

4 Diskussion

4.1 Calretinin wird im Gyrus dentatus nicht nur von Interneuronen exprimiert

Diese tierexperimentelle Studie konnte zeigen, dass heranreifende Körnerzellen, die während der adulten Neurogenese entstanden sind, transient das calciumbindende Protein (CBP) Calretinin (CR) exprimieren. Seit der Entdeckung CR 1987 (Rogers, 1987) wurde es zur Phänotypisierung verschiedener Zelltypen verwendet, wobei die Population CR-exprimierender Zellen im Gyrus dentatus bisher nicht detaillierter untersucht wurde. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden drei CR-positive Zelltypen unterschieden: Hilare Mooszellen, eine Subpopulation hippocampaler Interneurone, und Cajal-Retzius-Zellen. In einer Studie aus dem Jahre 1996 wiesen zwar Liu et al. (1996) schon darauf hin, dass CR-exprimierende Zellen in der subgranulären Zone (SGZ) unreife Körnerzellen sein könnten, jedoch wurde diese These nicht experimentell belegt. In dieser Untersuchung wiesen Liu et al. PSA-NCAM in CR-positiven Zellen der SGZ nach. Der Nachweis des Migrationsmarkers PSA-NCAM in CR-positiven Zellen war auch mit der Hypothese neuentstehender CR-positiver Interneurone vereinbar, bewies also nicht die CR-Expression in jungen Körnerzellen. Mooszellen stellen eine in Morphologie und Lokalisation sehr homogene Population exzitatorischer Neurone dar. Ihr Zellkörper ist etwa zwei- bis dreimal so groß wie der einer Körnerzelle. Lokalisiert sind diese Zellen ausschließlich im Hilus, und dort aufgrund der vorher erwähnten morphologischen Unterschiede klar von den Zellen in der angrenzenden Körnerzellschicht zu differenzieren. Da aber alle CR-positiven Zellen, die auch BrdU-markiert waren, ausschließlich in der SGZ oder im Stratum granulosum (SG) zu finden waren und Mooszellen ausnahmslos BrdU-negativ sind, kann eine Genese dieses Zelltyps im adulten Hippocampus ausgeschlossen werden. Cajal-Retzius-Zellen produzieren und sezernieren das Glykoprotein Reelin, welches eine wichtige Rolle während der kortikalen und hippocampalen Entwicklung spielt. Die ursprüngliche Überlegung, Reelin wirke während der cerebralen Entwicklung als Stoppsignal für migrierende Neurone, konnte von Frotscher et al. (2003) durch die Feststellung korrigiert werden, dass Reelin weniger einen direkten Einfluss auf die migrierenden Neurone hat, sondern vielmehr das Wachstum der für die Migration essentiellen radialen Glia-Ausläufer beeinflusst. Die meisten Studien zu diesem Thema stützen sich auf die Untersuchung eines mutanten Mausstammes, den so genannten Reeler-Mäusen, welche nicht in der Lage sind, dieses Glykoprotein zu

exprimieren. Bei diesen Mäusen kann man eine Aufhebung der normalen kortikalen und hippocampalen Nervenzellschichtung beobachten (Stanfield and Cowan, 1979). Besonders in den letzten Jahren wuchs das Interesse an der Reeler-Mutante im Bezug auf die adulte Neurogenese. Es wird angenommen, dass auch die Neuronenentwicklung im adulten Gehirn durch einen Mangel an Reelin gestört wird (Kim et al., 2002). Cajal-Retzius-Zellen des Hippocampus sind normalerweise in der Molekularschicht lokalisiert, von wo aus sie während der postnatalen Entwicklung, die über Reelin vermittelte Wirkung auf die Neuronenmigration ausüben (Del Rio et al., 1996; Forster et al., 2002; Gebhardt et al., 2002). Die ursprüngliche Hypothese, dass die für die richtige Platzierung der neuen Neurone wichtigen Cajal-Retzius-Zellen oder zumindest eine verwandte Reelin produzierende Zellpopulation auch im adulten Organismus nachgebildet werden, konnten wir nicht bestätigen. Keine der neugeborenen CR-positiven Zellen zeigte eine Reelin-Positivität (wohingegen viele Zellen in der Molekularschicht CR- und Reelin-positiv waren, aber eben nicht BrdU-markiert).

CR wird häufig zur Phänotypisierung einer Subpopulation hippocampaler Interneurone verwendet. Freund und Buzaki (1986) beschrieben in einer ausführlichen Studie über die Interneurone des Hippocampus einige CR-positive "Interneurone", in denen kein GABA nachweisbar ist. Damals erklärte man den nicht detektierbaren GABA-Gehalt im Zellsoma mit der weiten Projektion dieser Neurone und einem niedrigen GAD-Spiegel und der damit verbundenen reduzierten Synthese des inhibitorischen Transmitters. Nach den Ergebnissen unserer Studie deckt sich die damals beobachtete GABA-Negativität der CR-Zellen mit der These, dass es sich bei diesen Neuronen um unreife Vorstufen exzitatorischer Körnerzellen handelt und nicht um Interneurone.

Um den Phänotyp der neuen CR-Zellen nicht nur nach dem Ausschlussprinzip zu bestimmen (GABAA1- und Reelin-Negativität), bringen der Nachweis des Körnerzell-spezifischen Markers Prox-1 in diesen Zellen und deren exzitatorischen Eigenschaften (EAAT-positiv) den Beweis, dass es sich um Körnerzellen handelt. Dies bedeutet, dass nach dem jetzigen Wissensstand Körnerzellen im Hippocampus das alleinige Privileg der neuronalen Neogenese besitzen.

