicht beeinflusst. So waren bei den Kontrolltieren 3,7% und bei der *Runner*-Gruppe 2,8% der neuen Zellen CR-positiv ( $P = 0,488$ ).

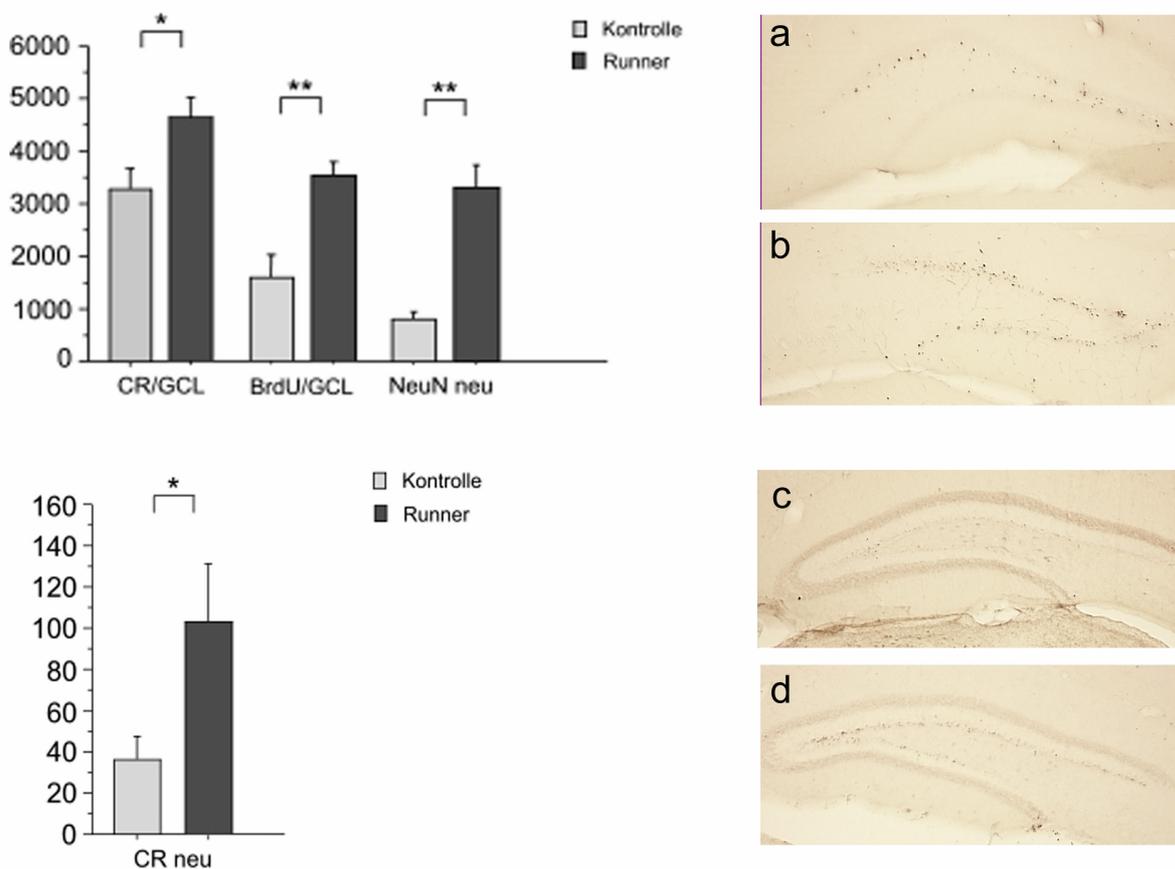


Abb. 17: Quantitative Analysen nach physischer Aktivität vier Wochen nach BrdU. Gezeigt werden die Gesamtzahl CR-positiver bzw. BrdU-positiver Zellen der Körnerzellschicht (CR/GCL, BrdU/GCL) und die Zahl BrdU-markierter Zellen, die NeuN exprimierten (NeuN neu) bzw. CR-positiv waren (CR neu). Die immunohistochemischen Färbungen mit Antikörpern gegen BrdU (a und b) und gegen CR (c und d) zeigen Übersichtsaufnahmen des Gyrus dentatus eines Kontrolltieres (a und c) und eines stimulierten Tieres (b und d). Bereits bei geringer Vergrößerung ist die Zunahme BrdU- bzw. CR-positiver Zellen bei der stimulierten Maus zu erkennen.

