

**Funktionale Relevanz adulter Neurogenese
im Hippokampus der Maus**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat)

vorgelegt von

Alexander Garthe

aus Bonn

im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie

der

Freien Universität Berlin



Berlin/Dresden im Januar 2008

Dekan:

Prof. Dr. Ronald Gust

Gutachter:

Prof. Dr. Gerd Kempermann, Technische Universität Dresden

Prof. Dr. Constance Scharff, Freie Universität Berlin

Disputation am 19. Juni 2008

”Der Forscher muss der Natur allgemeine Prinzipie ablauschen, indem er an größeren Komplexen von Erfahrungstatsachen gewisse allgemeine Züge erschaut. Ist diese Formulierung einmal gelungen, so setzt eine Entwicklung von Folgerungen ein, die oft ungeahnte Zusammenhänge liefert.”

Albert Einstein
Antrittsrede vor der Akademie 1914

Widmung

Für Flavia, Noah Cyrus, Delphine Charlotte

und

Gerd Rolffs

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung/Abstract	1
2 Theoretischer Hintergrund	4
2.1 Adulte Neurogenese	4
2.1.1 Einleitung	4
2.1.2 Neuronale Stammzellen	6
2.1.3 Adulte Neurogenese im Hippokampus	7
2.1.4 Adulte Neurogenese in anderen Hirnregionen	9
2.1.5 Regulation adulter Neurogenese im Hippokampus	10
2.1.6 Funktionale Relevanz adulter Neurogenese	12
2.2 Der Hippokampus der Säugetiere	16
2.2.1 Anatomie	16
2.2.2 Konnektivität	18
2.2.3 Hippokampale Neurophysiologie des Verhaltens	20
2.2.4 Funktion des Hippokampus	21
2.2.5 Ein theoretisches Modell zur funktionalen Relevanz adulter Neurogenese im Hippokampus	24
2.3 Fragestellung	32
3 Material & Methoden	34
3.1 Tiere	34
3.2 Temozolomid	34
3.3 Temozolomid-Applikation	36
3.4 BrdU-Markierung proliferativer Zellen	37
3.5 Hämatologie	38
3.6 Transkardiale Perfusion, Fixation und Schneiden des Gewebes	38
3.7 Immunohistochemie	39
3.8 Elektrophysiologie	39
3.9 Verhaltenstests	40
3.9.1 Rotarod	40
3.9.2 Open Field Test	41
3.9.3 Morris Water Maze Test	42

3.10	Analyse der MWM Daten	45
3.10.1	Klassische Analyse	45
3.10.2	Suchstrategien in der MWM	46
3.11	Klassifikationsalgorithmus	57
3.12	Konvolutionsanalyse	65
3.13	Experimentelles Design	66
4	Ergebnisse	68
4.1	Effekte von Temozolomid auf die Zellproliferation im Gyrus dentatus	68
4.2	Effekte von Temozolomid auf Typ 1 und Typ 2 Zellen der Stammzellnische	69
4.3	LTP in Gyrus dentatus und CA1	71
4.4	Effekte von TMZ auf die Mikrogliazellen im DG	74
4.5	Effekt des Temozolomids auf die Hämatopoiese	75
4.6	Körpergewicht	78
4.7	Rotarod Test	79
4.8	Open field Test (OFT)	80
4.9	MWM: Schwimmgeschwindigkeit	81
4.10	MWM: Quantitative Lernmaße	81
4.11	Quadrantenpräferenz in der MWM	83
4.12	Aufenthaltswahrscheinlichkeiten/Okkupationsplot	85
4.13	Qualitative Analyse der MWM	88
4.14	Konvolutionsanalyse	95
5	Diskussion	98
5.1	TMZ erlaubt die effektive Suppression adulter Neurogenese ohne das Auftreten negativer Nebenwirkungen.	99
5.1.1	Die TMZ Applikation resultiert in einer effektiven Ablation adulter Neurogenese im DG.	99
5.1.2	TMZ entfaltet seine Wirkung auf die Zellen der Stammzellnische in differenzierter Weise.	100
5.1.3	Das hämatopoietischen System erholt sich nach Ende der TMZ Applikation rasch und vollständig.	101
5.1.4	Der Allgemeinzustand der behandelten Mäuse ist mit dem der Kontrolltiere vergleichbar und untersteicht das positive Nebenwirkungsprofil des TMZ.	101
5.1.5	Die Ergebnisse des Rotarodexperiments schliessen einen negativen Einfluss den TMZ auf die motorische Lernfähigkeit, sowie das natürliche Explorationsverhalten aus.	102

5.1.6	Die Konsolidierung und Retention von Gedächtnisinhalten erscheint nach einer TMZ Behandlung intakt.	103
5.1.7	Im DG behandelte Tiere zeigen selektiv den Verlust junger, plastischer Körnerzellen zur LTP; die grundsätzliche Induzierbarkeit einer LTP im DG und der Region CA1 ist unverändert.	104
5.1.8	Das fehlende Auftreten entzündlicher Prozesse nach erfolgter TMZ Behandlung stellt einen erheblichen Vorteil gegenüber der Nutzung ionisierender Strahlung zur Suppression adulter Neurogenese dar.	105
5.1.9	Ein Vergleich mit anderen Ansätzen zur Suppression adulter hippocampaler Neurogenese offenbart die Vorteile einer multizyklischen TMZ Applikation.	106
5.2	Die Suppression adulter Neurogenese resultiert in quantitativen und qualitativen Veränderungen des räumlichen Lernens.	108
5.2.1	Die behandelten Tiere können die MWM grundsätzlich erlernen, zeigen jedoch eine insgesamt signifikant geringere Lernleistung.	108
5.2.2	Die Analyse der relativen Aufenthaltsdauer in den Quadranten der MWM offenbart im Kontext signifikanter Umweltveränderungen eine reduzierte kognitive Flexibilität in Folge einer supprimierten adulten Neurogenese.	109
5.2.3	Die Suppression adulter Neurogenese resultiert in zwei kausal zusammenhängenden, spezifischen Effekten.	111
5.2.4	Die quantitative Analyse der MWM Daten scheint die Prädiktion des Modells von Wiskott et al. zu bestätigen, qualitative Aspekte bleiben jedoch unberücksichtigt.	111
5.2.5	Die Darstellung der Aufenthaltswahrscheinlichkeit im Okkupationsplot erlaubt eine Beurteilung der Qualität des Lernvorgangs und bestätigt die zuvor gefundenen Effekte einer supprimierten adulten Neurogenese.	112
5.2.6	Die algorithmusbasierte qualitative Analyse der im MWM-Versuch genutzten Suchstrategien hat sich als sinnvoll und zuverlässig erwiesen.	115
5.2.7	Die Tiere beider Gruppen verwenden in der MWM das gesamte Spektrum verfügbarer Suchstrategien.	116
5.2.8	Signifikante Gruppenunterschiede treten spezifisch nur dann auf, wenn das gezeigte Verhalten einen intakten Hippokampus erfordert.	116

5.2.9	Die gefundenen Gruppenunterschiede in der Lernleistung beruhen auf einer gruppenspezifischen Frequenz der Anwendung der einzelnen Suchstrategien; in qualitativer Hinsicht unterscheiden sich die jeweils gezeigten Strategien jedoch nicht.	117
5.2.10	Die Konvolutionsanalyse bestätigt das Vorhandensein eines Kompensationsmechanismus bei den behandelten Tieren, in dessen Verlauf auch hippocampusunabhängige Strategien auftreten können.	118
5.2.11	Quantitative und qualitative Analyse belegen das Auftreten zweier kausal zusammenhängender, spezifischer Effekte einer supprimierten adulten Neurogenese im MWM Experiment.	119
5.3	Die beobachteten Effekte einer supprimierten adulten Neurogenese sind hochspezifisch.	120
5.3.1	Die qualitative Analyse der benutzten Strategien dient zugleich als interne Kontrolle und schliesst unspezifische Wirkungen des TMZ aus.	120
5.3.2	Die beobachteten Effekte fügen sich plausibel in den Kontext einer Interaktion des HC mit anderen Hirnarealen, besonders dem orbitofrontalen Kortex ein.	121
5.3.3	Die pharmakologische Suppression adulter Neurogenese resultiert in einem Phänotyp, welcher in vergleichbarer Weise auch nach altersbedingten oder pathologischen Veränderungen des cholinergen Systems beobachtet wird.	124
5.3.4	Die Entwicklung eines vergleichbaren Phänotyps in Folge einer Inaktivierung von CD4 ⁺ T-Lymphozyten und bei p27 ^{-/-} KO Mäusen bestätigt die kausale Beziehung zwischen einer supprimierten adulten Neurogenese und dem beobachteten Plastizitätsdefizit.	126
5.4	Aus den erhobenen Daten und der Analyse des MWM Protokolls kann eine allgemeine funktionale Hypothese abgeleitet werden.	127
5.4.1	Hypothese: Adulte hippocampale Neurogenese ermöglicht das effektive Erlernen neuer verhaltensrelevanter Regeln im Kontext einer bekannten Umgebung, für die bereits erlernte Regeln existieren.	128

5.4.2	Das MWM Protokoll nach Wolfer et al. erlaubt die Formung fester verhaltensrelevanter Regeln auf der Grundlage der Konfiguration visueller Landmarken, welche im Falle einer Zielverschiebung durch neue Regeln ersetzt werden müssen.	129
5.4.3	Das erfolgreiche Erlernen der ersten MWM Phase fällt zeitlich mit der Entfernung überschüssiger junger Neurone im DG durch Apoptose zusammen.	131
5.4.4	Die Anwendung der vorgeschlagenen Hypothese auf verschiedene MWM Protokolle erlaubt eine sinnvolle Interpretation zunächst widersprüchlich erscheinender Ergebnisse in einem gemeinsamen Kontext.	133
5.4.5	Das MWM Protokoll nach Saxe et al. beinhaltet zahlreiche, in schneller Abfolge stattfindende Veränderungen der räumlichen Konfiguration verhaltensrelevanter Stimuli, wodurch die Formung fester Regeln verhindert wird.	133
5.4.6	Ein Vergleich der MWM Protokolle offenbart eine mögliche Rolle von über Nacht stattfindenden Konsolidierungsmechanismen.	135
5.4.7	Das MWM Protokoll nach Madsen et al. enthält keinerlei Veränderung der räumlichen Konfiguration visueller Stimuli und bildet so den ersten Teil des in der vorliegenden Studie durchgeführten Experiments nach.	135
5.4.8	Die vorgeschlagene Hypothese kann auch erfolgreich zur Interpretation eines <i>place recognition</i> Tests als alternatives Paradigma für räumliches Lernen angewendet werden.	138
5.4.9	Die Anwendung der vorgeschlagenen Hypothese auf das <i>Radial Arm Maze</i> Paradigma ergibt eine plausible Erklärung scheinbar paradoxer, positiver Effekte einer supprimierten Neurogenese für das räumlichen Kurzzeitgedächtnis.	141
5.4.10	Der Kern der vorgeschlagenen Hypothese wird durch die in Studien anderer Autoren aufgezeigte Bedeutung einer wiederholten Exposition gegenüber gleichen Stimuluskonfigurationen für die effektive Formung eines Langzeitgedächtnisses bestätigt.	143
5.4.11	Der Genotyp hat eine grundlegende Bedeutung für die Entwicklung qualitativer Aspekte der Akquisitionphase in der MWM.	143

5.4.12	Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen das Modell nach Wiskott et al., lassen jedoch einige Modifizierungen als notwendig erscheinen.	144
5.5	Schlussbetrachtung und Ausblick	145
5.5.1	Die Fragestellung konnte erfolgreich bearbeitet werden.	145
5.5.2	Eine klinische Relevanz der erhobenen Befunde ist wahrscheinlich, kann jedoch nicht bewiesen werden.	146
5.5.3	Aus der Diskussion der hier durchgeführten Experimente und ihrer Ergebnisse ergeben sich neue interessante Fragestellungen.	147
5.5.4	Die Korrelation präzise charakterisierter Phänotypen mit unterschiedlichen Genotypen erlaubt ein differenziertes Verständnis der Regulation adulter Neurogenese im Kontext hippocampaler Funktion.	150
	Literaturverzeichnis	152
6	Appendix	170
6.1	Klassifikationsergebnisse für das MWM Experiment	170

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1	Entwicklungsstadien adulter Neurogenese im DG	8
Abb. 2.2	Die hippocampale Formation im Gehirn der Maus	16
Abb. 2.3	Struktureller Aufbau der hippocampalen Formation	17
Abb. 2.4	Extrinsische und intrinsische Konnektivität	20
Abb. 2.5	Ein Modell zur funktionalen Relevanz adulter Neurogenese	28
Abb. 3.1	Strukturformel von Temozolomid	35
Abb. 3.2	Konzept verschiedener Suchstrategien in der MWM	48
Abb. 3.3	Beispiele für die THIGMOTAXIS-Strategie	48
Abb. 3.4	Beispiel für die RANDOM SEARCH-Strategie	49
Abb. 3.5	Beispiel für die SCANNING-Strategie	50
Abb. 3.6	Beispiel für die CHAINING-Strategie	51
Abb. 3.7	Beispiel für die DIRECTED SEARCH PRESENT GOAL-Strategie	52
Abb. 3.8	Beispiel für die FOCAL SEARCH-Strategie	52
Abb. 3.9	Beispiel für die DIRECT SWIMMING-Strategie	53
Abb. 3.10	Beispiel für die DIRECTED SEARCH PREVIOUS GOAL-Strategie	54
Abb. 3.11	Beispiele für nicht-pathologische CIRCLING Strategien	54
Abb. 3.12	Beispiel für die PATHOLOGICAL CIRCLING-Strategie	55
Abb. 3.13	Beispiele für Praxisstrategien und Pfadintegration	56
Abb. 3.14	Aufteilung des MWM Pools in Zonen	58
Abb. 3.15	Aufteilung des MWM Pools in Sektoren	60
Abb. 3.16	GUI der in Matlab implementierte Analysesoftware	61
Abb. 3.17	Approximation der überstrichenen Pooloberfläche	62
Abb. 3.18	Lage von Punkten in einem Zielkorridor	63
Abb. 3.19	Bedeutung des Schwimmpfad-Schwerpunktes	64
Abb. 4.1	Effekt von TMZ auf die Zellproliferation in der SGZ	69
Abb. 4.2	Effekt von TMZ auf Nestin ⁺ Zellen in der SGZ	70
Abb. 4.3	Effekt von TMZ auf Nestin ⁺ und DCX ⁺ Zellen in der SGZ	71
Abb. 4.4	MPP LTP im Gyrus dentatus (nur ACSF)	72
Abb. 4.5	MPP LTP im Gyrus dentatus (5 μ M Bikukulin)	73
Abb. 4.6	Schaffer-Kollateralen LTP in Region CA1	73
Abb. 4.7	Effekt von TMZ auf die Morphologie von Mikrogliazellen	74
Abb. 4.8	Effekt von TMZ auf die Anzahl von Mikrogliazellen	75
Abb. 4.9	Hämatologische Untersuchung I	76
Abb. 4.10	Hämatologische Untersuchung II	77
Abb. 4.11	Körpergewicht	78

Abb. 4.12	Motorische Fähigkeiten	79
Abb. 4.13	Exploratorisches Verhalten	80
Abb. 4.14	Schwimmgeschwindigkeit in der MWM	81
Abb. 4.15	Latenzzeiten und zurückgelegte Wegstrecken in der MWM	83
Abb. 4.16	Relative Aufenthaltsdauer in den Zielquadranten	85
Abb. 4.17	Relative Aufenthaltsdauer in den Nicht-Zielquadranten	86
Abb. 4.18	Darstellung der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten / Okkupationsplot	88
Abb. 4.19	Elemente und Ablauf der MWM-Datenanalyse	90
Abb. 4.20	Schematische Darstellung des Klassifikationsalgorithmus	91
Abb. 4.21	Analyse der in der MWM genutzten Suchstrategien	94
Abb. 4.22	Durchschnittliche Häufigkeit der Anwendung einzelner Suchstrategien	95
Abb. 4.23	Prädiktionen der Konvolutionsanalyse	97
Abb. 5.1	Generierung von Erwartungsmomenten im OFC	123
Abb. 5.2	Stimuluskonfigurationen bei Wolfer et al.	132
Abb. 5.3	Stimuluskonfigurationen bei Saxe et al.	135
Abb. 5.4	Stimuluskonfigurationen bei Madsen et al. und Dupret et al.	137
Abb. 5.5	Latenzzeiten bei Madsen et al. und der vorliegenden Arbeit	138
Abb. 5.6	Stimuluskonfigurationen für das <i>place recognition</i> Experiment bei Madsen et al.	140
Abb. 5.7	Zusammenhang der Ergebnisse und Ableitung der Hypothese	146
Abb. 5.8	MWM Experiment mit multiplen Zielverschiebungen	149

Abkürzungen

ABL	basolateraler Komplex der Amygdala	GFP	green fluorescent protein	NMDA-R	N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor
ACh	Acetylcholin	GFAP	glial fibrillary acidic protein	OFC	orbitofrontaler Kortex
ACSF	künstliche Zerebro- spinalflüssigkeit	HCF	hippokampale Formation	PARA	Parasubikulum
AIC	5-Aminoimidazol-4- Carboxamid	HD	head direction cell	PRE	Präsubikulum
AMPA-R	α -Amino-3-Hydroxy-5- Methyl-4-Isoxazol- Propionsäure Rezeptor	HFS	Hochfrequenzstimulus	RFID	radio-frequency identification
BDNF	brain-derived growthfactor	i.p.	intra-peritoneal	RMS	rostral migratory stream
BrdU	5-Bromo-2-Deoxyuridin	KW	Körpergewicht	SEM	Standardfehler des Mittelwertes
DCX	Doublecortin	LTD	Langzeitdepression	SGZ	Subgranularzone
DG	Gyrus dentatus	LTP	Langzeitpotenzierung	SUB	Subikulum
DMP	<i>delayed matching to place</i> Protokoll (für MWM)	MAM	Methylazooxymethanol Azetat	SVZ	Subventrikularzone
EC	entorhinaler Kortex	mPFC	medialer Präfrontalkortex	TMZ	Temozolomid
ENR	stimulus-angereicherte Umwelt	MPP	mittlerer Tractus perforans	VEGF	vascular endothelial growthfactor
fEPSP	exzitatorisches postsynaptisches Feldpotential	MTL	medialer Temporallappen	VS	ventrales Striatum
GABA	γ -Aminobuttersäure	MTIC	5-(3-Methyl-1- Triazeno)Imidazol-4- Carboxamid	ZNS	Zentralnervensystem
GC	Körnerzelle	MWM	Morris water maze		

1 Zusammenfassung/Abstract

In der vorliegenden Dissertation wurden die folgenden Projekte bearbeitet:

1. Etablierung der systemischen Applikation des Zytostatikums Temozolomid als interventioneller Ansatz zur effektiven Suppression adulter Neurogenese im Hippokampus der Maus.
2. Entwicklung und Implementierung geeigneter Modelle und Methoden zur effektiven, rechnergestützten Durchführung einer quantitativen und qualitativen Analyse von Morris Water Maze Daten.
3. Differenzierte Charakterisierung verhaltensrelevanter kognitiver Effekte der Ablation adulter Neurogenese im Hippokampus der Maus unter Verwendung des Morris Water Maze Paradigmas.

Zusammenfassung

Im Gyrus dentatus (*dentate gyrus*, DG) des Hippokampus (HC) entstehen auch im Erwachsenenalter fortwährend neue Neurone, welche sich zu funktionsfähigen Körnerzellen differenzieren und in die bestehenden Schaltkreise funktional integrieren. Zwischen der Anzahl adult generierter Körnerzellen und der Leistungsfähigkeit in der Akquisitionsphase hippokampusabhängiger Verhaltenstests besteht eine positive Korrelation [Kempermann et al., 2002]. Die spezifische funktionale Relevanz adult generierter Neurone im Kontext hippocampaler Informationsprozessierung ist jedoch nicht bekannt.

Ein Modell nach [Wiskott et al., 2006] legt eine Rolle des DG bei der Enkodierung für eine Speicherung in CA3 bestimmter Informationen nahe und postuliert die Notwendigkeit einer Adaptation des Enkodierungsmechanismus bei Veränderungen der Stimuluskonfigurationen in der Umwelt des jeweiligen Organismus. Im Zuge einer solchen Adaptation tritt das Problem einer katastrophalen Interferenz zwischen bereits erlernten und neuen Aktivitätsmustern im DG auf, welches im Modell durch das Hinzufügen neuer Neurone effektiv vermieden werden kann.

Das Auftreten einer katastrophalen Interferenz im Kontext veränderlicher Stimuluskonfigurationen in der Umwelt bei gleichzeitiger Suppression adulter

Neurogenese stellt eine Prädiktion der o.g. Hypothese dar und wurde in der vorliegenden Arbeit experimentell überprüft.

Zur effektiven Suppression adulter Neurogenese konnte die systemische Applikation des Zytostatikums Temozolomid (TMZ) als Methode ohne das Auftreten negativer Nebenwirkungen erfolgreich etabliert werden. Als Paradigma zur Testung hippocampusabhängigen räumlichen Lernens diente die Morris Water Maze (MWM) unter Verwendung eines Umkehrlernprotokolls, wodurch auch die in der o.g. Hypothese enthaltene Veränderung relevanter Stimuluskonfigurationen berücksichtigt wurde.

Hinsichtlich des allgemeinen physiologischen Zustands sowie der grundsätzlichen Fähigkeit die MWM zu erlernen, unterschieden sich Kontrollen und TMZ behandelte Tiere nicht voneinander. Erst nach dem Wechsel der Plattformposition wurde ein signifikanter Unterschied beobachtet: Unbehandelte Tiere adaptierten effektiv innerhalb weniger Versuche an die neue Situation, wohingegen die behandelten Tiere eine perseverierende Präferenz für die vorige Zielposition zeigten. Weitere Gruppenunterschiede traten hinsichtlich qualitativer Parameter des Akquisitionsprozesses auf.

Die erhobenen Daten bestätigen somit die auf dem o.g. Modell beruhende Prädiktion, wonach die Möglichkeit eines flexiblen Umgangs mit einer sich hinsichtlich verhaltensrelevanter Stimuli verändernden Umwelt nach erfolgter Suppression adulter Neurogenese signifikant beeinträchtigt ist. Auf der Grundlage dieser Befunde wurde eine allgemeine Hypothese zur funktionalen Relevanz adulter Neurogenese entwickelt und erfolgreich zur Interpretation der Ergebnisse anderer Autoren und Testparadigmen verwendet, wodurch sich die gefundenen Effekte gut in die Vorstellung verschiedener, zum Zwecke des Lernens und Erinnerns interagierender Hirnareale einfügt.

abstract

In the dentate gyrus (DG) of the hippocampus (HC) new neurons are born throughout adulthood. The new neurons differentiate into granule cells and become functionally integrated into the existing networks. Despite a clear positive correlation between the number of adult borne neurons and the animals abilities shown in the aquisition phase of hippocampus dependent learning tasks, the specific functional relevance of adult neurogenesis for information processing in the HC remains unknown [Kempermann et al., 2002, Leuner et al., 2006].

A model by [Wiskott et al., 2006] suggests a role of the DG for the encoding of information to be stored in region CA3 and proposes the need for an adaptation of the encoding network in the context of changing environmen-

tal stimulus configurations. Intimately related to such an adaptation is the problem of catastrophic interference between old, already learned patterns of activity in the DG with new ones. As a consequence effective encoding of new activity patterns as well as retrieval of previously stored information becomes severely impaired. In the model adding new neurons through adult neurogenesis allow the network to avoid this problem by providing plasticity to the encoding mechanism.

Therefore referring to that model the prediction can be derived that in mice with pharmacological ablated adult neurogenesis changes of behaviorally relevant, spatial stimulus configurations in the environment result in catastrophic interference. This prediction was tested experimentally in this study.

To effectively suppress adult neurogenesis without confounding side effects the systemic application of the cytostatic drug Temozolomide (TMZ) was established. The animals spatial learning abilities were tested using the Morris water maze test paradigm (MWM) running a protocol including a reversal learning to cover the changing stimulus configurations mentioned in the hypothesis above.

Regarding the common physiological state and the animals general ability to learn the MWM task no significant differences between controls TMZ treated mice were found. Significant differences appeared only after platform reversal: control mice adapt effectively to the new situation whereas the treated animals show a perseverating preference for the previous goal position. Mice with ablated adult neurogenesis need significantly more trials to adapt to the changed platform position. Furthermore specific differences regarding qualitative aspects of learning and effective compensation strategies were found during the acquisition phase of the MWM task.

Therefore the results of this study strongly support the hypothesis that flexible adaptation to changes of behaviorally relevant stimulus configurations in the environment is significantly impaired in mice with suppressed adult neurogenesis. Finally a functional hypothesis is postulated and used to interpret the data from other authors fitting the observed effects nicely into the view of multiple interconnected brain areas facilitating learning and memory.

2 Theoretischer Hintergrund

Adulte Neurogenese, die Geburt neuer Nervenzellen im erwachsenen Gehirn, verstieß lange Zeit gegen ein zentrales Dogma der Neurobiologie, wonach keine neuen Neurone im adulten Organismus entstehen können. Heute jedoch kann das Phänomen auch für höhere Wirbeltiere als bewiesen angesehen werden, wobei die Entdeckung multipotenter Stammzellen im adulten Gehirn die Plausibilität neugeborener Neurone entscheidend erhöhte.

Das Hinzufügen neuer Zellen zu den bestehenden Netzwerken des HC eröffnet zu der bereits bekannten Modifikabilität der synaptischen Transmission eine grundsätzlich neue Möglichkeit funktionaler Plastizität. Theoretische Modelle zeigen, dass die bedarfsabhängige Rekrutierung junger und plastischer Neurone über vergleichsweise lange Zeiträume einen positiven kumulativen Effekt auf die Fähigkeit einer effektiven Anpassung an unterschiedliche Lebensumwelten haben kann.

Darüber hinaus lassen die Beschränkung adulter Neurogenese auf wenige, räumlich eng begrenzte Hirnregionen und ihre vielfältige Regulation auf verschiedenen physiologischen und funktionalen Ebenen eine funktionale Relevanz der neugeborenen Zellen als sehr wahrscheinlich erscheinen. Dennoch ist die spezifische Funktion adult generierter Neurone im Hippokampus der Säugetiere - auch aufgrund der Widersprüchlichkeit der Ergebnisse zahlreicher Studien zur funktionellen Relevanz adulter Neurogenese - noch unbekannt.

2.1 Adulte Neurogenese

2.1.1 Einleitung

Der Begriff *adulte Neurogenese* bezeichnet die Entstehung neuer Neurone im adulten Gehirn. Adult generierte Neurone wurden erstmalig von Joseph Altman im Hippokampus von Ratten durch die Verwendung von [³H]-Thymidin nachgewiesen [Altman, 1962b,a, 1963, Altman et al., 1965]. Der für die Mammalia ubiquitäre Charakter dieses Phänomens offenbarte sich durch die Beobachtung adult generierter Neurone im Hippokampus von Katzen und Meer-schweinchen [Altman et al., 1967, Das et al., 1971]. In Tieren der Ordnung *rodentia* gelang wiederum die erste Demonstration adulter Neurogenese im Bul-

bus olfactorius [Kaplan et al., 1977]. Arbeiten an niederen Vertebraten stellten das Auftreten neuer Nervenzellen in einen für das Verhalten relevanten funktionalen Kontext [Goldman et al., 1983], wobei Studien zu den bei Vögeln an der Neurogenese beteiligten Stammzellen und ihrer Entwicklung erheblich zu einem Verständnis analoger Mechanismen im Säugerhirn beitrugen [Alvarez-Buylla et al., 1987, 1988]. Adulte Neurogenese konnte auch in Primaten und bei *homo sapiens* belegt werden [Gould et al., 1997, 1999b, Kornack et al., 1999, Eriksson et al., 1998].

Adulte Neurogenese beschreibt einen vielschichtigen Prozess, an dessen Anfang die Teilung von Vorläuferzellen steht und welcher mit der Existenz vollständig differenzierter und funktional integrierter Nervenzellen endet. Im Verlauf dieser Entwicklung migrieren die Zellen vom Ort der frühen Zellteilungen zu den Positionen, an denen sie sich gemäß der Erfordernisse des bereits bestehenden neuronalen Netzwerkes funktional integrieren können. Hierzu müssen die noch jungen Neurone Neurite ausbilden und geeignete synaptische Verbindungen formen. Die Prozesse der Differenzierung und Migration sowie das Vorhandensein spezifischer neuronaler Eigenschaften der Zellmembran, wie beispielsweise die für die Erzeugung von Aktionspotentialen erforderlichen Kanalproteine, erfordern eine spezifische Regulation der im jeweiligen Kontext relevanten Gene.

Das Entstehen neuer Nervenzellen kann nur bei Vorliegen spezifischer, lokaler Umgebungsbedingungen stattfinden, woraus sich das Konzept der neurogenen Nische ableitet [Kempermann, 2006]. Als neurogene Nische bezeichnet man eine Region, in der sowohl mitotisch aktive, neuronale Vorläuferzellen vorkommen als auch die für eine neuronale Differenzierung erforderlichen Bedingungen herrschen wie z.B. die Verfügbarkeit spezifischer Zell-Zell-Kontakte und diffusibler, eine neuronale Differenzierung fördernder Faktoren. Blutgefäße sind im Zusammenhang mit der Schaffung einer für adulte Neurogenese permissiven Nische als konstitutive Elemente einer sog. vaskulären Nische ebenfalls von Bedeutung [Palmer et al., 2000].

Das Gehirn adulter Mammalia weist zwei neurogene Regionen auf: Die subgranuläre Zone (SGZ) im Gyrus dentatus (DG) und die Subventrikularzone (SVZ). In der SGZ des HC entstehen neue exzitatorische *Körnerzellen* (*granule cells, GC*); die adult generierten Zellen der SVZ bringen im Bulbus olfactorius inhibitorische Interneurone hervor. Adulte Neurogenese ist mithin ein - nach heutigem Kenntnisstand - auf zwei exklusive Hirnregionen beschränktes Phänomen. Diverse Studien fanden adulte Neurogenese außerhalb des Hippokampus bzw. Bulbus olfactorius wie z.B. im Neokortex von Primaten [Gould et al., 1999c, 2001], jedoch konnten diese Ergebnisse nicht reproduziert werden

[Kornack et al., 2001, Rakic, 2002, Koketsu et al., 2003]. Die Limitation auf ein Vorkommen in distinkten neurogenen Regionen grenzt die adulte Neurogenese eindeutig von einer reaktiven Neurogenese unter pathologischen Bedingungen als Konsequenz von Beschädigungen des Hirngewebes ab [Arvidsson et al., 2002].

Als *adult* wird im Kontext adulter Neurogenese der Lebensabschnitt nach Erreichen der sexuellen Reife des betrachteten Organismus bezeichnet. Zu unterscheiden ist *adult* von *postnatal*, da einige Neurone des Gehirns erst nach der Geburt, aber vor der sexuellen Reife entstehen. Während die postnatale Neurogenese eine direkte Kontinuation embryonaler Neurogenesevorgänge darstellt und so in zahlreichen Hirnregionen eine signifikante Anzahl neuer Nervenzellen nach der Geburt entsteht, finden die Vorgänge adulter Neurogenese in einer zellulären Umgebung statt, welche ihre Entwicklung abgeschlossen hat. Adulte Neurogenese muss daher als eine exklusive Ausnahme von der Regel betrachtet werden.

Im peripheren Nervensystem konnte ebenfalls adulte Neurogenese nachgewiesen werden, jedoch ist die verfügbare Literatur wenig umfangreich [Namaka et al., 2001].

2.1.2 Neuronale Stammzellen

Die Verfügbarkeit neuronaler Stammzellen (*neural stem cells, NSCs*) im adulten Gehirn ist eine unabdingbare Voraussetzung für das Stattfinden adulter Neurogenese. Stammzellen (*stem cells, SCs*) finden sich nicht nur im hämatopoietischen System des Knochenmarks, sondern auch in den Epithelien der Haut und des Intestinaltraktes, in Lunge und Leber, im Herzen sowie im Gehirn. Mittlerweile konnten Stammzellen aus allen Bereichen des adulten Gehirns isoliert werden [Palmer et al., 1999].

Stammzellen sind undifferenzierte, mitotisch aktive Zellen mit zwei elementaren Eigenschaften: Sie sind unbegrenzt teilungsfähig und in der Lage, sich zu verschiedenen Zelltypen zu differenzieren (*Multipotenzität*) [McKay, 1997, van der Kooy et al., 2000, Weissman et al., 2001]. Die potentiell unbegrenzte Teilungsfähigkeit von Stammzellen resultiert entweder in zwei identischen Tochterzellen (*symmetrische* Teilung), oder in einer neuen Stammzelle, die mit ihrer Mutterzelle identisch ist, und einer zweiten Zelle, welche hinsichtlich einer bestimmten Differenzierungslinie stärker determiniert ist als die Mutterzelle (*asymmetrische* Teilung).

Als direkte Nachkommen von den Stammzellen unterscheiden sich die Vorläuferzellen (*progenitor cells*) von diesen vor allem durch eine limitierte Teilungsfähigkeit [Seaberg et al., 2003, Weissman et al., 2001]. Oftmals ist die

proliferative Aktivität von Vorläuferzellen sehr hoch, so daß sie die Anzahl neugeborener Zellen innerhalb kurzer Zeit in erheblichem Maße erhöhen können, weshalb sie auch als *transit-amplifizierende* Vorläuferzellen angesprochen werden.

Im Gehirn können Zellen den Kriterien einer Stamm- oder Vorläuferzelle in unterschiedlichen Graden entsprechen. In der vorliegenden Arbeit wird daher der Begriff Vorläuferzelle für jene Zellen verwendet, welche die Stammzellkriterien nicht vollständig erfüllen. Die in der SGZ im Hippokampus der adulten Maus sind multipotente, gewebespezifische Stammzellen und können Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten als Hauptvertreter neuroektodermaler Zelltypen hervorbringen.

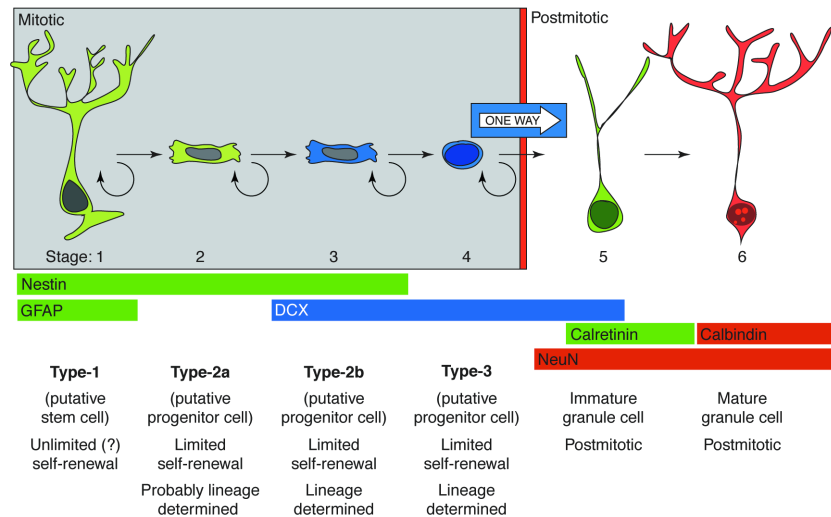
2.1.3 Adulte Neurogenese im Hippokampus

In der SGZ des HC existiert eine Population mitotisch aktiver Stamm- und Vorläuferzellen, aus welcher Neurone und Gliazellen hervorgehen können [Palmer et al., 1997]. Die neugeborenen Neurone wandern aus der SGZ in die Körnerzellschicht (s.u.) ein. BrdU-markierte Zellen können vier Wochen nach erfolgter Injektion überall in dieser Schicht nachgewiesen werden, wo sie sich zu exzitatorischen Körnerzellen differenzieren [Cameron et al., 1993]. Retrograde *tracing*-Studien haben den Nachweis erbracht, daß die adult generierten Körnerzellen ca. eine Woche nach Beendigung der mitotischen Aktivität Axone ausbilden, welche in die CA3 Region projizieren [Markakis et al., 1999, Hastings et al., 1999]. In vitro konnte gezeigt werden, daß die noch jungen Zellen in diesem Stadium bereits synaptische Eingänge erhalten und funktionale Verbindungen mit anderen Körnerzellen eingehen können, was als Voraussetzung für eine adäquate funktionale Integration angesehen werden kann [Stanfield et al., 1988, Markakis et al., 1999]. Eine erfolgreiche funktionale Integration adult generierter Neurone im HC konnte auch in vivo demonstriert werden [van Praag et al., 2002, Jessberger et al., 2003].

In funktionaler Hinsicht nicht benötigte Zellen werden durch Apoptose entfernt. Dies betrifft jedoch nur adult generierte Körnerzellen, welche älter als fünf oder jünger als 13 Tage sind [Dupret et al., 2007]. Es findet also eine selektive, von dem Vorhandensein spezifischer Eingangsaktivität abhängige und in einem bestimmten unreifen Stadium neugeborener Zellen stattfindende Regulation im Sinne der Aufrechterhaltung einer funktionalen Homeostasis statt.