Diese Schlussfolgerung steht im Widerspruch zu einer Studie von Liu et al. (2003). Sie beschrieben eine Neubildung hippocampaler Interneurone unter physiologischen

Bedingungen im Gehirn der Ratte. Nach unseren Erkenntnissen spricht eine Reihe von Daten gegen eine Regeneration einer bestimmten Interneuronenpopulation im Mäusegehirn. Wir konnten keine BrdU-markierte Zelle finden, die positiv für GABA A1 Rezeptor (spezifisch für hippocampale Interneurone, Bouillere et al., 2000), GABA oder GAD 67 war. Die Liu Studie beschrieb außerdem die neugeborenen Interneurone als Parvalbumin-positive Korbzellen. Die von uns untersuchten neugebildeten Nervenzellen im Gyrus dentatus der Maus exprimierten ausschließlich Calbindin oder CR, aber kein Parvalbumin. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die neuen Nervenzellen des Gyrus dentatus schon früh nach der Teilung, wie reife Körnerzellen, ihre Axone in Richtung CA3 aussenden (Stanfield und Trice, 1988; Hastings und Gould 1999; Markakis und Gage, 1999).

Auch wenn vieles dafür spricht, dass unter physiologischen Bedingungen im adulten Hippocampus ausschließlich Körnerzellen neu gebildet werden, bedarf es einer weiteren experimentellen Klärung, um die Frage nach der "Interneurogenese" im Gyrus dentatus der Ratte oder Maus, vor allem auch unter pathologischen Bedingungen, eindeutig zu beantworten.

4.2 Transiente CR-Expression während der Körnerzellreifung

Die Untersuchung der altersabhängigen CR-Expression in den neugeborenen Nervenzellen konnte zeigen, dass CR transient in unreifen Körnerzellen gebildet wird.

Die alternative Hypothese wäre, dass es sich auch um eine transiente Zellpopulation handeln könnte, die vor dem Eintritt in ein reifes Differenzierungsstadium wieder sterbe. Dieser These läge die Voraussetzung zu Grunde, dass die neugebildeten Zellen, die innerhalb der ersten vier Wochen wieder sterben, vor ihrem Tod CR exprimierten. Auf den ersten Blick erscheint dies durchaus plausibel, da die meisten BrdU-markierten Zellen im Alter zwischen drei und 17 Tagen sterben. Dies entspricht auch dem Zeitraum der höchsten CR-Expression. Außerdem würde dies erklären, warum kaum noch CR/BrdU-positive Zellen nach Erreichen einer stabilen Anzahl BrdU-positiver Zellen zu finden sind. Es gibt aber gute Argumenten, die gegen diese These sprechen:

- 1) Wenn man annimmt, CR sei de facto ein Präapoptose-Marker, müssten ca. 75% der Zellen, die sich eine Woche zuvor geteilt hatten, wieder absterben. Anders ausgedrückt überleben maximal 25% der eine Woche alten Zellen und stellen den Anteil der neuen Neurone, den man auch noch nach vier oder sechs Wochen sieht. In unserem Experiment waren eine Woche nach BrdU 62 der neugeborenen Zellen CR-negativ, aber drei Wochen später 75 Zellen BrdU/NeuN-positiv. Somit muss es CR-positive Zellen geben, die nicht sterben, sondern sich zu reifen Neuronen weiterentwickeln.
- 2) Eine Woche nach der BrdU Markierung exprimierten bereits alle CR-positiven Zellen NeuN und Prox1, hatten sich folglich schon für einen neuronalen Phänotyp entschieden. Sollten diese Zellen alle sterben, müsste der größte Anteil der neuen Körnerzellen später als eine Woche nach BrdU geboren werden, nachdem sie jedoch eine initiale Zellteilung (in der das BrdU aufgenommen wurde) eine Woche zuvor durchlaufen hatten. Dies würde bedeuten, dass die adulte Neurogenese in mehreren Wellen abläuft, die zunächst eine Population unreifer Neurone hervorbringt, die in ihrer Gesamtheit wieder stirbt.
- 3) Wie gezeigt werden konnte, sinkt die Zahl apoptotischer Zellen in der SGZ bei Tieren, die in einer reizreichen Umgebung lebten (Young et al., 1999). Wenn CR ein Zelltod-Marker für neugeborene Zellen sein sollte, müsste die Zahl CR-positiver Zellen in der SGZ dieser Mäuse signifikant abnehmen. Nach unseren Erkenntnissen steigt jedoch die Zahl CR-positiver Zellen bei der stimulierten Gruppe.
- 4) Im Rahmen der hier vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der unreifen Körnerzellen am siebten postnatalen Tag CR exprimieren (vgl. Abb. 16). Wären die CR-Zellen nur eine transiente Zellpopulation, die dem Zelltod entgegenginge, würde dies zu der sehr unwahrscheinlichen Schlussfolgerung führen, dass etwa zwei Drittel der Neurone des postnatalen SG apoptotisch sind und alle bleibenden Zellen erst später entstehen.

Auf Grund der oben genannten Überlegungen handelt es sich nicht um eine transiente Zellpopulation, die CR exprimiert, sondern um unreife Körnerzellen, die transient CR exprimieren.

Prox-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der im Gyrus dentatus spezifisch in Körnerzellen exprimiert wird (Pleasure et al., 2000). Wie wir zeigen konnten, beginnt die Expression dieses Proteins in einem sehr frühen Entwicklungsstadium der Zelle (einen Tag nach BrdU waren bereits etwa ein Viertel der Zellen Prox-1-positiv). Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde nicht weiter untersucht, ob Prox-1 bereits während des Proliferationsstadiums exprimiert wird. Sollte sich die Vermutung bestätigen, dass diese Zellen Ki-67-positiv sind, könnten sich teilende Prox-1-positive Zellen als "committed precursors" (Vorläuferzellen, deren Differenzierungsweg auf die neurale Linie beschränkt ist) bezeichnet werden. Im Gegensatz dazu waren CR-positive Zellen eindeutig negativ für den Proliferationsmarker Ki-67. Da alle BrdU-markierten CR-positiven Zellen Prox-1 exprimierten, ist davon auszugehen, dass die CR-Expression in diesen Zellen das Entwicklungsstadium beschreibt, indem neu entstandene Körnerzellen bereits postmitotisch sind.