Rechnerisch ergab sich aus diesen Ergebnissen, dass die körperliche Aktivität die Zahl der neugebildeten Neurone (BrdU- und NeuN-positiv) um mehr als das Dreifache steigert (Kontrolle:  $872 \pm 121$ ; Runner:  $3256 \pm 399$ ;  $P < 0,01$ ). Ein ähnlichen Anstieg ergab die Berechnung der Gesamtzahl neuer CR-positiver Zellen (BrdU- und CR-positiv) (Kontrolle:  $37 \pm 10$ ; Runner:  $103 \pm 26$ ;  $P < 0,05$ ).

### **3.8.2.2 Quantitative Analysen nach Stimulierung durch eine reizreiche Lebensumgebung**

Tiere, die in einer reizreichen Umgebung lebten (*Enriched*) zeigten vier Wochen nach der letzten BrdU-Injektion einen Anstieg BrdU-positiver Zellen um circa 100% (Kontrolle:  $1180 \pm 61,5$ ; Enriched:  $2187 \pm 188,3$ ;  $P < 0,001$ ). Die Gesamtzahl der CR-exprimierenden Zellen stieg zwar nach diesem Stimulus, zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrolltieren (Kontrolle:  $2622 \pm 182,1$ ; Enriched:  $3186 \pm 267,6$ ;  $P = 0,0957$ ). Der Anteil der BrdU-positiven Zellen, die NeuN exprimierten, war in der stimulierten Gruppe höher. Es konnte aber auch hier kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (Kontrolle:  $79,9\% \pm 1,8\%$ ; Enriched:  $83,7\% \pm 2,0\%$ ;  $P = 0,1927$ ). Ähnlich wie nach körperlicher Aktivität, beeinflusste die reizreiche Lebensumgebung nicht den prozentualen Anteil CR-exprimierender Zellen unter den BrdU-positiven Zellen. So waren bei beiden Gruppen etwa 6,5% der BrdU-markierten Zellen CR-positiv. Aus den prozentualen Ergebnissen und der Gesamtzahl BrdU-markierter Zellen, ergab sich eine Zunahme neuer Neurone (NeuN neu) um mehr als das Doppelte (Kontrolle:  $930,6 \pm 76,4$ ; Enriched:  $2042,2 \pm 92,0$ ;  $P < 0,001$ ). Die Gesamtzahl neuer CR-exprimierender Zellen ließ eine tendenzielle Erhöhung erkennen, zeigte aber aufgrund des hohen Standardfehlers keine Signifikanz (Kontrolle:  $81,5 \pm 29,5$ ; Enriched:  $150,0 \pm 51,3$ ;  $P = 0,2745$ ).