Die Stamm- und Vorläuferzellpopulation in der SGZ stellt sich sehr heterogen dar (Abb. 2.1). Adulte hippocampale Neurogenese läuft als sequentieller Prozess in sechs Stadien ab [Kempermann et al., 2004]: Ausgehend von möglicherweise bipotenten, radialen Gliazellen ähnelnden Stammzellen (*Typ-1* Zel-

len) mit astrozytischen Eigenschaften verläuft die Entwicklung über mindestens zwei, von hoch proliferativen und bereits neuronal determinierten Vorläuferzellen getragene Stadien (*Typ-2a/b* und *Typ-3* Zellen), hin zu postmitotischen, reifen Körnerzellen (Abb. 2.1).



TRENDS in Neurosciences

Abbildung 2.1: Entwicklungsstadien adulter Neurogenese im DG

Im Verlauf der neuronalen Entwicklung im adulten HC können sechs Stadien auf der Grundlage der jeweiligen Morphologie, Teilungsaktivität und Markergen-Expression identifiziert werden. Unterschieden werden die eigentlichen Stammzellen (Typ-1), drei Stadien transit-amplifizierender Vorläuferzellen (Typ-2a, -2b und -3) sowie eine frühe (Typ-5) und späte (Typ-6) postmitotische Phase. Es erfolgt eine zunehmende Determination in Richtung eines neuronalen Phänotyps. Aus [Kempermann et al., 2004].

In Stadium 1 teilen sich die mutmaßlichen, Nestin⁺ und GFAP⁺ Stammzellen, um in den Stadien 2-4 nach einer asymmetrischen Teilung mindestens drei verschiedene Arten von Vorläuferzellen (*transit-amplifying progenitors*) hervorzubringen. Diese unterscheiden sich hinsichtlich ihres proliferativen Potentials, der Kombination exprimierter Markerproteine und dem zunehmenden Grad einer neuronalen Differenzierung. Aufgrund der außerordentlich hohen Teilungsaktivität der Typ-2 Zellen wird diese Phase (Stadien 2-3) auch als Expansionsphase bezeichnet. Einige Typ-3 Zellen migrieren radial in die Körnerzellschicht, wo sie jedoch zumeist bereits in den inneren Regionen verbleiben [Kempermann et al., 2003a]. In späteren Stadien bleibt die Lage der adult generierten Körnerzellen unverändert. Erste Anzeichen neuronaler Funktion, Aktionspotentiale und GABAerge Synapsen, finden sich bereits früh in den Phasen 2 und 3.

Die Stadien 1-4 enden mit dem Austritt aus dem Zellzyklus und führen irreversibel in ein transientes postmitotisches Stadium 5, welches durch die Expres-

sion von Calretinin charakterisiert ist. In diesem Stadium findet ein effektiver Selektionsprozess statt, durch den der größte Teil der in der Expansionsphase entstandenen Zellen im Verlauf eines nach Hebb'schen Prinzipien ablaufenden Selektionsprozesses durch Apoptose wieder eliminiert wird [Winner et al., 2002, Kempermann et al., 2003a, Dupret et al., 2007]. Überlebende Zellen knüpfen die synaptischen Verbindungen mit den bereits bestehenden Netzwerken und beginnen so den finalen Differenzierungs- und Integrationsprozess (Stadium 5-6) [Biebl et al., 2000]. Dieser Selektions- und Eliminierungsprozess findet vornehmlich unmittelbar nach Eintritt in die postmitotische Phase (Stadium 5) statt und erfolgt sehr schnell [Seki, 2002]. Als Konsequenz dieser Vorgänge muss die Zellproliferation in der SGZ als schlechter Prädiktor für die tatsächliche Netto-Neurogenese angesehen werden [Kempermann et al., 2002]. Das letzte Stadium 6 beschreibt terminal differenzierte, neue Körnerzellen. Eindeutiges Identifikationsmerkmal ist die Expression von Calbindin.

Bereits sieben Wochen nach Teilung der Typ-1 Zellen zeigen die noch jungen Körnerzellen elektrophysiologische Eigenschaften, die mit denen älterer Körnerzellen vergleichbar sind [van Praag et al., 2002, Jessberger et al., 2003]. Ein wesentlicher Unterschied zu bereits funktional ausgereiften Körnerzellen mit weitreichenden funktionalen Implikationen besteht in einer erheblich reduzierten Induktionsschwelle für eine Langzeitpotenzierung in jungen gegenüber älteren Körnerzellen [Wang et al., 2000, Schmidt-Hieber et al., 2004].

Da i.d.R. nur unreife Körnerzellen durch Apoptose entfernt werden, kommt es im Verlauf des Lebens eines Organismus zu einem Nettowachstum des DG. Für Mäuse wurde eine Zunahme um 40% bereits im ersten Lebensjahr beobachtet [Peirce et al., 2003]. Quantitativ findet der weitaus größte Teil adulter Neurogenese innerhalb der ersten Lebensmonate statt [Kuhn et al., 1996, Kempermann et al., 1998b, Cameron et al., 1999]. Die genetisch determinierte, basale Neurogeneserate ist zwischen den verschiedenen Mausstämmen einer erheblichen natürlichen Variabilität unterworfen: Abhängig von dem jeweiligen genetischen Hintergrund kann die Neurogeneserate sich um das bis zu 25fache unterscheiden [Kempermann et al., 1998a, 2002, Amrein et al., 2004].

2.1.4 Adulte Neurogenese in anderen Hirnregionen

Die Ventrikel des Säugergehirns sind von einer germinativen Matrix, der Subventrikularzone (SVZ) umgeben. In der SVZ entstehen auch im Erwachsenenalter Neurone. Diese migrieren über den rostralen migratorischen Strom (*RMS*) zum Bulbus olfactorius und reifen dort zu lokalen Interneuronen [Altman, 1969, Lois et al., 1993, Alvarez-Buylla et al., 1995, Kornack et al., 2001].

Adulte Neurogenese in der SVZ wird durch eine Vielzahl von Faktoren regu-

liert. In Analogie zur Induktion adulter Neurogenese im HC durch Erfahrung einer reizangereicherten Umwelt kann die Exposition gegenüber einer olfaktorisch angereicherten Umgebung die Neurogenese im Bulbus olfactorius erhöht werden. Wie im HC (s.u.) beruht dieser Effekt auf einer Erhöhung der Überlebenswahrscheinlichkeit, nicht jedoch auf einer erhöhten Proliferationsaktivität [Rochefort et al., 2002].

Hinweise für adulte Neurogenese ergeben sich auch für weitere Hirnregionen wie den cerebralen Kortex der Primaten [Gould et al., 2001], die Amygdala [Bernier et al., 2002] sowie die Substantia nigra von rodentia [Zhao et al., 2003]. Andere Studien stellen diese Ergebnisse jedoch in Frage [Kornack et al., 2001, Ehninger et al., 2003, Koketsu et al., 2003, Frielingsdorf et al., 2004].

2.1.5 Regulation adulter Neurogenese im Hippokampus

Die Regulation adulter Neurogenese im HC beruht auf der Interaktion zahlreicher Faktoren. Ansatzpunkte der regulativen Mechanismen sind stets die Prozesse der Proliferation und Differenzierung der Stamm- und Vorläuferzellen. Intrinsische, die Proliferationsrate der Vorläuferzellen bestimmende Faktoren umfassen die Aktivität zahlreicher, zellzyklusregulierender Proteine, welche entscheiden ob eine Vorläuferzelle den Zellzyklus von der G1- über die S-Phase fortsetzt oder aber in den Differenzierungsprozess eintritt. Eine neuronale Differenzierung erfordert darüber hinaus die Anwesenheit spezifischer, proneuronaler Transskriptionsfaktoren [Abrous et al., 2005]. Als extrinsische Faktoren wirken Hormone, Neurotransmittersubstanzen und -regulatoren, Wachstumsfaktoren, Morphogene und Gliazellen.

Die Exposition gegenüber einer stimulusangereicherten Umwelt (*enriched environment*, ENR) resultiert in einer signifikanten Zunahme adult generierter Neurone im DG [Kempermann et al., 1997]. Dieser Effekt beruht in C57BL/6-Mäusen auf der Steigerung der Überlebenswahrscheinlichkeit bereits postmitotischer, Calretinin⁺ Vorläuferzellen in der SGZ und nicht auf einer erhöhten Proliferation von Vorläuferzellen früherer Phasen [Kronenberg et al., 2003]. Da in Tieren des Stammes 129/SvJ außerdem die Proliferation in der Expansionsphase (Stadien 2 und 3) durch ein ENR beeinflusst wird, muss von einem signifikanten Einfluss vererbbarer Merkmale auf die spezifische Regulation adulter Neurogenese ausgegangen werden.

Der die Neurogenese steigernde Effekt eines ENR bleibt in gealterten Tieren bestehen: Relativ gesehen ist der beobachtete Induktionseffekt sogar größer als in jungen Tieren [Kempermann et al., 1998b]. In gleicher Weise führt das Erlernen einer hippokampusabhängigen Lernaufgabe zu einer Zunahme adulter Neurogenese [Leuner et al., 2004].

Physische Aktivität induziert adulte Neurogenese durch eine akute, signifikante Erhöhung der Typ-2 Vorläuferzellproliferation [van Praag et al., 1999a,b, Kronenberg et al., 2003]. Darüberhinaus tritt ein langfristiger positiver Effekt auf die Stammzellnische der SGZ auf. Die adulte Neurogenese im olfaktorischen System bleibt von physischer Aktivität unbeeinflusst [Brown et al., 2003]. Eine signifikante positive Regulation adulter Neurogenese auf der Ebene der Zellproliferation - auch außerhalb des HC - wird ferner im Zusammenhang mit pathologischen Geschehen gefunden [Arvidsson et al., 2001, Parent, 2002, Jjang et al., 2003].

Akuter Stress verringert die Anzahl adult generierter Neurone im DG sowohl in der Expansions- als auch in der Selektionsphase signifikant [Gould et al., 1992, 1993, 1994, 1998]. Hauptmediator der stressinduzierten Verringerung adulter Neurogenese ist das Hormon Glukokortikoid (Menschen und nicht-menschl. Primaten) bzw. Kortikosteron (Nagetiere). Bereits pränataler Stress hat einen negativen Einfluss auf adulte Neurogenese, kann jedoch durch postnatales *handling* abgemildert werden [Meaney et al., 1991, Kippin et al., 2004].

Eine Exposition gegenüber milden Stressoren wie das Benutzen eines Laufrades oder das Leben in einer stimulusangereicherten Umwelt steigert hingegen die Produktion neuer Zellen im HC, so daß für den Dosis-Wirkungs-Zusammenhang von Stress eine invertierte U-Kurve angenommen werden kann. Chronischer milder Stress verringert wiederum die Zahl adult generierter Neurone im DG [Alonso et al., 2004].

Der Alterungsprozess ist der effektivste negative Modulator adulter Neurogenese im HC. Stereologische Studien haben gezeigt, daß während und unmittelbar nach der Pubertät die Anzahl adult generierter Zellen am höchsten ist, um dann rapide in Form einer hyperbolischen Kurve abzunehmen [Kempermann, 2006]. Adulte Neurogenese nimmt mit zunehmendem Alter ab, ohne jedoch vollständig zu enden. Auch im Gehirn gealterter Menschen wurden neugeborene Körnerzellen im DG nachgewiesen [Eriksson et al., 1998].

Einen ebenfalls stark negativen Einfluss haben Entzündungsprozesse auf die adulte Neurogenese [Monje et al., 2003, Kempermann et al., 2003b]. Exposition der SGZ gegenüber einer ionisierenden Strahlung resultiert in einer nahezu vollständigen Ablation proliferativer Aktivität [Palmer et al., 2000, Raber et al., 2004a]. Weitere Folgen sind Entzündungen des Gewebes, welche die Stammzellnische dauerhaft erheblich schädigen und mit einer erhöhten Anzahl aktivierter Mikrogliazellen einhergehen. Ebenso beeinträchtigt sind die Vorgänge der Angiogenese.

Ein im Hinblick auf ihre funktionale Relevanz bedeutsames Ereignis ist das

Entfernen offenbar überschüssiger, neugeborener Körnerzellen im Zusammenhang mit dem Abschließen der Akquisitionsphase eines hippocampusabhängigen Verhaltenstests [Dupret et al., 2007]. Der durch den Lernprozess induzierte Apoptoseprozess korreliert eng mit der räumlichen Lernleistung der betrachteten Tiere, wobei diejenigen mit der höchsten Apoptoserate die beste Leistung erbrachten. Dies muss als direktes Argument für das Entstehen eines stabilen Kodierungsmechanismus im DG aufgefasst werden, welcher durch das Entfernen weiterer, potentiell rekrutierbarer Zellen vor einer Destabilisierung geschützt wird [Changeux et al., 1976, Rolls, 1994]. Die Blockade apoptotischer Vorgänge resultiert in signifikanten Beeinträchtigungen der spatialen Lernfähigkeit.

Betroffen sind allgemein adult generierte Körnerzellen in einem Alter von 7-9 Tagen nach ihrer Geburt. Jüngere oder ältere Granulozyten werden von der Induktion apoptotischer Prozesse nicht berührt. Eine Regulation der Überlebenswahrscheinlichkeit adult generierter Zellen findet also in Folge erfahrungsspezifischer Modifikationen der betroffenen Neurone in einer bestimmten kritischen Periode des noch undifferenzierten Entwicklungsstadiums statt. In der Tat erhalten neugeborene Zellen im DG nach der ersten Woche GABAerge Eingangssignale, welche zum Ende der zweiten Woche ihres Entwicklungsprozesses einen stärker werdenden hyperpolarisierenden Einfluss haben [Piatti et al., 2006, Ge et al., 2006]. Ferner werden die noch jungen Granulozyten zunehmend sensitiv für glutamatergen Input und es kommt zu einer massiven Ausbildung dendritischer Dornfortsätze, was die funktionale Integration manifestiert. In ihrem Reifungsprozess fortgeschrittenere und stärker in das bestehende Netzwerk eingebundene Zellen können von dem starken GABAergen Input profitieren und überleben [Piatti et al., 2006].

In einem gewissen Widerspruch zu den zuvor dargestellten Ergebnissen stehen die Daten von [Kee et al., 2007]. Diese zeigen eine präferentielle Inkorporation 2-4 Wochen alter adult generierter Körnerzellen in die an räumlichen, hippocampusabhängigen Lernvorgängen beteiligten Schaltkreise des DG. Hieraus folgt, dass auch nicht unmittelbar rekrutierte Zellen durchaus einen positiven Einfluss auf nachfolgende Lernvorgänge haben können.

2.1.6 Funktionale Relevanz adulter Neurogenese

Die überwiegende Zahl bisheriger Studien zu einer möglichen Funktion adult generierter Zellen zeigt eine positive Korrelation zwischen der Anzahl neugeborener Zellen und der Leistungsfähigkeit der jeweiligen Tiere in diversen Verhaltenstests [Leuner et al., 2006]. Dabei ist die von der Teilung bis zur terminalen Differenzierung benötigte Zeit insofern von zentraler Bedeutung, als dass sie

einen unmittelbaren Effekt in Folge eines akuten Bedarfs ausschließt. Ferner beeinflussen die für die Regulation adulter Neurogenese relevanten Faktoren auch andere Elemente und Funktionen des Gehirns wie z.B. Anzahl und Dichte der Synapsen und Beschaffenheit von Dendriten. Daher ist es stets problematisch, beobachtete Veränderungen eindeutig auf das Vorliegen adult generierter Neurone zurückzuführen.

Erste Beweise für eine direkte positive Korrelation von adulter Neurogenese und veränderter kognitiver Funktion konnten bei Kanarienvögeln geführt werden. Die Fähigkeit zum Erlernen eines komplexen Gesangs steht hier in einem engen Zusammenhang mit von dem jeweiligen Geschlecht und der jeweiligen Jahreszeit abhängigen Unterschieden hinsichtlich der Anzahl adult generierter Zellen im Nukleus HVC [Goldman et al., 1983]. Eine positive Korrelation konnte auch für Säugetiere demonstriert werden: Mäuse mit einer für den jeweiligen Stamm genotypisch bedingten, signifikant geringeren Anzahl durch adulte Neurogenese erzeugter hippocampaler Körnerzellen, zeigen für die Akquisitionsphase des MWM Tests eine signifikant geringere, spatiale Lernleistung [Kempermann et al., 2002]. In Ratten wurden verschiedene Bedingungen identifiziert, unter denen eine Reduktion adulter Neurogenese in einer verminderten Leistungsfähigkeit bei verschiedenen Lernvorgängen resultiert. Solche umfassen Stresssituationen sowie in deren Konsequenz erhöhte Kortikosteronkonzentrationen im Blutplasma der betroffenen Tiere [Mirescu et al., 2004, 2006]. In alten Ratten besteht ein enger Zusammenhang zwischen dem von den Tieren gezeigten spatialen Lernen der MWM und der Anzahl adult generierter hippocampaler Körnerzellen [Drapeau et al., 2003]. Auch unter, die adulte Neurogenese steigernden Bedingungen, wie einer stimulusangereicherten Umwelt oder erhöhter physischer Aktivität nimmt mit der Anzahl neugeborener Zellen auch die kognitive Leistungsfähigkeit zu [Kempermann et al., 1997, Tanapat et al., 1999, van Praag et al., 1999a].

Dieser scheinbar eindeutigen positiven Korrelation zwischen adulter Neurogenese und der Lernfähigkeit stehen jedoch auch gegensätzliche Befunde gegenüber. So wurde die in Mäusen beobachtete Korrelation zwischen der genotypisch determinierten Neurogeneserate und dem Verhalten der Tiere in der Akquisitionsphase der MWM bei Ratten nicht beobachtet [der Borghot et al., 2005b].

Ausgehend von der Beobachtung, dass junge Körnerzellen im DG selektiv rekrutiert werden, ist anzunehmen, dass das Stattfinden bestimmter kognitiver Vorgänge zu einem spezifischen, erhöhten Bedarf junger, in funktionaler Hinsicht hoch plastischer Neurone führt, was für den MWM Test erfolgreich demonstriert wurde [Gould et al., 1999a, Ambrogini et al., 2000, Dobrossy et al.,

2003, Leuner et al., 2004, Kee et al., 2007]. Der positive Effekt hippocampusabhängiger Verhaltenstests wie der spatialen Version der MWM und des *trace eyeblink conditioning* Tests auf die Überlebenswahrscheinlichkeit adult generierter Neurone ist selektiv, da das Erlernen anderer Tests, in welchen der HC zwar u.U. partizipiert, jedoch keine tragende Rolle spielt, nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl neuer Körnerzellen im DG führt. Beispiele sind das *delay eyeblink conditioning*, die *cue*-Version der MWM und der *active shock avoidance* Test [Gould et al., 1999a, der Borghot et al., 2005b]. Für den stimulierenden Effekt von Lernprozessen auf die adulte Neurogenese wurden jedoch auch einige gegenteilige Ergebnisse erhalten [Ambrogini et al., 2004]. Als ursächlich für diese scheinbaren Widersprüchlichkeiten können subtile Unterschiede der verwendeten Versuchsprotokolle angenommen werden.

Die Notwendigkeit verfügbarer, adult generierter Neurone für das Stattfinden hippocampusabhängiger Lernvorgänge kann durch die Anwendung interventioneller Methoden demonstriert werden. Anhand der als Konsequenz einer unterdrückten Neurogenese auftretenden funktionalen Defizite wird die entsprechende Relevanz der neuen Zellen dann deutlich. Unabhängig von der zur Suppression adulter Neurogenese verwendeten Methode sind die erhaltenen Ergebnisse jedoch sehr widersprüchlich. Eine positive Korrelation ergab sich unter Benutzung des Zytostatikums Methylaoxymethanol (*MAM*) beim Erlernen des *trace eyeblink conditioning* sowie des *fear memory* Tests: Die kognitiven Leistungen behandelter Tiere lagen signifikant unter denen der jeweiligen Kontrolltiere [Shors et al., 2001, 2002].

Aufgrund der unerwünschten Nebenwirkungen der *MAM*-Behandlung verwendeten andere Autoren eine fokussierte Bestrahlung des HC mit ionisierender Strahlung. In Folge dieser Bestrahlung zeigten sich Defizite beim Erlernen eines *conditioned avoidance* Tests, des *discriminative learnings*, dem *place recognition* Test sowie der Bildung von Langzeiterinnerungen [Madsen et al., 2003, Raber et al., 2004b, Snyder et al., 2005]. Auch für das räumliche Lernen in der *Barnes maze*, dem trockenen Pendant der MWM, wurden die Konsequenzen einer signifikant reduzierten Neurogenese offensichtlich [Rola et al., 2004]. Bedeutsamerweise resultierte weder die Suppression adulter Neurogenese durch die Applikation des Zytostatikums *MAM* noch die Ablation aller proliferativer Zellen im HC durch ionisierende Strahlung in einer Beeinträchtigung des spatialen Lernens im Rahmen des MWM Tests.

Von besonderer Bedeutung im Kontext eines spatialen Lernparadigmas wie der in der vorliegenden Arbeit verwendeten MWM ist eine aktuelle Studie, in der eine präferentielle Integration junger, adult generierter Körnerzellen in die für eine Enkodierung von spatialen Informationen benötigten Schaltkreise

demonstriert wird [Kee et al., 2007]. Demnach ist das Vorhandensein neugeborener plastischer Zellen eine wichtige Voraussetzung für einen effektiven Verlauf eines spatialen Lernprozesses.

Zusammenfassend muss also festgestellt werden, dass ein eindeutiger, kausaler Zusammenhang zwischen adulter Neurogenese und qualitativen Aspekten von Lernvorgängen noch zu beweisen ist [Leuner et al., 2006]. Insbesondere die für die Mehrheit der durchgeführten Verhaltenstests gegensätzlichen Ergebnisse werfen die Frage auf, wie diese sinnvoll begründet werden können. Da positive Korrelationen beobachtet wurden, die induktive Wirkung hippokampusabhängiger Verhaltenstests demonstriert und die Unabdingbarkeit adulter Neurogenese für einige Paradigmen bestätigt wurde, sind subtile, hinsichtlich ihrer Bedeutung im Kontext der funktionalen Relevanz neugeborener Neurone entscheidende Unterschiede in den jeweils verwendeten Versuchsaufbauten und -protokollen die wahrscheinlichste Erklärung für diese experimentellen Befunde. Eine Funktion adulter Neurogenese für kognitive Prozesse wird durch die vorliegenden Studien jedoch nicht grundsätzlich in Frage gestellt.

2.2 Der Hippokampus der Säugetiere

2.2.1 Anatomie

Der grundlegende zytoarchitektonische Aufbau und die Interkonnektivität der einzelnen hippocampalen Regionen sowohl untereinander als auch mit anderen Hirnregionen ist in allen Mammalia von großer Ähnlichkeit (Abb. 2.2). Die hippocampale Formation (HCF) ist als bilaterale Struktur in beiden Hemisphären des Gehirns ausgebildet. Die Hippokampi beider Seiten sind bei Nagetieren durch dorsale und ventrale Kommissuren miteinander verbunden, welche im Zuge des Lateralisationsprozesses bei den Primaten weitestgehend verschwunden sind.

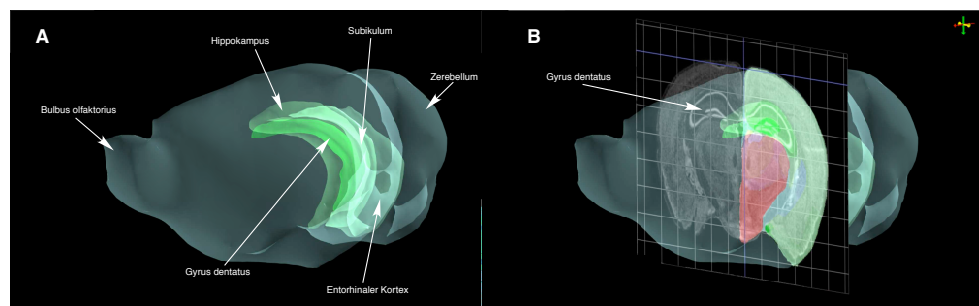


Abbildung 2.2: Die hippocampale Formation im Gehirn der Maus

Als *hippocampale Formation (HCF)* wird eine Gruppe anatomisch benachbarter, jedoch in (zyto-) architektonischer Hinsicht differenter Hirnregionen bezeichnet, zu denen neben dem eigentlichen *Hippokampus proper* auch der *Gyrus dentatus*, das *Subikulum*, das *Prä-* und *Parasubikulum* sowie der *entorhinale Kortex* gehören. (A) Der DG ist grün hervorgehoben, andere Bestandteile der HCF sind transparent dargestellt. (B) Die Querschnittsebene ist durch ein Raster dargestellt. Transparent auf dem Raster ist eine lichtmikroskopische Aufnahme der entsprechenden Region gezeigt. Der DG ist wieder grün hervorgehoben. Quelle: <http://www.brain-map.org>

Der **entorhinale Kortex** (*entorhinal cortex, EC*) stellt die einzige multilaminare Struktur der hippocampalen Formation dar (Abb. 2.3). Als Haupteffferenz hat der Tractus perforans (*perforant path*) seinen Ursprung in den Schichten II (zum DG und CA3) und III (zu CA1 und Subikulum) des EC. Von der Region CA1 und dem Subikulum kommend enden die Afferenzen des EC in den tiefen Schichten V und VI und schließen so den hippocampalen Schaltkreis.

Der **Gyrus dentatus** (*dentate gyrus, DG*) ist eine trilaminare Struktur mit charakteristischer V- oder U-Form und auf allen Ebenen entlang der septo-temporalen Achse der hippocampalen Formation gleichartig aufgebaut (Abb. 2.3). Von den drei Schichten des DG wird die superfizal, nahe der hippocampalen Fissur gelegene als Molekularzellschicht (*stratum moleculare, molecular layer*) bezeichnet. In ihr enden die vom EC kommenden Fasern des tractus

perforans. Das stratum moleculare enthält nahezu keine Zellsomata und wird hauptsächlich von den Dendriten der Granulozyten (s.u.) aus der unterhalb der Molekularzellschicht liegenden Körnerzellschicht (*stratum granulare, granule cell layer*) eingenommen. Das stratum granulare ist bereits lichtmikroskopisch als bandartige Region dicht beieinander liegender Zellsomata zu erkennen und enthält den Hauptzelltyp des DG, die Granulozyten (*Körnerzellen*). Die Körnerzellen liegen in hoher Packungsdichte und ohne interkalierende Gliazellen vor. In der als Hilus bezeichneten *lamina multiformis* (*polymorphic layer*) verlaufen die nach CA3 ziehenden Axone der Körnerzellen (*Moosfasern*), sowie die Dendriten einiger Interneurone.

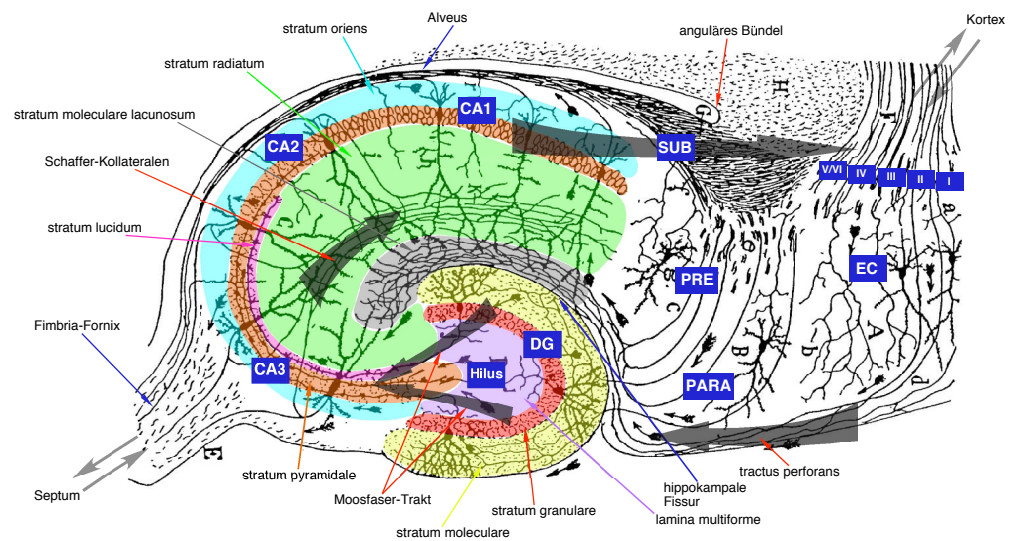


Abbildung 2.3: Struktureller Aufbau der HCF

Der primäre Informationsfluss ist durch große schwarzen Pfeile repräsentiert. Bezeichnungen für Untereinheiten der HCF, sowie des EC sind blau unterlegt. PARA=Parasubikulum, SUB=Subikulum, PRE=Präsubikulum. Modifiziert nach Lorente de No, 1901.

Der **Hippokampus proper (HC)** der Säugetiere ist eine längliche, gebogene Struktur, welche sich C-förmig von der Mittellinie des Gehirns nahe der Septum Kerne rostradorsal über den bzw. hinter dem Thalamus bis in die caudoventralen Bereiche des Temporallappens erstreckt (Abb. 2.3). Entlang seiner tangentialen Achse besteht der HC aus drei zytoarchitektonisch eindeutig voneinander abgrenzbaren Regionen: *CA3*, *CA2* und *CA1* [No, 1934].

Das **Subikulum** stellt eine der beiden Hauptquellen für die Efferenzen der HCF dar [Swanson et al., 1975, Kloosterman et al., 2003]. Daher kann das Subikulum als letzte einer Reihe von Relaisstationen des hippocampalen Schaltkreises angesehen werden. Von hier gelangt die bereits im DG und HC prozessierte Information zu einer Reihe kortikaler und subkortikaler Areale [Verwer et al., 1997].

2.2.2 Konnektivität

Sowohl über den benachbarten Parahippokampus als auch den EC, welcher als Verbindungsmodul zwischen dem multilaminar aufgebauten Kortex und den trilaminaren Strukturen des DG und des HC dient, erhält der HC Eingänge von nahezu allen Assoziationsarealen des Kortex. Auf diese Weise sind im HC hoch integrierte, multimodale Informationen verfügbar, die in einer Vielzahl z.T. untereinander verbundener sensorischer Schaltkreise eine umfangreiche Präprozessierung erfahren haben. Weitere Afferenzen erreichen den HC von der Amygdala und verschiedenen regulatorischen Systemen wie dem cholinergen (ACh) System. Komplementär zu der massiv konvergenten Struktur der hippocampalen Afferenzen existiert ein stark divergentes System von Efferenzen, das über den EC zurück zu denjenigen kortikalen Arealen projiziert, welche auch den Ursprungsort der Afferenzen darstellen.

Auch wenn das moderne Bild des internen und externen Informationsflusses z.T. erheblich differenzierter erscheint, erfolgt die Informationsverarbeitung im HC weitestgehend seriell in einem unidirektionalen, trisynaptischen Schaltkreis [Andersen et al., 1971]. Die multimodalen Inhalte gelangen aus den kortikalen Bereichen über den EC zum DG (erste Synapse), von dort über den Moosfasertrakt zu CA3 (zweite Synapse) und weiter zu CA1 (dritte Synapse). Aus der superfizialen Schicht (II) des EC erreichen die Informationen über den glutamatergen tractus perforans den DG, wo die Axone auf den distalen Dendritenabschnitten der Körnerzellen enden. Einige Axone des Tractus perforans formen auch Synapsen auf den apikalen Dendriten der CA3 Pyramidenzellen. Eine weitere kleine Gruppe von Fasern zieht vom EC (Schicht III) direkt zu CA1.

Die Axone der glutamatergen Körnerzellen ziehen als nicht-myelinisierte Fa-

sern des Moosfasertraktes zur Region CA3 des HC, wo sie auf den proximalen Dendriten der CA3 Pyramidenzellen terminieren. Dabei kommt es zur Formung besonderer präsynaptischer *en passant* Terminationen (= *Boutons*), welche mit den für die CA3 Pyramidenzellen typischen Dornfortsätzen auf den stark verzweigten proximalen Dendriten eingegangen werden. Auf diese Weise kann eine einzelne Moosfaser mehr als 35 synaptische Kontakte mit einem einzelnen Dendriten einer CA3 Pyramidenzelle eingehen, was die Effizienz der synaptischen Transmission erheblich erhöht.

Jede Pyramidenzelle der Region CA3 unterhält synaptische Verbindungen mit maximal 50 Axonen des Moosfasertraktes. Im Gegensatz dazu erhalten die CA3 Pyramidenzellen ungleich mehr (4×10^3), jedoch zugleich schwache synaptische Eingänge aus dem EC direkt über den tractus perforans. Der weitaus größte Teil der Synapsen auf den Pyramidenzellendendriten in CA3 entfällt jedoch auf rekurrente Axonkollaterale anderer CA3 Pyramidenzellen. Diese Axonkollaterale durchziehen die Region CA3 in der vollen Ausdehnung des HC und erzeugen so ein einziges zusammenhängendes, exzitatorisches Netzwerk. Das verbreitete Auftreten rekurrenter Verbindungen erlaubt einer einzelnen CA3 Pyramidenzelle Informationen zu jeder ihrer Geschwisterzellen über nur 2-3 synaptische Zwischenschritte zu übertragen. Verbindungen zu Mitgliedern der heterogenen Gruppe zumeist inhibitorischer Interneurone treten nur in geringem Maße auf.

Pyramidenzellen in CA3 entsenden ferner Axone in den Fimbria-Fornix, welcher die HCF verlässt und das murine Äquivalent des orbitofrontalen Kortex (OFC) im basalen Vorderhirn sowie verschiedene Kerne des Hirnstamms erreicht. Diese subkortikalen Verbindungen dienen der allgemeinen Regulation neuronaler Aktivität im HC und übertragen keine für eine Prozessierung bestimmte, spezifische Information. Abzweigungen derselben Axone ziehen ihrerseits als Schaffer-Kollaterale zu den Pyramidenzellen der Region CA1 und vollenden damit einen weiteren Schritt des trisynaptischen Schaltkreises.

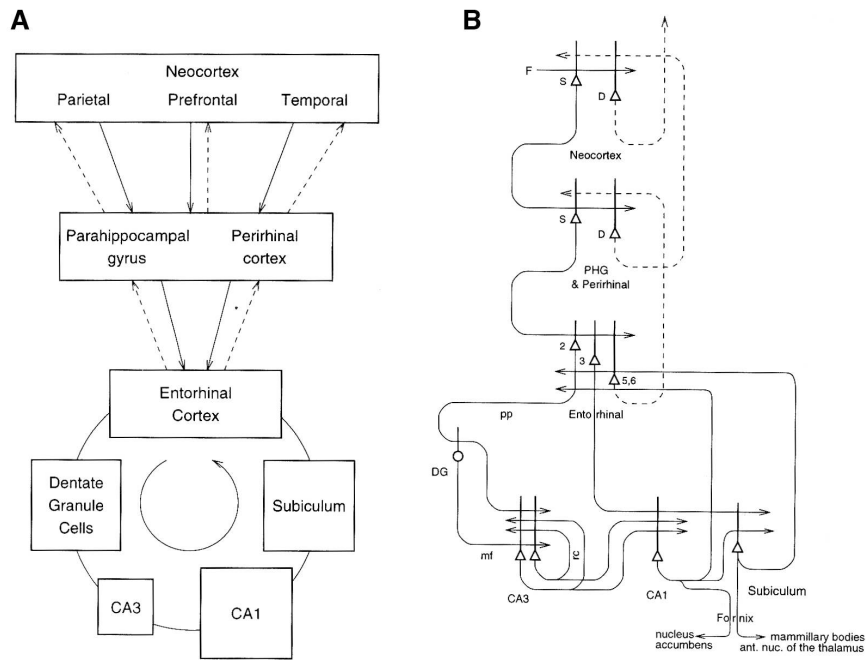


Abbildung 2.4: **Extrinsische und intrinsische Konnektivität**

(A) Blockdiagramm der beteiligten Strukturen und ihrer Verbindungen. (B) Detaillierte Darstellung der beteiligten exzitatorischen Neurone und ihrer jeweiligen synaptischen Verbindungen. Durchgezogene Linien repräsentieren Efferenzen des Assoziationskortex, gestrichelte Linien die Afferenzen. In Richtung des CA3 Netzwerkes findet eine starke Konvergenz statt, der eine Divergenz vergleichbarer Größenordnung in den Rückprojektionen zum Kortex entspricht. (aus [Rolls, 1994])

Die Anzahl der Pyramidenzellen ist im EC und DG deutlich größer als in CA3, welches somit für die zu verarbeitenden Informationen einen Engpass (*bottleneck*) darstellt, um im Anschluss erneut auf das CA1 Netzwerk zu expandieren. Von dort gelangt die Information sowohl über das Subikulum als auch auf direktem Wege zurück zum EC, womit ein geschlossener und (vereinfachend) unidirektionaler hippocampaler Schaltkreis realisiert ist (Abb. 2.4)[Amaral et al., 1989].