Die Ergebnisse aus dem Zeitreihenexperiment ergaben auch interessante Konsequenzen in Bezug auf die Heterogenität der Population DCX-exprimierender Zellen. DCX wird als Marker für unreife Neurone angesehen (des Portes et al., 1998) und scheint in Zusammenhang mit der Zellmigration zu stehen (Corbo et al., 2002). Bei einem Teil der DCX-exprimierenden Zellen, die das intermediäre Filament Nestin exprimieren (Typ-2b Zellen), konnten Eigenschaften von proliferierenden Vorläuferzellen in vivo nachgewiesen werden (Filippov et al., 2003). Ein weiterer Grund, der für die proliferativen Eigenschaften dieser Zellpopulation spricht, ist die hier nachgewiesene Ki-67-Positivität eines Teils der DCX-Zellen. Die partielle Coexpression von CR, Prox-1 und DCX bedeutet, dass die Population DCX-exprimierender Zellen, sowohl proliferierende Vorläuferzellen einer neuronalen Linie enthält, als auch postmitotische Zellen, die bereits morphologische und immunhistochemische Eigenschaften von Körnerzellen aufweisen.

4.3 CR-Expression nach Neurogenese beeinflussenden Stimuli

Die hier erhobenen Daten konnten zeigen, dass Manipulationen, die einen bekannten Effekt auf die adulte Neurogenese haben (physische Aktivität, reizreiche

Lebensumgebung und durch Kainat induzierte Anfälle), die Körnerzellentwicklung auf der Stufe der CR-Expression beeinflussen.

Stimuli, die zu einer Erhöhung der Nettoneurogenese führen, hatten gleichermaßen eine gesteigerte Zahl CR-exprimierender Zellen in der SGZ zur Folge. Bei genauer Betrachtung der hier in diesem Zusammenhang erhobenen Daten, stellt man fest, dass die, durch die Stimuli bedingte Steigerung CR/BrdU-positiver Zellen (CR neu) allein auf die erhöhte Anzahl BrdU-positiver Zellen zurückzuführen ist. Die Zahl der neuen CR-positiven Zellen berechnet sich aus der Anzahl BrdU-positiver Zellen und dem prozentualen Anteil CR-positiver Zellen unter den BrdU-markierten Zellen (%CR). Da sich sowohl bei der Runner-Gruppe als auch bei der Enriched-Gruppe dieser prozentuale Anteil im Vergleich zu den Kontrollen nicht signifikant ändert, spiegelt die erhöhte Zahl neuer CR-Zellen lediglich die Steigerung BrdU-positiver Zellen wieder. Im Gegensatz dazu veränderte sich der prozentuale Wert bei der Kainat Gruppe von 4% bei den Kontrollen auf 9% nach Kainat induzierten Anfällen.

Eine Veränderung des prozentualen Anteils BrdU-positiver Zellen, die zu diesem Zeitpunkt CR exprimierten, bedeutet eine Änderung der Entwicklungskinetik. Sind zum Zeitpunkt „vier Wochen“ bei der Kainat Gruppe mehr BrdU-markierte Zellen CR-positiv, so ist es wahrscheinlich, dass dieser Stimulus entweder die Phase der CR-Expression verlängert oder bei gleicher Dauer, die Phase später beginnt. Beide Überlegungen deuten auf eine verzögerte Reifung der neuen Zellen hin. Da einen Tag nach einwöchiger BrdU-Gabe kein Unterschied des Wertes %CR zwischen den Kontrollen und der Kainat Gruppe zu sehen war, ist es wahrscheinlicher, dass die Vorläuferzellen zum gleichen Zeitpunkt in die CR-Phase eintreten und lediglich die Dauer der CR-Expression durch diesen Stimulus beeinflusst wird.

Die bei den Tieren ausgelösten Anfälle führten zum frühen Zeitpunkt (ein Tag nach einwöchiger BrdU Gabe) zu einer massiven Steigerung BrdU-positiver Zellen. Da man zu diesem frühen Zeitpunkt im wesentlichen die Proliferation, aber noch nicht das Überleben neugebildeter Zellen detektiert, unterstützt dieses Ergebnis die These, dass Anfälle besonders die Zellteilung der Vorläuferzellen stimuliert, bzw. mehr bisher passive Stammzellen zu aktiven rekrutiert (Parent, 2002). Um die Vorläuferzellpopulation, die durch diesen Stimulus beeinflusst wird, genau zu identifizieren, sind weitere Studien erforderlich.

Interessanterweise zeigten die verschiedenen Paradigmen einen unterschiedlichen Einfluss auf die Gesamtzahl CR-exprimierender Zellen. Während sowohl physische als auch konvulsive Aktivität zu einer signifikanten Steigerung CR-positiver Zellen in der SGZ führten, war bei den Tieren im *enriched environment* zwar eine Tendenz, aber keine signifikante Steigerung dieser Zellzahl zu beobachten. Zurückzuführen ist dies wahrscheinlich auf den weniger ausgeprägten pro-proliferativen Effekt des *enriched environments*. Die reizreiche Lebensumgebung resultiert durch eine überlebenssichernde Wirkung auf die neuen Neurone in einer gesteigerten Nettoneurogenese (Kempermann et al., 1997). Dieser protektive Effekt auf die Neurone scheint nur die Zellen zu beeinflussen, die bereits die CR-Phase erreicht haben, da sich ansonsten die erhöhte Nettoneurogenese bereits in der Zahl CR-exprimierender Zellen widerspiegeln müsste.

Der Effekt der physischen und konvulsiven Aktivität beeinflusst hingegen Vorläuferzellen, die noch kein CR exprimieren. Wie wir zeigen konnten, wird CR erst nach Verlassen des letzten Zellzyklus exprimiert. Die genannten Stimuli haben jedoch einen proliferationssteigernden Effekt, der zu einer erhöhten Anzahl von Vorläuferzellen führt, die nach ihrer letzten Mitose beginnen, CR zu exprimieren. Somit ist die erhöhte Anzahl CR-positiver Zellen vier Wochen nach Beginn der Stimulation auf die gesteigerte Proliferationsrate vor der CR-Expression zurückzuführen.