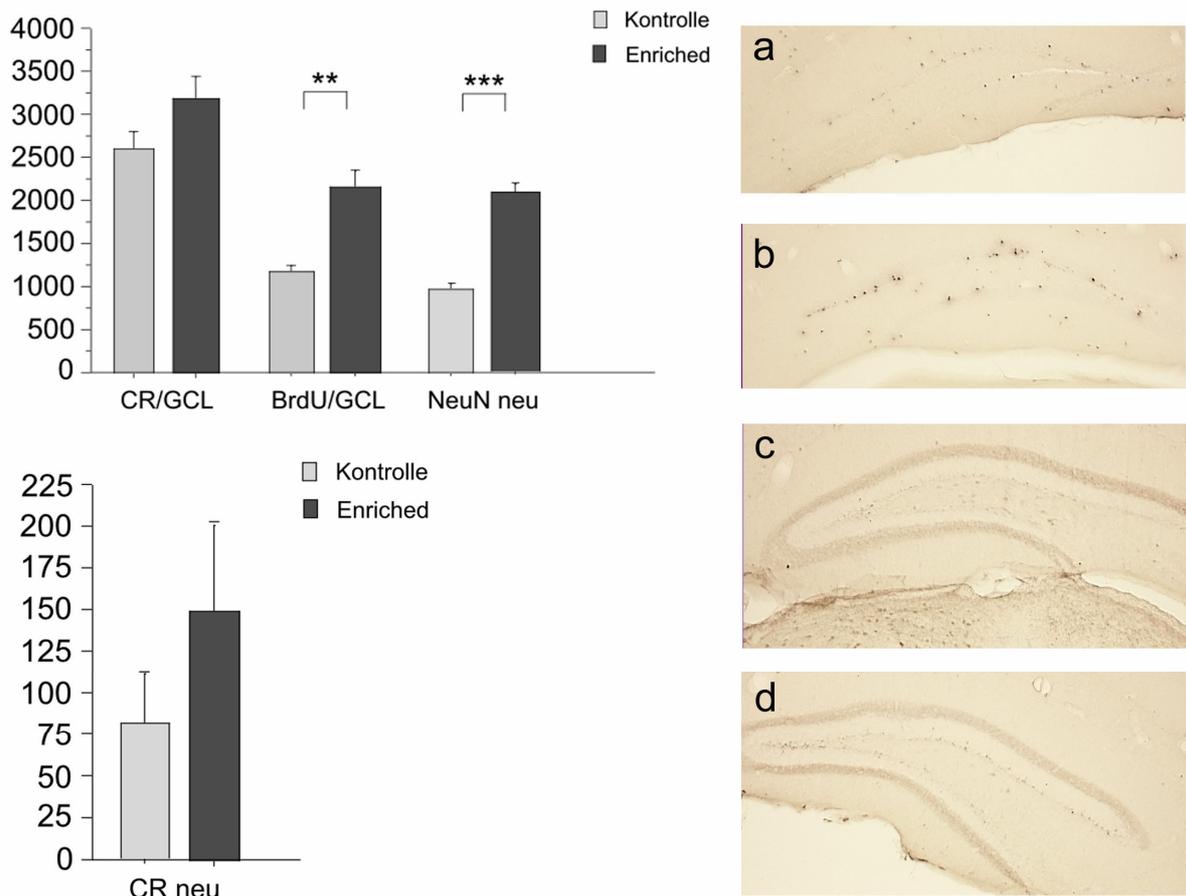


Abb. 18: Die abgebildeten Graphen zeigen die Gesamtzahl CR-positiver Zellen im SG (CR/GCL (= granule cell layer)) der Kontrolltiere (c) und der Mäuse, die im *enriched environment* lebten (d), die Anzahl der BrdU-positiven Zellen (BrdU/GCL; Kontrolle: a; enriched: b), die Zahl der neuen Neurone (NeuN neu) und die Anzahl neuer CR-positiver Zellen (CR neu).

### 3.8.2.3 Quantitative Analysen nach Kainat-induzierten Anfällen

Durch Kainat induzierte Anfälle erwiesen sich als Stimulus mit dem höchsten proliferativen Potential. Vier Wochen nach dem Anfall (Kainat) und der letzten BrdU-Injektion stieg die Zahl BrdU-positiver Zellen auf 7852. Im Vergleich dazu hatten die Kontrolltiere im Mittel lediglich 1407 Zellen, die BrdU inkorporiert hatten ( $P < 0,001$ ). Der Anstieg CR-positiver Zellen in der SGZ belief sich in dieser Gruppe auf etwa 70% (Kontrolle:  $2362 \pm 43,2$ ; Kainat:  $3968 \pm 230,4$ ;  $P < 0,001$ ). Ein signifikanter Unterschied ergab sich auch bei der Phänotypisierung der BrdU-markierten Zellen: Bei der Kontrollgruppe exprimierten 74% der BrdU-positiven Zellen den neuronalen Marker NeuN; bei der stimulierten Gruppe waren es im Mittel 82,2% ( $P < 0,001$ ). Im Gegensatz zu den ersten beiden physiologischen Stimuli beeinflusste dieses

Paradigma auch den prozentualen Anteil der BrdU-positiven Zellen, die CR exprimierten (Kontrolle:  $4,0\% \pm 0,9\%$ ; Kainat:  $9,0\% \pm 1,1\%$ ;  $P < 0,01$ ).

Die Hochrechnung der Gesamtzahl neuer Zellen mit einem bestimmten Phänotyp ergab folgendes Ergebnis: Kontrolltiere hatten vier Wochen nach einwöchiger BrdU-Gabe 1043,5 neue Zellen, die NeuN exprimierten. Diese Zahl stieg nach einem Kainat-induzierten Anfall auf 6445,5. Die Anzahl neuer CR-positiver Zellen stieg im Mittel von 58,2 (Kontrolle) auf 695,7 (Kainat).