Das Fimbria-Fornix-System verbindet den HC mit dem basalen Vorderhirn und geht aus dem Alveus hervor. Zahlreiche Fasern des Alveus haben ihren Ursprung in den Pyramidalzellen von Hippokampus oder Subikulum und terminieren in subkortikalen Regionen [Meibach et al., 1975].

2.2.3 Hippokampale Neurophysiologie des Verhaltens

Ein Typ von Zellen der HCF ist aufgrund der spezifischen Natur ihres jeweiligen Verhaltenskorrelats besonders hervorzuheben: die sog. *place cells* im HC.

Die *place cells* kodieren nach der klassischen Vorstellung die aktuelle Position des Tieres im Raum relativ zu entfernten, meist visuellen Landmarken (*place field*) [O'Keefe et al., 1971, O'Keefe, 1976]. Die Lokalisation der *place fields* hängt zudem von dem unmittelbar zuvor gezeigten Verhalten des Tieres ab. Informationen über Translationsbewegungen in bestimmte Richtungen finden sich in den *grid cells*. Zusammen liefern die genannten Zelltypen hinreichend Informationen, um als Kartierungssystem die Umgebung, sowie die Position des Tieres relativ zu den konstituierenden Elementen dieser Umgebung zu erfassen. Es ermöglicht dem Organismus sich flexibel auf jedem möglichen Weg zwischen verschiedenen Punkten seiner Umwelt zu bewegen.

Veränderungen der Effektivität von Übertragungsvorgängen an synaptischen Verbindungen zwischen Neuronen bilden die morphologische und physiologische Grundlage von Lernvorgängen im Gehirn. Diese synaptische Plastizität tritt in verschiedenen Formen auf, von denen die Langzeitpotenzierung (LTP) die bekannteste darstellt [Lomo, 2003]. Sie wurde erstmals an den Synapsen der Schaffer-kollateralen in Region CA1 von Ratten entdeckt. Bei der LTP wird die Effektivität der synaptischen Transmission dauerhaft erhöht. Zugrunde liegt der LTP das Zusammenwirken von AMPA- und NMDA-Glutamatrezeptoren in Folge einer hochfrequenten, wiederholten Depolarisation zugrunde. Der resultierende Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die postsynaptischen Neurone bewirkt über diverse Kinasen eine erhöhte Expression von AMPA- und Kainat-Rezeptormolekülen sowie eine verbesserte Leitfähigkeit bestehender AMPA-Rezeptoren durch Phosphorylierung. Der direkte Zusammenhang von Lernvorgängen und LTP wurde inzwischen experimentell verifiziert [Whitlock et al., 2006].

2.2.4 Funktion des Hippokampus

Cognitive map theory

Die einflussreichste Theorie hippokampaler Funktion hat ihren Ursprung in der Entdeckung der *place cells* bei Ratten [Scoville et al., 1957, O'Keefe et al., 1971, O'Keefe, 1976, O'Keefe et al., 1978]. Im Rahmen der *cognitive map theory* fungiert die HCF als Lokalisierungssystem, welches die Enkodierung und Repräsentation wahrgenommener Stimuli in einem allozentrischen, räumlichen Grundgerüst realisiert [Tolman, 1948]. Im Zuge der Exploration der Umwelt werden die räumlichen Koordinaten von Landmarken sowie ihre relative Lage zueinander in diese kognitive Karte integriert. Neben der durch die *place cells* gelieferten Ortsinformationen sind auch die Orientierungsrichtung (*HD cells*) und der Abstand des Tieres zu den jeweiligen Grenzen der Versuchs-Umgebung

bei diesem Prozess von Bedeutung [O'Keefe et al., 1996].

Die allozentrische kognitive Repräsentation des Raumes dient der räumlichen Navigation eines Organismus in seiner Umwelt. Den verschiedenen Komponenten der HCF kommen dabei unterschiedliche Aufgaben bei der hierzu erforderlichen Informationsverarbeitung zu, wobei die spezifische Anatomie des Allokortex für die Prozessierung geometrischer Informationen und Probleme als besonders geeignet angesehen wird [Douglas et al., 2004]. Aus evolutiver Sicht stellt das hippocampale Lokalisierungssystem nur eines einer Reihe von Gedächtnisformen dar, welches neben seinen spezifischen anatomischen Substraten auch auf distinkten Lerngesetzen beruht [Nadel, 1991]. Andere Formen von Lernen und Gedächtnis stellen nach der *cognitive map* Theorie z.B. rein assoziative Mechanismen und das Lösen einfacher, geometrischer Probleme mit Hilfe sog. Taxon-Strategien dar. Solche Formen des Lernens sind explizit nicht hippocampusabhängig und beruhen auf dem Erlernen einfacher Assoziationen (Amygdala). Diese können in diversen Test-Paradigmen zur Erfassung räumlichen Lernens parallel zu einer allozentrischen kognitiven Karte erfordernden Navigationsstrategien auftreten.

Alle im Laufe der Zeit akquirierten kognitiven Karten verbleiben nach der *cognitive map* Theorie im HC und werden dort dauerhaft gespeichert. Dennoch wird eine Interaktion dieser Informationen mit anderen extrahippokampalen Hirnarealen angenommen, ebenso wie die Möglichkeit intrahippokampaler Konsolidierungsmechanismen [Moscovitch et al., 2005].

Auch wenn die Rolle der hippocampalen Formation für das räumliche Gedächtnis - besonders bei Nagetieren - allgemein akzeptiert ist, können in ihrem Rahmen zahlreiche experimentelle Befunde nicht sinnvoll interpretiert werden. Eine klare Abgrenzung gegen rein assoziative Formen des Lernens ist schwierig [Biegler et al., 1999, Chamizo, 2003].

Declarative memory Theorie

Das Konzept des deklarativen Gedächtnisses (*declarative memory theory*) entstammt einem stark klinisch geprägten Kontext [Cohen et al., 1980, Squire et al., 1984, Squire, 1992, 1993, 2004]. Nach dieser Vorstellung besteht die zentrale Funktion der HCF in der Prozessierung spezifischer Gedächtnisinhalte, welche allgemein unter dem Begriff des deklarativen Gedächtnisses zusammengefasst werden. Dieses umfasst das semantisch organisierte, propositionale Faktenwissen sowie das episodische Gedächtnis. Es ist somit als explizites Gedächtnis dem prozeduralen (impliziten) Gedächtnis diametral gegenübergestellt. Die Theorie des deklarativen Gedächtnisses sieht im HC nur einen Teil des Medio-Temporal-Lappen Systems (MTL), welches als Einheit die Verarbei-

tung deklarativer Gedächtnisinhalte übernimmt. Im Gehirn wird die Existenz multipler, spezialisierter Gedächtnissysteme angenommen. Die Partizipation der HCF in diesem Prozess der Gedächtnisbildung ist zeitlich begrenzt. Nach dem stark hippocampusabhängigen Erlernen neuer Inhalte findet ein kontinuierlicher Konsolidierungsprozess statt, in dessen Verlauf die Gedächtnisinformation zunehmend hippocampusunabhängig werden. Als Langzeitspeicher wird der Kortex betrachtet.

Ein zentraler Unterschied der *declarative memory* Theorie zu derjenigen einer kognitiven Karte besteht in der generalistischen Perspektive, welche den Raum als besonderen Fall relationaler Beziehungen von Objekten versteht, gegenüber der kantianischen Auffassung des Raumes als eigenständige, von der Existenz jeglicher Sinneswahrnehmungen unabhängiger (a priori) Entität.

Neben diesen beiden beschriebenen Auffassungen, sind im Laufe der Zeit verschiedene weitere Theorien zur hippocampalen Funktion formuliert worden. Ihnen ist gemeinsam, dass sie eine Beteiligung des HC besonders bei der Lösung von solchen Problemen postulieren, bei denen die Bedeutung eines Stimulus von seinem jeweiligen Kontext abhängig ist (*predictable ambiguity*, XOR-Problem). Jede dieser modernen, alternativen Vorstellungen geht davon aus, dass der HC ein konfigurales, relationales oder kontextuales Gedächtnis implementiert.

2.2.5 Ein theoretisches Modell zur funktionalen Relevanz adulter Neurogenese im Hippokampus

Das Problem der katastrophalen Interferenz in neuronalen Netzwerken

Physiologische neuronale Netzwerke bestehen aus zahlreichen einfachen Elementen (Neurone), welche untereinander synaptisch verbunden sind [Hertz, 1991]. Jedes Neuron integriert die Eingangssignale von anderen Neuronen, verarbeitet sie nach einfachen stereotypen Gesetzmäßigkeiten und sendet das Ergebnis dieser Operationen zu anderen Neuronen mit denen es verbunden ist. Die Verarbeitung von Informationen erfolgt in neuronalen Netzwerken verteilt, d.h. an jeder Operation ist immer eine große Anzahl von Neuronen und Verbindungen zwischen diesen Elementen beteiligt. Den synaptischen Verbindungen zwischen den Elementen eines neuronalen Netzwerkes wird jeweils eine spezifische Gewichtung zugeordnet. Diese bestimmt den Grad in welchem ein gegebenes Neuron auf die Aktivierung eines anderen Einfluss nehmen kann. Die synaptischen Gewichte werden im Verlauf eines Lernprozesses gezielt so verändert, dass durch das Zusammenwirken vieler Neurone und ihrer synaptischen Verbindungen die für das jeweils betrachtete neuronale Netzwerk charakteristische Operation effektiv durchgeführt wird.

Es existieren verschiedene grundsätzliche Arten neuronaler Netzwerke, welche sich hinsichtlich der Konnektivität ihrer Elemente und der Art der von ihnen durchgeführten Operationen unterscheiden: Vorwärtsgerichtete-Netzwerke (*Feedforward*) bestehen aus spezifischen Eingangsneuronen (*input layer*), einer Zwischenschicht (*hidden layer*) und einer Ausgabeschicht (*output layer*). Der Informationsfluss ist unidirektional und ausgehend von einem Eingangssignal wird ein spezifisches Ausgangssignal erzeugt. Da zu jedem Eingangssignal ein gewünschtes Ausgangssignal existiert, erfolgt das Training einfach durch das Minimieren der Differenz dieser beiden Aktivitätsmuster. *Hopfield-Netzwerke* zeichnen sich durch eine stark rekurrente Konnektivität aus, d.h. nahezu alle Neurone des Netzwerkes sind untereinander synaptisch verbunden und können sich gegenseitig beeinflussen. Nach einer gewissen Trainingszeit stabilisiert sich die Aktivität aller Elemente eines solchen Netzwerkes. Die verschiedenen stabilen Aktivitätsmuster eines Hopfield-Netzes korrespondieren mit verschiedenen Konfigurationen von Eingangssignalen, so dass verschiedene Informationen gespeichert und wieder abgerufen werden können.

Die Autoassoziationsfähigkeit ist eine herausragende Eigenschaft rekurrenter neuronaler Netze: Dient ein korrumpiertes, unvollständiges Aktivitätsmuster als Eingangssignal, stabilisiert sich die Aktivität des Netzwerkes in einer Weise, die dem vollständigen, korrekten Eingangsmuster entspricht. Darüberhinaus

sind Hopfield-Netzwerke zur Generalisierung gespeicherter Informationsinhalte fähig. Die Region CA3 des HC stellt ein gutes biologisches Beispiel eines solchen massiv rekurrenten neuronalen Netzes dar [Rolls, 1994].

Aufgrund der verteilten Verarbeitung von Informationen in neuronalen Netzwerken erfordert jeder Lernprozess die Modifikation aller synaptischer Gewichte des Netzwerks. Müssen mehrere verschiedene Eingangsmuster erlernt werden, ergibt sich das Problem einer Wechselwirkung: Sind die synaptischen Gewichtungen für ein Eingangssignal a optimiert, führt das Erlernen eines neuen Musters b zur Degeneration der soeben für a gefundenen Optimierungen. Kommt noch ein weiteres zu erlernendes Muster c hinzu, degradieren die synaptischen Gewichtungen für a noch weiter, so dass nach einer gewissen Zeit das mit a korrespondierende Aktivitätsmuster nicht mehr verfügbar ist. Dieses Problem wird als *katastrophale Interferenz* bezeichnet [Wiskott et al., 2006].

Für vorwärtsgerichtete Netzwerke kann dieses Problem durch ein verschachteltes (*interleaved*) Training gelöst werden. Alle Eingangsmuster a, b und c werden abwechselnd präsentiert (z.B. abcabcabc...) und ermöglichen somit ein effektiv gleichzeitiges Lernen aller Eingangsmuster. Hopfield-Netze wie CA3 benötigen für die effektive Verarbeitung multipler Eingangsmuster eine orthogonale Repräsentation der zu speichernden Informationen, welche dann ohne zu interferieren nebeneinander abgelegt werden können. Eine mögliche Strategie alle Eingangsinformationen zu orthogonalisieren ist die Verwendung einer schwach besetzten (*sparse*) Kodierung, bei der zu einem gegebenen Zeitpunkt nur sehr wenige Elemente eines Netzwerkes gleichzeitig aktiv sind [Bentz, 1989]. Mit einer steigenden Anzahl zu lernender Muster erhöht sich jedoch auch hier der Bedarf an für eine orthogonale Repräsentation verfügbaren Neuronen. Eine Kompression der Eingangsinformationen durch Eliminierung nicht-relevanter Dimensionen ist hier ein gangbarer, wenngleich limitierter Weg zur Lösung des Kapazitätsproblems.

Ein allgemeines theoretisches Modell hippocampaler Funktion

Das dieser Arbeit zugrunde liegende theoretische Modell hippocampaler Funktion basiert auf dem Standardmodell von Rolls und Treves [Rolls, 1994]. Im Rahmen dieses Modells dient der HC gemäß der Theorie eines deklarativen Gedächtnisses als temporärer Zwischenspeicher für Informationen, da generalisierendes Lernen anhand von Beispielen die Verfügbarkeit zuvor perzipierter Inhalte für einen gewissen Zeitraum nach dem Auftreten der jeweiligen Stimuli erfordert.

Ein verschachteltes Training hippocampaler Netzwerke wie oben beschrieben ist aufgrund der nicht gegebenen beliebigen Verfügbarkeit aller Stimuli unmög-

lich. Der HC stellt hinsichtlich des Informationsflusses eine *bottleneck*-Struktur dar, in der eine Vielzahl von Afferenzen konvergieren und von wo ebenso zahlreiche Efferenzen divergieren. Als Verbindung mit den kortikalen Assoziationsarealen als Ursprungsort integrierter, multimodaler Inhalte fungiert der EC. Der Region CA3 wird aufgrund ihrer hoch rekurrenten Verbindungen die Rolle als intrahippokampaler Speicherort für die verarbeiteten Informationen zugewiesen. Das Auftreten überwiegend rekurrenter Verbindungen zwischen den CA3 Pyramidenzellen ist charakteristisch für Hopfield-Netzwerke, in welchen Inhalte verteilt, d.h. unter Beteiligung aller Synapsen, repräsentiert werden. Die Informationsspeicherung erfolgt sehr schnell innerhalb einer Periode des Theta-Rhythmus.

Aus den dargestellten Eigenschaften eines Hopfield-Netzes ergibt sich eine begrenzte Kapazität des autoassoziativen CA3-Netzwerkes. Unter Berücksichtigung dieser limitierten Kapazität und aufgrund der Risiken einer katastrophalen Interferenz (s.o.), ist eine entsprechende Aufbereitung der für eine Speicherung vorgesehenen Informationen obligat. Als Enkodierungsinstanz in Form eines kompetitiven Netzwerkes tritt im Rahmen des hier relevanten Modells der DG auf, in dem neben einer effektiven Redundanzkompression auch die Erzeugung eines schwach besetzten Codes stattfindet [Rolls, 1994]. Beide Prozesse erhöhen die Kapazität und Reliabilität einer Informationsspeicherung in CA3 signifikant.

In unterschiedlichen Umgebungen können die den DG erreichenden Aktivitätsmuster unterschiedliche statistische Eigenschaften aufweisen. Von der Statistik der zu verarbeitenden Informationen hängt wiederum die Beschaffenheit eines hierfür geeigneten Enkodiermechanismus ab, so dass sich ein solcher an Veränderungen der statistischen Eigenschaften der perzipierten Umwelt im Sinne einer maximalen Variabilität der resultierenden Repräsentation anpassen muss (s.u.). Eine solche Anpassung erfordert die Möglichkeit plastischer Modifikationen der an dem Enkodiermechanismus beteiligten synaptischen Gewichte des Netzwerkes. Die Plastizität der jungen, adult generierten Körnerzellen des DG stellt mithin die grundlegende Voraussetzung für eine effektive Speicherung von Informationen im Kontext veränderlicher Umgebungen dar. Treves und Rolls postulieren ferner die Möglichkeit dauerhafterer, synaptischer Modifikationen im DG, welche die Etablierung spezifischer Codes für redundant auftretende Stimulus-Konfigurationen darstellen [Rolls, 1994].

Als weitere wichtige Voraussetzung eines erfolgreichen Speichervorgangs erlaubt die besondere Beschaffenheit und Physiologie der Synapsen des aus den Körnerzellen des DG entspringenden Moosfasertraktes auf den somatanahen Dendriten der CA3 Pyramidenzellen eine starke Dominanz über die CA3-

internen Aktivitätsdynamik. Auf diese Weise kann die Aktivität des rekurrenten CA3-Netzwerk reliabel für verschiedene Inhalte stabilisiert werden, auch wenn die synaptischen Verbindungen bereits für bereits gespeicherte Informationen optimiert sind. CA1 und das Subikulum arbeiten als Dekodierungsnetzwerke für die in CA3 gespeicherten Informationen, über welche diese zu kortikalen Regionen zurückgelangen. Alle Elemente dieses theoretischen Modells werden von elektrophysiologischen Befunden gestützt [O'Reilly et al., 1994].

Das Modell von Wiskott et al.

Eine mögliche funktionale Beteiligung adult generierter Körnerzellen im DG an der effizienten Enkodierung von Informationen im Kontext veränderlicher Stimuluskonfigurationen ist Gegenstand eines einfachen Modells von [Wiskott et al., 2006]. Eine optimale Enkodierung von für eine Speicherung in CA3 bestimmten Inhalten muss stets unter Berücksichtigung der größten möglichen Variabilität der jeweiligen Daten erfolgen. Die statistischen Eigenschaften dieser Umgebung bestimmen also den optimalen Enkodierungsmechanismus des DG, was sich in Form spezifischer, synaptischer Gewichtungen manifestiert.

Treten nun in einer veränderlichen Umgebung signifikante Veränderungen in der Konfiguration der die Umwelt konstituierenden Stimuli auf oder wird der Organismus mit einer neuen, ihm unbekanntem Umwelt konfrontiert, verändern sich auch die statistischen Eigenschaften der den Hippokampus erreichenden Aktivitätsmuster [Wiskott et al., 2006]. Dies wiederum erfordert eine Anpassung des Enkodierungsmechanismus, um auch in der veränderten Umgebung eine effiziente und reliable Speicherung in CA3 zu ermöglichen. Als Folge einer solchen Rekonfiguration der Enkodiermechanismen des DG kommt es zu einer Verminderung der Reliabilität des Abrufens zuvor gespeicherter Inhalte. Nach längerer Exposition gegenüber einer neuartigen, nicht zu einem bestimmten Satz von in CA3 abgelegten Inhalten gehörigen Umgebung können eben jene bereits zuvor gespeicherten Informationen nicht mehr sinnvoll abgerufen werden; der adäquate Enkodiermechanismus ist nicht mehr vorhanden und es kommt zu einer katastrophalen Interferenz. Das Hinzufügen weniger neuer Neurone im DG durch adulte Neurogenese ermöglicht die effiziente Lösung dieses Problems. Indem das bestehende Enkodiernetzwerk erweitert wird anstatt die synaptischen Verbindungen für jede neue Umgebung zu rekonfigurieren, können die zuvor etablierten Codes weitestgehend erhalten bleiben.

Aufgrund ihrer hohen Plastizität repräsentieren neugeborene Körnerzellen die neuartigen Aspekte einer noch unbekanntem oder veränderten Umgebung. Diese Vorstellung wird auch von physiologischen Daten gestützt: Die Anzahl adult generierter Neurone ist in frühen Phasen des Lebens am höchsten, al-

so genau dann, wenn der Gehalt neuartiger Informationen aus der perzipierten Umwelt in Ermangelung früherer Erfahrungen auch ein Maximum aufweist. Im weiteren Verlauf des Lebens nimmt die Neurogeneserate rapide ab ohne jedoch gänzlich zu enden. Analog dazu sinkt auch der Gehalt neuartiger Stimuluskonfigurationen der Umgebung mit der zunehmenden Lebenserfahrung. Daher ist anzunehmen, dass zur Kodierung eines durchschnittlich geringen Aufkommens neuartiger Informationen in der Zeit nach der ersten Lebensphase eine ebenfalls geringe Zahl adult generierter Neurone ausreicht.

Das von Wiskott et al. vorgeschlagene theoretische Modell macht einige vereinfachende Annahmen, jedoch sind alle im Kontext adulter Neurogenese relevanten Elemente enthalten. Da z.B. die zwecks Vermeidung einer katastrophalen Interferenz von [French, 1991] vorgeschlagen Erzeugung eines schwach besetzten Kodes als komplementärer Ansatz zu dem Hinzufügen plastischer, neugeborener Neurone aufgefasst wird, wird sie in dem Modell nicht berücksichtigt. Ferner wird die Dynamik der rekurrenten Verbindungen in CA3 nicht explizit modelliert, es wird von einer idealen, verlustfreien Speicherung ausgegangen. Ewige Fehler beruhen also ausschliesslich auf dem Kompressions- und Enkodierungs-/Dekodierungsprozess im DG. Strukturell entspricht das Modell einem einfachen Autoenkodiernetzwerk. Es besteht aus einer Schicht Eingangsneurone, einer Zwischenschicht und einer Ausgangsschicht. Das Modell sowie die jeweils repräsentierten anatomischen Pendanten sind in Abb. 2.5 dargestellt.

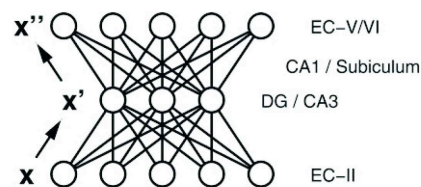


Abbildung 2.5: **Ein Modell zur funktionalen Relevanz adulter Neurogenese**

Das Modell ist als einfaches lineares Kodiernetzwerk konzipiert. Eingangsschicht und Ausgangsschicht repräsentieren jeweils die Schichten II bzw. V/VI des EC, die Zwischenschicht den DG bzw. die Region CA3 (retrieval Situation). CA1 und das Subikulum sind nicht explizit repräsentiert, jedoch in den Verbindungen der Eingangsschicht mit der Ausgangsschicht enthalten. Für die Simulationen enthalten Ein- und Ausgangsschicht jeweils 60, die Zwischenschicht 15 (+5 durch Neurogenese) Neurone. Aus [Wiskott et al., 2006].

Aufgrund seiner konzeptionellen Simplität erlaubt das vorgeschlagene Modell eine genaue Analyse quantitativer und qualitativer Aspekte des Lernvorgangs. Zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit werden drei Fehlergrößen be-

trachtet, welche einen unmittelbaren Bezug zu analogen Situationen im lebenden Organismus haben und geeignete Ansatzpunkte für eine experimentelle Überprüfung liefern. Der *recoding error* beschreibt den bei einem vollständigen Kodierungs-Dekodierungszyklus auftretenden Fehler. Physiologisch entspricht dies dem Unterschied zwischen den zunächst in der Schicht II des EC vorliegenden Aktivitätsmustern und denen in den Schichten V und VI des EC nach dem sie im Hippokampus nacheinander kodiert, gespeichert und dekodiert wurden. Der recoding error kann für verschiedene Umgebungen A und B angegeben werden. Eine andere Situation liegt vor, wenn sich der Organismus von Umgebung A nach B bewegt, an B adaptiert und nun ein bereits in CA3 gespeichertes, der Umgebung A zugeordnetes Aktivitätsmuster aufgrund eines Teilelements als Hinweis abgerufen wird. Die Abweichung der so nach Abrufen zuvor in CA3 gespeicherter Inhalte erzeugten Aktivitätsmuster von den ursprünglich zur Speicherung verwendeten Eingangsmuster wird durch den *retrieval error A* repräsentiert. Ist er groß, können vormals erlernte Informationen nicht effizient abgerufen und genutzt werden.

Grundsätzlich werden bei der Modellierung des Lernprozesses hinsichtlich der Stattfindens adulter Neurogenese drei verschiedene Situationen betrachtet. Im ersten Fall findet nach einer kurzen plastischen Anfangsphase grundsätzlich keine Adaptation im DG mehr statt. Der zweite Fall beschreibt die Situation bei Stattfinden adulter Neurogenese, d.h. es werden die jeweils beim Wechsel in eine neue Umgebung benötigten neuen Neurone hinzugefügt. Für Inhalte einer solchen noch unbekanntes Umgebung benötigte Modifikationen des Enkodiermechanismus werden ausschließlich die neuen, plastischen Zellen verwendet. Im letzten Fall erfolgt stets eine vollständige Anpassung der synaptischen Gewichte im DG an die jeweilige Umgebung ohne das Stattfinden adulter Neurogenese.

Der theoretische Organismus befindet sich zunächst in einer Umwelt A, wechselt dann in einer Umgebung B und kehrt am Ende nach A zurück. Alle Ergebnisse der mit dem beschriebenen Modell durchgeführten Berechnungen sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst dargestellt.

	<i>No DG-adaptation</i>	<i>Neurogenesis</i>	<i>Full adaptation</i>
Network adapted to environment A			
Recoding error A	0.30	0.33	0.30
Recoding error B	0.67	0.75	0.67
Network adapted to environment B			
Recoding error B	0.44	0.36	0.30
Retrieval error A	0.61	0.45	1.69
Recoding error A	0.61	0.41	0.67

Tabelle 2.1: **Ergebnisse der Modellrechnungen (nach Wiskott et al.)**

Es überrascht nicht, daß zunächst für alle Szenarien ein vergleichbarer, kleiner recoding error für Stimuli der Umgebung A gefunden wird, da zu Beginn der Modellierung (unter der Voraussetzung eines naiven Netzwerkes) in jedem Fall eine neuronale Plastizität vorliegt, um eine vollständige Adaptation der En- und Dekodiermechanismen für A zu gewährleisten. Aufgrund einer fehlenden Exposition der modellierten Organismen gegenüber der Umgebung B resultiert logischerweise ein hoher recoding error B.

Differenzierter sind die Ergebnisse nach einem Wechsel nach B. Das Netzwerk ohne Adaptationsmöglichkeit an die neue Umwelt weist einen durchschnittlichen, jedoch auffallend niedrigen Rekodierungsfehler B auf. Begründet ist dies in einer theoretisch möglichen Anpassung des Dekodierungsnetzwerkes in CA1, was z.T. durch physiologische Daten gestützt wird. Das Erinnern aus A stammender Inhalte, sowie die En-/Dekodierung unmittelbar nach einer Rückkehr zu Umgebung A resultiert unter der Bedingung einer fehlenden Adaptation des DG in einem recht hohen Fehler (retrieval error A und encoding error A). Für die zuletzt genannten Operationen zeigt das maximal anpassungsfähige Netzwerk eindeutig die geringste Leistungsfähigkeit, wohingegen das Hinzufügen neuer, plastischer Zellen durch adulte Neurogenese zu den niedrigsten Fehlerwerten führt. Dies gilt insbesondere für einen Wechsel von B zurück nach A.

Zusammengefasst führt das Hinzufügen neuer Neurone durch adulte Neurogenese also besonders in solchen Fällen zu einer Verbesserung der Reliabilität von En- und Dekodierung sowie dem Erinnern zuvor gespeicherter Inhalte, wenn Stimuluskonfigurationen aus verschiedenen Umgebungen sequentiell erlernt und abgerufen werden müssen. Anforderungen dieser Art entsprechen in guter Weise den Gegebenheiten unter naturalistischen Bedingungen.

Eine weitere Stärke des Wiskott'schen Modells ist, dass es in zahlreichen Punkten durch anatomische und physiologische Daten gestützt wird. Dies gilt für die Grundhypothese einer signifikant höheren Plastizität adult generierter

Körnerzellen gegenüber ihren reiferen Geschwistern, den akkumulativen Effekt adulter Neurogenese über die Lebensspanne, die hohe synaptische Plastizität in CA1 als putatives Dekodiernetzwerk und die akute, selektive Rekrutierung junger Neurone aus dem Vorläuferzellenpool bei gleichzeitiger Apoptose der nichtbenötigten Zellen.

Aus den dargestellten Ergebnissen des Modells lassen sich unmittelbar spezifische Prädiktionen ableiten. Eine davon betrifft das Verhalten des hippocampalen Systems gegenüber veränderlichen Umweltbedingungen bei gleichzeitiger Ablation adulter Neurogenese. Erwartet wird für diesen Fall eine signifikant geringere Fähigkeit der Detektion und des effektiven Umgangs mit neuartigen Stimuluskonfigurationen. Die synaptischen Gewichte sind bereits für eine Umgebung konfiguriert und die Plastizität der beteiligten Neurone im DG ist gering. Da keine oder nur sehr wenige junge, plastische Körnerzellen verfügbar sind, können neue Stimuluskonfigurationen somit nicht effektiv repräsentiert werden.

2.3 Fragestellung

Die Fülle von Daten bezüglich unterschiedlichster Aspekte der Regulation adulter Neurogenese im HC der Säugetiere, in Kombination mit detaillierten theoretischen Modellen des HC, hat die Funktion adult generierter Neurone bisher nicht zufriedenstellend erklären können. Besonders die Widersprüchlichkeiten in den Ergebnissen verschiedener Studien zur funktionalen Relevanz der neugeborenen Zellen legen die Anwendung eines neuartigen Ansatzes sowohl in der Versuchsdurchführung als auch in der Analyse von in hippocampusabhängigen Lernparadigmen gewonnenen Daten nahe.

Die vorliegende Arbeit greift die Hypothese des von Wiskott et al. postulierten Modells zur funktionalen Relevanz adulter Neurogenese auf, wonach die neugeborenen Zellen der Aufrechterhaltung eines effektiven Enkodiermechanismus im DG bei Vorliegen veränderlicher Umgebungsbedingungen dienen und so entscheidend zur Vermeidung des Problems einer katastrophalen Interferenz beitragen [Wiskott et al., 2006].

Im Folgenden soll die Frage beantwortet werden, ob das Modell nach Wiskott et al. grundsätzlich mit den Verhältnissen in vivo übereinstimmt. Ausgangspunkt hierfür ist die Prädiktion des Modells, wonach es in Folge einer fehlenden Verfügbarkeit plastischer Granulozyten unter der Bedingung veränderter, verhaltensrelevanter Stimuluskonfigurationen in der Umwelt des Organismus zu einer katastrophalen Interferenz im DG kommt.

Hierzu soll zunächst ein pharmakologischer, interventioneller Ansatz zur effektiven Suppression adulter Neurogenese etabliert werden. Als Pharmakon wird das Zytostatikum TMZ verwendet, welches sich durch ein besonders günstiges Nebenwirkungsprofil auszeichnet. Ziel ist die effiziente Suppression adulter hippocampaler Neurogenese bei einem Minimum von Nebenwirkungen.

Im Anschluss soll die TMZ-induzierte Ablation adult generierter Neurone im DG von Mäusen hinsichtlich ihrer funktionalen Konsequenzen quantitativ und qualitativ analysiert werden. Aufgrund seiner Eigenschaft als de facto Standard zur Testung räumlichen hippocampusabhängigen Lernens wird die MWM in dieser Studie als experimentelles Paradigma gewählt. Das von Wolfer et al. vorgeschlagene und hier verwendete Protokoll beinhaltet zum einen ein *reversal*-Lernen und implementiert somit in direkter Weise die Exposition der getesteten Tiere gegenüber sich signifikant verändernden Umgebungsbedingungen.

Zum anderen entwickelten die Autoren einen Ansatz für eine qualitative Analyse des spatialen Lernprozesses in der MWM [Wolfer et al., 1992]. Dieser wird in der vorliegenden Arbeit erheblich modifiziert und weiterentwickelt, um

die Konsequenzen der Ablation adulter Neurogenese hinsichtlich der Qualität kognitiver Lernvorgänge beurteilen zu können.

Die rechnergestützte Analyse quantitativer und qualitativer Aspekte des MWM-Lernens bietet die Möglichkeit auch die subtilen Effekte einer supprimierten adulten Neurogenese zu erfassen. Somit kann die funktionale Relevanz der neugeborenen Körnerzellen im Kontext eines hippocampusabhängigen Lernparadigmas und bei Vorliegen des Risikos einer katastrophalen Interferenz präzise charakterisiert werden.

3 Material & Methoden

3.1 Tiere

In allen Experimenten wurden Mäuse des Stammes C57BL/6 verwendet, welche von Charles River WIGA Deutschland GmbH bezogen wurden. Alle Tiere waren zu Beginn der Experimente 6-8 Wochen alt und zu diesem Zeitpunkt mindestens eine Woche an die Haltungsbedingungen des Haltungsraumes adaptiert. Aus Gründen der Minimierung sozialer Stressfaktoren und der Vordatenlage wurden nur weibliche Tiere verwendet.

Für einige histologische Experimente kamen ferner transgene Mäuse zum Einsatz, welche unter dem Nestinpromotor das *green fluorescent protein (GFP)* exprimieren. Die Herstellung dieser transgenen Tiere ist zuvor bereits im Detail beschrieben worden [Yamaguchi et al., 2000].

3.2 Temozolomid

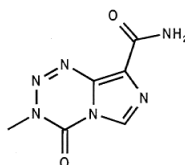
Zur Suppression der Zellproliferation im Hippokampus wurde die systemische Applikation des alkylierenden Agens Temozolomid (TMZ, IUPAC-Name: 5-Amino-Imidazol-4-Carboxamid, Abb. 3.1) als pharmakologischer interventio-neller Ansatz etabliert.

Das Imidazo-Tetrazin-Derivat TMZ ist ein oral applizierbares Alkylans, das 1999 zur Behandlung von Patienten mit rezidivierendem oder progredientem Glioblastom zugelassen wurde und sich neben einer hohen Wirksamkeit durch eine gute Veträglichkeit auszeichnet [Newlands et al., 1997], [Avgeropoulos et al., 1999], [Mason et al., 2005].

TMZ ist eine Wirkstoff-Vorstufe und hydrolysiert bei physiologischem bis alkalischem pH spontan zu 5-(3-Methyl-1-Triazeno)- Imidazol-4-Carboxamid (MTIC) [Wilman, 1986]. MTIC ist bereits als Wirkstoff von Dacarbazin (DTIC) bekannt und seine Zytotoxizität beruht auf der Alkylierung von Guanin [Tisdale, 1987]. MTIC wiederum zerfällt spontan in ein reaktives, für die Wirksamkeit des TMZ verantwortliches Methyl-Diazonium Ion und 5-Amino-Imidazol-4-Carboxamid (AIC) [Denny et al., 1994], [Chowdhury et al., 1999].

TMZ ist nur mäßig in Wasser bzw. sauren wässrigen Lösungen löslich (3,1

mg/ml) und verfügt über keinerlei protische Gruppen. Im Vergleich mit chemisch verwandten Substanzen kann diese Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln jedoch als relativ gut angesehen werden. Seine chemische Stabilität verändert sich in Abhängigkeit von pH-Wert, Feuchtigkeit und Temperatur. Die Vorteile des TMZ gegenüber Dacarbazin ergeben sich in pharmakologischer Hinsicht durch die Vermeidung hepatischer Stoffwechselwege sowie eine hervorragende Penetration des Gehirns über die Blut-Hirn-Schranke [Brindley et al., 1986], [Marzolini et al., 1998].



Strukturformel von Temozolomid

Aufgrund seiner DNA-alkylierenden Eigenschaften entfaltet TMZ seine apoptoseinduzierende Wirkung spezifisch in schnell proliferierenden Zellen durch Methylierung der Purinbase Guanin an der Position O6 (Guanin → O6-Methylguanin). Eine Alkylierung methylgruppenreicher Gene wie c-myc oder C-Hararas wurde in präklinischen Studien nicht beobachtet, weshalb eine allgemeine methylierende Aktivität mit Einfluss auf die Genexpression nicht proliferativ aktiver Zellen als unwahrscheinlich gelten kann [Zucchetti et al., 1989].

Seine anti-proliferative zytotoxische Aktivität wurde in zahlreichen präklinischen Studien an Mäusen, Ratten und Hunden beider Geschlechter experimentell bestätigt. Sowohl bei oraler als auch intraperitonealer (i.p.) Applikation zeigt sich eine gute Wirksamkeit von TMZ gegen Tumorzellen. Die systemische Bioverfügbarkeit nach erfolgter oraler Applikation kann als vollständig angesehen werden, c_{\max} ist nach 20 min erreicht und seine Plasmahalbwertszeit beträgt (im Menschen) zwischen 40 min und 2 h [Baker et al., 1999], [Chowdhury et al., 1999]. Eine Distribution von TMZ in verschiedene Gewebe erfolgt schnell und ohne Akkumulationseffekte bei zeitlich prolongierten multi-zyklischen Therapien [Griffiths et al., 2000]. Die Ausscheidung erfolgt bei allen getesteten Spezies hauptsächlich über das renale System [Tsang et al., 1990].