4.4 Mögliche Funktion der transienten CR-Expression während der Neurogenese

Die qualitative Analyse der Proteinexpression während der postnatalen Entwicklung (P7) konnte zeigen, dass diese "primäre Neurogenese" die Situation während der adulten Neurogenese widerspiegelt. Die Körnerzellen des Gyrus dentatus durchlaufen auch während der postnatalen Entwicklung ein Stadium der CR-Expression. Frühere Studien zur prae- und postnatalen Entwicklung des Hippocampus der Ratte konnten CR in einer großen Anzahl migrierender Pyramidenzellen zum Zeitpunkt E20 und kurz nach der Geburt nachweisen (Jiang and Swann, 1997). Diese transiente Expression könnte darauf hinweisen, dass CR

eine wichtige Rolle für bestimmte Neuronenpopulationen während eines begrenzten Entwicklungsstadiums spielt.

Calcium spielt eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung intrazellulärer Signalkaskaden. Jedoch agieren Ca^{2+} -Ionen nicht allein, sondern mit Hilfe von calciumbindenden Proteinen, die entweder die Aktionen der Ca^{2+} -Ionen modulieren oder vermitteln (Baimbridge et al., 1992). Ca^{2+} -Ionen beeinflussen eine Reihe von Differenzierungs- und Entwicklungsvorgängen. Dazu gehören das Wachstum neuronaler Ausläufer (Gomez et al., 1995), die Expression verschiedener Neurotransmitter-Rezeptoren (Spitzer et al., 1994), sowie die neuronale Migration (Komuro und Rakic, 1996). Welche spezifische Rolle dabei die CBP spielen, insbesondere die Aufgabenverteilung unter den verschiedenen CBP, ist unklar.

Die Tatsache, dass Körnerzellen während ihrer Entwicklung zunächst CR exprimieren, bevor sie als reife Zellen ihre Calcium-Homeostase mit Hilfe von Calbindin aufrechterhalten, deutet darauf hin, dass CR vor allem die entwicklungsspezifischen Aufgaben der Calcium-Ionen moduliert.

Schurmans et al. (1997) fanden heraus, dass CR-Knockoutmäuse eine erniedrigte LTP aufweisen, wenn diese im Gyrus dentatus induziert wurde, jedoch nicht in CA1. In dieser Studie machte man hilare Mooszellen für die reduzierte LTP verantwortlich, um dieses Ergebnis zu interpretieren. Nach den hier vorliegenden Auswertungen müsste zumindest auch daran gedacht werden, dass die Reduzierung der LTP auf eine gestörte Entwicklung der hippocampalen Körnerzellen zurückzuführen sein könnte.

Wie die hier vorliegende Arbeit zeigen konnte, gibt es bis auf wenige Ausnahmen keine Körnerzelle, die sowohl CR als auch Calbindin zur gleichen Zeit exprimierte. Auch dies weist auf eine phasenspezifische Aufgabenverteilung zwischen den beiden CBP während der Differenzierung der Zelle hin.

Es ist bekannt, dass CBP durch ihre calciumpuffernde Wirkung einen protektiven Effekt auf die Zelle ausüben (Baimbridge et al., 1992). Dieser Effekt spielt besonders nach exzitatorischer Stimulation eine große Rolle. So wird angenommen, dass der massive Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle, vermittelt durch eine Überstimulation von Glutamatrezeptoren, Hauptursache des Zelltods bei verschiedenen pathologischen Prozessen ist (Schanne et al., 1979). Junge Körnerzellen zeigen den ersten axonalen Kontakt zu Zellen der CA3-Region etwa drei bis fünf Tage nach der

Zellteilung (Hastings and Gould, 1999). Zur selben Zeit exprimieren unreife Körnerzellen zum ersten mal ein CBP: Calretinin (CR). Junge Vorläuferzellen zeigen aber bereits zu einem früheren Zeitpunkt Zeichen neuronaler Funktion. Neue elektrophysiologische Untersuchungen der Nestin-positiven Vorläuferzellen weisen darauf hin, dass eine Subpopulation dieser Zellen, die sowohl Glutamat- als auch GABA-Rezeptoren exprimieren, zunächst nur GABAerg innerviert werden (Wang et al., 2005). Die Rolle des Neurotransmitters GABA während der neuronalen Reifung ist bereits aus der embryonalen und frühen postnatalen Entwicklung bekannt. Interessanterweise agiert GABA in diesem frühen Entwicklungsstadium an den ersten funktionellen Synapsen als exzitatorischer Transmitter und führt ebenso wie Glutamat zu einem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Gehaltes (Ben-Ari Y. 2002; Leinekugel et al., 1997).

Nach unseren Ergebnissen sterben die meisten neugeborenen Zellen während der Phase der CR-Expression, im Alter zwischen 3 und 18 Tagen, wohingegen die Zahl der neuen CB-positiven Zellen stabil bleibt. Wenn CR im Gegensatz zu Calbindin nicht in der Lage ist, die Zelle vor zu hohem Calciumeinstrom nach exzitatorischer Aktivierung zu schützen, könnte dies darauf hindeuten dass diese Phase der neuronalen Differenzierung ein vulnerables Stadium der Entwicklung darstellt, indem eine Selektion der neugeborenen Zellen stattfindet.

Auch wenn man bisher nicht nachweisen kann, dass CR in direktem Zusammenhang mit dem Tod bzw. der Selektion der neuen Neurone steht, gibt es weitere Gründe, die zeigen, dass sich zumindest zeitlich die Selektion der neuen Zellen und die Phase der CR-Expression decken:

- 1) Kempermann et al. (1997) haben nachgewiesen, dass eine reizreiche Umgebung die netto Neurogenese steigert, indem im Vergleich zur Kontrollgruppe mehr neugeborene Zellen überleben. In dem hier vorliegenden Experiment konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die in einer reizreichen Umgebung lebten, zwar vier Wochen nach der BrdU-Injektion mehr neue Neurone haben, aber der Anstieg der CR-positiven Zellen bei weitem nicht so hoch ist wie bei der Läufergruppe verglichen mit den jeweiligen Kontrolltieren. So könnte auch hier eine verkürzte Phase der CR-Expression direkt oder indirekt für das Überleben der neuen Nervenzellen verantwortlich gemacht werden.