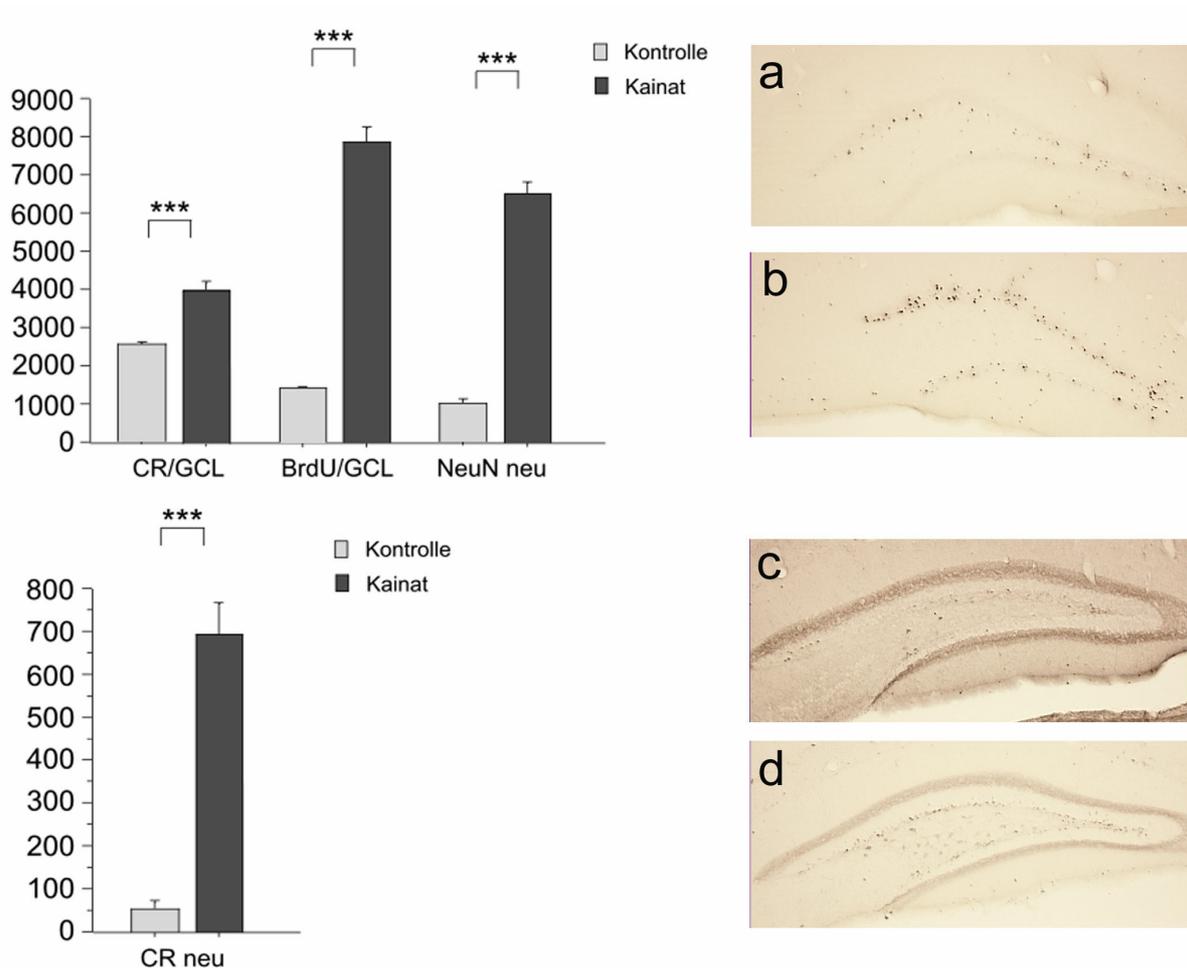


Abb. 19: Quantitative Analyse vier Wochen nach BrdU bei der Kainat-Gruppe. Abgebildet sind die Zahlen CR- bzw. BrdU-positiver Zellen im SG (=GCL), sowie die Zahl neuer NeuN-positiver und neuer CR-positiver Zellen. Abbildungen a und b zeigen die BrdU-positiven Zellen, c und d die CR-positiven Zellen des Gyrus dentatus der Kontrolltiere (a und c) bzw. vier Wochen nach der Kainatbehandlung (b und d).