Bei hohen sublethalen Dosen kommt es zu irreparablen Schädigungen des hämatopoietischen, lymphoretikularen und gastrointestinalen Systems sowie der Testikel, jedoch konnte für die betroffenen Gewebe mit Ausnahme der Testikel in applikationsfreien Perioden eine solide Rekonstitution nachgewiesen werden.

Kardiovaskuläre Effekte oder Veränderungen des renalen Systems treten nicht auf. Für Mäuse wurde die maximale nicht-lethale Dosis mit 500 mg/m^2 Körperoberfläche bestimmt (Ratten 750 mg/m^2 oral und 1000 mg/m^2 i.p.). Potentielle akute Schädigungen des ZNS (z.B. Tremor, Prostration, Hypoaktivität, gebeugte Haltung, teilweise geschlossene Augen) sowie retinale Degeneration treten ebenfalls nur unter dem Einfluss lethaler Dosen auf, ein im Kontext der Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Studie bedeutsamer Sachverhalt. Karzinogene Effekte sind bei Verbindungen dieser Substanzklasse zu erwarten und nach prolongierten multizyklischen Applikationen ist das Auftreten von Neoplasien beobachtet worden.

Das in der vorliegenden Studie verwendete TMZ wurde in Form für die orale Applikation bestimmter Hartkapseln von der Firma Essex Pharma (SP Europe, Brüssel, Belgien) bezogen. Jede Kapsel enthielt 5 mg reines TMZ, sowie eine Reihe von Träger und Füllstoffen (Lactose, hochdisperses Siliciumdioxid, Poly-(Ocarboxymethyl)-stärke-Natriumsalz, (R, R)-Weinsäure, Stearinsäure). Alle Träger- und Füllstoffe gelten als unbedenklich und interagieren chemisch nicht mit dem Wirkstoff. Allergische Reaktionen konnten für den Verlauf der vorliegenden Studie ausgeschlossen werden. Die Kapselhüllen enthielten Gelatine, Titandioxid, Natriumlaurylsulfat und waren mit pharmazeutischer Tinte bedruckt.

3.3 Temozolomid-Applikation

Um die Dosisgleichheit für alle injizierten Tiere zu gewährleisten, wurde TMZ in der vorliegenden Studie i.p. appliziert. Da die Substanz nicht in Reinform zur Verfügung stand, mussten die ursprünglich für eine orale Applikation vorgesehenen Hartkapseln geöffnet und das TMZ für die Injektion in NaCl 0.9 % gelöst werden. Dieser und alle folgenden Schritte erfolgten aufgrund der hohen Toxizität und Karzinogenität der verwendeten Substanz unter größter Vorsicht und Sorgfalt unter dem Abzug. Der Inhalt aus je zwei Hartkapseln (=10 mg TMZ) wurde unter Verwendung eines 15 ml FalconTubes (BD Biosciences, USA) in 4 ml NaCl 0.9 % + 2,5 % 1N HCl gelöst. Durch die Zugabe von 1N HCl wurde ein niedriger pH (pH=4) eingestellt, um die vorzeitige spontane Hydrolyse des TMZ zu MTIC zu verhindern. Dies beeinträchtigte die Verträglichkeit der Injektion nicht [Beale et al., 1999]. Um eine vollständige Lösung des TMZ zu erreichen, wurde das Falcon Röhrchen für mindestens 10 min auf einem Schüttler platziert, danach zur Sedimentation in einen geeigneten Ständer überführt und aufrecht hineingesetzt. Wenn sich ein deutliches Sediment

am Boden des Röhrchens gebildet hatte, konnte der klare Überstand mit Hilfe einer Spritze abgenommen werden. Nach Aufsetzen eines Micropore 0.45 μm Spritzenaufsatz-Filters (Whatman, UK) wurde die TMZ-Lösung aliquotweise zu je 1 ml in bereitgestellte Eppendorfgefäße filtriert und im Anschluss bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert. Bei sorgfältiger Durchführung gingen somit bei der Sedimentation und Filtration nur sehr geringe Mengen TMZ verloren. Die Endkonzentration von 2,5 mg/ml blieb hiervon unberührt.

Zur Bestimmung der Dosisabhängigkeit des antiproliferativen Effekts von TMZ wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Dosisfindungsexperiment durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse dieses Experiments (s.u. und Abb. 4.1 B)) erhielten alle mit TMZ behandelten Tiere eine Dosis von 25 mg/kg Körpergewicht (KW). Das Gewicht einzelner Mäuse variiert, daher musste jedes Tier vor der Injektion gewogen und die verabreichte Menge dementsprechend angepasst werden. Beispielsweise erhielt eine 15 g schwere Maus 150 μl der vorbereiteten TMZ-Lösung mit der Konzentration 2,5 mg/ml.

Um kumulative zytotoxische Effekte zu vermeiden, erfolgten die TMZ Injektionen in zyklischer Weise jeweils die ersten drei Tage einer Woche für insgesamt vier Wochen. Die verbleibenden Tage einer jeden Woche dienten der Rekonvaleszenz der Tiere. Zum Vergleich: Beim Menschen hat 1 Zyklus 28 Tage und die Applikation erfolgt jeweils die ersten 5 Tage [Newlands et al., 1997]. Obgleich die Zellproliferation in diesen Tagen nicht direkt supprimiert wurde, kumulierte der gesamte Suppressionseffekt im Verlauf der vierwöchigen Behandlung, an deren Ende eine nahezu vollständige Ablation teilungsaktiver Zellen im Gyrus dentatus beobachtet wurde. In analoger Weise erhielten alle Tiere der Kontrollgruppe Injektionen (0,9 % NaCl) ohne TMZ.

Zur Bestimmung der proliferativen Aktivität wurde am dritten Tag der letzten Behandlungswoche ca. 3h nach der letzten TMZ-Injektion BrdU i.p. appliziert (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG).

Die Injektionen wurden von den Tieren gut toleriert. Eine Reaktion konnte lediglich auf die durch die Injektionsnadel herbeigeführte Verletzung beobachtet werden und trat in gleicher Weise bei den Tieren aller Gruppen auf.

3.4 BrdU-Markierung proliferativer Zellen

Der Nachweis adulter Neurogenese wird durch das sog. "birth-marking" mit 5'-Bromo-2'-deoxyuracil (BrdU), einem synthetischen, halogenierten Thymidinanalogon, ermöglicht, welches im Verlauf der S-Phase des Zellzyklus kompetitiv anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird. Die BrdU-Markierung,

welche als nichtradiographische Methode den Einsatz von radioaktivem [³H]-Thymidin weitestgehend ersetzt, wird mit immunhistologischen Verfahren nachgewiesen und ermöglicht so eine Mehrfachmarkierung gemeinsam mit anderen Antigenen [Corotto et al., 1993].

In allen im Kontext der vorliegenden Studie durchgeführten Versuchen wurde eine Dosis von 50 µg/g Körpergewicht i.p. injiziert. Die Injektionen begannen stets am letzten Tag der TMZ-Applikation, mindestens 3 h nach Erfolgen der letzten TMZ Dosis und wurden für insgesamt drei Tage einmal täglich durchgeführt.

3.5 Hämatologie

TMZ entfaltet als systemisch appliziertes Zytostatikum seine Wirkung in allen proliferativ aktiven Geweben des behandelten Organismus. Antineoplastische alkylierende Agenzien resultieren, insbesondere bei prolongierter und hochdosierter Applikation, in einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Beeinträchtigung hämatopoietischer Prozesse des Knochenmarks (Myelosuppression). Das Vorliegen einer Leukopenie, Erythropenie oder Immunsuppression kann das Verhalten der behandelten Tiere in erheblichem Maße modifizieren und die Verwertbarkeit standardisierter Verhaltenstests in Frage stellen.

Um dies auszuschließen, wurde den Tieren unter einer leichten Ethernarkose jeweils ca. 500 µl Blut mittels einer Pasteurpipette aus dem retro-orbitalen Sinus entnommen und in EDTA-beschichteten MiniCollect[®] Küvetten (Greiner bio-one, Österreich) überführt. Die Bestimmung der Blutzellzahl erfolgte mit Hilfe eines Beckman Coulter ACT Diff Automaten. Da sich humane und tierische Blutzellen hinsichtlich zahlreicher Parameter unterscheiden, wurde das Gerät mit einer veterinärmedizinischen Software betrieben. Die Entnahme erfolgte an drei Zeitpunkten: Unmittelbar vor, nach und schließlich vier Wochen nach Beendigung der TMZ-Applikation.

3.6 Transkardiale Perfusion, Fixation und Schneiden des Gewebes

Die Fixation des Gewebes erfolgte durch transkardiale Perfusion der Tiere mit kalter Paraformaldehydlösung (4% in 0,1 M Phosphat-Buffer, pH 7,4). Hierzu wurde zunächst die obere Körperhöhle durch eine Thorakotomie freigelegt und das Perikard vorsichtig geöffnet. Nach erfolgter Punktion des rechten Atriums konnte eine großlumige Kanüle in den linken Ventrikel vorgeschoben werden, über welche durch eine Peristaltik-Pumpe zunächst eine NaCl-Lösung

(0,9%) in das Gefäßsystem gelangte. Auf diese Weise wird der Organismus des Tieres entblutet, was eine spätere Analyse qualitativ deutlich verbessert, da die sonst überall im Gewebe vorhandenen Blutzellen eine histologische Auswertung erheblich beeinträchtigen. Es folgte die eigentliche Fixation des Gewebes durch Perfusion des Tieres mit 100 ml einer kalten (4°C) Paraformaldehydlösung (4%), an die sich die sorgfältige Präparation des Gehirns anschloss.

Das Schneiden der Gehirne erfolgte auf einem trockeneisgekühlten Kupferblock mit einem Gleitmikrotom (Leica). Zur Vermeidung von Gefrierschäden am Gewebe wurden die Gehirne vor dem Auffrieren für 24 h in einer Sucroselösung (30%) bei 4 °C inkubiert. Die Dicke der angefertigten Gewebeschnitte betrug 40µm. Bis zu ihrer weiteren histologischen Verwendung verblieben die Schnitte bei 4 °C in einer Glykollösung.

3.7 Immunohistochemie

Für die immunhistologische Detektion BrdU⁺ Zellen wurden die Gewebeschnitte zunächst bei 37 °C in 2 N HCl inkubiert um die DNA vollständig zu denaturieren und das BrdU so für die verwendeten Antikörper besser zugänglich zu machen. Im Anschluss erfolgte eine Neutralisation in 0,1 M Borat-Puffer (pH 8,5). Abschließend wurden die Gewebeschnitte mehrfach mit TBS-Puffer (tris-gebufferte Saline) gespült. Die Verdünnung der primären und sekundären Antikörper erfolgte in TBS mit 0,1 % TritonX-100 und 3 % Eselserum. Es schloss sich nach einer Vorbehandlung mit 0,6 % H₂O₂ zur Blockung gewebeeigener Peroxidaseaktivität eine Inkubation des Gewebes für 2 h mit dem jeweiligen sekundären Antikörper an. Für eine Amplifikation nach dem Avidin-Biotin Prinzip wurde ein ABC-Reagenz (Vectastain, Vector Laboratories, Burlingame, CA) verwendet. In der abschließenden Färbereaktion diente 3,3'-Diaminobenzidin (Sigma, Germany) als Chromogen. Die Anwendung der Primärantikörper erfolgte in den folgenden Konzentrationen: α-BrdU (Ratte, 1:500, Harlan Seralab, Indianapolis, IN), α-Iba (Ziege, 1:250, Abcam plc, Cambridge, UK), α-DCX (Ziege, 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

3.8 Elektrophysiologie

Die für die Elektrophysiologie verwendeten horizontalen Hippokampuschnitte stammten von 10-12 Wochen alten C57BL6 Mäusen. Nach erfolgter Dekapitation wurden die Gehirne sorgfältig präpariert und unter sofortiger Kühlung (auf Eis, 2-4 °C) in einer mit ACSF (*artificial cerebro-spinal fluid*) gefüllten Kammer mittels eines Vibratoms (Campden vibroslicer, UK) geschnitten. Die Dicke

der transversalen Schnitte betrug 350 μm um den Erhalt intakter Netzwerkverbindungen zu gewährleisten. Während der Durchführung des Experiments ruhte das Gewebe in einer Plexiglasskammer mit einer auf 34 °C temperierten und oxygenierten (95 % O₂, 5 % CO₂) ACSF-Lösung. Die ACSF-Lösung enthielt bei einem pH von 7,4 129 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.8 mM MgSO₄, 1.6 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃, 1,25 mM NaH₂PO₄ sowie 10 mM Glukose. Vor Beginn der Messungen adaptierte das Gewebe für 2 h in der abgedeckten Kammer.

Die fEPSP-Messungen erfolgten in einem Abstand von 30 s über eine mit ACSF gefüllte Mikroelektrode (\varnothing 150 μm) mit einem Spitzen-Widerstand von 2-3 M Ω . Der DG wurde über den mittleren tractus perforans (*medial perforant path*, *MPP*) stimuliert und aus der Molekular-Zellschicht des oberen Flügels abgeleitet. In der Region CA1 erfolgte die Stimulation an den afferenten Schaffer-Kollateralen, die Messelektrode war im stratum radiatum von CA1 platziert. Eine korrekte Platzierung der Elektroden konnte durch die Applikation eines einzelnen Test-Pulses überprüft werden.

Nach Verifikation eines über 10 min stabilen Basis-fEPSPs (Messung alle 30 s) wurde mit der LTP-Induktion begonnen. Die Induktion einer LTP im DG und der Region CA1 erfolgte unter Benutzung eines etablierten Standardprotokolls. Einzelne hochfrequente Folgen (100 Hz) von Depolarisationen wurden in viermaliger Wiederholung für eine Dauer von jeweils 1 s präsynaptisch in einem Abstand von 10 s appliziert. Die Messung der post-tetanischen fEPSPs erfolgte alle 30 s für 30 min.

Nach Filterung (3 kHz), und Digitalisierung (8-10 kHz) der gemessenen Potentiale (TIDA, HEKA-Soft, Germany) wurden die maximalen Amplitudendifferenzen ermittelt, jeweils vier aufeinanderfolgende Messpunkte zusammengefasst und prozentual relativ zu dem vor Beginn der Stimulation ermittelten baseline-EPSP aufgetragen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test unter einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

3.9 Verhaltenstests

3.9.1 Rotarod

Die lokomotorischen Fähigkeiten eines Tieres haben einen entscheidenden Einfluss auf seine Leistungsfähigkeit in Verhaltenstests. Da ein pharmakologischer Ansatz stets das Risiko einer systemischen Einflussnahme auf verschiedene, für das Verhalten eines Tieres relevante, physiologische Systeme in sich birgt, musste eine grundlegende Verhaltensänderung in Folge einer TMZ-Applikation ausgeschlossen werden. Der Rotarod Test ist ein einfaches Paradigma, mit dem

die lokomotorischen Fähigkeiten und ihre Flexibilität im Einsatz dieser Fähigkeiten effektiv beurteilt werden können [Jones and Roberts, 1968]. Er besteht im Wesentlichen aus einem durch einen elektrisch betriebenen Motor in Rotation versetzten runden Stab mit einem Durchmesser von 3 cm. Die Tiere müssen stetig Laufen, um auf der Oberseite des mit einem gummierten Material überzogenen Stabes zu verbleiben.

Die Tiere wurden zu Beginn des Experiments auf dem stillstehenden Rotationsstab des Testapparats (Columbus Instruments, USA) platziert und der Stab nach einer kurzen Wartezeit von 5 s in eine gleichmäßige Rotation versetzt (4 U/min). Nach weiteren 5 s beschleunigte sich die Rotation gleichmäßig (8 U/min) bis auf eine maximale Rotationsgeschwindigkeit von 40 U/min nach 5 Minuten. War es zunächst für die Tiere nicht schwierig das Gleichgewicht zu halten und auf der Oberseite des rotierenden Stabes zu verbleiben, erforderte die stetige Beschleunigung eine zunehmend anspruchsvolle lokomotorische Koordination. Die Zeit die das jeweilige Tier auf dem beschleunigten Stab verblieb ohne herunterzufallen diente als Maß für die lokomotorische Koordinationsfähigkeit dieses Tieres.

Der Rotarodtest wurde im Verlauf des TMZ-Experiments mit jeweils neuen naiven Tieren an drei Zeitpunkten durchgeführt: Einen Tag vor Beginn der Behandlung, einen Tag nach der letzten Injektion sowie nach vier Wochen Rekonvaleszenz. An jedem dieser Zeitpunkte fanden jeweils drei aufeinanderfolgende Versuche statt (ITI = 30 min).

3.9.2 Open Field Test

Der Open-field Test (*OFT*) dient der Evaluation des Explorationsverhaltens eines Tieres in einer neuen und ungewohnten Umgebung auf der Grundlage der von ihm gezeigten Neophobie und Aversivität [Broadhurst, 1961]. Die Konfrontation mit einer für sie unbekanntem Umgebung veranlasst die Tiere diese zu erkunden, wobei die allgemeine Aktivität deutlich zunimmt. Initial wird dieses Verhalten stets durch einen emotionalen Erregungszustand begleitet, welcher sich durch Strecken des Körpers und das reglose Verweilen an einem festen Ort manifestiert. In gesunden Kontrolltieren wird dieses Verhalten innerhalb einer kurzen Zeit von einem intensiven Explorationsverhalten abgelöst, in dessen Verlauf die Tiere die gesamte Oberfläche der Arena erkunden. Kranke und verletzte sowie zahlreiche genetisch modifizierte Tiere verweilen hingegen an wenig exponierten Positionen wie Ecken und Randzonen; ein natürliches Explorationsverhalten fehlt. Die im Versuchsverlauf zurückgelegte Wegstrecke dient als Indikator für den emotionalen Status des betrachteten Tieres. Sie gibt ferner, insbesondere in Verbindung mit einer Analyse der Bewegungsgeschwindigkeit,

Aufschluss über die motorischen Fähigkeiten des Tieres.

Als qualitativer Parameter aufgefasst kann, alternativ zur Wegstrecke und Geschwindigkeit, die Aufenthaltsdauer in verschiedenen Zonen der open-field Arena Aufschluss über den dem Explorationsverhalten zugrundeliegenden emotionalen Zustand geben. Stark emotionalisierte, ängstliche Tiere verweilen überwiegend reglos in den Ecken bzw. dicht an die Seitenwände gedrückt und vermeiden den freien Raum (open-field) in der Mitte der Arena.

Die hier verwendete open-field Arena hat eine Dimension von 60x60 cm mit einer Höhe der Seitenwände von 25 cm. Der Einsatz von weißem PVC als Baumaterial resultiert in uniformen weißen Oberflächen innerhalb der Arena und ermöglichte eine unkomplizierte und effektive Reinigung zwischen den Versuchen. Innerhalb der Arena herrschte eine gleichmäßige Helligkeit von ca. 165 cd. Die Randzone reichte jeweils 10 cm von jeder Seitenwand in die offene Mitte der Arena.

Zu Versuchsbeginn wurden die Tiere jeweils alleine in die Mitte der Arena gesetzt. Eine an der Raumdecke montierte LCD-Kamera zeichnete sowohl die Versuchszeit als auch den zurückgelegten Bewegungspfad auf (Ethovision, Noldus, NL). Das Erfassen bzw. Berechnen aller verwendeten Parameter erfolgte ebenfalls rechnergestützt mit Hilfe von Ethovision. Jeder Versuch hatte eine Dauer von 5 min, dann wurden die Tiere entnommen und in ihren Haltungskäfig zurückgesetzt. Die Arena wurde für das folgende Tier gereinigt, wodurch eine Urinmarkierung bestimmter Bereiche ausgeschlossen werden konnte. Für die TMZ- und die Kontroll-Gruppe wurde dieser Versuch jeweils mit neuen, naiven Tieren an drei verschiedenen Zeitpunkten (1 Tag vor, 1 Tag nach und 4 Wochen nach der mehrzyklischen TMZ-Behandlung) durchgeführt.

3.9.3 Morris Water Maze Test

Der Morris water maze Test (*MWM*, *Wasserlabyrinth*) ist einer der am häufigsten genutzten Tests für räumliches Lernen und Gedächtnis in Ratten sowie Wildtyp, transgenen und Knockout-Mäusen [Morris, 1984, 1981]. Der MWM-Test beruht auf einem einfachen Grundprinzip: Die getesteten Tiere müssen in einem mit Wasser gefüllten Pool eine unter der Wasseroberfläche verborgene Plattform lokalisieren. Die in der hippocampusabhängigen Versuchsvariante für die Tiere unsichtbare Plattform ist der einzige "Ausgang" und kann nur nach erfolgreichem Erlernen ihrer Position im Verlauf mehrerer Versuchsdurchgänge durch die Nutzung stabiler visueller Landmarken außerhalb des MWM-Pools effektiv angesteuert werden. Da Mäuse eine im allgemeinen starke Motivation zeigen, dass von ihnen unter normalen Umständen nicht präferierte Wasser so rasch wie möglich zu verlassen, ist eine aversive Lernmotivation per se ge-

geben. Für hippocampusunabhängige Version der MWM wird die Plattform visuell eindeutig markiert und kann so von den Tieren direkt angeschwommen werden.

Der MWM Test ist ein robuster, zuverlässiger Verhaltenstest, welcher eng mit hippocampaler synaptischer Plastizität und einer intakten NMDA Rezeptorfunktion korreliert ist [Vorhees et al., 2006]. Getestete Tiere benötigen kein Vortraining und die erhobenen Daten sind unabhängig von der jeweils verwendeten Poolkonfiguration. Sekundäre, genetisch oder pharmakologisch bedingte, motivationale Unterschiede beeinflussen das gezeigte Verhalten ebenfalls nicht.

Wenngleich beim Erlernen der MWM verschiedene Hirnregionen wie der präfrontale Kortex, das Neostriatum und das Zerebellum involviert sind, ist ein intakter Hippokampus für die Akquisition des MWM-Tests obligat. Läsionen des Hippokampus oder einer seiner Subkompartimente beeinträchtigen die Leistungsfähigkeit von Ratten und Mäusen beim Erlernen des MWM-Tests in signifikanter Weise [Logue et al., 1997, Eichenbaum et al., 1990, Morris et al., 1982]. Da es sich bei der MWM um einen räumlichen Navigationstest im Wasser handelt und für ein erfolgreiches Bewältigen der Aufgabe die Ausbildung einer, auf distalen visuellen Landmarken beruhenden, allozentrischen neuronalen Repräsentation der MWM und deren Umgebung erforderlich ist, muss das Vorhandensein einer ausreichenden visuellen Sensorik - insbesondere bei der Verwendung von Knockout-Tieren - sichergestellt sein. Die in unserem Test verwendeten C57BL6 Tiere verfügen über für Mäuse normale visuelle Fähigkeiten und zeigen eine im Vergleich mit anderen Mausstämmen gute spatiale Lernfähigkeit [Upchurch et al., 1988].

Weitere allgemeine, das Verhalten in der MWM beeinflussende Faktoren sind das Körpergewicht, der physische Entwicklungszustand, Stress und das Alter der jeweiligen Tiere [Gower et al., 1993, Brandeis et al., 1989]. Studien zur Rolle von Geschlechtsunterschieden lieferten widersprüchliche Ergebnisse [Bucci et al., 1995], obgleich der Einfluss der jeweiligen Geschlechtshormone auf das MWM-Verhalten gut belegt ist [Daniel et al., 1999, Rissanen et al., 1999, Roof, 1993]. Die ausschliessliche Verwendung weiblicher Tiere in der vorliegenden Studie vermeidet diese Problematik. Grundsätzlich kann die spatiale Lernfähigkeit von Ratten und Mäusen als vergleichbar angesehen werden und die beobachteten Unterschiede in der MWM müssen den besseren, phylogenetisch bedingten Schwimmfähigkeiten der Ratten zugeschrieben werden [Whishaw et al., 1996]. Die Ergebnisse des MWM Test werden von Umgebungsvariablen wie Versuchsaufbau, Trainingsprotokoll, Alter der Tiere, Haltingsbedingungen nicht entscheidend beeinflusst [Crabbe et al., 1999].

In den von uns durchgeführten Experimenten wurde ein kreisförmiger MWM-

Pool mit einem Durchmesser von 1,89 m und einer Seitenwandhöhe von 0,6 m benutzt. Der Pool besteht aus mehrschichtigem weißem PVC und steht leicht erhöht in der Mitte eines ca. 15 m² großen Raumes. Genau über dem Mittelpunkt des Pools ist an der Decke eine LCD-Kamera montiert, mit welcher das Geschehen in der MWM aufgezeichnet wurde. Die Digitalisierung und Speicherung der Daten erfolgte über einen Windows-PC mit der Software Ethovision (Noldus, NL).

Zur Feststellung der Identität einer gegebenen Maus und einer späteren individualisierten Datenanalyse erhielten alle Versuchstiere einen RFID-Transponder (Datamars, Swiss) subkutan in den Nacken implantiert. Das Auslesen der ID-Nummer erfolgte über eine Handlesegerät (Datamars, Swiss).

Zum Zeitpunkt der Durchführung aller Experimente betrug die Wassertemperatur 19-20 °C. Die Beimischung ungiftiger weißer Wandfarbe auf Wasserbasis (Relius, Germany) führte zu der gewünschten Trübung des Wassers. Die Beleuchtung erfolgte indirekt durch in Bodennähe montierte Lampen (4x100 W) und resultierte auf der Wasseroberfläche in einer homogenen Helligkeit von ca. 123 cd.

Der MWM Test wurde für jedes Tier über einen Zeitraum von fünf Tagen durchgeführt. Pro Tag hatte jedes Tier insgesamt sechs Versuche zu absolvieren. Jeder Versuch endete mit dem Erreichen der Plattform, spätestens jedoch nach 120 s. Die Position der Zielplattform war jeweils für die ersten drei (NE Quadrant) und die beiden letzten Tage (SW Quadrant) identisch. Mithin entsprach das von uns gewählte Wolfer-Lipp Protokoll [Wolfer et al., 1998] der *reference-memory* Version der MWM (für eine Abgrenzung zum *delayed-match to sample* Protokoll (DMP) vergleiche auch [Steele et al., 1999]). Nach Tag drei fand eine als *reversal* bezeichnete Veränderung der Plattformposition statt. Die Veränderung betrug relativ zur Geometrie des Pools 180°. Es wurden vier verschiedene Startpositionen benutzt, welche durch ein pseudo-randomisiertes Verfahren ausgewählt wurden. Innerhalb eines Versuchstages war die Startposition jedoch immer gleich. Beim Start wurde jede Maus mit dem Kopf zur Wand gerichtet in den Pool gesetzt. Die Datenaufnahme startete und endete automatisch. Sowohl nach einem missglückten als auch dem erfolgreichen Auffinden der Zielplattform wurde das jeweilige Tier für 15 s auf der Plattform platziert, um es danach in seinen Käfig zurückzusetzen.

Zwischen den Versuchen warteten die Tiere in einem Standardkäfig, welcher durch eine Infrarotlampe beheizt wurde und den Tieren Zugang zu Futter und Wasser ermöglichte. Dies erlaubte den Tieren eine vollständige Trocknung und unterstützte die physische und psychische Rekonvaleszenz nach jedem Versuchsdurchgang.

3.10 Analyse der MWM Daten

3.10.1 Klassische Analyse

Die klassische Analyse von MWM-Daten umfasst vor allem die Betrachtung rein quantitativer Größen zur Beurteilung des Lernerfolgs der getesteten Tiere. Von diesen Größen ist die für das Erreichen der Plattform benötigte Zeit (*latency*, Latenzzeit) der wichtigste Parameter. Indirekt erlaubt eine Messung der Latenzzeit auch eine Aussage hinsichtlich der Qualität des Lernvorgangs: Kurze Schwimmzeiten entsprechen effektiven, lange Zeiten hingegen ineffektiven Such- und Navigationsstrategien. Wird der MWM-Test erfolgreich gelernt, können die immer kürzeren, benötigten Schwimmzeiten als Lernkurve betrachtet werden. Als zweites quantitatives Maß von allgemeiner Bedeutung ist die im Laufe eines Versuchs zurückgelegte Schwimmdistanz ebenfalls unmittelbar mit der Effektivität der von dem jeweiligen Tier gezeigten Strategie korreliert. Da es sich bei der MWM primär um einen Test der räumlichen Lernfähigkeit von Nagetieren handelt, ist eine Quantifizierung der Effektivität über die relative Aufenthaltsdauer in dem jeweils aktuellen Zielquadranten eine erste geeignete Möglichkeit zur Beurteilung des endgültigen Lernerfolgs, wenn auch die räumliche Auflösung sehr gering ist.

Eine detaillierte Beurteilung der räumlichen Komponente des Lernerfolgs, der Qualität des Lernprozesses sowie eine qualitative Analyse der in den einzelnen Versuchen verwendeten Suchstrategien ist jedoch mit den o.g. klassischen Parametern nicht möglich. Daher können unter den stark reduktionistischen Bedingungen der MWM durchaus für das Vorliegen effektiver, hippokampusabhängiger Suchstrategien sprechende Ergebnisse die eigentliche Benutzung weniger oder gar nicht hippokampusabhängiger Strategien in erheblichem Maße maskieren. Im Kontext eines einzelnen Versuchs kann z.B. die Benutzung einer simplen, rein prozeduralen und weitestgehend hippokampusunabhängigen Suchstrategie zu einer vergleichbaren Effektivität führen wie eine direkte räumliche Navigation anhand einer zuvor etablierten allozentrischen Repräsentation der Umgebung.

Die Idee einer qualitativen Analyse des Verhaltens von Mäusen in der MWM ist nicht grundsätzlich neu: D.P. Wolfer et al. konnten die Relevanz distinkter Verhaltensmuster für das Entstehen spezifischer Maus-Phänotypen für den MWM-Test durch eine Faktorenanalyse belegen [Wolfer et al., 2000]. Als Werkzeug zur Durchführung einer solcherart qualitativ orientierten Analyse entwickelten die Autoren der genannten Studie die Software Wintrack, welche als public domain frei verfügbar erhältlich ist [Wolfer et al., 2001, 1992]. Alternative Varianten einer qualitativen Analyse von MWM-Daten finden sich bei:

[Brody et al., 2006, Janus, 2004, Graziano et al., 2003].

Eine nutzbringende Beurteilung qualitativer Merkmale des Schwimmverhaltens von Mäusen in der MWM muss zwingend aufgrund objektiver Kriterien erfolgen. Es fällt leicht, bestimmte Charakteristika einzelner Such- und Navigationsstrategien zu identifizieren und diese als menschlicher Beobachter für eine Klassifikation noch unbekannter Versuche heranzuziehen. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde jedoch die Feststellung gemacht, dass verschiedene menschliche Beobachter eine jeweils sehr individuelle Tendenz zeigen, einen vorliegenden Schwimmpfad in die eine oder andere Kategorie zu klassifizieren und dabei bestimmten Strategien den Vorzug vor anderen zu geben. Eine große Anzahl von Versuchen verstärkt diesen Effekt noch und lässt den Ansatz einer Klassifikation durch einen menschlichen Beobachter zweifelhaft und mitunter willkürlich erscheinen, was den Nutzwert einer derart durchgeführten qualitativen Analyse von MWM-Daten in Frage stellt. Darüber hinaus ist die Analyse vieler MWM-Schwimmpfade anhand eines Satzes vordefinierter Kriterien als hoch redundante Operation für den Einsatz eines computergestützten Algorithmus prädestiniert.

Auch hier wurden von Wolfer et al. erste Ansätze unternommen und mit der Wintrack-Software eine auf wenigen Variablen basierende Lösung vorgeschlagen, wobei sich der vorgeschlagene Algorithmus jedoch in der Anwendung auf die vorliegenden Daten als nicht ausreichend reliabel erwies. Daher wurde das Strategiekonzept in der vorliegenden Arbeit überarbeitet, modifiziert und erweitert. Der computergestützte Analyseprozess umfasst nun die Detektion weiterer Suchmuster, das Erstellen einer graphischen Ausgabe der Aufenthaltswahrscheinlichkeit in 10x10 cm großen Sektoren der Pooloberfläche und wurde in Form eines Matlab-Programms implementiert.

3.10.2 Suchstrategien in der MWM

Ein Tier hat in der MWM drei grundsätzliche Möglichkeiten die Zielplattform schnell und zuverlässig zu erreichen [Brandeis et al., 1989]. Es kann eine über viele Versuche hinweg gelernte Sequenz von Bewegungen anwenden (PRAXIS), die Plattform anhand naheliegender Landmarken direkt ansteuern (TAXIS) oder es kann die räumliche Konfiguration entfernter Landmarken nutzen (spatiale Navigation), um das Ziel flexibel von jedem beliebigen Startpunkt aus zu erreichen. Das Vorliegen einer TAXIS-Strategie kann in der Regel ausgeschlossen werden, da die Verfügbarkeit entfernter visueller Landmarken durch eine sorgfältige Vorbereitung des Versuchsaufbaus zu unterbinden ist. Vielmehr kann das bewusste Anbringen visueller Merkmale an der Zielplattform als zusätzliche Kontrolle für intakte visuelle und motorische Fähigkeiten dienen.

Schwieriger gestaltet sich eine eindeutige Differenzierung zwischen reinen räumlichen Navigations- und PRAXIS-Strategien und deren Mischformen. Letztere zeichnen sich durch - oftmals zirkuläre - repetitive Schwimmuster von geringer Komplexität aus und können sich bereits innerhalb der Versuche eines Tages entwickeln. Die Verwendung randomisierter Startpunkte reduziert die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von PRAXIS-Strategien, schließen sie jedoch nicht aus. Besonders gegen Ende einer umfangreichen Versuchsreihe mit mehrfachen Plattformverschiebungen zeigen ca. 5-10 % der getesteten Tiere eine eindeutige Wiederholung stereotyper Bewegungssequenzen.

Räumliche Navigationsstrategien sind von der Lokalisation des Startpunktes völlig unabhängig. Bevor sie jedoch von einem Tier in der MWM genutzt werden können, muss ein Lern- und Differenzierungsprozess durchlaufen werden, in dessen Verlauf verschiedene Formen von Suchstrategien auftreten. Am Ende dieses Prozesses steht die nahezu exklusive Nutzung räumlicher, d.h. flexibler, effektiver und präziser Navigationsstrategien, um die Zielplattform zu erreichen (Abb. 3.2).

Obwohl das Verhalten individueller Tiere in der MWM hinsichtlich der Ausprägung der verschiedenen Stadien im Verlauf des Lernprozesses z.T. beträchtlich variiert, erfolgt das Erlernen und Anwenden der unterschiedlichen Strategien in Form einer sequentiellen Abfolge beginnend mit einfachen, völlig ungerichteten Suchmustern hin zum direkten Anschwimmen der Zielplattform.

Die vorgestellten Suchstrategien basieren auf einem von Wolfer et al. entwickelten Konzept, welches im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach sorgfältiger Auswertung von mehr als 2000 einzelnen MWM-Versuchen für die vorliegende Studie modifiziert und erweitert wurde [Wolfer et al., 2000, 2001, 2002]. Der Übergang zwischen den verschiedenen Strategieformen ist fließend. Innerhalb eines Versuchs können auch mehrere Strategien nacheinander, in seltenen Fällen sogar mehr oder weniger parallel gezeigt werden, wobei es jedoch in der Regel möglich ist, eine eindeutig vorherrschende Strategie zu identifizieren.

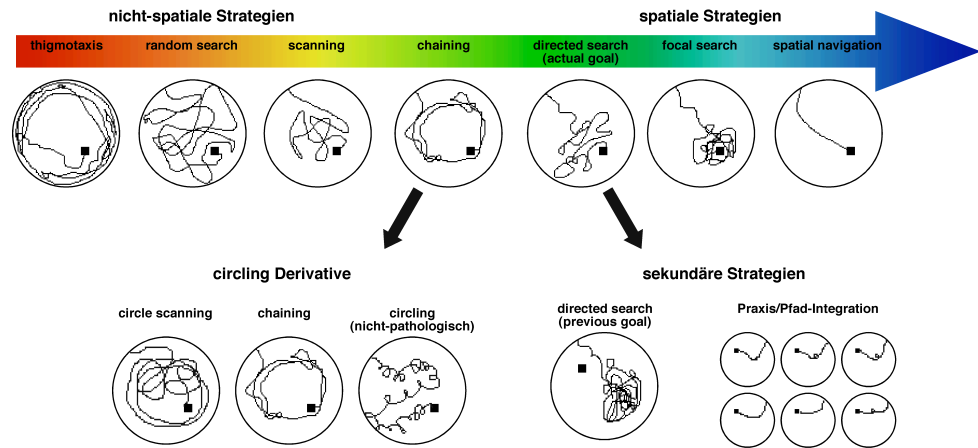


Abbildung 3.1: **Konzept verschiedener Suchstrategien in der MWM**

Darstellung der von Mäusen des Stammes C57BL/6 in der MWM genutzten Suchstrategien geordnet von links nach rechts nach zunehmender Abhängigkeit von einer intakten hippocampalen Formation. Links hippocampusunabhängige Strategien ohne räumliche Präferenz (rot), rechts hippocampusabhängige Strategien mit räumlicher Präferenz (blau). CIRCLING Derivate und sekundäre Strategien stellen explizit keine pathologischen Muster dar, sondern sind das Ergebnis von Übertraining in einer stark reduktionistisch geprägten Umgebung.