- 2) Neue Neurone, die während der adulten Neurogenese entstanden sind, weisen andere elektrophysiologische Eigenschaften auf als reife Körnerzellen. Ihr Membranpotential ist durch ein niedriges Schwellenpotential und isolierte Calcium-Spitzen geprägt (Schmidt Hieber et al., 2004). Die untersuchten Neurone waren alle PSA-NCAM-positiv. PSA-NCAM ist ein Marker für junge Neurone (Vorläuferzellen), die sich ein bis maximal drei Wochen zuvor geteilt haben (Seki, 2002). PSA-NCAM und DCX werden zur selben Zeit in den Vorläuferzellen exprimiert, und wie wir demonstrieren konnten, beginnen die unreifen Neurone in der DCX-Phase CR zu exprimieren. Auch hier kann hypothetisch der hohe Calciumeinstrom während der frühen CR-Phase für die Vulnerabilität dieser Zellen verantwortlich gemacht werden.
- 3) Es wurde schon früher vermutet, dass LTP, welches beim Lernen und im *enriched environment* auftritt, die Selektion, das Überleben und die funktionelle Integration der neugebildeten Neurone vermittelt (Kempermann et al., 1997; Gould et al., 1999). Schmidt-Hieber et al. zeigten, dass LTP in jungen PSA-NCAM-positiven Körnerzellen leichter auszulösen ist als in reifen Körnerzellen. Da reife Körnerzellen Calbindin als CBP exprimieren, könnte auch hier CR durch eine erniedrigte Pufferleistung oder durch Modulierung intrazellulärer Signalkaskaden seinen Teil zur physiologischen Selektion beitragen.

Darüber hinaus scheint aus „ökonomischer Sicht“ eine Auslese der neuen Neurone auch vor dem postmitotischen CR-Stadium, in dem die Vorläuferzellen noch proliferative Eigenschaften aufweisen, weniger sinnvoll zu sein. Eine Selektion teilungsaktiver Zellen führt wegen der asymmetrischen Proliferation unweigerlich nicht nur zu einer Reduktion der Zellen, die im Verlauf der weiteren Entwicklung funktionell in das neuronale Netzwerk integriert werden sollen, sondern auch zu einer Reduktion proliferativer Vorläuferzellen, die somit auch später keinem weiteren Zellzyklus und keiner weiteren Differenzierung zur Verfügung stehen. In Analogie zu dem in Kapitel 1.2.1 erwähnten „pine-tree model“ würde eine Selektion im postmitotischen Stadium einem Stutzen der Äste gleichkommen. Wohingegen die Aussortierung neuentstandener Vorläuferzellen, die sich asymmetrisch teilen, eine Manipulation am Stamm des Baumes mit weitreichenderen Konsequenzen bedeutet.

Somit hätte eine Selektion zu einem so frühen Zeitpunkt sehr viel längerfristige Auswirkungen auf die Nettoneurogenese, was durch die zeitliche Verzögerung eine umweltangepasste Regulation sehr viel schwieriger macht, als die regulative Selektion auf Ebene der postmitotischen Zellen.

Den deutlichsten Hinweis darauf, dass der programmierte Zelltod der neuen Neurone in einem postmitotischen Stadium abläuft, fanden Sun et al. (2004) Ende des letzten Jahres. Sie analysierten die Zahl der proliferierenden bzw. reifen Zellen im adulten Hippocampus einer Bax-Knockoutmaus. Bax ist ein Gen der Bcl-2 Familie, welches die Apoptose der während der Neurogenese entstandenen Neurone vermittelt (Sun et al. 2003; White et al. 1998; Deckwerth et al. 1996). Im Hippocampus von Mäusen, die dieses Gen nicht besitzen, ist keiner der bekannten Apoptose-Marker (TUNEL, Caspase 3) nachweisbar. Dementsprechend verdoppelten sich bei den Bax-Knockoutmäusen in den ersten zwölf Lebensmonaten auf grund der fehlenden Apoptose die Zahl der hippocampalen Körnerzellen (Sun et al. 2004). Das Ausmass der Zellproliferation und die Gesamtzahl proliferierender Zellen blieben trotz Fehlen des Gens unbeeinflusst. Jedoch stieg die Zahl CR-positiver Zellen im Gyrus dentatus der Bax-Knockoutmäuse um mehr als das Doppelte. Auf unsere Ergebnisse berufend erklären Sun et al. die steigende Zahl CR-positiver Zellen damit, dass die physiologische Apoptose der adult generierten Zellen im frühen postmitotischen Stadium ihrer Entwicklung stattfindet.

In wie weit die Expression Calretinins Einfluss auf den Zelltod der unreifen Körnerzellen hat, bleibt unklar und bedarf einer weiteren experimentellen Abklärung. Ein viel versprechender experimenteller Ansatz zum besseren Verständnis des funktionellen Zusammenhangs der transienten CR-Expression und der Reifung neuer Körnerzellen, könnte die Untersuchung der adulten Neurogenese einer CR-Knockoutmaus darstellen.

4.5 Ausblick: Mögliche Anwendungen von CR als "Neurogenesemarker"

Die in dieser Studie erhobenen Daten geben einen Hinweis darauf, dass sich die Zahl CR-positiver Zellen im Gyrus dentatus in Abhängigkeit des jeweiligen Stimulus im selben Maße ändern wie die Zahl BrdU-positiver Zellen. Ist CR eine echte Alternative zu BrdU zur quantitativen Bestimmung adulter Neurogenese?