### 3.8.3 Ergebnisse: Einen Tag nach einwöchiger BrdU-Gabe (Proliferation)

Die quantitative Analyse der neugeborenen Zellen einen Tag nach einwöchiger BrdU-Gabe zeigte, dass physische Aktivität und durch Kainat induzierte Anfälle unterschiedlich starke Effekte auf die Proliferation der Vorläuferzellen ausüben. Die Zahl der BrdU-positiven Zellen verdoppelte sich bei der *Runner*-Gruppe und stieg bei den mit Kainat behandelten Tieren sogar um das sechsfache (Kontrolle:  $2776,0 \pm 242,4$ ; Runner:  $5117,1 \pm 632,2$ ; Kainat:  $16147,5 \pm 1630,0$ ;  $P < 0,05$  (Kontrolle vs. Runner);  $P < 0,001$  (Kontrolle vs. Kainat)). Einen vergleichbaren Anstieg konnte man bei der Gesamtzahl der CR-exprimierenden Zellen im Gyrus dentatus erkennen (Kontrolle:  $2747,7 \pm 213,7$ ; Runner:  $4555,4 \pm 362,4$ ; Kainat:  $10218,0 \pm 464,5$ ;  $P < 0,01$ ;  $P < 0,001$ ). Der prozentuale Anteil NeuN-positiver unter den BrdU-markierten Zellen lag zwischen 44,1% (Kontrolle) und 37,2% (Kainat), ergab aber keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Die aus diesen Ergebnissen resultierende Gesamtzahl neuer Zellen mit neuronalem Phänotyp (NeuN neu) ergab folgende Zellzahlen: Kontrollen:  $1157,0 \pm 143,4$ ; Runner:  $2246,4 \pm 320,5$ ; Kainat:  $6226,3 \pm 1687,7$ .

Der Anteil der BrdU-markierten Zellen, die nach einer Woche CR exprimierten (%CR), unterschied sich zwischen den Gruppen nicht signifikant. So waren im Mittel bei den Kontrolltieren 36,7%, bei der *Runner*-Gruppe 35,7% und bei den Kainat-Tieren 39,0% der BrdU-markierten Zellen CR-positiv. Aus dem prozentualen Anteil der CR-positiven Zellen und der Gesamtzahl BrdU-positiver Zellen ließ sich die Zahl der neuen CR exprimierenden Zellen berechnen: Kontrollen:  $1054,5 \pm 148,5$ ; Runner:  $1816,7 \pm 293,8$ ; Kainat:  $6409,8 \pm 935,0$ ;  $P = 0.2037$  (Kontrolle vs. Runner);  $P < 0,001$  (Kontrolle vs. Kainat).