Im Folgenden werden die beobachteten Strategien im Einzelnen vorgestellt, charakterisiert und hinsichtlich ihrer Relevanz für das Entstehen eines distinkten Phänotyps in der MWM analysiert. Die Implementierung des Identifikationsprozesses für den in dieser Studie verwendeten Klassifikationsalgorithmus wird im Anschluss dargestellt. Aus Gründen der Einheitlichkeit werden hier sowohl bekannte als auch neu definierte Strategien mit ihren englischen Bezeichnungen und kapitalisiert angesprochen.

Thigmotaxis

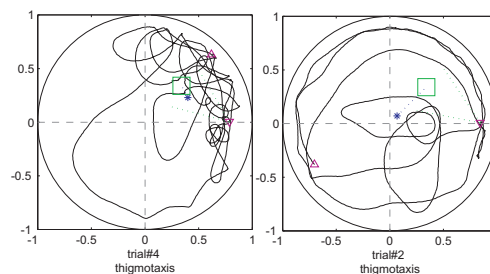


Abbildung 3.2: **Beispiele für Thigmotaxis**

Wurden Mäuse das erste Mal in den MWM-Pool eingesetzt, zeigten ca. 5 % der Tiere ein Verhalten, welches als THIGMOTAXIS bezeichnet wird. Gekennzeichnet ist dieses hoch emotionale und z.T. stereotype Verhalten durch den Versuch der jeweiligen Tiere, aus der MWM über die Seitenwand zu entkommen. Da die Seitenwand keine solche Möglichkeit bietet, schwimmen die Tiere in beliebiger Richtung zumeist in unmittelbarem Kontakt mit der Wand umher, wobei der Kopf des Tieres stets zur Wand ausgerichtet ist. In den meisten Fällen wechseln die Tiere innerhalb eines Versuchs rasch zu einer anderen Suchstrategie. Die Fähigkeit zu einem solchen Wechsel und mithin der erfolgreiche Umgang mit einer stressbedingten und stark affekt dominierten Situation kann als Beleg für das Vorhandensein intakter exekutiver Hirnfunktionen gewertet werden. Die THIGMOTAXIS-Strategie ist hippokampusunabhängig und kann auch nach vollständiger Entfernung beider Hippokampi beobachtet werden. Sie tritt bei zahlreichen Knockout-Mäusen mit einer signifikant erhöhten Wahrscheinlichkeit auch in späteren Phasen eines MWM-Experiments auf. Wolfer et al. konnten zeigen, daß THIGMOTAXIS als singulärer Faktor für einen großen Teil der bei Knockout-Tieren beobachteten MWM-Phänotypen bestimmend ist [Wolfer et al., 2000].

Random search

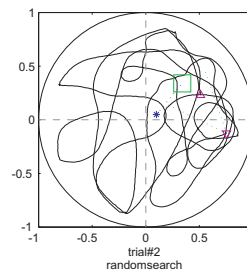


Abbildung 3.3: **Beispiel für random search**

Die von den in der vorliegenden Studie verwendeten Mäusen weitaus am häufigsten gezeigte initiale Suchstrategie war das RANDOM SEARCH, bei dem die Tiere die gesamte Pooloberfläche nach einem potentiellen Ausgang absuchen. Räumliche und directionale Präferenzen fehlen vollständig und es werden lange Wegstrecken zurückgelegt. Auf diese Weise können die Tiere an die Situation adaptieren und eine gute Übersicht über die Dimensionen der Arena gewinnen, was eine wichtige Voraussetzung für das Entstehen einer allozentrischen Repräsentation in späteren Versuchsphasen darstellt. Häufig treten repetitive

kreisförmige Schwimmuster auf, welche sich entweder aus einer vorhergehenden THIGMOTAXIS entwickeln oder aber zu der systematischeren SCANNING-Strategie überleiten. Das RANDOM SEARCH ist wie THIGMOTAXIS hippokampusunabhängig.

Scanning

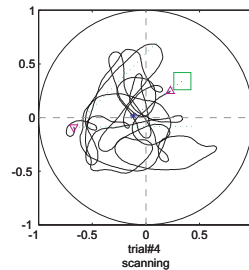


Abbildung 3.4: **Beispiel für scanning**

Als mit Abstand am häufigsten beobachtete, nicht-direktionale Suchstrategie entwickelt sich das SCANNING zumeist aus dem RANDOM SEARCH oder tritt spontan auf. Im Gegensatz zu allen vorherigen Strategien zeigt sich hier eine spatiale Präferenz für die mittigen Bereiche des MWM-Pools innerhalb der Annuluszone (s.u.); die Randzone wird mehr oder weniger konsequent gemieden (Abb. 3.5). Mit vergleichbarer Häufigkeit treten repetitive, zirkuläre und meandernde, teilweise jedoch auch völlig zufällige Schwimmuster auf. Hinsichtlich seiner Bedeutung für eine effektive Etablierung einer allozentrischen räumlichen Repräsentation im Gehirn des jeweiligen Tieres ist das Vorliegen einer räumlichen Präferenz für die zentralen Bereiche der MWM-Arena insofern von Bedeutung, dass in dieser Region die gleichzeitige Verfügbarkeit mehrerer, entfernter, stabiler, visueller Landmarken maximal ist. Somit kann hier die Bestimmung der eigenen Position zu einem gegebenen Zeitpunkt in Relation zu mehreren Landmarken mit der größtmöglichen Präzision erfolgen.

Chaining

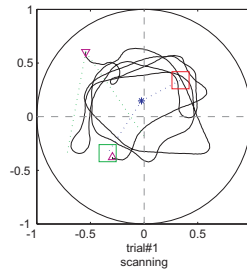


Abbildung 3.5: Beispiel für chaining

Das CHAINING trat in der vorliegenden Arbeit nur äußerst selten auf und wird von verschiedenen Autoren in unterschiedlicher Weise bewertet. So wird ihm eine Bedeutung als Zwischenstufe zwischen nicht-gerichteten und gerichteten Strategien zugeschrieben [Wolfer et al., 2002], eine Interpretation, welche auf der Annahme beruht, daß die Tiere zunächst den Abstand der Zielplattform zur Seitenwand des MWM-Pools erlernen und erst dann deren exakte Position relativ zu externen Landmarken. Andere Autoren sehen in der CHAINING-Strategie ein Derivat der repetitiven Muster der SCANNING-Strategie [Graziano et al., 2003, Dalm et al., 2000].

In der vorliegenden Arbeit wird die letztere Interpretation übernommen, da sämtliche im Kontext dieser Studie erhobenen Daten eine Rolle als Intermediat zwischen nicht-gerichteten und gerichteten Strategien nicht unterstützen. Vielmehr scheint das CHAINING eine Alternativstrategie zu der Verwendung räumlicher Suchmuster darzustellen. Aufgrund der, im Vergleich mit naturalistischen Verhältnissen, geringen Abmessungen des MWM-Pools sowie der exakt geometrischen Anordnung der möglichen Plattformpositionen auf einem Kreisumfang entsteht eine in besonderer Hinsicht artifizielle Situation. In dieser Situation stellt das kreisförmige Schwimmen parallel zu den Seitenwänden in den inneren Poolbereichen eine durchaus effiziente Strategie für das rasche und zuverlässige Auffinden der verborgenen Plattform dar - unabhängig von entfernten Landmarken und mithin unabhängig von hippocampalen Funktionen.

Directed search present goal

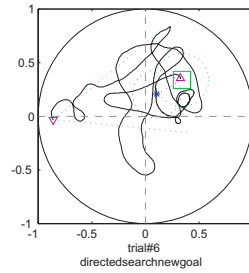


Abbildung 3.6: Beispiel für directed search present goal

Als erste Suchstrategie mit eindeutig räumlicher und gerichteter Präferenz beschreibt das DIRECTED SEARCH PRESENT GOAL ein ganzes Kontinuum sehr ähnlicher und übergangslos auseinander hervorgehender Suchmuster. Sind frühe Formen dieser Suchstrategie durch breit gefächerte, repetitiv zirkuläre oder meandernde Schwimmpfade charakterisiert, welche zunächst nur grob auf die Position der Zielplattform ausgerichtet sind, treten nach und nach vermehrt eindeutig und z.T. direkt auf das Ziel ausgerichtete Muster auf. Diese unterscheiden sich von den sehr strikt definierten Strategien FOCAL SEARCH und DIRECT SWIMMING insbesondere hinsichtlich ihrer geringeren räumlichen Präzision und damit ihrer geringeren Gesamteffizienz. Gestützt wird die Vorstellung einer zumindest direktionalen Präferenz durch eine Kontinuität des Phänomens auch bei der Verwendung wechselnder Startpositionen. Die Richtung zum Ziel kann somit offenbar flexibel für beliebige Startpositionen ermittelt werden, was ein eindeutiges Merkmal einer hippocampusabhängigen allozentrischen Repräsentation der Umwelt darstellt.

Focal search

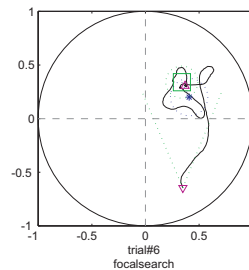


Abbildung 3.7: Beispiel für focal search

Schwimmen die Tiere auf einem direkten Weg in die unmittelbare Nähe der Zielplattform, um dann dort eine in der Regel nach kurzer Zeit erfolgreiche, lokal eng begrenzte Suche nach dem Ziel zu beginnen, liegt als Suchstrategie FOCAL SEARCH vor. Grundsätzlich kann sie als zur Familie der DIRECTED SEARCH PRESENT GOAL Strategien zugehörig angesehen werden, jedoch rechtfertigt das häufige Auftreten als distinktes Suchmuster die Deklaration einer eigenständigen Strategie. Als wichtigstes Unterscheidungsmerkmal gegenüber der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Strategie kann die Gestalt des Schwimmpfades aufgefasst werden, welcher das Tier in die unmittelbare Nähe der Zielplattform führt. Dieser muss ohne wesentliche Umwege zum Zielgebiet verlaufen, um die Bedingungen für das Vorliegen einer FOCAL SEARCH Strategie hinreichend zu erfüllen. FOCAL SEARCH ist aufgrund des Vorliegens starker gerichteter und räumlicher Präferenzen eindeutig von einem intakten Hippokampus abhängig. Die Startposition hat keinen Einfluss auf die fokale Suche.

Direct swimming

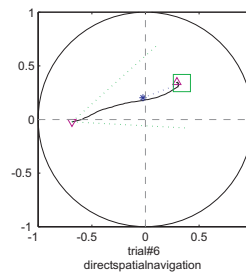


Abbildung 3.8: Beispiel für direct swimming

Die effizienteste aller in der MWM möglichen Suchstrategien ist das DIRECT SWIMMING. Kennzeichnendes Merkmal ist das direkte und präzise Ansteuern der Zielplattform von jeder beliebigen Startposition (Abb. 3.9). Ein solches Verhalten ist nur unter Zuhilfenahme einer hinreichend präzisen, allozentrischen Repräsentation der Umwelt möglich und damit als klar hippocampusabhängig zu bezeichnen. Läsionsstudien haben die Konsequenzen selbst lokal eng begrenzter hippocampaler Läsionen für das DIRECT SWIMMING dokumentiert [Brandeis et al., 1989]. Hinsichtlich des Erreichens dieser räumlichen Präzision treten unter den Versuchstieren z.T. beträchtliche Variabilitäten auf: ca. 80 % aller Tiere wenden auch nach drei Versuchstagen mit jeweils sechs Versuchen keine DIRECT SWIMMING Strategie an. Andere Tiere (<2 %) schwimmen bereits innerhalb des ersten Tages direkt zum Ziel.

Directed search previous goal

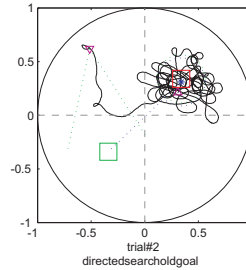


Abbildung 3.9: Beispiel für directed search previous goal

Wird im Rahmen eines Versuches die Plattformposition geändert oder diese gar entfernt, zeigen die Tiere in der MWM zunächst eine starke Präferenz für die zuvor erlernte Position. Nach einem zumeist sehr präzisen Ansteuern der vermeintlichen Zielplattform beginnen sie in einem räumlich eng begrenzten Bereich mit einer aktiven Suche, in deren Verlauf sich das Suchgebiet stetig erweitert. Auf diese Weise entsteht ein dem FOCAL SEARCH sehr ähnlicher Phänotyp, welcher jedoch durch die rigiden Kriterien dieser Strategie nicht verlässlich erfasst werden kann. Daher wird hier der Begriff einer auf das vorherige Ziel ausgerichteten Suche eingeführt. Sie tritt per definitionem nur nach dem Erlernen einer Plattformposition auf und wird innerhalb weniger Versuche (1-2) zumeist durch die SCANNING Strategie ersetzt. Es sind jedoch auch unmittelbare Übergänge zu DIRECTED SEARCH ACTUAL GOAL Strategien möglich.

nicht-pathologische Circling Strategien

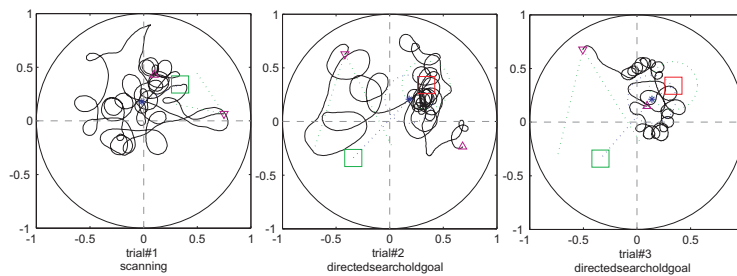


Abbildung 3.10: Beispiele für nicht-pathologische circling Strategien

Wie bereits oben für das CHAINING erwähnt, zeigen vereinzelte Tiere eine erhöhte Tendenz zu kreisförmigen Schwimmbewegungen. Diese unterscheiden

sich von dem unten beschriebenen PATHOLOGICAL CIRCLING vor allem darin, dass sie nicht als ausschließliche, völlig aus dem Kontext der Lernaufgabe herausgelöste Schwimmuster auftreten, sondern entweder andere Strategien überlagern oder diese ergänzen. Die exakte Bedeutung sowie die Grundlagen dieser Phänotypen verbleiben rein spekulativ. Eine Klassifikation durch den unten beschriebenen Algorithmus war in diesen Fällen aufgrund der eindeutig vorliegenden Grundmuster zumeist dennoch erfolgreich. Insgesamt traten nicht-pathologische CIRCLING Strategien in der vorliegenden Studie nur sehr selten auf ($< 2\%$ in 4320 Versuchen).

Floating und pathologisches Circling

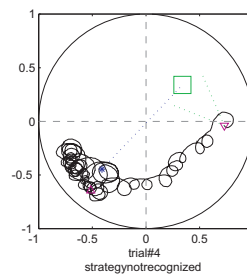


Abbildung 3.11: **Beispiel für pathological circling**

Verletzte, kranke, motorisch oder sensorisch beeinträchtigte Tiere tendieren entweder dazu, regungslos im Wasser zu treiben und nur eine sehr geringe Eigenaktivität zu zeigen oder sich durch das hochfrequente wiederholte Schwimmen enger Kreise ungerichtet durch das Wasser zu bewegen [Brandeis et al., 1989]. Ein solches Verhalten ist nicht Teil des von einem intakten Tier in der MWM gezeigten Verhaltensrepertoires. Tritt ein solcher Phänotyp auf, müssen die entsprechenden Tiere gegebenenfalls aus der Analyse ausgeschlossen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Muster jedoch nicht beobachtet.

Praxis- und Pfadintegrationsstrategien

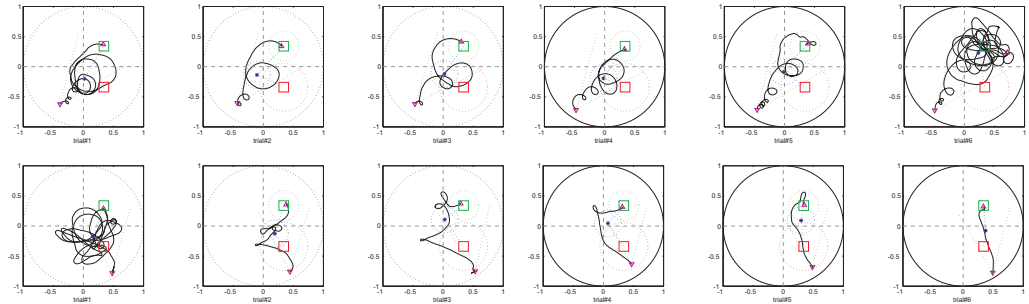


Abbildung 3.12: Beispiele für Praxisstrategien und Pfadintegration
(**obere Reihe**) Praxisstrategien führen niemals direkt zum Ziel und zeigen eine nur geringe Variation ihrer Grundform. (**untere Reihe**) Pfadintegrationsstrategien gehen häufig aus Praxisstrategien hervor und zeichnen sich durch eine stetig zunehmende Präzision hinsichtlich einer direkten Ansteuerung des Ziels aus. In späten Phasen ist eine eindeutige Differenzierung von der DIRECT SWIMMING Strategie nicht möglich.

Neben den hippocampusabhängigen räumlichen Suchstrategien existieren weitere Möglichkeiten für die getesteten Tiere den MWM-Test erfolgreich zu erlernen. Insbesondere nach mehreren Wiederholungen des Versuchs von einem gegebenen Startpunkt entwickeln manche Tiere die Strategie, eine immer gleiche Sequenz von Bewegungen auszuführen. In dem besonderen Fall stabiler Start- und Zielpunkte und unter den Bedingungen einer hinsichtlich ihrer Größe, insbesondere im Vergleich zu naturalistischen Umgebungen, begrenzten MWM-Arena ist eine solche PRAXIS Strategie ebenso effizient wie die kognitiv wesentlich anspruchsvolleren räumlichen Suchstrategien.

PRAXIS Strategien führen in der Regel nicht direkt von der Startposition zur Zielplattform. Über mehrere Versuchsdurchgänge hinweg nimmt jedoch die Präzision, mit welcher der geschwommene Pfad direkt ohne Umwege zum Ziel führt, systematisch zu: Der gewählte Weg nimmt schrittweise an Direktheit zu, die Tiere integrieren den bis dahin gewundenen Pfad und wählen den direkten Weg. Auch diese, als Pfadintegration bezeichnete Strategie, ist hippocampusunabhängig, kann jedoch unter den Bedingungen der MWM durchaus effektiv sein. In der hier dargestellten Studie wurden PRAXIS- und aus diesen hervorgehende Pfadintegrationsstrategien nur in späten Versuchsphasen vereinzelt beobachtet (<1 % in 4320 Versuchen).

3.11 Klassifikationsalgorithmus

Eine allgemeine Beschreibung des für die rechnergestützte Klassifikation erstellten Klassifikationsalgorithmus und seiner Intention findet sich im Resultateteil in Abschnitt 4.13. Es folgt eine detaillierte Beschreibung aller für die Anwendung des Algorithmus erforderlichen Operationen und Konzepte. Sie stellen ebenso Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dar wie die durch Anwendung der automatisierten Klassifikation erhobenen Daten. Aufgrund der inhaltlichen Nähe zu den zuvor diskutierten Suchstrategien und ihres eher technischen Charakters wird die Implementation in ihren Einzelheiten hier im Methodenteil dargestellt.

Datenakquise

Im Verlauf eines Experiments wurden die räumlichen Koordinaten eines jeweiligen Tieres in der MWM über eine CCD-Kamera aufgezeichnet und die Koordinaten in ihrer zeitlichen Reihenfolge als sog. *track-file* gespeichert (Ethovision, Noldus, NL). Ein solcher Datensatz enthält neben den Positionsinformationen auch alle Angaben zur Identität des getesteten Tieres, zur Versuchsnummer, die aktuell gültige Position der Zielplattform sowie eventuell durch den Experimentator eingegebene Kommentare. Darüberhinaus finden sich auch solche Daten, welche standardmäßig von Ethovision als Bestandteil eines Trackfiles angesehen werden, jedoch für den weiteren Ablauf der algorithmusbasierten Klassifikation nicht von Bedeutung sind.

Die weitere Verarbeitung der Daten erfolgte mit der Public-Domain Software Wintrack. Das Importieren der Trackfiles in Wintrack erledigt dessen Import-Funktion, wobei die besonderen Nomenklaturspezifikationen des Programms beachtet werden müssen. Die Gruppierung und Sortierung der eingelesenen Schwimmpfaddaten in der Reihenfolge ansteigender Versuchsnummern geschieht in Wintrack automatisch. Abschließend wird für jedes Tier ein sog. *case-document* erzeugt, in welchem sich die Daten aller Versuche eines jeweiligen Tieres befinden. Ein case-document bildet die Grundlage für die weitere Prozessierung der MWM-Daten in Wintrack.

Bevor mit der eigentlichen Datenanalyse begonnen werden kann, müssen dem Programm genaue Angaben zum Versuchsaufbau (Pool-Dimensionen, Plattformpositionen, etc...), zur Versuchsdauer und zum Analysemodus übergeben werden. Durch die Nutzung der Automatisierungsfunktion in Wintrack können sämtliche Analyseschritte durch den Aufruf eines einzigen benutzerdefinierten Skripts schnell und zuverlässig auch ohne weitere Nutzerinteraktion durchgeführt werden.

Wintrack besitzt eine umfangreiche Sammlung vordefinierter Analysevariablen, welche, mit Ausnahme der ausschließlich für die Verwendung einer Barnesmaze vorgesehenen Variablen, vollständig berechnet wurden.

Datenaufbereitung

Für eine systematische Analyse des Schwimmverhaltens erschien eine Aufteilung des MWM-Pools in diverse Zonen sinnvoll (Abb. 3.14). Diese erfolgt im Sinne einer universalen Anwendbarkeit unabhängig von den absoluten Dimensionen des jeweils verwendeten Versuchsaufbaus. Der Zoneneinteilung liegt eine Abstraktion der im Kontext der Strategiedefinitionen (Abbschnitt 3.10.2) auftretenden Verhaltensmuster hinsichtlich der Nutzung verschiedener Poolbereiche zugrunde.

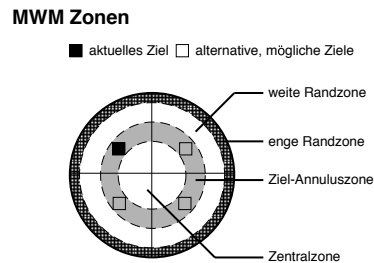


Abbildung 3.13: **Aufteilung des MWM Pools in Zonen**

Die Aufteilung der MWM Arena in verschiedenen Zonen erfolgt vor dem theoretischen Hintergrund der Strategiedefinitionen und ist von den absoluten Dimensionen des Pools unabhängig.

Die folgende Tabelle enthält eine Übersicht aller verwendeten Zonen, ihrer relativen Positionen, Dimensionen, sowie der von ihnen abgedeckten Wasseroberfläche (Tab. 3.1).

Zonenidentität	relative Position	Dimension (abs.)	Fläche (rel.)
MWM Arena	kreisförmig	d=1,89m; A=2,8cm	100%
nahe Randzone	ringförmig, parallel zur Seitenwand	Breite=15cm	28,9%
weite Randzone	ringförmig, parallel zur Seitenwand	Breite=37cm	62,9%
Annuluszone	ringförmig, Abstand zu Seitenwänden wie Zielplattform	Breite=16cm	17,9%
innere Zone	kreisförmig, Mittelpunkt ist Ursprung des Pools	r=41,5cm	19,3%
aktuelle Zielplattform	quadratisch, im Zentrum des jeweiligen Quadranten	16 x 16cm	0,9%
vorige Zielplattform	wie aktuelle Zielplattform	16 x 16cm	0,9%
1. alternative Zielplattform	wie aktuelle Zielplattform	16 x 16cm	0,9%
2. alternative Zielplattform	wie aktuelle Zielplattform	16 x 16cm	0,9%
Nord-Ost- Quadrant	Teilkreis (90°), Ursprung wie MWM Pool	$\alpha=90^\circ$; r=0,945m	25%
Süd-Ost- Quadrant	Teilkreis (90°), Ursprung wie MWM Pool	$\alpha=90^\circ$; r=0,945m	25%
Süd-West- Quadrant	Teilkreis (90°), Ursprung wie MWM Pool	$\alpha=90^\circ$; r=0,945m	25%
Nord-West- Quadrant	Teilkreis (90°), Ursprung wie MWM Pool	$\alpha=90^\circ$; r=0,945m	25%

Tabelle 3.1: Übersicht der im Rahmen des Analyseprozesses für den MWM Pool verwendeten Zonendefinitionen

Mit Hilfe eines benutzerdefinierten Analyseskripts wird für jeden Datenpunkt die jeweilige Zonen-Identität ermittelt. So kann im weiteren Verlauf berechnet werden, wie lange sich ein Tier in einer bestimmten Zone aufgehalten hat. Diese Informationen werden im Verlauf des Klassifikationsprozesses weiter genutzt.

Für die Beurteilung des Entstehens räumlicher Präferenzen im Verhalten der getesteten Tiere stellte die intuitive, farbkodierte Darstellung der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten in einem Okkupationsplot ein äußerst nützliches Konzept dar. Hierzu wird die gesamte Pooloberfläche mit einem Gitternetz (Kantenlänge 10 cm) überzogen (Abb. 3.15). Für die in der vorliegenden Studie benutzte MWM ergeben sich so 276 Gitterquadrate, welche im Folgenden als Sektoren bezeichnet werden. Ein weiteres benutzerdefiniertes Analyseskript ermittelt für jeden Datenpunkt die zugehörige Sektor-Identität. So kann bestimmt werden,

wie häufig sich ein Tier in einem bestimmten Sektor des MWM-Pools aufhielt.

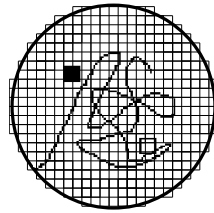


Abbildung 3.14: Aufteilung des MWM Pools in Sektoren

Die MWM Arena wird in 276 quadratische Sektoren mit einer Kantenlänge von 10 cm aufgeteilt.

Implementation des Klassifikationsalgorithmus in Matlab

Der Klassifikationsalgorithmus ist Teil eines umfangreicheren Matlabprogrammes, welches auch alle notwendigen Vorberechnungen durchführt und darüber hinaus eine graphische Benutzeroberfläche für die Optionswahl, Bedienung und Ausgabe zur Verfügung stellt. Dieses Programm wurde von mir im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelt und angewendet.

Aus Gründen der einfachen Validierung der vom Computer getroffenen Klassifikationen werden die Schwimmpfade jedes Versuchs bei der Ausgabe des Klassifikationsergebnisses graphisch repräsentiert (Abb. 3.16). Zu den grundlegenden Elementen des MWM-Aufbaus werden, im Kontext der getroffenen Klassifikationsentscheidung relevante, zusätzliche Informationen wie Schwerpunkte, Radien und Zielkorridore angezeigt, welche die Validierung durch den Benutzer in Grenzfällen erleichtern. Grundlage dieser Darstellungen sind die im Laufe des MWM-Experiments aufgezeichneten xy -Koordinaten, welche jeweils für einen Versuch in einem normalisiertes Koordinatensystem (MWM-Radius=1) geplottet werden. Auf potentiell repetitiv auftretende Praxisstrategien wird lediglich hingewiesen, da eine eindeutige Klassifikation dieser speziellen Suchmuster noch nicht ausreichend reliabel implementiert werden kann. Die Entscheidung obliegt in solchen Fällen dem Betrachter.

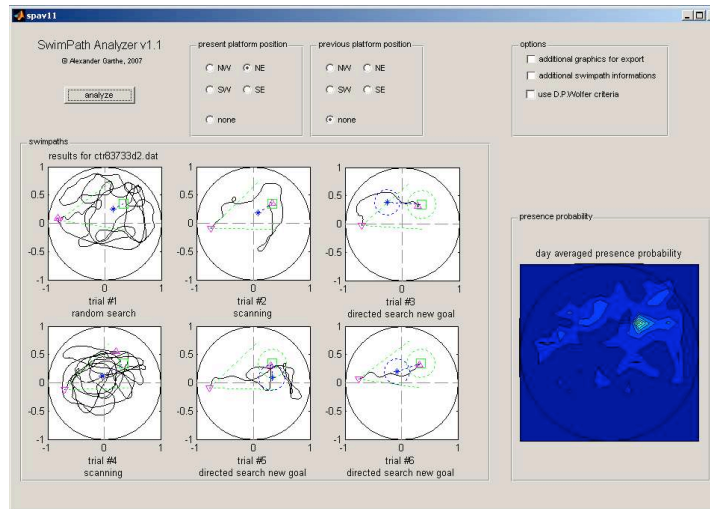


Abbildung 3.15: In Matlab implementierten Analysesoftware

Auf der Grundlage der zeitpunktmarkierten xy-Koordinaten und der in Wintrack berechneten Variablen erfolgen weiterführende Kalkulationen sowie der eigentlich Klassifizierungsprozess im Rahmen einer Matlab-Routine. Das Erstellen des Okkupationsplots erfolgt ebenfalls im Rahmen dieser Routine. Für die Auswahl des jeweiligen Datensatzes, der aktuellen und vorherigen Zielposition wird eine Benutzeroberfläche mit graphischer Ausgabe zur Verfügung gestellt.

Die zeitlich geordneten xy-Koordinaten werden in vielfältiger Weise für den eigentlichen Klassifikationsprozess genutzt. Z.T. geschieht dies indirekt über bereits in Wintrack berechnete Variablen, jedoch meist direkt unter Verwendung in Matlab implementierter Routinen.

Eine Differenzierung der einfachen, nicht-räumlichen Suchstrategien erfolgt u.a. aufgrund der überstrichenen Pooloberfläche. Die von einem Tier im Verlauf eines Versuchs überstrichene Fläche kann sinnvoll nur approximativ ermittelt werden. Hierzu werden zunächst die Minima und Maxima der xy-Koordinaten aller Datenpunkte eines jeweiligen Versuchs ermittelt. Ausgehend vom Abstand zwischen den Minima und Maxima der x- und y-Koordinaten (dx und dy) wird ein Ellipsoid konstruiert, dessen Fläche eindeutig berechnet werden kann (Abb. 3.17). Die Fläche des Ellipsoids approximiert in guter Weise die durch den Schwimmpfad überstrichene Pooloberfläche.

Die Vorteile der Verwendung dieser Strategie bestehen darin, dass die maximale Fläche des Ellipsoids niemals größer als die Oberfläche des Pools werden kann und der Approximationsfehler lediglich bei solchen Schwimmpfadformen bedeutsam wird, bei denen die überstrichene Pooloberfläche als Klassifikationsparameter nicht relevant ist.

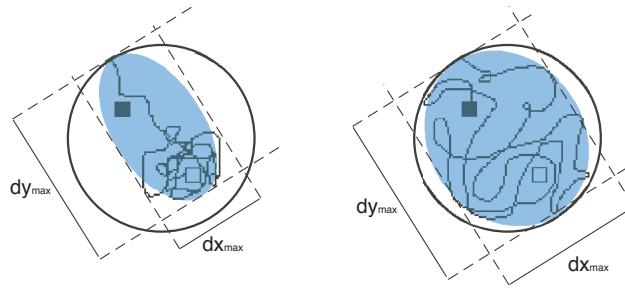


Abbildung 3.16: Approximation der überstrichenen Pooloberfläche

Die von den Tieren abgesuchte Pooloberfläche kann nur approximiert werden. Dies erfolgt durch die Konstruktion eines Ellipsoids, basierend auf den maximalen rechtwinklig stehenden Abständen.

Räumliche Strategien sind anfänglich nur wenig präzise, lassen jedoch eine klare Ausrichtung der Suche in Richtung der Zielplattform erkennen. Häufig treten mäandernde, zirkuläre oder fächerartige Suchmuster auf, welche i. d. R. stets beim ersten Annäherungsversuch mit dem Erreichen der Plattform abgeschlossen werden (Abb. 3.18 links). Um festzustellen, ob ein bestimmter Datenpunkt innerhalb eines fächerförmigen und auf die Zielplattform ausgerichteten Korridors liegt, sind eine Reihe verschiedener Berechnungen notwendig, in deren Verlauf zunächst der Fächer (mit Ursprung im Startpunkt des Tieres) konstruiert und auf das jeweilige Ziel ausgerichtet wird (Abb. 3.18 mitte). Der durch den Fächer eingeschlossene Winkel kann frei gewählt werden.

Nach einer Drehung des gesamten Koordinatensystems mit dem Zentrum im Startpunkt P_1 um den Winkel γ befindet sich die Zielposition P_2 senkrecht über P_1 (γ wird mit Hilfe des Kosinussatzes bestimmt). Nun wird die Steigung der den Fächer bildenden Geraden ermittelt und so eine einfache Funktion gebildet, mit deren Hilfe für jede x -Koordinate ein dazugehöriger y -Wert berechnet werden kann. Ein Vergleich des so für eine gegebene x -Koordinate berechneten y -Wertes mit der y -Koordinate des jeweiligen Datenpunktes an derselben x -Position ermöglicht eine eindeutige Bestimmung der Lage des Datenpunktes innerhalb oder außerhalb des zuvor konstruierten Fächers (Abb. 3.18 rechts).

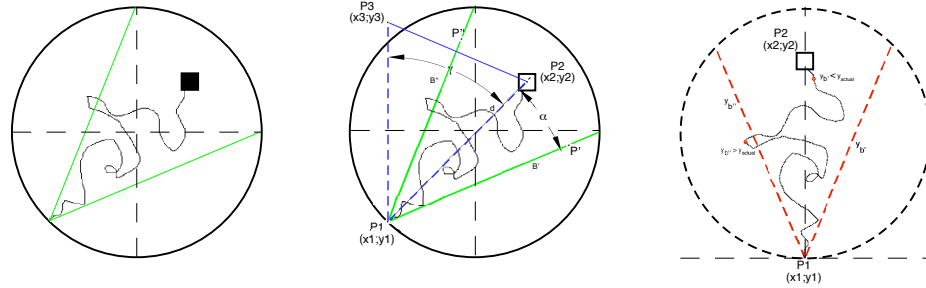


Abbildung 3.17: Lage von Punkten in einem Zielkorridor

Die Bestimmung der Lage von Wegpunkten relativ zu einem vom Startpunkt auf das Ziel ausgerichteten Korridor erfordert zunächst die Konstruktion des Korridors, eine anschließende Drehung des Schwimmpfades sowie weitere geometrische Berechnungen.

Die Größe des von dem Fächer eingeschlossenen Winkels kann vor Beginn der Analyse frei gewählt werden, jedoch hat sich für alle im Rahmen der vorliegenden Studie durchgeführten Experimente ein Winkel von 40° ($\alpha=20^\circ$) als geeignet erwiesen. Liegen mehr als 80% des Schwimmpfades eines Versuchs innerhalb des vom Startpunkt zur Zielplattform ausgerichteten Fächers, handelt es sich um eine gerichtete Suchstrategie.

Spätere und wesentlich präzisere räumliche Suchmuster zeichnen sich durch ein direktes Anschwimmen der Plattform oder deren unmittelbaren Nachbarschaft aus, so daß die Suche in einem räumlich eng begrenzten Areal stattfindet. Der Schwerpunkt eines als Punktwolke aufgefassten Schwimmpfades mit n Datenpunkten erwies sich für die Beschreibung einer räumlich eng begrenzten Suche besonders dann als geeignet, wenn die exakte Form des Suchmusters unvorhersehbar ist. Als weitere Größen werden der durchschnittliche Abstand aller Punkte eines Versuchs zum Schwerpunkt (dtPOG), zum Mittelpunkt des MWM Pools (dtCENTER), zur aktuellen (dtGOAL) und zur vorherigen Zielposition (dtoldGOAL) bestimmt.

Durch die verschiedenen Abstandsgrößen werden mehrere Radii konstruiert, welche sich überschneiden können. Eine fokale Suche liegt vor, wenn der durchschnittliche Abstand aller Punkte des Suchpfades zum Schwerpunkt (dtPoG) weniger als $0,35$ SE und zur Zielplattform (dtGOAL) weniger als $0,3$ SE beträgt (Abb. 3.19). Eine Standardeinheit (SE) entspricht $\frac{1}{2}d_{\text{Pool}}=94,5$ cm.