Um diese Frage beantworten zu können, sind weitere Studien erforderlich, insbesondere Korrelationsberechnungen CR- und BrdU-positiver Zellen bei verschieden stark ausgeprägter Neurogenese. Basierend auf den hier erhobenen Daten wurden (in unserem Labor) bereits weitere Untersuchungen in dieser Richtung unternommen. Im Vorfeld zu diesen Experimenten wurden verschiedene Mäusestämme untersucht, die hinsichtlich ihres neurogenen Potentials, gemessen an der Zahl BrdU-positiver Zellen und der Anzahl NeuN/BrdU doppelpositiver Neurone, große Unterschiede aufwiesen (Kempermann, 1997). Die bei denselben Tieren bestimmte Zahl CR-positiver Zellen scheint mit wenigen Ausnahmen direkt mit der Zahl BrdU-positiver bzw. NeuN/BrdU-positiver Zellen zu korrelieren (unveröffentlichte Beobachtung). Die aufgetretenen Unregelmäßigkeiten zwischen den verschiedenen Stämmen lassen sich mit hoher Wahrscheinlichkeit damit erklären, dass sich die Stämme nicht nur hinsichtlich der Quantität neuer Zellen unterscheiden, sondern auch hinsichtlich der Entwicklungskinetik. Eine verlängerte Reifung der Zellen führt möglicherweise zu einer längeren Expression des CBP CR, und somit zu einer erhöhten Anzahl CR-positiver Zellen. Daraus ergibt sich ein Nachteil Calretinins gegenüber BrdU als Neurogenesemarker. Während BrdU nur die Zellen markiert die sich im Moment der Injektion teilen und lediglich die initial markierten Zellen das BrdU im weiteren Verlauf an die Tochterzelle abgeben, gibt es ein relativ genaues Bild der Proliferation während und nach der Injektion wieder. Im Gegensatz dazu ist die CR-Expression als Bestandteil der neuronalen Entwicklung von mehreren Faktoren abhängig und kann, allein betrachtet, nur ungefähr Aufschluss über das Maß der Neurogenese und der Reifungsdauer geben.

CR als Marker zur Bestimmung der Neurogenese hippocampaler Körnerzellen birgt aber auch Vorteile gegenüber den herkömmlichen Methoden. So kann die CR-Expression und damit die Neurogenese auch dann bestimmt werden, wenn die Verabreichung von BrdU nicht möglich ist (z.B. in humanem Gewebe). Voraussetzung für diesen experimentellen Ansatz ist, dass auch humane Vorläuferzellen ähnliche Entwicklungsstadien und Expressionsmuster aufweisen wie die der Maus.

Adulte Neurogenese im humanen Gehirn:

Ende der neunziger Jahre wurden erstmals die Phänotypen neu entstandener Zellen im adulten humanen Gehirn untersucht. Eriksson et al. (1998) standen damals

Gewebsproben von Karzinom-Patienten zur Verfügung, die Wochen bis Monate vor der Autopsie aus diagnostischen Gründen BrdU verabreicht bekamen. Somit konnte nicht nur die zelluläre Regeneration im erwachsenen humanen Hippocampus nachgewiesen werden, sondern auch demonstriert werden, dass zahlreiche BrdU-markierte Zellen ebenso wie im murinen Hippocampus neuronale Proteine wie NeuN und Calbindin exprimieren. Nachteil dieser experimentellen Studie war jedoch der lange Zeitraum zwischen der BrdU-Applikation und der letztlichen Bestimmung der Proteinexpression in diesen Zellen, der keine Analyse noch undifferenzierter Neurone zuließ.

Auch wenn bisher noch nicht untersucht wurde, ob unreife Körnerzellen des Menschen CR exprimieren, gibt es viel versprechende Studien, die auf ähnliche Expressionsmuster in humanen Vorläuferzellen hindeuten. Wie bei der Maus so auch im humanen Gehirn entstehen in der SVZ Vorläuferzellen, die entlang des „rostral migratory stream“ zum Bulbus olfaktorius wandern, um sich dort zu Interneuronen zu differenzieren (Bedard und Parent, 2004). Eine große Anzahl der dabei entstehenden periglomerulären Zellen exprimieren sowohl Marker unreifer Vorläuferzellen, wie DCX, TuJ1 und PSA-NCAM, als auch CR. Es gibt jedoch auch Studien, die eine Neubildung und Migration neuronaler Zellen im humanen Bulbus olfaktorius in Frage stellen. Sanai et al. (2004) bestätigen in ihrer Untersuchung zwar das Vorkommen potentieller Stammzellen in der humanen SVZ, aber bezweifeln eine Migration und Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen im humanen Bulbus und Pendunculus olfaktorius. Unabhängig von dieser Diskussion über die adulte Neurogenese in der humanen SVZ, gibt es zurzeit keinen Zweifel an der adulten Neurogenese im menschlichen Hippocampus. Auch im humanen Hippocampus konnten Zellen nachgewiesen werden, die Proteine exprimierten, die uns aus tierexperimentellen Studien bekannt sind. So war bei Alzheimer-Patienten die Zahl PSA-NCAM-, DCX- und TUJ1-positiver Zellen im Gyrus dentatus erhöht (Kunlin et al., 2003). Es gibt also viele Hinweise darauf, dass humane Vorläuferzellen in vivo ähnliche Entwicklungsstadien und Expressionsmuster aufweisen, wie die der Maus. Somit bekommt auch CR, als einziger bekannter postmitotischer Marker unreifer Körnerzellen, eine wichtige Bedeutung bei der Erforschung der adulten Neurogenese des menschlichen Organismus.

Eine weitere Besonderheit Calretinins ist dessen spezifischere Expression im Gegensatz zu anderen transienten Vorläuferzellmarkern. Während DCX in sowohl mitotischen als auch postmitotischen Zellen exprimiert wird, ist die CR-Expression auf neuentstandene, postmitotische, unreife Körnerzellen beschränkt, und erlaubt somit die Erforschung der Entwicklung adult generierter Körnerzellen in einem spezifischen Zeitfenster.

Auch wenn CR durch diese Spezifität eine Alternative oder sogar hinsichtlich der Phänotypbestimmung eine Verbesserung zu BrdU darstellen kann, ergibt sich das größte experimentelle Potential weiterhin aus einer Kombination aus Proliferationsmarkern wie BrdU und phasenspezifischen Markern wie CR.

4.6 Eingliederung der hier gewonnenen Erkenntnisse in den Gesamtkontext der neuronalen Reifung während der adulten Neurogenese.

Von der Stammzelle zum reifen Neuron

Basierend auf in den letzten Jahren veröffentlichten Studien und den hier beschriebenen Ergebnissen kann die Entwicklung der Körnerzellen während der adulten Neurogenese wie folgt zusammengefasst werden (Abb. 21):

Aufgrund morphologischer Kriterien und der phasenspezifischen Expression bestimmter Proteine kann man die Entwicklung adult generierter Körnerzellen in sechs Stufen einteilen (Kempermann et al., 2004). Die ersten vier Stufen, welche die Subpopulationen proliferierender Vorläuferzellen beschreiben, wurden bereits im Kapitel 1.2.1. näher erläutert. Zum besseren Verständnis des gesamten Kontexts sollen sie nochmals kurz erwähnt werden.