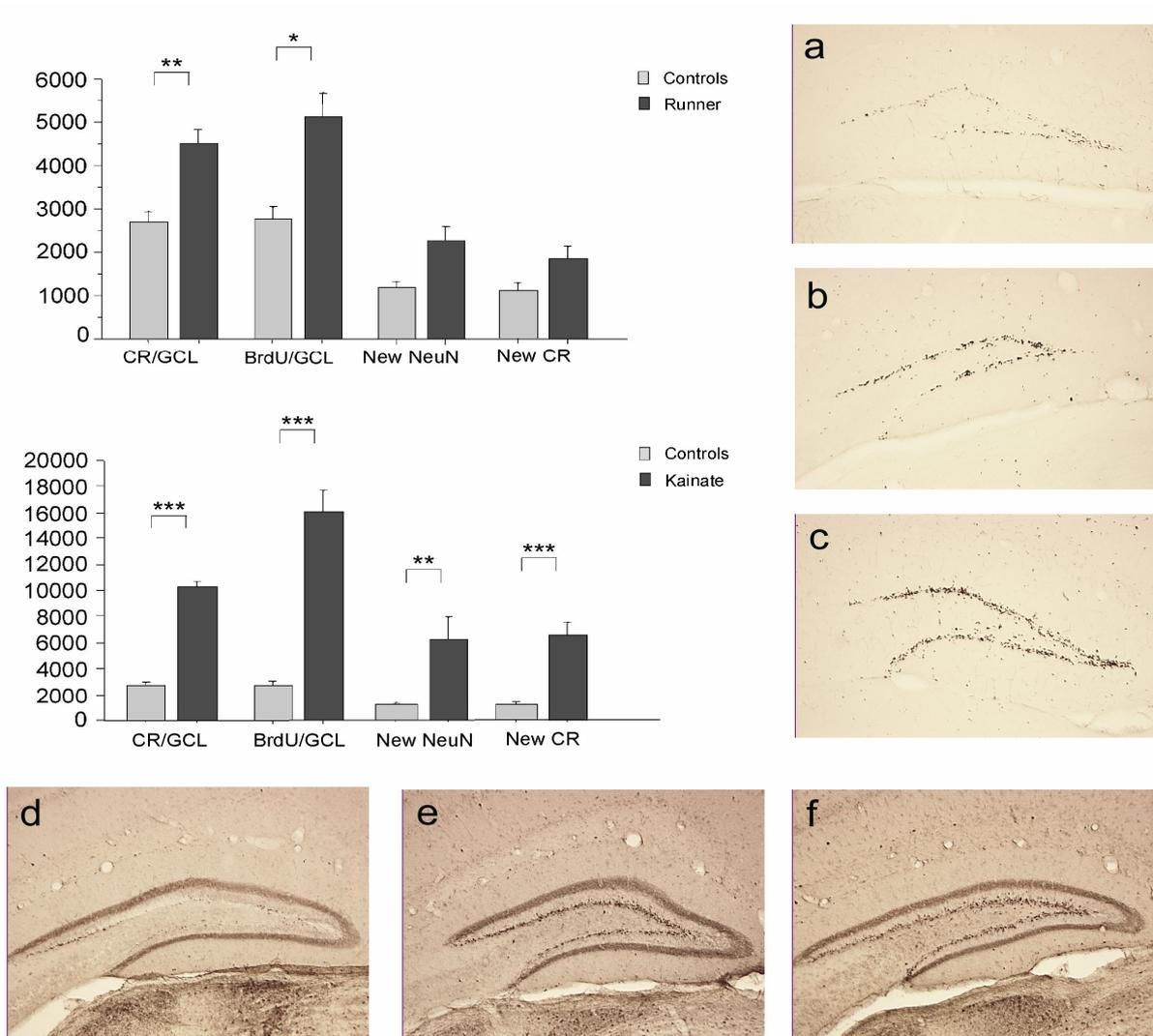


Abb. 20: Quantitative Analysen ein Tag nach einwöchiger BrdU-Gabe (Proliferation). Die Graphen zeigen die Gesamtzahl CR-positiver Zellen (CR/GCL) und BrdU-markierter Zellen (BrdU/GCL) in der Körnerzellschicht, sowie die Zahl BrdU-markierter Zellen, die NeuN bzw. CR exprimierten (New NeuN, New CR), bei den Kontrolltieren und nach dem jeweiligen Stimulus (Runner, Kainat). Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen BrdU (a-c) und gegen CR (d-f) (Kontrollen: a + d; Runner: b + e; Kainat: c + f).

### 3.8.4 Interpretation

Die quantitative Bestimmung CR-exprimierender Zellen im Gyrus dentatus lässt eine Aussage über das Ausmaß der dort stattfindenden Neurogenese zu, da sämtliche hier untersuchten neurogenesesteigernden Stimuli auch zu einem Zuwachs CR-positiver Zellen führten. Eine Ausnahme stellt dabei die Gruppe der in einer reizreichen Umgebung lebenden Mäuse, welche zwar tendenziell mehr CR-Zellen

aufwiesen, jedoch konnte bei ihnen im Gegensatz zu den anderen Paradigmen kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Der Wert %CR ist ausschlaggebend bei der Beurteilung der Entwicklungs- bzw. Reifungskinetik. Er gibt an, wie viele Zellen sich schon (ein Tag nach einwöchiger BrdU-Gabe) bzw. noch (vier Wochen nach der letzten BrdU-Injektion) in der "CR-Phase" befanden.