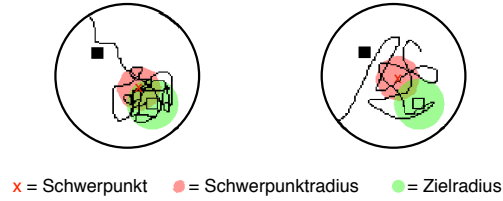


Abbildung 3.18: **Bedeutung des Schwimmpfad-Schwerpunktes**

Für den Klassifikationsprozess sind definierte Radien um den Schwer- und Zielpunkt (rot und grün dargestellt) von Bedeutung. Links die Situation einer großen Überlappung beider Radien im Falle einer FOCAL SEARCH. Rechts eine nur geringe Überlappung für eine SCANNING Strategie.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war eine detaillierte Analyse des von D.P.Wolfer in Wintrack verwendeten Quellcodes nicht möglich, jedoch soll die Bedeutung der in dem hier implementierten Algorithmus genutzten vordefinierten Wintrack-Variablen kurz dargestellt werden:

Der kumulative Suchfehler (*cumulative search error, cse*) beschreibt die Differenz zwischen der tatsächlichen kumulativen Distanz und der minimalen kumulativen Distanz. Die tatsächliche kumulative Distanz wird durch die Multiplikation des durchschnittlichen Abstands zum Ziel (*dtGOAL*) mit der zum Erreichen des Ziels benötigten Zeit berechnet, wobei Phasen der Immobilität nicht berücksichtigt werden. Als Einheit wird folglich [m·s] benutzt. Zur Berechnung der minimalen kumulativen Distanz wird das Quadrat der Länge einer direkten Verbindung des Start- mit dem Zielpunkt durch die doppelte durchschnittliche Schwimmggeschwindigkeit geteilt:

$$cse = cd_{actual} - cd_{min}$$

$$cd_{actual} = dtGOAL_{actual} \cdot t_{trial}$$

$$cd_{min} = \frac{dtGOAL_{min}}{2v_{trial}}$$

Somit gilt: Je kleiner der kumulative Suchfehler, desto effektiver ist die genutzte Suchstrategie. Senkrecht zur Zielrichtung verlaufende Bewegungen haben einen erheblichen Einfluss auf die Größe des kumulativen Suchfehlers, weshalb nur absolut geradlinig verlaufende Schwimmpfade in einem kleinen *cse* resultieren. Ergänzend wird daher zur Differenzierung effektiver Strategien zudem der durchschnittliche, absolute Richtungsfehler (*average absolute heading error, aer*) herangezogen. Diese Größe gibt die durchschnittliche Abweichung der Bewegungsrichtung von der direkten Zielrichtung von allen Datenpunkten in [°] an und ist somit auch für die Beschreibung weniger präziser und direkter Schwimmpfade geeignet. Die Kombination der Variablen *cse* und *aer* hat

sich zur Differenzierung effektiver und präziser Suchstrategien bei gleichzeitiger Tolerabilität gegenüber individuellen Schwankungen bewährt.

Zwei weitere vordefinierte Variablen aus Wintrack werden für den Klassifikationsprozess genutzt, unterscheiden sich jedoch von den beiden zuvor genannten durch ihre Eigenschaft als Zonendefinitionen. Analog zu den benutzerdefinierten Zonen geben die Variablen *ctm* (*center zone*) und *wtm* (*wider wallzone*) an, wie häufig sich ein Tier in einer der genannten Zonen aufgehalten hat.

Die Detektion redundanter Suchmuster im Kontext von Praxis- und Pfadintegrationsstrategien erfolgt nach der Glättung des Schwimmpfades, bei der aus jeweils 25 Datenpunkten ein gleitender Mittelwert gebildet wird. Diese werden für alle Versuche eines Tieres pro Tag verglichen und so eine eventuelle Ähnlichkeit des Suchmusters festgestellt. Der Algorithmus weist jedoch nur auf die Möglichkeit des Vorliegens einer Praxisstrategie hin, die entgültige Entscheidung obliegt jedoch dem Benutzer.

3.12 Konvolutionsanalyse

Häufig ist eine direkte Messung einer Variable X experimentell nicht möglich, da X nur in Verbindung mit einer Variable Y erfasst werden kann. In der vorliegenden Studie wurde die Leistungsfähigkeit eines Tieres in der MWM durch die Größe "Schwimmpfadlänge" ($=U$) und der dazugehörigen Funktion $g(u)$ beschrieben. Sie korreliert eng mit der für das Erreichen der Zielplattform benötigten Latenzzeit und wurde durch das Auftreten unterschiedlicher Translationsgeschwindigkeiten nicht beeinflusst. Bei genauerer Betrachtung erwiesen sich jedoch vor dem Hintergrund qualitativ differenzierter Suchmuster zweierlei Faktoren als kausal bestimmend hinsichtlich der zeitlichen Entwicklung der jeweils betrachteten Schwimmpfadlänge: 1. Die Qualität der Anwendung eines spezifischen Suchmusters, beschrieben durch die Funktion $q(y)$ und 2. die Effektivität des Wechsels von einem weniger effizienten zu einem effizienteren Suchmuster, beschrieben durch die Funktion $f(x)$. Daraus folgt:

$$g(u) = (f * q)(u) \wedge u = x + y$$

Will man nun den tatsächlichen relativen Einfluss einer Funktion auf $g(u)$ ermitteln, wird jeweils eine der Terme $f(x)$ oder $q(y)$ konstant gehalten, indem der Mittelwert von f bzw. q für alle Versuche des betrachteten Zeitrahmens

gebildet wird:

$$(f * q)(u) = \int_{t_1}^{t_i} f(x) \cdot q(u - x) dx \text{ (konstante Frequenz)}$$

$$\text{Beispiel : } g(u) = (f * q)(u) = \bar{f}_1 \cdot 123cm + \bar{f}_2 \cdot 103cm + \bar{f}_3 \cdot 76cm...$$

sowie

$$(f * q)(u) = \int_{t_1}^{t_i} f(u - y) \cdot q(y) dy \text{ (konstante Qualitaet)}$$

$$\text{Beispiel : } g(u) = (f * q)(u) = 0,2 \cdot \bar{q}_1 + 0,5 \cdot \bar{q}_2 + 0,3 \cdot \bar{q}_3...$$

Hieraus resultiert eine Prädiktion der Größe U unter der Annahme einer jeweils konstanten Frequenz in der Anwendung einer spezifischen Suchstrategie bzw. einer jeweils konstanten Qualität in der Anwendung der einzelnen Strategien.

Ein Vergleich der so vorhergesagten mit den tatsächlich gemessenen Werten erlaubte eine Beurteilung der relativen Kontribution einer Veränderung der Qualität in der Anwendung gegenüber einer Anpassung der Frequenz des Auftretens der verschiedenen Strategien zur tatsächlich beobachteten Lernleistung [Brody et al., 2006].

3.13 Experimentelles Design

In der vorliegenden Arbeit soll eine Prädiktion des Modells von [Wiskott et al., 2006] durch Anwendung des MWM Paradigmas überprüft werden. Nach dem weitestgehenden Ausschluss potentieller Nebenwirkungen der TMZ Applikation wird zunächst die Funktion der HCF in einer räumlichen Lernaufgabe bei gleichzeitigem Vorliegen einer pharmakologisch supprimierten adulten Neurogenese getestet. Darüber hinaus resultiert das Durchlaufen einer ersten Akquisitionsphase in der MMW in der Adaptation des Enkodiermechanismus im DG an eben diese spezifische Umweltsituation.

Die anschließende Verschiebung der Zielplattform entspricht einer signifikanten Veränderung bereits erlernter Stimuluskonfigurationen in der Umwelt des Organismus und realisiert so die im o.g. Modell betrachtete Situation, in der das Enkodiernetzwerk des DG zu einer effektiven Anpassung gezwungen wird (vergl. Abschnitt 2.2.5). Laut Hypothese ist hier abhängig von der jeweiligen Verfügbarkeit adult generierter Neurone ein unterschiedliches Verhalten der

TMZ behandelten Tiere und der Kontrollgruppe zu erwarten.

Um die spezifischen Unterschiede in der Reaktion der Tiere beider Gruppen auf die Veränderung der Stimuluskonfiguration beurteilen zu können, werden die MWM Daten einer quantitativen und qualitativen Analyse unterworfen. Eine Konvolutionsanalyse dient der Detektion möglicher Kompensationsmechanismen.

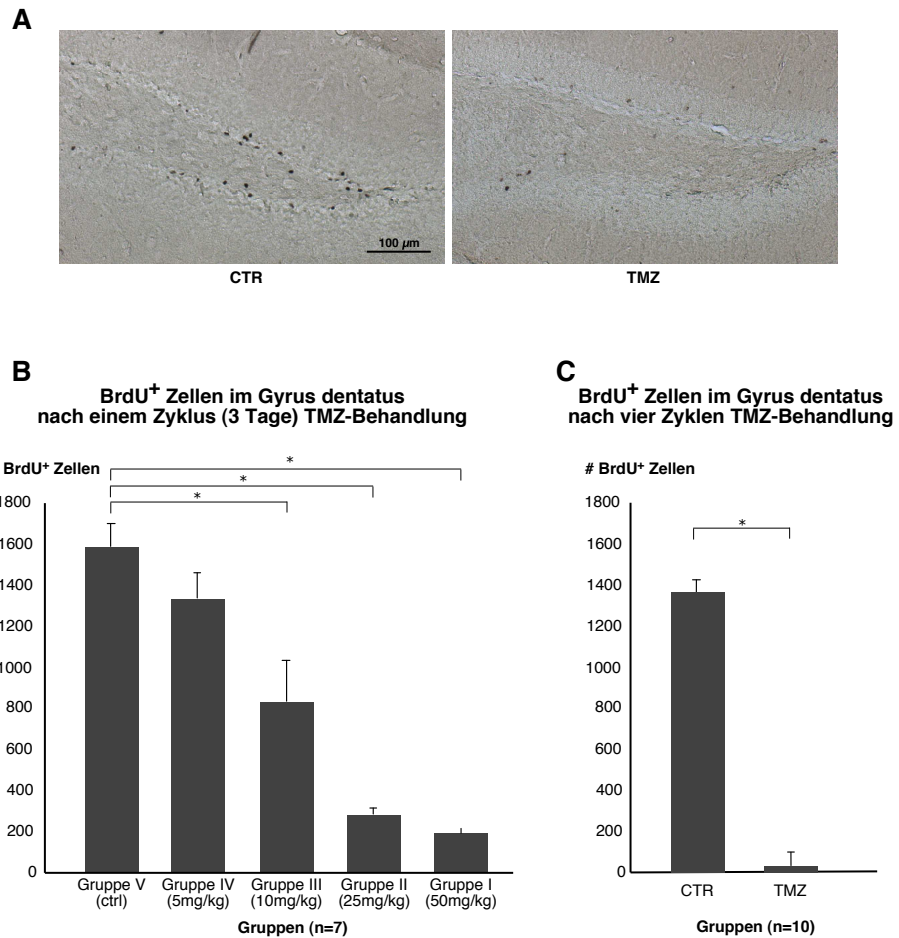
4 Ergebnisse

4.1 Effekte von Temozolomid auf die Zellproliferation im Gyrus dentatus

Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung von TMZ als pharmakologischem Ansatz zur Suppression adulter Neurogenese. Hierzu war zunächst die grundsätzliche Wirksamkeit der verwendeten Substanz zu demonstrieren sowie ein Dosisfindungsexperiment durchzuführen, um die minimale effektive Injektionsdosis für die folgenden Versuche zu ermitteln.

Abb. 4.1 A zeigt links eine große Anzahl adult generierter Zellen im DG der Kontrolltiere. Nach multizyklischer (vier Zyklen) TMZ-Behandlung mit 25 mg/kg KG zeigte sich die Anzahl BrdU⁺ Zellen als signifikant reduziert (Abb. 4.1. A rechts). Geringe Dosen TMZ (5 mg/kg und 10mg/kg) verringerten die Anzahl BrdU⁺ Zellen zwar signifikant ($p < 0,05$), jedoch betrug die tatsächliche Reduktion nur ca. 10% (5 mg/kg KG) bzw. ca. 50 % (10 mg/kg KG). Eine effektive Suppression (>80 %) trat erst nach der Applikation der 25 mg/kg KG Dosen ein ($p < 0,001$). Der suppressive Effekt des TMZ konnte auch durch eine Verdoppelung der jeweiligen Dosen nicht signifikant erhöht werden. Daher wurde im Sinne einer möglichst geringen Belastung der Versuchstiere für alle folgenden Experimente TMZ in Dosen von 25 mg/kg KG je Injektion verwendet (Abb. 4.1 B).

Im Verlauf einer multizyklischen Behandlung mit TMZ kam es zu einem (erwünschten) Kumulationseffekt: Obwohl jeweils vier Tage Rekonvaleszenz die Behandlungstage interkalierten, konnte sich das Zellproliferationsniveau bis zum Beginn einer neuen TMZ-Gabe nicht vollständig erholen. Nach insgesamt vier Applikationszyklen betrug die effektive Suppression mehr als 95 % (Abb. 4.1 C).



Effekt von TMZ auf die Zellproliferation

(A) Lichtmikroskopische Darstellung DAB gefärbter BrdU⁺ Zellen im DG un behandelter (links) und TMZ behandelter Tiere (rechts). (B und C) Anzahl BrdU⁺ Zellen im DG nach monozyklischer TMZ Behandlung mit fünf verschiedenen Dosen und nach vier Behandlungszyklen mit 25mg/kg KW TMZ.

Die systemische Applikation des Zytostatikums Temozolomid über vier Zyklen bei einer Dosis von 25mg/kg KW stellt somit einen effektiven Ansatz zur Suppression adulter Neurogenese im DG dar.

4.2 Effekte von Temozolomid auf Typ 1 und Typ 2 Zellen der Stammzellnische

Die Wirkung des TMZ entfaltet sich systemisch, daher ist die gesamte Stammzellnische in der SGZ betroffen. Um eine allgemeine Schädigung der in der SGZ vorhandenen Zellen und insbesondere der überlebenden Stamm- und Vorläuferzellen auszuschließen, wurde in transgenen Nestin-GFP Mäusen die Morphologie von Typ-1 und Typ-2a/b Zellen untersucht.

Die multizyklische TMZ-Behandlung resultierte in einer effektiven Suppression der Zellproliferation in der Körnerzellschicht. Die Morphologie überlebender Zellen, insbesondere der als Stammzellen vermuteten Typ-1 Zellen, erwies sich jedoch auch nach der TMZ-Applikation als unverändert (Abb. 4.2). Die charakteristischen, pyramidenförmigen Somata, sowie die in die äußere Körnerzellschicht hineinreichenden, apikalen Zellfortsätze konnten eindeutig identifiziert und als unverändert beschrieben werden.

Die sich schnell teilenden und ebenfalls Nestin⁺ Typ 2a/b Zellen (transit-amplifizierende Vorläuferzellen) werden aufgrund seines Wirkungsmechanismus von der Wirkung des TMZ in stärkerem Maße erfasst als die sich langsam teilende Population putativer Stammzellen (Typ-1). Typ 2a/b-Zellen konnten nach einer multizyklischen TMZ Applikation in den behandelten Tieren praktisch nicht mehr gefunden werden, besaßen jedoch auch eine im Vergleich zu den Kontrollen unveränderte Morphologie.

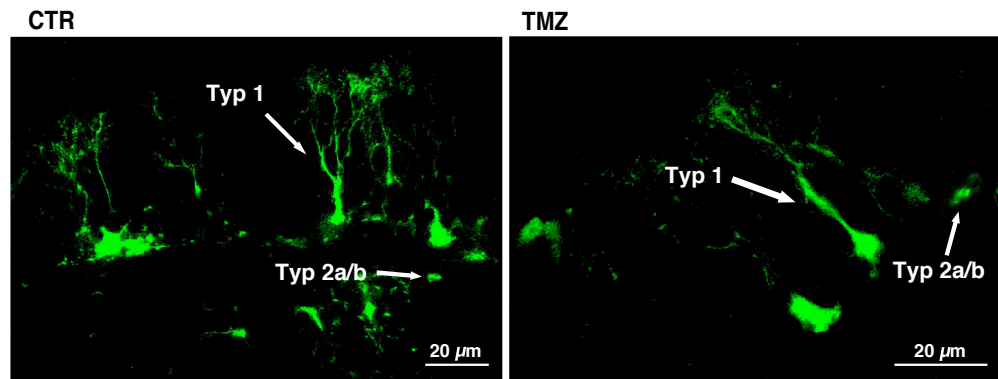


Abbildung 4.1: **Effekt von TMZ auf Nestin⁺ Zellen in der SGZ**

Die konfokalmikroskopischen Bilder zeigen Nestin⁺ Zellen in der SGZ nach einer Behandlung der Tiere mit vier Zyklen TMZ (25mg/kg KW). Typ 1 und 2a/b Zellen beider Gruppen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Soma- und Neuritenmorphologie nicht.

Wie bereits der rein histologischen Analyse zu entnehmen ist, fand in Folge der TMZ Applikation keine vollständige Eradikation Nestin⁺ Zellen in der SGZ statt. Die Anzahl Nestin⁺ Zellen im DG erschien jedoch nach einer multizyklischen TMZ-Behandlung signifikant geringer als in Kontrolltieren ($p < 0,05$; Abb. 4.3). Konsequenterweise wurden auch signifikant weniger DCX⁺ Zellen gefunden ($p < 0,05$).

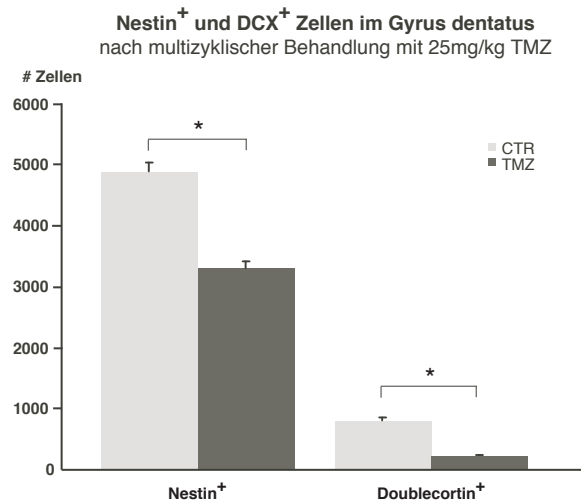


Abbildung 4.2: **Effekt von TMZ auf Nestin⁺ und DCX⁺ Zellen der SGZ**
Die Anzahl Nestin⁺ Zellen im DG ist nach erfolgter multizyklischer TMZ Behandlung mit 25mg/kg KW ist signifikant gegenüber der Kontrollgruppe reduziert. Dies gilt auch für die Anzahl DCX⁺ Zellen. Zu beachten ist die höhere antiproliferative Wirkung des TMZ gegen Zellen mit hoher Proliferationsrate (transitamplifizierende Vorläuferzellen).

Die systemische Applikation von TMZ resultiert also hinsichtlich der Morphologie der überlebenden Stamm- und Vorläuferzellen in der SGZ nicht in einer allgemeinen Schädigung. Fehlfunktionen des DG-Netzwerkes infolge der Anwesenheit pathologisch veränderter Körnerzellen erscheinen somit als unwahrscheinlich.

4.3 LTP in Gyrus dentatus und CA1

TMZ greift nicht in den Prozess der Proteinbiosynthese ein, weshalb eine direkte Beeinträchtigung des LTP-Induktionsprozesses nicht zu erwarten ist. Um dennoch eine Aussage hinsichtlich der funktionalen Eigenschaften der nach einer multizyklischen TMZ Behandlung in der SGZ verbleibenden Körnerzellen treffen zu können, wurde die Induzierbarkeit einer LTP im DG sowie in der Region CA1 untersucht.

Ohne Blockung des starken inhibitorischen Einflusses der Interneurone konnte in den Kontrolltieren eine moderate, aber stabile LTP beobachtet werden (Abb. 4.4). Das Feldpotential der exzitatorischen postsynaptischen Potentiale (fEPSP) betrug unmittelbar nach der hochfrequenten, präsynaptischen Stimulation des MPP (HFS, 4x 100 Hz) 175 % über der Grundlinie und stabilisierte sich nach 10 min bei 125 %.

Im DG behandelte Tiere mit supprimierter Neurogenese konnte durch Stimulation mit einer Folge von HFS keine signifikante LTP induziert werden.

Für die Zeit 40-60 min nach erfolgter Induktion erwies sich der Unterschied zwischen beiden Gruppen (n=5) als hochsignifikant ($p < 0,001$, ANOVA). Der Beitrag junger und plastischer Granulozyten verschwand also nach Ablation der Zellproliferation im DG der TMZ behandelten Tiere, was bereits von anderen Autoren beobachtet wurde [Saxe et al., 2006].

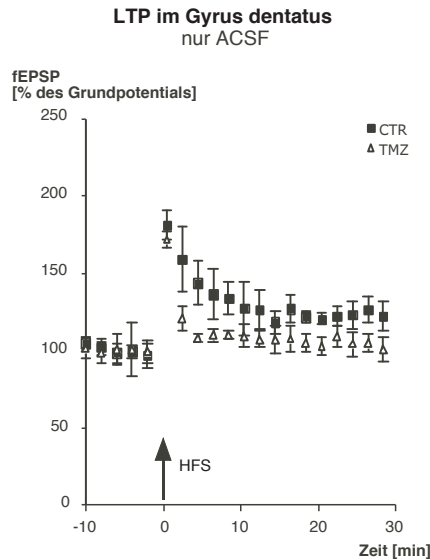


Abbildung 4.3: **MPP LTP im Gyrus dentatus nur ACSF**

Unter Perfusion des Gewebeschnitts mit ACSF unterliegen alle reifen Körnerzellen des DG einer starken, durch GABAerge Interneurone vermittelten Inhibition. Der Beitrag junger Granulozyten zum fEPSP ist in den behandelten Tieren gegenüber der Kontrollgruppe signifikant reduziert.

Bei Blockung inhibitorischer Einflüsse durch Perfusion des Gewebes mit ACSF und $5\mu\text{M}$ Bikukulin konnte bei beiden Gruppen eine starke LTP (ca. 180 % über dem Grundpotential) induziert werden, da nun auch die reifen Granulozyten beider Gruppen hierzu beitragen konnten (Abb. 4.5).

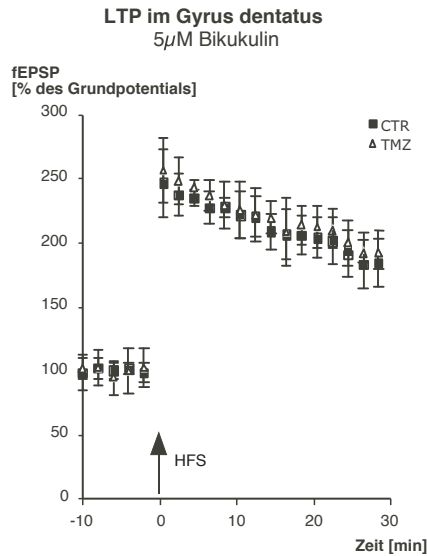


Abbildung 4.4: MPP LTP im Gyrus dentatus, 5 μ M Bikukulin

Die Aufhebung der GABAergen Inhibition durch Zusatz von Bikukulin ermöglicht den Beitrag aller reifen Granulozyten zum fEPSP. Aufgrund ihrer im Vergleich zu den jungen Zellen großen Anzahl resultiert deren Abwesenheit in den behandelten Tieren nicht in einem signifikanten Unterschied der Gruppen fEPSPs.

Bei beiden Gruppen wurde eine starke LTP (170 % über dem Grundpotential) in der Region CA1 beobachtet (Abb. 4.6).

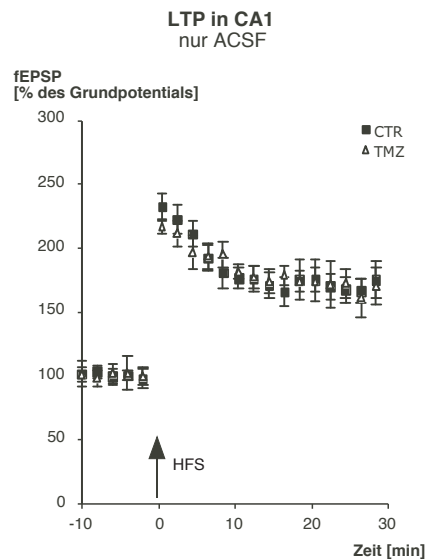


Abbildung 4.5: Schaffer-Kollateralen LTP in Region CA1

An den Synapsen der Schaffer-Kollateralen auf den Dendriten der CA1 Pyramidenzellen ist eine robuste LTP in Tieren beider Gruppen induzierbar.

Die Applikation des DNA-methylierenden TMZ nimmt somit wie erwartet

keinen negativen Einfluss auf die grundsätzliche Induzierbarkeit einer LTP im DG oder der Region CA1. Eine verminderte LTP-Induzierbarkeit in den behandelten Tieren ohne gleichzeitige Blockung inhibitorischer Einflüsse durch Bikukulin kann auf das Fehlen des Beitrages adult generierter plastischer Neurone zurückgeführt werden und wurde auch unter Verwendung alternativer Paradigmen zur Ablation adulter Neurogenese beobachtet [Saxe et al., 2006].

4.4 Effekte von TMZ auf die Mikrogliazellen im DG

Die Bestrahlung der HCF ist ein etablierter Ansatz zur vollständigen Ablation teilungsaktiver Zellen in der SGZ. Hiermit verbunden ist jedoch stets das Auftreten eines Entzündungsprozesses, in dessen Folge die gesamte Stammzellnische über einen weit über die akute Bestrahlung hinausgehenden Zeitraum geschädigt wird [Monje et al., 2003]. Bei einer späteren Interpretation funktionaler Effekte einer Ablation adulter Neurogenese ist eine präzise Differenzierung zwischen spezifisch auf das akute Fehlen junger Granulozyten oder aber auf weiterreichenderen allgemeinen Schädigungen des DG Netzwerkes beruhenden Veränderungen nicht möglich. Das Auftreten einer Entzündungsreaktion in Folge einer multizyklischen TMZ Applikation war daher nach Möglichkeit auszuschließen.

In ihrer Größe und Form unterschieden sich die in behandelten Tieren beobachteten Iba-1⁺ Mikroglia nicht von denen der Kontrollgruppe (Abb. 4.7).

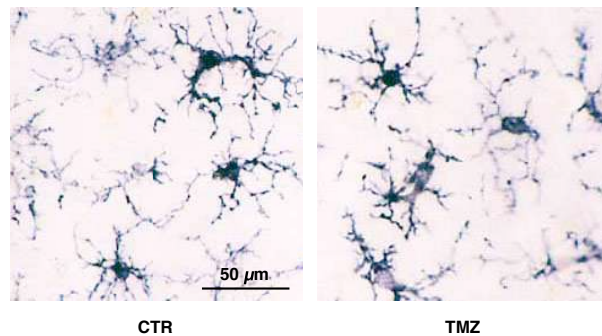
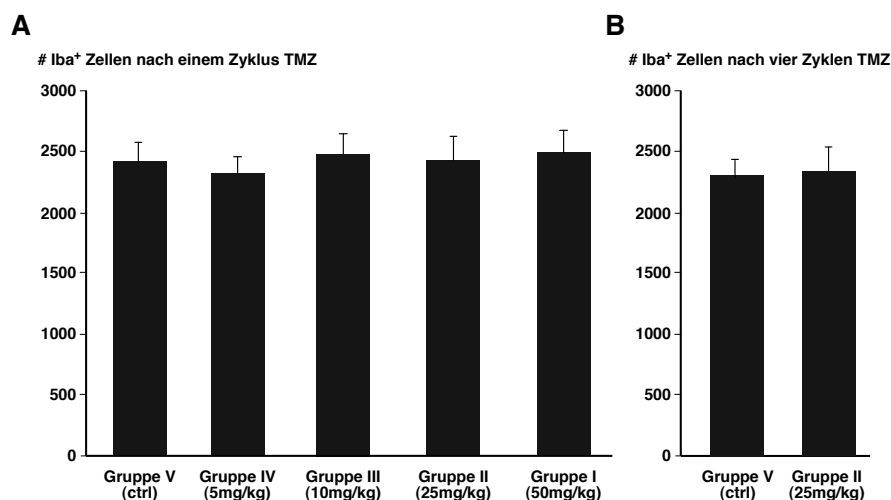


Abbildung 4.6: **Effekt von TMZ auf die Morphologie von Mikrogliazellen**
Die lichtmikroskopische Darstellung von Iba-1⁺ Mikroglia zeigt hinsichtlich der Größe und Komplexität der Zellfortsätze keine morphologischen Unterschiede zwischen den CTR (rechts) und TMZ Tieren (links).

Auch quantitativ wurden keinerlei signifikante Unterschiede sowohl nach einer monozyklischen als auch nach einer multizyklischen TMZ-Applikation beobachtet (Abb. 4.8 A und B).

Iba-1⁺ Zellen im Gyrus dentatus



Effekt von TMZ auf die Anzahl von Mikrogliazellen

(A) Anzahl Iba-1⁺ Zellen nach monozyklischer Applikation fünf verschiedener Dosen TMZ. (B) Anzahl Iba-1⁺ Zellen nach multizyklischen Applikation mit 25mg/kg KW TMZ. Es treten in keinem Fall signifikanten Gruppenunterschiede auf.

Das Auftreten einer Entzündungsreaktion in Folge einer multizyklischen TMZ Applikation ist somit auszuschliessen. Veränderungen der Netzwerkfunktion aufgrund einer allgemeinen Schädigung des DG und der Stammzellnische treten nicht auf, was einen erheblichen Vorteil gegenüber der Verwendung ionisierender Strahlung zur Ablation adulter Neurogenese darstellt.

4.5 Effekt des Temozolomids auf die Hämatopoiese

Da TMZ als oral appliziertes Zytostatikum seine Wirkung systemisch entfaltet sind alle Typen teilungsaktiver Zellen im Organismus betroffen. Als besonders kritisch hinsichtlich des allgemeinen Gesundheitszustands und somit auch der kognitiven Leistungsfähigkeit und Motivation der behandelten Tiere ist eine antiproliferative Wirkung auf das hämatopoietische System des Knochenmarks anzusehen. Es musste daher sichergestellt werden, dass zum Zeitpunkt der Durchführung der Verhaltenstests keine signifikante Veränderung hämatologischer Parameter vorliegt.

Die multizyklische Applikation von TMZ hatte an keinem der betrachteten Zeitpunkte einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der gefundenen Erythrozyten und Thrombozyten (Abb. 4.9 A und C). Für die Leukozyten (Abb. 4.9 B) hingegen konnte unmittelbar nach Abschluss der 4 wöchigen Behandlung eine signifikante Reduktion ($p < 0,05$) beobachtet werden (Leukopenia). Die Befunde zeigten für die Leukozyten außerdem eine vollständige Rekonvaleszenz

im Verlauf von vier Wochen nach Beendigung der Behandlung. Zum Zeitpunkt der durchgeführten Verhaltenstests konnte eine signifikante Leukopenie somit ausgeschlossen werden.

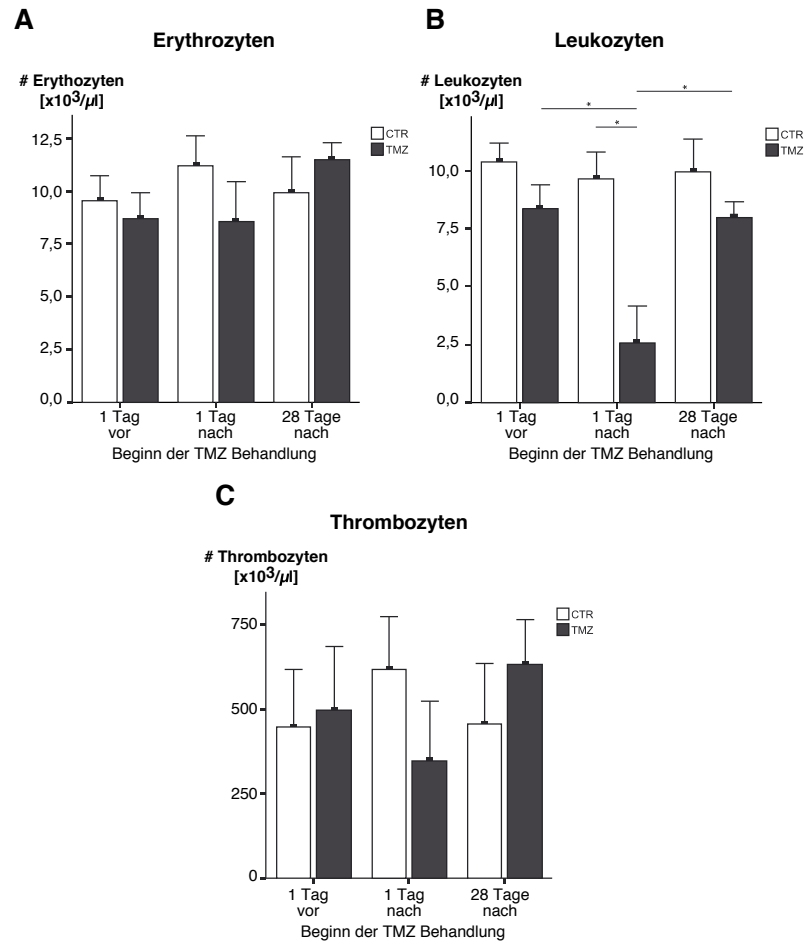


Abbildung 4.7: **Hämatologische Untersuchung I**

(A, B, C) Gezeigt sind die Daten für Erythrozyten, Leukozyten und Granulozyten. (B) Signifikante Gruppenunterschiede treten nur für die Anzahl der Leukozyten unmittelbar nach Beendigung der TMZ Behandlung auf.

Desweiteren traten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bei keinem der folgenden Parameter auf (Abb. 4.10 B-E): Anteil roter Blutzellen an allen erfassten Zellen, Größe der Erythrozyten, Menge des Hämoglobins pro Erythrozyt und Konzentration von Hämoglobin pro Erythrozyt. Lediglich die Gesamtmenge Hämoglobin erschien vier Wochen nach Beendigung der TMZ-Behandlung in den behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht ($p < 0,05$, Abb. 4.10 A).

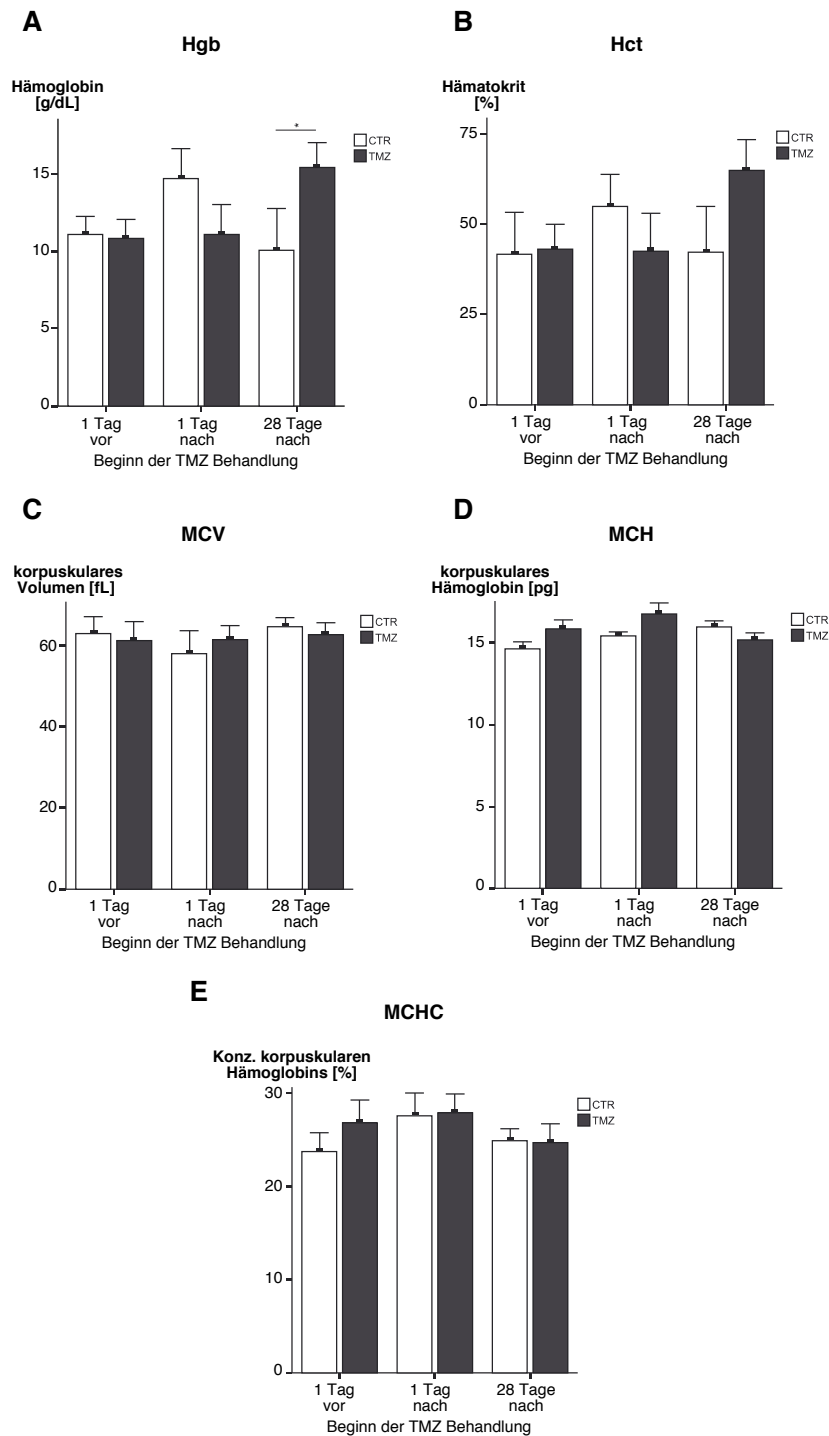


Abbildung 4.8: Hämatologische Untersuchung II

(A) Signifikante Gruppenunterschiede treten nur für die Gesamtmenge Hämoglobin vier Wochen nach Beendigung der Behandlung in Form einer erhöhten Menge in den TMZ Tieren auf. (B, C, D, E) Bei keinem weiteren Parameter werden signifikante Unterschiede gefunden.