Die erste Vorläuferzelle, die sowohl gliale als auch neuronale Vorläuferzellen bilden kann, ist Nestin-positiv (Filippov et al., 2003). Die Population Nestin-positiver Zellen kann in zwei Subtypen klassifiziert werden: GFAP-positive Typ-1 Zellen mit astrozytären Eigenschaften, und GFAP-negative Typ-2 Zellen (Filippov et al., 2003; Kronenberg et al., 2003).

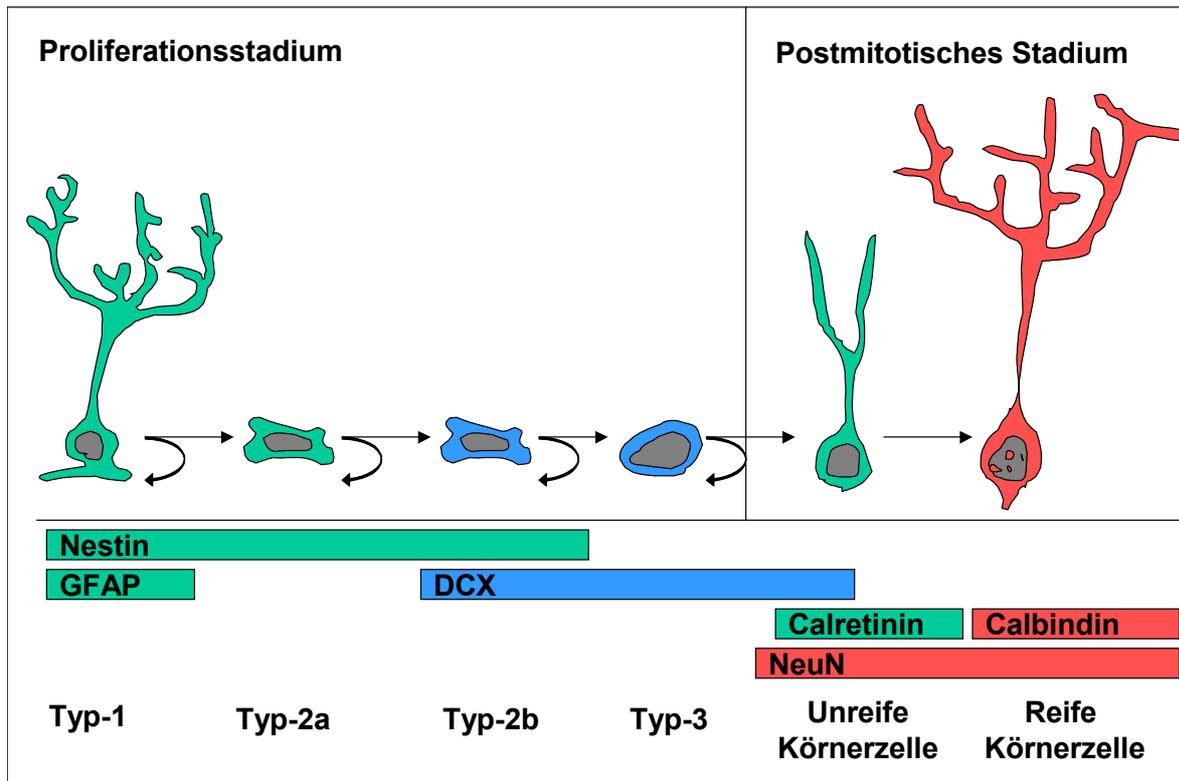


Abb. 21: Schematische Darstellung der sechs verschiedenen Stufen neuronaler Entwicklung während adulter Neurogenese im Gyrus dentatus. Die Differenzierung der Entwicklungsstadien basiert auf morphologischen, proliferativen und immunhistochemischen Eigenschaften der Zellen. Die doppelten Pfeile weisen auf die asymmetrische Zellteilung während des Proliferationsstadiums hin (Kempermann et al., 2004).

Zwei Drittel der Nestin-positiven Zellen sind Typ-1 Zellen. Diese mutmaßlichen Stammzellen stellen jedoch nur etwa 5% der teilungsaktiven Nestin exprimierenden Zellen dar. Die meisten der proliferierenden Nestin-positiven Vorläuferzellen sind die GFAP-negativen Typ-2 Zellen, welche in DCX-negative Typ-2a und DCX-positive Typ-2b Zellen unterteilt werden können. Es ist wahrscheinlich, dass diese Typ-2 Zellen restriktive neuronale Vorläuferzellen sind (Filippov et al., 2003; Fukuda et al., 2003), die dann im Laufe ihrer Differenzierung den Homeobox-Transkriptionsfaktor Prox-1 exprimieren, welcher der früheste bekannte persistierende Marker für hippocampale Körnerzellen ist (Pleasure et al., 2000). Wie man dem Schema (Abb. 21) entnehmen kann, sind die Zellen in diesem Stadium noch in einer Proliferationsphase, es konnte aber mit den hier angewendeten Methoden – auch

wenn es wahrscheinlich ist – nicht eindeutig bewiesen werden, ob aus einer sich teilenden DCX/Nestin-positiven Zellen eine Prox-1-positive Nestin-negative zukünftige Körnerzelle entsteht, oder ob noch vor der Prox-1 Expression andere Zwischenstadien durchlaufen werden.

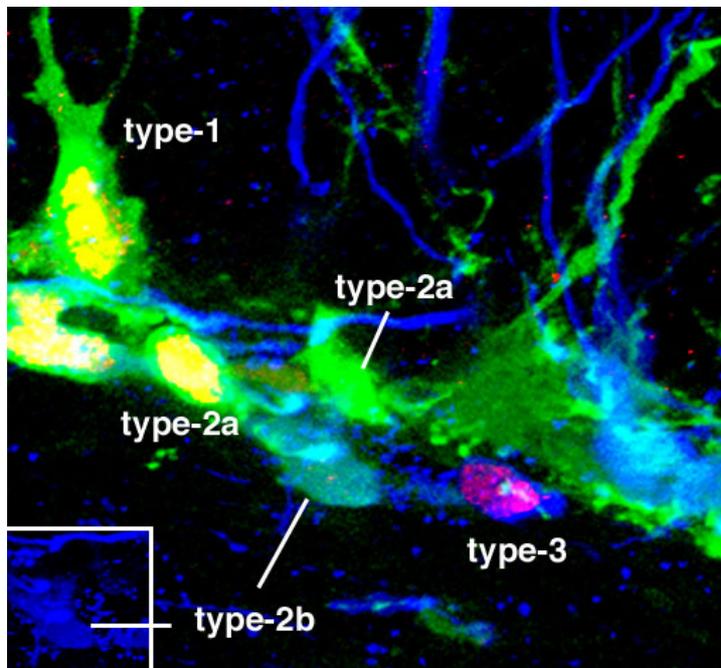


Abb. 22: Darstellung aller vier proliferativen Zelltypen in der SGZ einer adulten Maus. Die vier Vorläuferzellpopulationen können anhand morphologischer Unterschiede und der Expression spezifischer Marker (Nestin: grün; DCX: blau) unterschieden werden.

Das Vorhandensein von Ki-67 (rot) in diesen Zellen beweist die mitotische Aktivität aller vier Subtypen.

(aus Kempermann et al., 2004)

Ein bis drei Tage nach Beendigung des Zellzyklus und dem Erreichen der postmitotischen Differenzierungsphase beginnt die Typ-3 Zelle CR zu exprimieren. Bis zu dieser Entwicklungsstufe hat sich die Zahl neuer Zellen auf das vier bis fünffache erhöht. Drei bis sieben Tage nach der initialen Zellteilung erreicht die Expression Calretinins ihr Maximum (Abb. 23). Im selben Zeitraum sinkt die Zahl BrdU-positiver Zellen und erreicht nach etwa 2,5 Wochen ein stabiles Niveau (Kempermann et al., 2003).

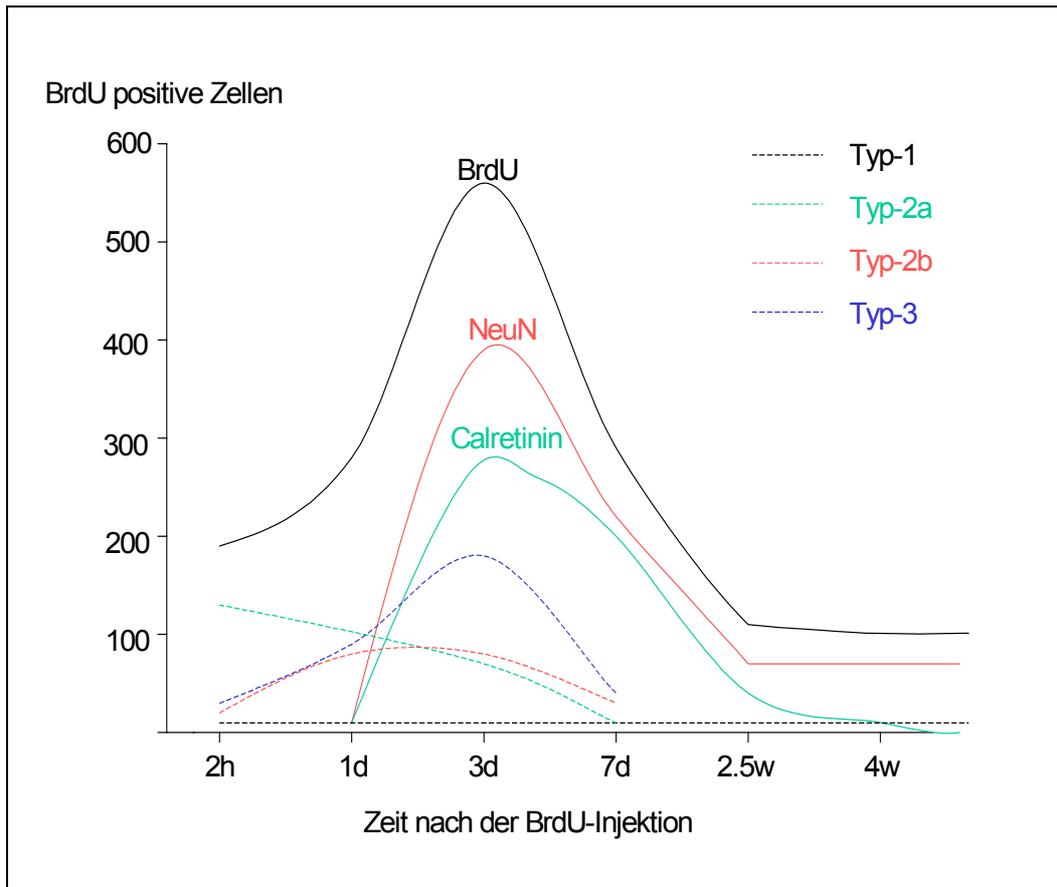


Abb. 23: Zahl der neu generierten Zellen während der verschiedenen Entwicklungsstadien. Die schwarze Kurve zeigt die Anzahl BrdU-markierter Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der BrdU-Injektion. Die farbigen Kurven zeigen die Anzahl BrdU-positiver Zellen, die die Charakteristika der in Abb. 21 dargestellten Entwicklungsstadien erfüllen (Typ-1 bis 3, und postmitotische CR- bzw. NeuN-positive Zellen, Kempermann et al., 2004).

Der zeitliche Verlauf der wachsenden Population BrdU-markierter Zellen und der anschließende Untergang des Großteils der neu entstandenen Zellen lässt die Vermutung zu, dass die quantitative Zunahme dieser Population im Stadium der Vorläuferzellen (Typ 1 und 2) reguliert wird und die Selektion der neuen Neurone, die für die terminale Differenzierung rekrutiert werden, im frühen postmitotischen Stadium abläuft.