Aus einer hämatologischen Perspektive erschienen die Tiere nach Abschluss

einer multizyklischen TMZ Behandlung und einer anschließenden Rekonvaleszenzphase als gesund. Trotz der systemischen Wirkung des TMZ auch auf das Knochenmark kommt es zu keiner dauerhaften Schädigung des hämatopoietischen Systems.

4.6 Körpergewicht

Die Entwicklung des Körpergewichts ist als allgemeiner Parameter für eine Bewertung des Gesundheitszustandes eines Tieres gut geeignet. Durch die Verwendung ausschließlich junger Tiere (6 Wochen zu Beginn der Experimente) wurde eine stetige Gewichtszunahme als normal angesehen.

Sowohl die TMZ behandelten, als auch die Kontrolltiere zeigten in dem erfassten Zeitraum eine stetige und vergleichbare Gewichtszunahme. Signifikante Unterschiede traten an keinem der Messzeitpunkte auf (Abb. 4.11).

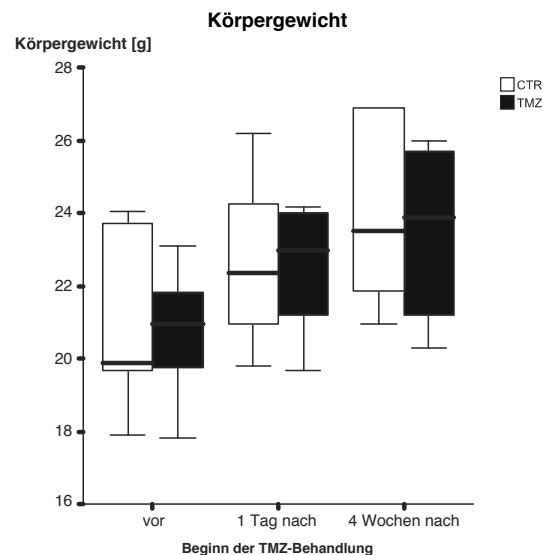


Abbildung 4.9: Körpergewicht

Im Verlauf des gesamten Experiments ist eine Gewichtszunahme bei den Tieren beider Gruppen zu beobachten. Signifikante Gruppenunterschiede treten an keinen Messzeitpunkt auf.

Zum Zeitpunkt der Durchführung der Verhaltenstest kann somit der Allgemeinzustand der behandelten Tiere als gut angesehen werden, was einen Beleg für das günstige Nebenwirkungsprofil des verwendeten TMZ darstellt. Alternative Methoden zur Ablation adulter Neurogenese im HC resultieren hingegen sowohl dauerhaft (MAM) als auch vorübergehend in einer signifikanten Verschlechterung des Allgemeinzustands [Shors et al., 2001, Saxe et al., 2006].

4.7 Rotarod Test

Für die effektive Bewältigung hippokampusabhängiger Verhaltenstests wie der MWM sind die allgemeinen motorischen Fähigkeiten der untersuchten Tiere von grundlegender Bedeutung. Das Vorliegen unauffälliger motorischer Fähigkeit sowie der Möglichkeit einer erfahrungsabhängigen Verbesserung derselben über mehrere Versuche hinweg kann mit dem Rotarod Test überprüft werden.

Zwischen den Gruppen traten zu keinem Zeitpunkt der Messungen signifikante Unterschiede im Hinblick auf die Zeit auf, welche die Tiere in der Lage sind auf dem beschleunigendem Stab zu verbleiben (Abb. 4.12).

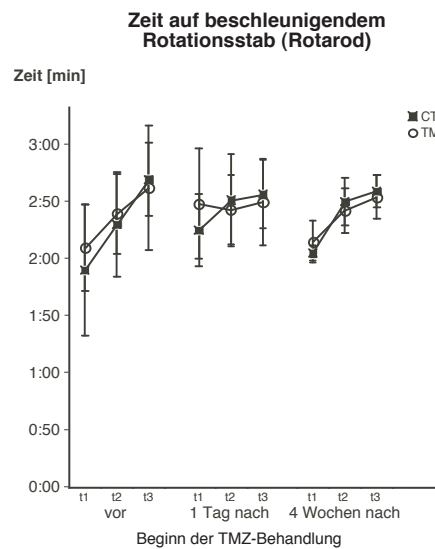


Abbildung 4.10: **Motorische Fähigkeiten**

Rotarod Test: Die Tiere beider Gruppen zeigen im Verlauf des Experiments eine gute motorische Lernfähigkeit. Signifikante Gruppenunterschiede treten an keinem der Messzeitpunkte auf.

Die lokomotorische Lern- und Leistungsfähigkeit erschien auch in den behandelten Tieren intakt, zudem konnte innerhalb eines jeden Versuchstages eine Verbesserung in den späteren Versuchen gegenüber den ersten des jeweiligen Tages gezeigt werden.

Etwaige Defizite in einem nach einer multizyklischen TMZ Applikation durchgeführten Verhaltenstest beruhen demnach mit großer Wahrscheinlichkeit auf kognitiven Veränderungen der betroffenen Tiere und nicht auf Veränderungen ihrer motorischen Fähigkeiten, bzw. des motorischen Systems.

4.8 Open field Test (OFT)

Neben den allgemeinen motorischen Fähigkeiten und dem Allgemeinzustand eines getesteten Tieres ist dessen emotionaler Zustand für seine Leistungsfähigkeit in räumlichen Verhaltensparadigmen wie der MWM von Bedeutung. Eine allgemeine und dennoch sensitive Beurteilung der Ängstlichkeit von Mäusen ist über die Analyse des Explorationsverhaltens der Tiere im OFT möglich.

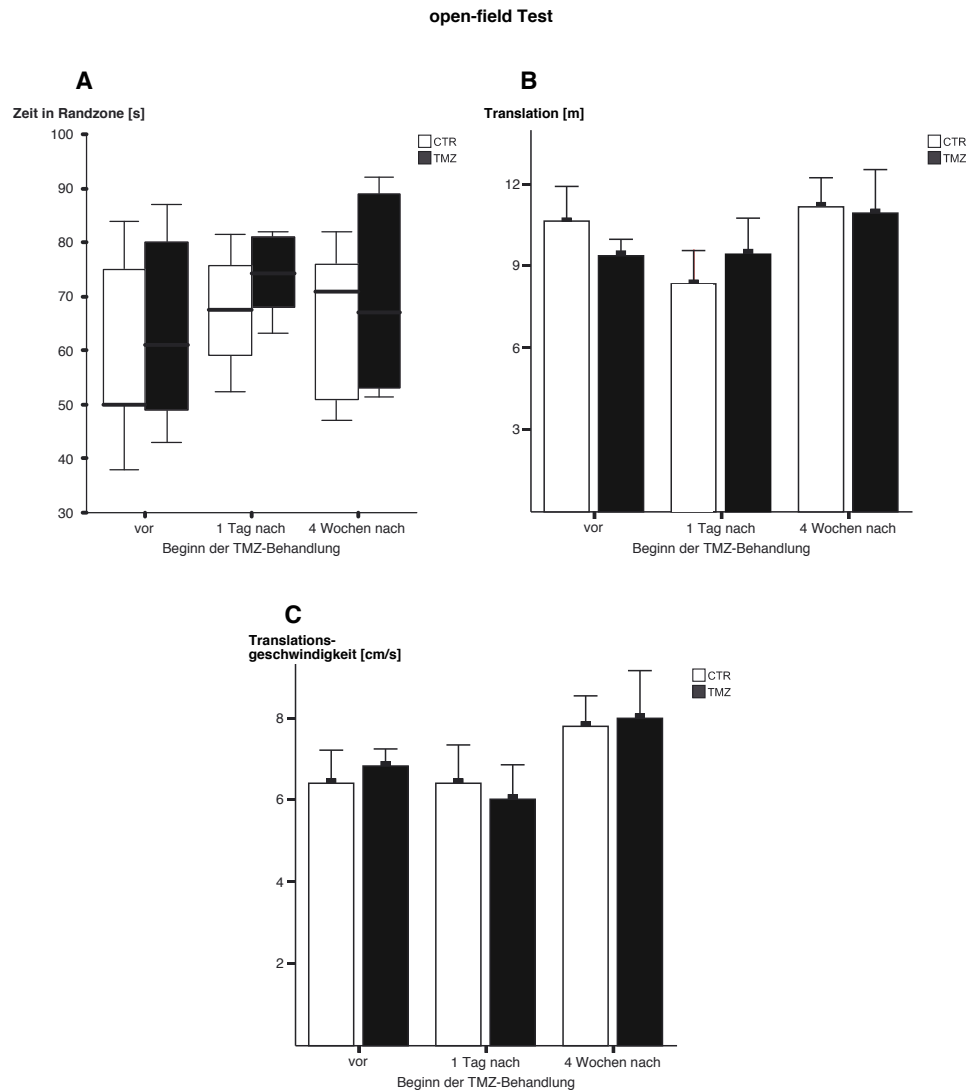


Abbildung 4.11: **Exploratorisches Verhalten im Open Field Test**

An keinem Messzeitpunkt treten signifikante Gruppenunterschiede auf. (A) Aufenthalt in der Randzone, (B) Translationsdistanz und (C) Translationsgeschwindigkeit.

Im OFT zeigten beide Gruppen an allen drei Testzeitpunkten keine signifikant unterschiedliche Aufenthaltswahrscheinlichkeit für die Randzone (Abb. 4.13 A). Unmittelbar nach Abschluß der Behandlung hielten sich die Tiere

beider Gruppen tendenziell länger in der Randzone auf. Hinsichtlich der Bewegungsgeschwindigkeit und des zurückgelegten Weges konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden (Abb. 4.13 B und C).

Durch eine TMZ Behandlung wird also das Explorationsverhalten nicht beeinflusst. Die in der MWM beobachteten Verhaltensänderungen sind somit nicht auf grundlegende Unterschiede der Stresstoleranz oder allgemeinen Ängstlichkeit zurückzuführen.

4.9 MWM: Schwimmgeschwindigkeit

Die durchschnittliche Schwimmgeschwindigkeit in der MWM ist, unabhängig von Aspekten des räumlichen Lernens, ein gutes Maß für die allgemeine physische und motorische Leistungsfähigkeit eines Tieres. Diese sind wiederum für das Lernverhalten in der MWM von grundlegender Bedeutung.

Beide Gruppen unterschieden sich hinsichtlich ihrer Schwimmgeschwindigkeiten nicht signifikant und zeigten darüberhinaus nur eine geringe Variabilität im Verlauf des gesamten Experiments (Abb. 4.14).

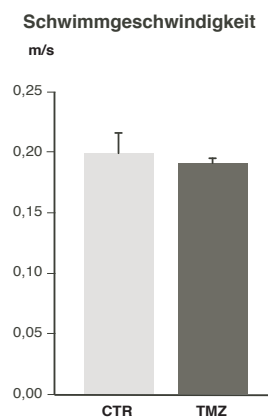


Abbildung 4.12: **Schwimmgeschwindigkeit in der MWM**

Es treten keine Gruppenunterschiede hinsichtlich der von den Tieren in der MWM gezeigten Schwimmgeschwindigkeit auf.

Der fehlende negative Einfluss einer TMZ Behandlung auf den physischen Zustand der betroffenen Tiere kann also auch im unmittelbaren Kontext des MWM Paradigmas demonstriert werden.

4.10 MWM: Quantitative Lernmaße

Die Überprüfung hippocampaler Funktion erfolgte mit dem MWM Paradigma. Im Allgemeinen umfasst die grundsätzliche Analyse des von den betrachteten

Tieren in der MWM gezeigten Verhaltens zunächst die Betrachtung der zum Erreichen der Zielplattform benötigten Latenzzeit und Schwimmdistanz. Beide Parameter sind eng miteinander verknüpft und ermöglichen die Detektion einer Lernkurve als Kennzeichen eines erfolgreichen hippocampusabhängigen Lernvorgangs.

Hinsichtlich der benötigten Latenzzeit um die Zielplattform zu erreichen, traten unter Betrachtung der gesamten Versuchsdauer signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen auf ($p < 0,001$ ANOVA; Abb. 4.15 A).

Auf der Ebene der einzelnen Tage stellte sich die Situation differenzierter dar. Die behandelten Tiere benötigten am zweiten Versuchstag signifikant länger, um die Plattform zu erreichen (Tag 2 $p < 0,05$ t-Test). An Tag 3 wurde jedoch annähernd die gleiche Leistung von beiden Gruppen erreicht, es hatten also alle Tiere erfolgreich gelernt, die Zielplattform auf eine effiziente Weise zu erreichen.

Nach Wechseln der Zielplattformposition zeigten die behandelten Tiere ein der Form nach identisches, jedoch quantitativ weniger effizientes Lernen. Die von den TMZ-Tieren an Tag 5 erreichten Zeiten lagen zwar auf demselben Niveau wie von Tag 2, jedoch noch über dem der Kontrollen an Tag 4, unmittelbar nach Verändern der Plattformposition ($p < 0,001$ für die Tage 4 und 5).

Dieses Muster wiederholte sich für die zurückgelegten Schwimmdistanzen (Abb. 4.15 B): Auch hier erwies sich der Unterschied zwischen den Gruppen als signifikant ($p < 0,001$ ANOVA). Erneut erreichten die Tiere beider Gruppen an Tag 3 eine vergleichbare Leistung (wie zuvor Tag 2, $p < 0,05$). Nach Wechseln der Zielposition jedoch zeigten die behandelten Tiere ein formal normales, jedoch in quantitativer Hinsicht erheblich ineffizienteres Lernen der neuen Plattformposition ($p < 0,001$ für Tag 5).

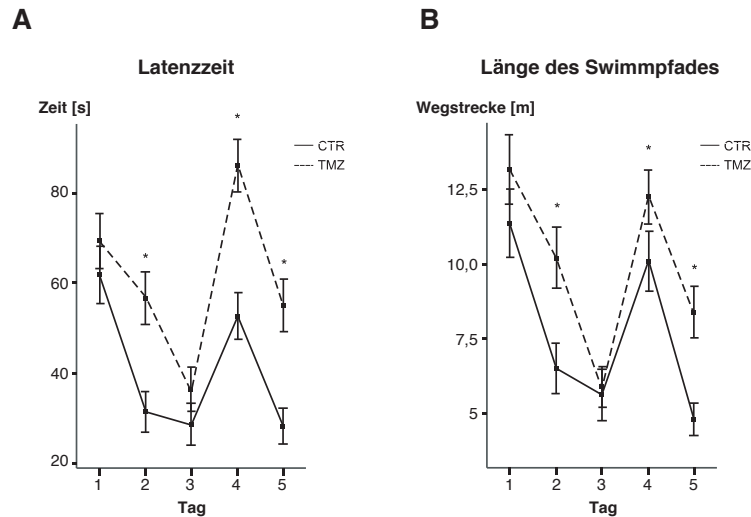


Abbildung 4.13: **Latenzzeiten und zurückgelegte Wegstrecken in der MWM** Dargestellt ist (A) die benötigte Zeit und (B) Wegstrecke bis Erreichen der Zielplattform in der MWM.

Bedeutsam ist hier das Vorliegen eindeutiger Lernkurven für die Tiere beider Gruppen, welche sich lediglich in quantitativer Hinsicht unterscheiden. Die TMZ behandelten Tiere zeigen besonders in der Akquisitionsphase längere Latenzzeiten, erreichen jedoch - zumindest für die erste Zielposition - eine vergleichbare Leistung.

4.11 Quadrantenpräferenz in der MWM

Das MWM Paradigma ist ein räumlicher Test hippokampusabhängigen Lernens. Die relative Aufenthaltsdauer in einem bestimmten Quadranten des MWM-Pools dient als Indikator für den Lernerfolg, unabhängig von einem tatsächlichen Erreichen der Plattform. So kann eine deutliche Suchpräferenz in dem entsprechenden Poolquadranten als erfolgreiches Lernen interpretiert werden. Auch wenn die räumliche Spezifität einer Aufteilung der MWM in lediglich vier Quadranten gering ist, ist so eine Beurteilung der Entwicklung einer räumlichen Präferenz grundlegend möglich.

Beide Gruppen zeigten im Verlauf der ersten drei Tage eine eindeutige Präferenz für den Zielquadranten (NE), auch wenn diese Präferenz bei den TMZ-Tieren zumindest an den beiden ersten Tagen signifikant weniger deutlich war, als von den Kontrollen gezeigt ($p < 0,05$ für die Tage 1 und 2; Abb. 4.16 A). In Folge des Wechsels der Zielposition nach Tag 3, nahm die Präferenz für den NE-Quadranten bei den Kontrolltieren erwartungsgemäß schnell ab. Die behandelten Tiere verloren die Präferenz für den nun ungünstigen Zielquadranten.

ten signifikant langsamer ($p < 0,001$ für Tag 4). Beide Gruppen unterschieden sich über alle Tage in Bezug auf ihren Aufenthalt im NE-Quadranten signifikant voneinander ($p < 0,001$ ANOVA). Ferner wurde ein Interaktionseffekt GROUP * DAY beobachtet ($p < 0,001$ ANOVA).

Die Situation im gegenüberliegenden SW-Quadranten stellte sich zu diesen Befunden komplementär dar (Abb. 4.16 B). In den ersten drei Tagen des Experiments entwickelten die Tiere keine über der Zufallswahrscheinlichkeit liegende Präferenz für diesen Quadranten. Signifikante Unterschiede traten an den Tagen 1 und 2 (beide $p < 0,05$) auf. Wurde der SW-Quadrant zum aktuellen Zielquadranten zeigten die Kontrolltiere die rasche Entwicklung einer klaren Präferenz. Tiere der TMZ-Gruppe zeigten zwar den Ansatz einer solchen Präferenzentwicklung, jedoch kamen sie im Kontrast zu den Kontrolltieren auch nach zwei Versuchstagen über die Zufallswahrscheinlichkeit nicht hinaus (Tag 4 und 5 jeweils $p < 0,001$). Auch hier wurde für den SW-Quadranten ein signifikanter Gruppenunterschied ($p < 0,05$ ANOVA), sowie ein Interaktionseffekt GROUP * DAY ($p < 0,001$ ANOVA) beobachtet.

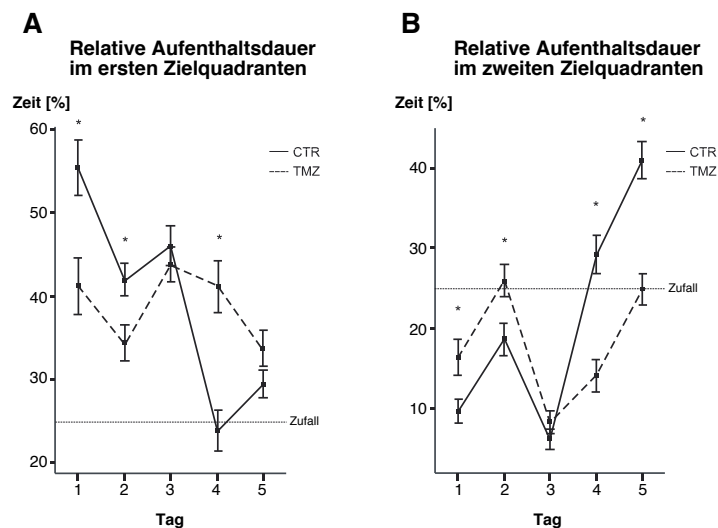


Abbildung 4.14: **Relative Aufenthaltsdauer in den Zielquadranten**
 Dargestellt ist die relative Aufenthaltsdauer (A) im NE-Quadranten, bzw. (B) im SW-Quadranten. Die Zielplattform liegt im Mittelpunkt des jeweiligen Quadranten.

Grundsätzlich anders stellten sich die Ergebnisse für die Nicht-Zielquadranten dar. Signifikante Unterschiede an einzelnen Tagen fanden sich für NW-Quadranten (Abb. 4.17 A) an den Tagen 3 und 5 (jeweils $p < 0,001$) und für den SE-Quadranten (Abb. 4.17 B) nur an Tag 3 ($p < 0,001$). Für die Tiere beider Gruppen lag die relative Aufenthaltsdauer in den beiden Quadranten zumeist nicht über dem Zufallsniveau. Lediglich für die Tage 4 (NW-Quadrant) und 3 (SE-Quadrant) wurde eine höhere Aufenthaltsdauer für beide Gruppen beobachtet.

Unter Betrachtung aller Zeitpunkte konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Gruppen nur für den NW-Quadranten ($p < 0,05$, ANOVA) gezeigt werden. Für beide Nicht-Zielquadranten lag ein Interaktionseffekt GROUP * DAY vor ($p < 0,001$ für den NW- und $p < 0,05$ für den SE-Quadranten).

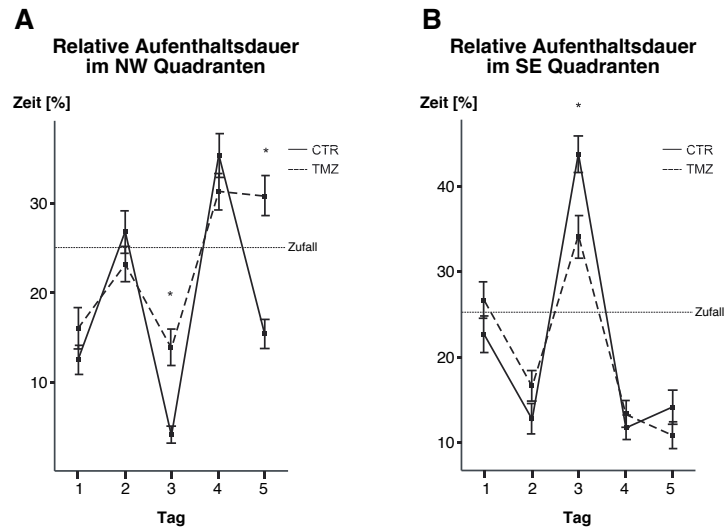


Abbildung 4.15: **Relative Aufenthaltsdauer in den Nicht-Zielquadranten**
Dargestellt ist die relative Aufenthaltsdauer (A) im NW-Quadranten, bzw. (B) im SE-Quadranten.

4.12 Aufenthaltswahrscheinlichkeiten/Okkupaionsplot

Die räumliche Spezifität der Einteilung des MWM Pools in Quadranten ist nur gering. Die signifikanten Gruppenunterschiede bei der Latenzzeit in Verbindung mit dem spezifisch in beiden Zielquadranten des Experiments verzögerten Erlernen bzw. Vergessen einer räumlichen Präferenz durch die behandelten Tiere weist auf einen Zusammenhang zeitlicher und räumlicher Faktoren sowie eine mögliche Rolle qualitativer Verhaltensunterschiede bei der Genese der beobachteten Effekte hin.

Die Darstellung der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten in Form eines Okkupaionsplots erlaubte eine weitere Differenzierung und intuitivere Beurteilung der auftretenden Gruppenunterschiede. Darüber hinaus wurde so eine erste qualitative Betrachtung des von den Tieren gezeigten Verhaltens möglich.

Die Kontrolltiere zeigten die rasche Entwicklung einer präzisen, spatialen Präferenz (repräsentiert durch eine hohe Aufenthaltswahrscheinlichkeit) bereits innerhalb der ersten sechs Versuche des ersten Versuchstages (Abb. 4.18 A). Diese Präferenz verbesserte sich in den Tagen 2 und 3 hinsichtlich der spatialen Präzision noch deutlich. Nach erfolgtem Wechsel der Zielplattformposition trat

an den ersten beiden Versuchen an Tag 4 eine perseverierende Präferenz für die alte Zielposition auf, welche jedoch bereits innerhalb der folgenden vier Versuche durch eine eindeutige Präferenz für die neue Plattformposition abgelöst wurde. An Tag 5 erreichte die neu entwickelte Präferenz erneut eine sehr hohe Präzision und es traten nur diffuse Reminiszenzen einer Präferenz für die erste Zielposition auf.

Demgegenüber verlief die Ausbildung einer spatialen Präferenz bei den TMZ-behandelten Tieren deutlich langsamer und in qualitativer Hinsicht vermindert ab (Abb. 4.18 B): Erst am dritten Tag konnte eine eindeutige Präferenz für die Zielposition beobachtet werden. Nach Wechseln der Plattformposition um 180° waren die behandelten Tiere offenkundig nicht in der Lage, effektiv an die neue Situation zu adaptieren. Die räumliche Präferenz für die vorige Zielplattform konnte auch an Tag 5 noch nachgewiesen werden. Eine Ausrichtung auf das neue Ziel fand lediglich in Ansätzen statt.

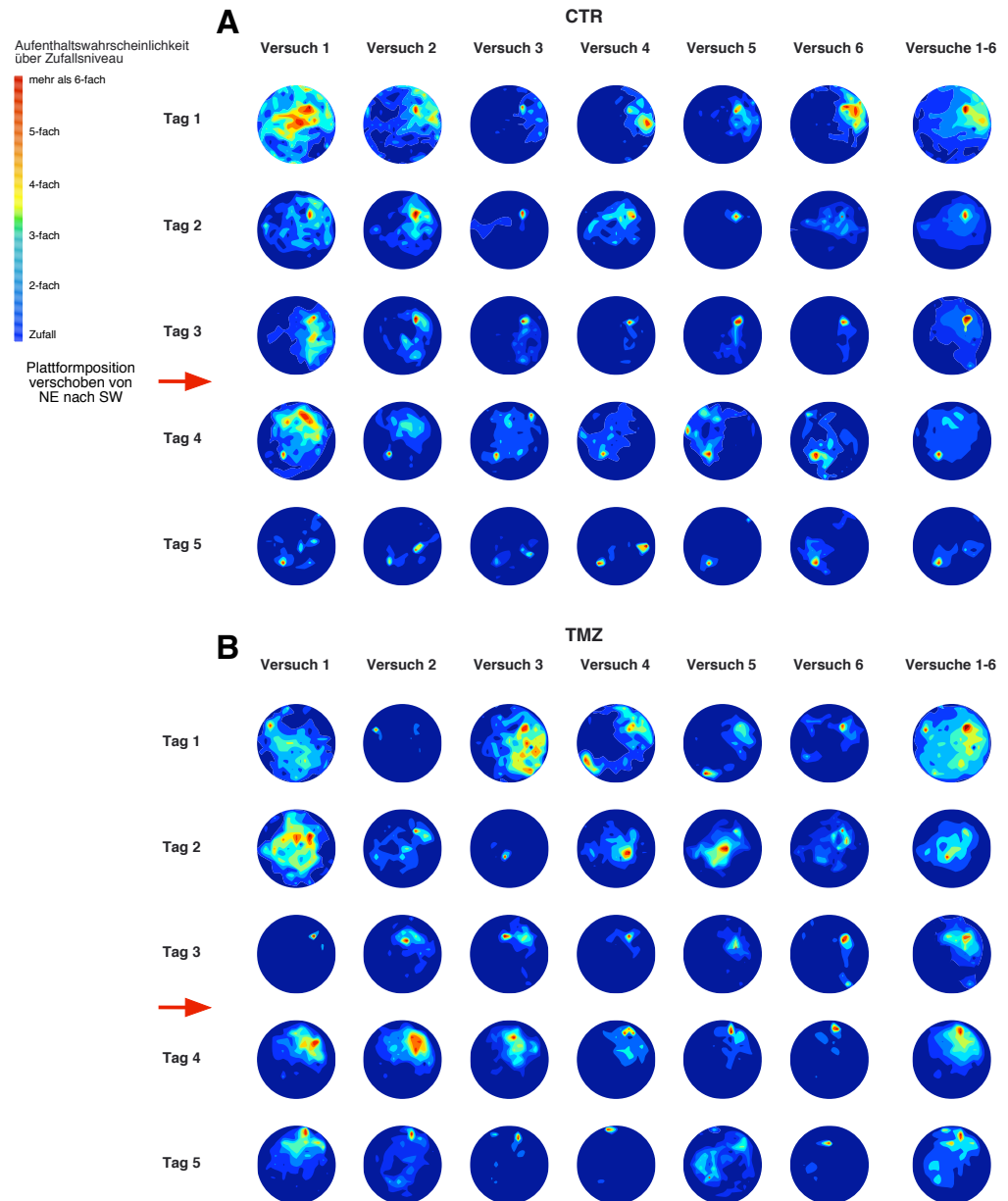


Abbildung 4.16: Okkupationsplot der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten
 Dargestellt ist die Entwicklung spatialer Präferenzen der getesteten Tiere in der MWM für jeden einzelnen der sechs Versuche eines Tages und als Durchschnitt aller Versuche eines Tages. Die Daten repräsentieren die Leistung der jeweiligen Gruppe. **(A)** Effektive Entwicklung einer räumlichen Präferenz bei Tieren der Kontrollgruppe sowohl für die erste Akquisitionsphase (Tage 1-3) als auch für die *reversal* Phase (Tage 4-5). **(B)** Langsamere und weniger effektive Entwicklung einer räumlichen Präferenz in den TMZ behandelten Tieren für die Tage 1-3 und massiv perseverierende Präferenz für die erste Zielposition an den Tagen 4-5 als Zeichen einer signifikant reduzierten, funktionalen Plastizität.

Die Darstellung der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten in einem Okkupationsplot visualisiert das Problem einer in Folge der Ablation adulter Neurogenese signifikant verminderten Plastizität des DG in intuitiv verständlicher Weise und offenbart ferner die Relevanz bereits in der Akquisitionsphase des MWM Tests auftretender qualitativer Unterschiede für das Entstehen dieses Phänotypen.

4.13 Qualitative Analyse der MWM

Das Auftreten qualitativer Gruppenunterschiede bereits in der Akquisitionsphase des MWM Experiments wirft erneut die Frage nach möglicherweise vorhandenen subtilen Nebeneffekten der systemischen TMZ Applikation auf, welche in einem grundsätzlich anderen Lernmodus resultieren können. Die beobachteten Effekte müssten in diesem Fall anders bewertet werden als bei Vorliegen eines qualitativ gleichartigen Lernens. Es musste daher die Qualität des Lernvorgangs in allen Stadien untersucht und mit dem Verhalten der Kontrolltiere verglichen werden.

Eine Beurteilung der qualitativen Aspekte des von den Tieren in der MWM gezeigten Lernverhaltens erfordert die Definition eindeutiger und objektiver Kriterien, wie sie bereits in Abschnitt 3.10.2 vorgestellt wurden. Die Durchführung einer solchen Analyse unter Verwendung eines Computerprogrammes stellte die geforderte Objektivität sicher und erlaubte die aufwändige Rohdatenanalyse in relativ kurzer Zeit.

Der Klassifikationsalgorithmus

Übersicht der Datengewinnung und -aufbereitung Die Analyse der MWM Daten sowie die Klassifikation der jeweils verwendeten Suchstrategien erfolgte unter Verwendung verschiedener Hard- und Softwarekomponenten. Abb. 4.19 zeigt eine schematische Übersicht aller beteiligten Ebenen der Datenprozessierung und der jeweils verwendeten bzw. erhaltenen Variablen. Eine detaillierte Darstellung der technischen und mathematischen Implementierung der einzelnen Datenverarbeitungsschritte findet sich im Methodenteil in Abschnitt 3.11.

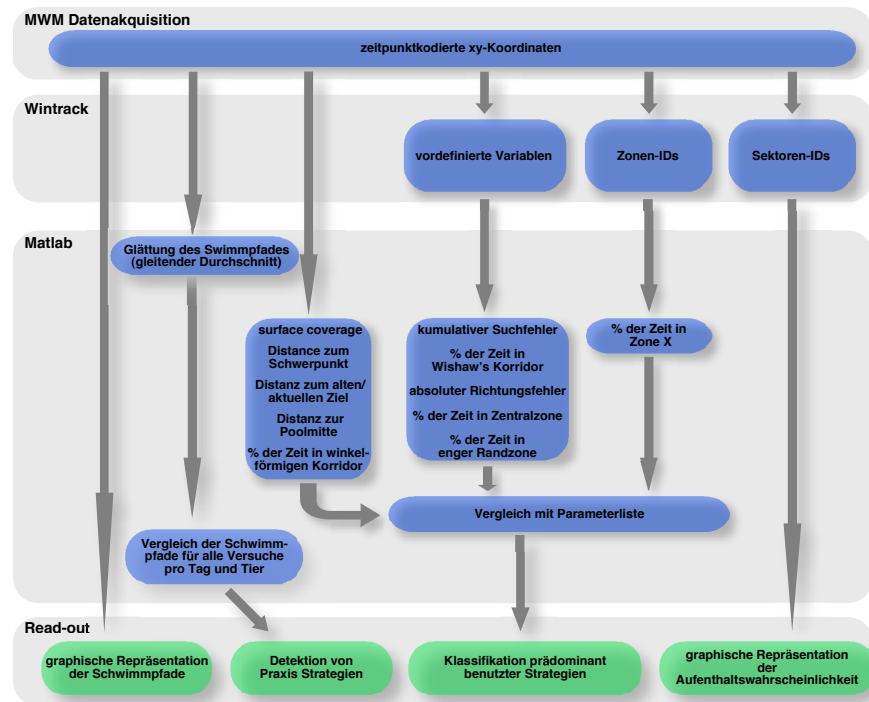


Abbildung 4.17: Elemente und Ablauf der Datenanalyse

Als Grunddaten dienen die zeitpunkt-kodierten xy-Koordinaten der zurückgelegten Schwimmpfade. Auf der Grundlage dieser Daten und zahlreicher Zwischenschritte (blau) wird unter Nutzung der Wintrack und Matlab Software der für eine qualitative Beurteilung der Lernleistung benötigte Read-out abgeleitet (in grün).

Obwohl es sich bei der Implementierung ebenfalls um Ergebnisse der vorliegenden Arbeit handelt, wird sie aufgrund ihrer inhaltlichen Nähe zum Konzept verschiedener Suchstrategien im direkten Anschluss an diese in Abschnitt 3.11 besprochen. Für die Diskussion qualitativer Effekte einer TMZ Behandlung auf das von den Tieren in der MWM gezeigte Verhalten sind die Einzelheiten der technischen Umsetzung jedoch nur sekundär relevant. Daher wird hier nur der eigentliche Klassifikationsalgorithmus in der Übersicht dargestellt.

Struktur des Klassifikationsalgorithmus Als zentrales Element der Datenanalyse wurden alle Versuche hinsichtlich der jeweils verwendeten, prädominanten Suchstrategien klassifiziert. Der Klassifikationsprozess beruht dabei auf der Anwendung eines Satzes eindeutig definierter Parameter. Für jede Strategie wird eine Kombination von maximal drei Variablen ausgewertet. Die Reihenfolge des Ausschlussverfahrens ist dabei keineswegs beliebig, da bestimmte Strategien das Vorliegen einer anderen explizit ausschließen, umgekehrt aber auch zu falschen positiven Ergebnissen führen können (Abb. 4.20; vergleiche auch Abb. 3.2).

Allgemein erfolgt die Klassifikation beginnend mit den effektivsten, hippokampusabhängigen, räumlichen Strategien und endet mit den am wenigsten effektiven, hippokampusunabhängigen. Begründet werden kann dies mit den spezifischeren Eigenschaften der gerichteten, räumlichen Strategien: Erst wenn diese ausgeschlossen sind, können die allgemeineren Parameter wie z.B. die relative Aufenthaltsdauer in den verschiedenen Zonen der MWM für die Klassifikation herangezogen werden.

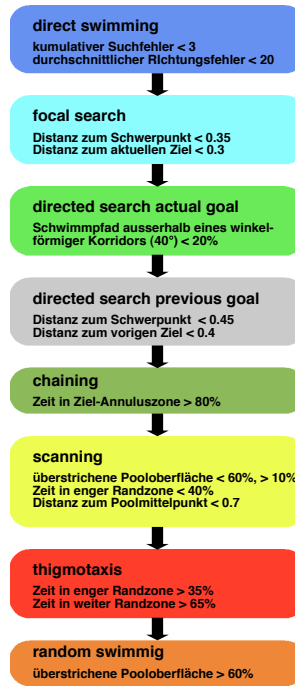


Abbildung 4.18: **Schematische Darstellung des Klassifikationsalgorithmus**
 Dargestellt ist eine Zusammenfassung der im finalen Klassifikationsprozess verwendeten Parameter für jede klassifizierte Suchstrategie. Die Hintergrundfarben entsprechen den in späteren Darstellungen für die jeweiligen Strategien verwendeten Farben.

Die der Klassifikation zugrundeliegenden Parameterkombinationen wurden weder zufällig gewählt noch wurden sie mit der Intention gesetzt, ein bestimmtes Ergebnis zu erzeugen. Vielmehr ergeben sie sich natürlicherweise als Abstraktionen der Beschreibung der eine jede Strategie charakterisierenden Merkmale. Alle verwendeten Größen sind von der exakten Größe des MWM-Pools unabhängig und setzen auch sonst keinerlei spezifische Gegebenheiten des Versuchsaufbaus voraus. In der folgenden Tabelle sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Klassifikationsparameter aller postulierten Strategien zusammengestellt (Tab. 4.1). Im Vergleich zu den frühen, nicht-räumlichen Suchmustern resultiert der signifikant größere Zielbezug bei den räumlichen Strategien konsequenterweise in der Benutzung wesentlich präziser definierter Parameter.

Strategie	Parameter 1	Parameter 2	Parameter 3
Thigmotaxis	>35% Zeit in der engen Randzone	>65% Zeit in der weiten Randzone	-
Random search	>60% Abdeckung der Poolfläche	-	-
Scanning	<60% und > 10% Abdeckung der Poolfläche	<40% Zeit in der engen Randzone	< 0.7 [SE] durchschn. Abstand zum Poolmittelpunkt
Chaining	>80% Zeit in der Annuluszone	-	-
Directed search actual goal	>80% Zeit in Zielkorridor	-	-
Focal search	<0.35 [SE] durchschn. Abstand zum Schwimmpfad-Schwerpunkt	<0.3 [SE] durchschn. Abstand zum aktuellen Ziel	-
Direct swimming	<3[m·s] kumulativer Suchfehler	<20[°] absoluter durchschn. Richtungsfehler	-
Directed search previous goal	<0.45 [SE] durchschn. Abstand zum Schwimmpfad-Schwerpunkt	<0.4 [SE] durchschn. Abstand zum vorherigen Ziel	-

Tabelle 4.1: Übersicht der MWM Suchstrategien und der jeweils verwendeten Klassifikationsparameter.

Die Zuverlässigkeit des hier implementierten Algorithmus betrug für die Gesamtheit der in dieser Studie durchgeführten MWM-Experimente >95%. Schwierigkeiten ergaben sich immer dann, wenn ein Tier in einem Versuch mehrere Strategien im Wechsel zeigte, keine eindeutig prädominante Strategie vorhanden war oder die jeweils gemessenen Parameterwerte sehr nahe am Übergangsbereich zur vorherigen oder nachfolgenden Strategie lagen. In diesen Fällen musste die Klassifikation von einem menschlichen Beobachter, welcher die Gruppenzugehörigkeit der betroffenen Tiere nicht kannte, durchgeführt werden.

Einen Sonderfall stellte die Praxis- und Pfadintegrationsstrategien dar, da sie sich aus verschiedenen Ausgangsstrategien entwickeln und ihnen keine, für eine automatisierte Klassifikation geeigneten, allgemeingültigen Charakteristika zugeschrieben werden konnten. Zwar enthält das Programm eine Routine zur Detektion redundanter Schwimmuster, jedoch erwies sich dieses Verfahren nur als eingeschränkt verlässlich.

Ergebnisse der algorithmusbasierten Klassifikation

Die algorithmusbasierte Klassifikation der für das Auffinden der Zielplattform genutzten Strategien zeigte für beide Gruppen eine signifikante, sequentielle Nutzung der verschiedenen Suchstrategien (Abb. 4.21 A): Für alle Strategien galt für den Inner-Subjekt-Test $p < 0,001$ (nur für *directed search actual goal* ist $p < 0,05$).

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen in der Häufigkeit der Benutzung bestimmter Strategien traten bei Betrachtung des gesamten Experiments auf für *scanning* ($p < 0,05$), *focal search* ($p < 0,05$), *direct swimming* ($p < 0,001$) und *directed search previous goal* ($p < 0,05$). Interaktionseffekte DAY * GROUP fanden sich für *scanning* ($p < 0,05$), *directed search actual goal* ($p < 0,05$), *direct swimming* ($p < 0,001$) und *directed search previous goal* ($p < 0,05$).

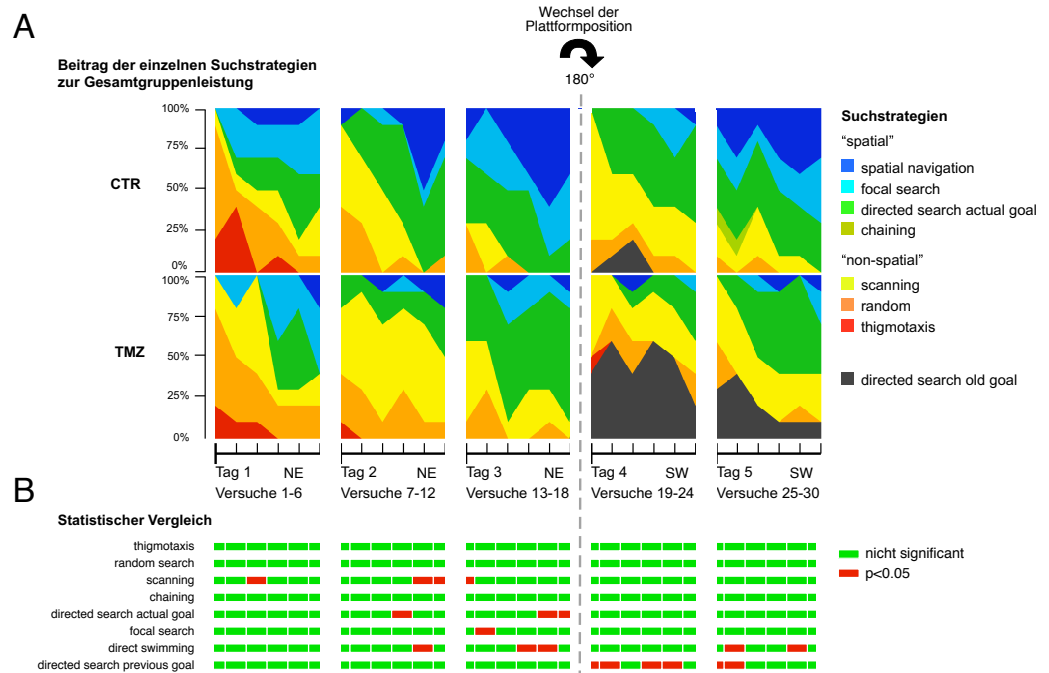


Abbildung 4.19: Analyse der in der MWM genutzten Suchstrategien

Dargestellt sind der jeweilige Beitrag der verschiedenen Suchstrategien zu Gruppenleistung in den einzelnen Versuchen. (A) Algorithmusbasierte Klassifikationsergebnisse für die genutzten Suchstrategien der getesteten Gruppen in der MWM. (B) Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der Benutzung der jeweiligen Strategien sind rot dargestellt (Signifikanzniveau: 5%).

Die Unterschiede und Verschiebungen zwischen den Gruppen in der Benutzung der verschiedenen Suchstrategien erwiesen sich als spezifisch. In Abb. 4.21 B sind für alle einzelnen Versuche signifikante Gruppenunterschiede durch rote Rechtecke dargestellt ($p < 0,05$, Mann-Whitney Test). Versuche ohne signifikante Unterschiede sind grün markiert.

Wie die Abbildungen zeigen, dominierten frühe, hippocampusunabhängige Suchstrategien (*thigmotaxis*, *random search*) den ersten Versuchstag, um dann am zweiten Tag bereits durch das vergleichsweise systematische *scanning* abgelöst zu werden (Abb. 4.21 A und B sowie Abb. 4.22 A-C). Zu diesem Zeitpunkt wendeten Kontrolltiere bereits signifikant häufiger das *directed search actual goal* zum Erreichen der Plattform an (Abb. 4.22 D). Die TMZ Tiere folgten erst an Tag 3: Während sie nun signifikant häufiger das *directed search actual goal* nutzten, zeigten nahezu alle Kontrollen die präzisesten hippocampusabhängigen Strategien *focal search* und *direct swimming*. Sie bewältigten den MWM-Test also mit sehr hoher Effizienz und unterschieden sich darin signifikant von ihren behandelten Geschwistern (Abb. 4.21 B und 4.22 D-F).

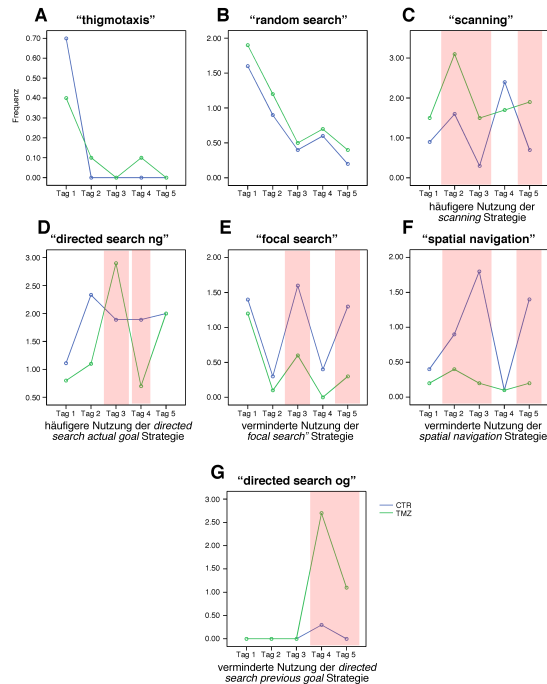


Abbildung 4.20: **Frequenz der Anwendung einzelner Suchstrategien (A-G)** Dargestellt sind die Frequenz-Mittelwerte der einzelnen Suchstrategien. Signifikante Unterschiede sind rot unterlegt.

Nach Wechseln der Zielplattformposition durchliefen die unbehandelten Tiere die sequentielle Abfolge von den frühen hin zu den effizientesten Strategien sehr schnell und erreichten nach nur zwei Tagen Training ein zu dem Lernerfolg der ersten drei Tage vergleichbares Niveau. Tiere der TMZ-Gruppe erreichten dieses Ergebnis hingegen nicht (Abb. 4.21 B und 4.22 A-G). Auffällig war die Häufung signifikanter Unterschiede hinsichtlich der Nutzung der *directed search previous goal* Strategie an den Tagen 4 und 5 (Abb. 4.21 B und 4.22 G). Sie repräsentiert die bereits in Abb. 4.20 gezeigte, perseverierende Präferenz für die zuvor erlernte Zielposition.

Die rechnergestützte qualitative Analyse des in der MWM gezeigten Verhaltens offenbart also, dass die Tiere beider Gruppen das Auffinden der Plattform unter Anwendung verschiedener, zunehmend effizienter Strategien erlernen konnten. Darüberhinaus geschah dies unter Anwendung grundsätzlich vergleichbarer Strategien, es wurden also keine qualitativ völlig anderen, in Folge unspezifischer Nebenwirkungen auf andere Hirnareale auftretenden Suchmuster von den Tieren gezeigt.

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen in der Anwendung der jeweiligen Strategien ergaben sich zum Einen bei der Reaktion auf das Ver-

schieben der Zielposition und zum Anderen in grundsätzlicherer Weise für die Anwendung der räumlich präzisesten und effizientesten Suchmuster. Die Anwendung dieser Strategien scheint bei Vorliegen einer supprimierten adulten Neurogenese nur eingeschränkt möglich zu sein. Letzterer Aspekt wirft vor dem Hintergrund dennoch oftmals vergleichbarer Leistungen die Frage nach einem Kompensationsverhalten der TMZ behandelten Tiere auf.

4.14 Konvolutionsanalyse

In der MWM haben die getesteten Tiere grundsätzlich zwei Möglichkeiten die Latenzzeit zum Auffinden der Plattform zu reduzieren. So kann die frühzeitige Nutzung höherwertigerer, per se effizienterer Suchstrategien innerhalb weniger Versuche zu einer erheblichen Verringerung der Latenz führen. Das rasche Wechseln hin zu den prinzipiell erfolgreichsten Strategien bestimmt die Verbesserung der Lernleistung.

Die andere Möglichkeit besteht darin, zunächst die Qualität solcher Suchstrategien zu steigern, welche zwar keinen grundsätzlich optimalen Ansatz zum Auffinden des Ziels darstellen, bei hinreichend hoher Qualität in der Anwendung jedoch in ebenfalls sehr kurzen Latenzen resultieren. Zwischen beiden Varianten zur Verbesserung der Lernleistung kann nach Durchführung einer Konvolutionsanalyse unterschieden werden.

Das Vorliegen von nur zwei Datenpunkten an den Tagen 4-5 ließ eine sinnvolle Interpretation der Ergebnisse für diesen Zeitraum fraglich erscheinen. Daher wurden nur die Daten für die Tage 1-3 berücksichtigt, d.h. für die Prädiktionen wurden jeweils die Mittel für Frequenz und Qualität der ersten Akquisitionsphase der Tage 1-3 verwendet. Abb. 4.23 zeigt den Vergleich der tatsächlich gemessenen mit den, unter Benutzung verschiedener Modelle, vorhergesagten Schwimmpfadlängen für die Annahme einer konstanten Frequenz (Abb. 4.23 A und C), bzw. einer konstanten Qualität der Anwendung aller Strategien (Abb. 4.23 B und D).

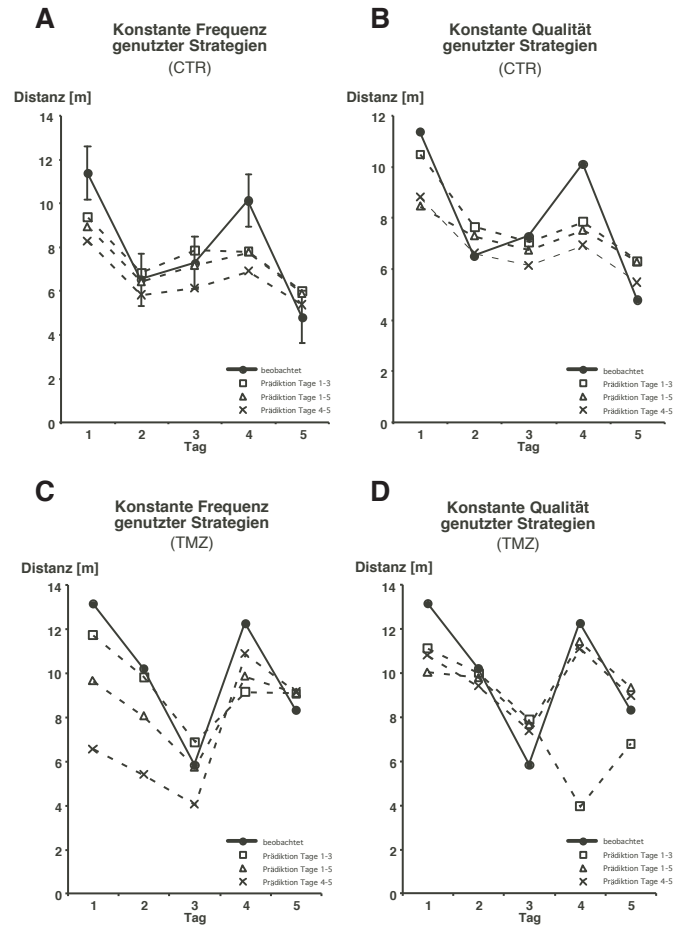


Abbildung 4.21: **Prädiktionen der Konvolutionsanalyse**

Prädiktionen und gemessene Schwimmdistanzen für beide Gruppen und verschiedene Bedingungen. **(A und B)** Konstante Frequenz und konstante Qualität der genutzten Strategien bei der CTR Gruppe. **(C)** und **(D)** zeigen die entsprechenden Graphen für die TMZ Gruppe.

Aus der Konvolutionsanalyse geht hervor, daß die Tiere der CTR-Gruppe bei konstanter Qualität in der Anwendung der einzelnen Strategien immer noch eine Verbesserung von 32,72% von den gemessenen 36,06% erreicht hätten und nur 16,01% bei konstanter Frequenz der Anwendung aller jeweiligen Strategien. Dem standen 29,19% von 55,67% bei konstanter Qualität und 41,39% von 55,67 bei konstanter Frequenz bei der TMZ-Gruppe gegenüber (Tabelle 4.2).

	durchschnittl. Verkürzung des zurückgelegten Schwimmpfades			
	Tage 1-3		Tage 4-5	
Gruppe	CTR	TMZ	CTR	TMZ
gemessen	36,06%	55,67%	52,62%	32,11%
konstante Frequenz	16,01%	41,39%	22,37%	15,94%
konstante Qualität	32,72%	29,19%	20,93%	19,33%

Tabelle 4.2: **Prädiktionen der Konvolutionsanalyse für die beiden Phasen des MWM Experiments und unter Annahme verschiedener Bedingungen.**

Das bedeutet, daß die unbehandelten Kontrolltiere ihre Leistung in der MWM weitestgehend durch den schnellen Wechsel zu immer effizienteren und räumlich präziseren Strategien steigerten, wohingegen die behandelten Tiere vornehmlich die Anwendung der benutzten Strategien perfektionierten.

5 Diskussion

In der vorliegenden Studie konnte eine effektive Suppression adulter Neurogenese durch die multizyklische Applikation des Zytostatikums TMZ ohne das Auftreten negativer Nebenwirkungen erreicht werden. Obwohl die Tiere mit supprimierter adulter Neurogenese das Auffinden der Zielplattform in der MWM grundsätzlich erlernten und dabei mit denen der Kontrollen vergleichbare Latenzzeiten erreichten, unterschied sich ihr Lernverhalten in qualitativer Hinsicht signifikant von dem unbehandelter Tiere.

Als grundlegender Unterschied zeigte sich bei den TMZ behandelten Tieren nach Verschieben der Zielplattform eine perseverierende Präferenz für die zuvor erlernte Zielposition und somit eine signifikant verringerte Fähigkeit des effektiven Umgangs mit Veränderungen der Umwelt. Demgegenüber passten sich Tiere mit einer normalen adulten Neurogenese innerhalb weniger Versuche effektiv an die neue Situation an, womit eine Voraussage des Modells nach [Wiskott et al., 2006], wonach das Fehlen neugeborener, plastischer Körnerzellen im DG zu einer reduzierten Adaptationsfähigkeit gegenüber veränderlichen Stimuluskonfigurationen in der Umwelt führt, in direkter Weise bestätigt werden konnte.

Im Folgenden wird zunächst der pharmakologische Ansatz zur Suppression adulter Neurogenese hinsichtlich seiner Effizienz und potentiell relevanter Nebenwirkungen auf den behandelten Organismus diskutiert. Dabei zeigt sich, dass die Verwendung von TMZ keine der negativen Nebeneffekte alternativer interventioneller Ansätze mit sich bringt und daher die beobachteten Verhaltensänderungen mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschliesslich auf das Fehlen adult generierter Körnerzellen im DG zurückzuführen sind.

Anschließend werden die in der vorliegenden Studie erhobenen MWM Daten im Detail besprochen und die hohe Spezifität der Befunde dargelegt. Es wird deutlich, dass sich das in Folge einer supprimierten adulten Neurogenese beobachtete Plastizitätsdefizit leicht in das Zusammenspiel des HC mit anderen Hirnregionen einfügt und so die Diskussion anderer, nicht ausschließlich auf den HC bezogener Phänomene um einen interessanten Aspekt erweitert.

In Verbindung mit dem o.g. Modell ergibt sich so eine differenzierte Perspektive der im Verlauf der MWM Experiments stattfindenden Prozesse im DG

unter Beteiligung adult generierter Körnerzellen. Hieraus kann eine allgemeine Hypothese zur funktionalen Relevanz adult generierter GCs im DG abgeleitet werden, welche im Kontext der Studien verschiedener Autoren erfolgreich diskutiert wird.

Die vor diesem einheitlichen Hintergrund durchgeführte Interpretation der von verschiedenen Autoren unter Verwendung verschiedener Testparadigmen erhobenen Befunde bekräftigt die hier postulierte Hypothese einer spezifischen funktionalen Relevanz adulter Neurogenese:

Adulte hippocampale Neurogenese ermöglicht das effektive Erlernen neuer verhaltensrelevanter Regeln im Kontext einer bekannten Umgebung, für die bereits erlernte Regeln existieren.

5.1 TMZ erlaubt die effektive Suppression adulter Neurogenese ohne das Auftreten negativer Nebenwirkungen.

Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines interventionellen, pharmakologischen Ansatzes zur effektiven Suppression adulter hippocampaler Neurogenese. Entscheidend für den Erfolg eines solchen Ansatzes in Kombination mit der Durchführung sensitiver Verhaltenstests ist der weitestgehende Ausschluss einer Beeinflussung des von den behandelten Tieren gezeigten Verhaltens bei einer zugleich hohen Effektivität.

5.1.1 Die TMZ Applikation resultiert in einer effektiven Ablation adulter Neurogenese im DG.

Die multizyklische, systemische Applikation des Zytostatikums TMZ resultierte in einer signifikanten und effektiven Suppression der Zellproliferation im HC der adulten Maus (Abb. 4.1). Eine bereits in präklinischen Studien beobachtete Dosisabhängigkeit konnte bestätigt werden. Aufgrund der Ergebnisse der Dosisfindungsstudie wurde eine Einzeldosis von 25 mg/kg KW gewählt, da eine weitere Erhöhung keine den erhöhten Belastungen des Tieres entsprechende Wirkungszunahme mit sich brachte. Obwohl der Effekt der gewählten Dosis nach einer monozyklischen Applikation (drei Tage TMZ) bei einer Reduktion der Zellproliferation um nur ca. 80% lag, führte der kumulative Effekt einer mehrzyklischen Anwendung (4x drei Tage TMZ, jeweils vier Tage Rekonvaleszenz) zu einer nahezu vollständigen (>90%) Suppression mitotischer Aktivität im DG. Das Interkalieren im Vergleich zu den Injektionsphasen längerer Rekonvaleszenzzeiträume reduziert das Auftreten negativer Nebenwirkungen auf

ein relatives Minimum und erlaubt so die Verwendung geringerer Einzeldosen bei gleichzeitigem Erhalt der maximalen Effizienz.

In Folge der weitestgehenden Ablation der teilungsaktiven Stamm- und Vorläuferzellen nach Abschluss des vierwöchigen Behandlungsschemas ist in Verbindung mit der ca. 28 Tage dauernden Reifezeit adult generierter Neurone im DG davon auszugehen, dass für eine Rekrutierung aufgrund eines akuten kognitiven Bedarfs zunächst keine jungen Körnerzellen verfügbar sind. Frühestens vier Wochen nach Abschluss der Behandlung stehen erneut adult generierte, ausreichend differenzierte Typ-3 Zellen für eine Integration bereit. Dabei ist es als unwahrscheinlich anzusehen, dass die Teilungsaktivität in der SGZ sofort wieder ihr ursprüngliches Niveau erreicht. Im weiteren Kontext der vorliegenden Studie konnte eine *Rebound*-Reaktion der Mitoseaktivität zumindest für die ersten Wochen nach Beendigung der TMZ-Applikation insofern ausgeschlossen werden, als dass Daten von MWM-Tests acht Wochen nach Behandlungsende auf eine anhaltende funktionale Beeinträchtigung hindeuten (Abschnitt 5.5.1, Abb. 5.6).

5.1.2 TMZ entfaltet seine Wirkung auf die Zellen der Stammzellnische in differenzierter Weise.

Die verschiedenen proliferativen Zelltypen der SGZ werden durch die TMZ-Applikation erwartungsgemäß differenziert beeinflusst: Das Zytostatikum konnte seine antiproliferative Wirkung auf die sich schnell teilenden Typ-2 Vorläuferzellen erheblich effektiver entfalten als auf die weniger teilungsaktiven, putativen Stammzellen (Typ-1). Folglich waren letztere zwar in reduzierter Zahl anzutreffen, jedoch noch in weit größerer relativer Häufigkeit vorhanden als die Typ-2 Vorläuferzellen.

Begründet werden kann die höhere Wirksamkeit gegenüber den sich schnell teilenden Vorläuferzellen durch den Wirkungsmechanismus von TMZ, da die DNA in teilungsaktiven Zellen für eine Methylierung besonders gut zugänglich ist. Quantitativ fand eine signifikante Reduktion der Gesamtzahl Nestin⁺ Zellen in der SGZ statt. Der Vorläuferzellenvorrat wird also bereits in frühen Phasen adulter Neurogenese dezimiert, ohne dabei die Population der eigentlichen Stammzellen zu zerstören.

Eine histologische Analyse der Nestin⁺ Zellen in der SGZ des DG zeigte eine unveränderte Morphologie sowohl der putativen Stammzellen (Typ-1) als auch der Vorläuferzellen in TMZ-behandelten Tieren (Abb. 4.2), wodurch eine spätere Beeinflussung hippokampaler Funktionen durch die Rekrutierung überlebender, jedoch veränderter Stamm- und Vorläuferzellen ausgeschlossen werden kann.

Hierfür spricht ebenso die unveränderte Gesamtmorphologie des DG und der SGZ: Da die antiproliferative Wirkung des TMZ auch Prozesse der Glio- und Angiogenese erfasst, sind insbesondere nach multizyklischen Applikationsparadigmen weitreichendere Schädigungen (z.B. der vaskulären Nische) möglich, welche jedoch in der vorliegenden Studie nicht beobachtet wurden.

Als natürliche Konsequenz der reduzierten Anzahl früher Nestin⁺ Vorläuferzellen fanden sich auch signifikant weniger DCX⁺ Zellen in der SGZ (Abb. 4.3). Die multizyklische und systemische Applikation von TMZ resultiert folglich in einer erfolgreichen Ablation neuronaler Vorläuferzellen im HC sowohl in frühen als auch in späten Stadien adulter Neurogenese.

5.1.3 Das hämatopoietischen System erholt sich nach Ende der TMZ Applikation rasch und vollständig.

Die systemische Applikation pharmakologisch wirksamer Substanzen birgt stets das Risiko unerwünschter und z.T. nur schwer identifizierbarer Nebenwirkungen, welche bei der Analyse der gewonnenen Daten zwingend berücksichtigt werden müssen. Im Falle eines zytostatischen Agens wie TMZ ist von einer Wirkung nicht nur auf die proliferativen Zellen innerhalb des ZNS, sondern insbesondere auch auf das hämatopoietische System des Knochenmarks auszugehen [Griffiths et al., 2000].

Die Erhebung hämatologischer Daten an drei unterschiedlichen Zeitpunkten ergab den erwarteten Befund einer signifikanten Leukopenie unmittelbar nach Beendigung des letzten von insgesamt vier Behandlungszyklen (Abb. 4.9). Darüber hinaus wurde bereits nach drei Wochen Rekonvaleszenz eine nahezu vollständige Erholung der proliferativen Aktivität des Knochenmarks beobachtet. Die hohe antiproliferative Wirksamkeit des TMZ führt also nicht zu einer dauerhaften Schädigung des hämatopoietischen Systems.

Dies wird zudem durch das Fehlen signifikanter Veränderungen einer Reihe weiterer hämatologischer Parameter untermauert (Abb. 4.10). Somit können zum Zeitpunkt des MWM Experiments die Tiere beider Gruppen aus hämatologischer Sicht als unauffällig angesehen werden. Beeinträchtigungen des Verhaltens aufgrund hämatologischer Befunde sind somit auszuschließen.

5.1.4 Der Allgemeinzustand der behandelten Mäuse ist mit dem der Kontrolltiere vergleichbar und untersteicht das positive Nebenwirkungsprofil des TMZ.

Auf der systemischen Ebene wurde zunächst der Einfluss einer TMZ-Applikation auf den wohl allgemeinsten Indikator des physiologischen Zustands eines Orga-

nismus betrachtet: Das Körpergewicht vor und unmittelbar nach der Behandlung sowie nach einer dreiwöchigen Rekonvaleszenzphase.

Die erhobenen Daten zeigten eine stetige Gewichtszunahme ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 4.11). Da eine Anorexie in Folge einer Zytostatikum-Injektion häufig vorkommt, kann die beobachtete Gewichtszunahme als Indiz für die außergewöhnlich gute Verträglichkeit der TMZ-Applikation angesehen werden. Insbesondere der Tatsache, dass es sich bei den getesteten Tieren um sehr junge Exemplare handelt, kommt eine zentrale Bedeutung zu, da eine konstante Gewichtszunahme in diesem Stadium der Ontogenese eng mit der Entwicklung unauffälliger motorischer, sensorischer und kognitiver Fähigkeiten verknüpft ist.

Bei allen im Rahmen der vorliegenden Studie getesteten Tieren kann aufgrund des Befundes einer stetigen Gewichtszunahme von einer normalen Entwicklung und einem guten allgemeinen Gesundheitszustand ausgegangen werden.

5.1.5 Die Ergebnisse des Rotarodexperiments schliessen einen negativen Einfluss den TMZ auf die motorische Lernfähigkeit, sowie das natürliche Explorationsverhalten aus.

Für die Leistungsfähigkeit von Tieren in Verhaltenstest wie der MWM sind die allgemeinen motorischen Fähigkeiten und die Möglichkeit des rein prozeduralen Lernens von grundlegender Bedeutung, und daher wurden sie mit dem Rotarod Test überprüft. Da zwischen den beiden Gruppen keinerlei signifikante Unterschiede an keinem der drei Messzeitpunkte auftraten, kann davon ausgegangen werden, dass die Applikation von TMZ keinen negativen Einfluss auf die lokomotorischen Fähigkeiten der Tiere hat (Abb. 4.12). Unterstützt wird diese Interpretation durch den Befund eines erfolgreichen motorischen Lernens beider Gruppen nicht nur über alle drei Messzeitpunkte, sondern auch innerhalb der einzelnen Testtage.

Darüber hinaus zeigten die behandelten Tiere in der MWM eine mit Kontrolltieren nahezu identische Schwimgeschwindigkeit (Abb. 4.14). Im Kontext der systemischen Applikation und Wirksamkeit des TMZ kann so eine Beeinträchtigung des für prozedurales Lernen essentiellen Zerebellums und des vestibulären Systems sowie von an der Steuerung von Bewegungen beteiligten, zentral-exekutiven und peripher-übertragenden Funktionen durch die pharmakologische Suppression adulter Neurogenese verneint werden.

Das Vorhandensein eines natürlichen Explorationsverhaltens wird durch die Ergebnisse des Open Field Tests bestätigt (Abb. 4.13). Für die Interpretation der in der MWM gewonnenen Daten ist dies von zentraler Bedeutung, da ein

intaktes Explorationsverhalten unabdingbare Voraussetzung für eine effektive Bewältigung dieser räumlichen Lernaufgabe ist.

Verstärktes Angstempfinden in Folge eines durch genetische Modifikationen oder pharmakologische Interventionen veränderten affektiven Systems ist ein in der Literatur häufig beobachtetes Phänomen. Da bei der Genese affektiver Störungen wie auch von Veränderungen des Explorationsverhaltens multiple Hirnareale beteiligt sind, können die Ergebnisse des in dieser Studie durchgeführten Open Field Tests als Argumente für eine intakte, unbeeinflusste Funktion nicht nur des HC, sondern auch weiterer Hirnareale, wie z.B. der Amygdala, und deren Verbindungen untereinander gewertet werden.

Die multizyklische, systemische Applikation des Zytostatikums TMZ stellt mithin eine effektive Methode zur Suppression adulter hippocampaler Neurogenese bei Mäusen dar. Akute Nebenwirkungen wurden nur in Form einer akuten Leukopenie sowie der Abwesenheit einer von den spezifischen elektrophysiologischen Eigenschaften junger, adult generierter Körnerzellen abhängigen Langzeitpotenzierung unmittelbar nach Beendigung der Behandlung beobachtet. Nach einer dreiwöchigen Rekonstitution traten diese Nebenwirkungen nicht mehr auf. Zum Zeitpunkt des MWM Tests in der vierten Woche nach der letzten TMZ-Injektion erschienen die getesteten Tiere sowohl in physiologischer als auch in verhaltensbiologischer Hinsicht als unauffällig und verfügten über alle notwendigen Fähigkeiten um den MWM Test erfolgreich und effizient zu bewältigen.

5.1.6 Die Konsolidierung und Retention von Gedächtnisinhalten erscheint nach einer TMZ Behandlung intakt.

Eine erfolgreiche Konsolidierung der im Verlaufe eines Versuchstages gespeicherten Informationen ist eine notwendige Grundvoraussetzung für das erfolgreiche Erlernen der MWM Tests und erfordert intakte Verbindungen des HC mit diversen Hirnarealen, insbesondere mit dem Kortex [Rolls, 1994, Lavenex et al., 2000, Ramus et al., 2007].

Aus Abb. 4.19 geht hervor, dass die Tiere beider Gruppen vor dem Wechsel der Plattformposition jeweils zu Beginn eines neuen Versuchstages auf einem vergleichbaren qualitativen Niveau begannen. Die Erfahrungen des Vortages konnten also offenbar auch nach einigen Stunden außerhalb der MWM Arena zur Lösung der räumlichen Lernaufgabe genutzt werden. Das Vorliegen einer soliden Konsolidierungs- und Retentionsfähigkeit kann als weiteres Argument für das Fehlen unspezifischer Effekte der TMZ Applikation angesehen werden.

5.1.7 Im DG behandelte Tiere fehlt selektiv der Beitrag junger, plastischer Körnerzellen zur LTP; die grundsätzliche Induzierbarkeit einer LTP im DG und der Region CA1 ist unverändert.

Einige Zytostatika wie z.B. das in früheren interventionellen Studien zur Funktion adulter Neurogenese eingesetzte MAM greifen in die Proteinbiosynthese ein. Obwohl das hier verwendete TMZ über einen anderen Wirkungsmechanismus verfügt, musste in der vorliegenden Studie eine Einflussnahme der Behandlung auf Prozesse der Proteinbiosynthese, insbesondere bei der Induktion einer synaptischen Langzeitpotenzierung (LTP) ausgeschlossen werden. Hintergrund ist hier die Tatsache, dass die dauerhaften Formen einer LTP zwingend die Synthese spezifischer Proteine erfordern und eine intakte LTP als die Grundlage von Lernprozessen angesehen wird. Etwaige Beeinträchtigungen des Verhaltens können folglich durch eine Fehlfunktion bei der Induktion einer LTP an den Synapsen des HC entstehen.

Einzelzellableitungen haben die besonderen elektrophysiologischen Eigenschaften zwei bis vier Wochen alter, adult generierter Körnerzellen aufgezeigt [Schmidt-Hieber et al., 2004]. Die noch jungen Körnerzellen sind nicht der allgemein im adulten DG vorherrschenden GABAergen Inhibition unterworfen und zeigen eine erheblich erleichterte Erregbarkeit, welche auf das Vorhandensein eines hohen Eingangswiderstandes sowie der Expression niedrig-schwelliger Kalzium-Kanäle zurückzuführen ist [Wang et al., 2000, Schmidt-Hieber et al., 2004]. Auch das Membranruhepotential ist deutlich erhöht, was insgesamt mit den übrigen zuvor genannten Eigenschaften in einer erhöhten Plastizität junger Körnerzellen gegenüber ihren reifen Geschwistern resultiert und auch für die in der vorliegenden Studie gefundene, schwache LTP im DG unbehandelter Tiere verantwortlich zeichnet. Logischerweise verschwindet diese LTP mit einer weitestgehenden Ablation adulter hippocampaler Neurogenese (Abb. 4.4), was gut mit den Beobachtungen anderer Autoren übereinstimmt [Snyder et al., 2001, Saxe et al., 2006].

Das Vorliegen einer reliablen LTP-Induzierbarkeit im DG und der Region CA1 wurde hier an hippocampalen Gewebeschnitten durch die Reizung des mittleren Abschnitts des Tractus perforans (für den DG) bzw. afferenter Fasern der Schaffer-Kollateralen (für die Region CA1) überprüft. Im Falle einer Perfusion des Gewebeschnittes mit reinem ACSF, also ohne pharmakologische Blockade GABAerger Aktivität, konnte bei Tieren der Kontrollgruppe eine schwache, aber stabile LTP im DG beobachtet werden, welche bei behandelten Tieren fehlte (Abb. 4.8). Dies bestätigt frühere Arbeiten über eine mögliche

Rolle adulter Neurogenese bei der LTP-Induktion im DG, bei denen unter den gleichen Bedingungen ebenfalls eine schwache, von dem Vorhandensein junger, durch adulte Neurogenese erzeugter Granulozyten abhängige LTP gefunden wurde [Wang et al., 2000, Snyder et al., 2001].

Nach pharmakologischer Blockade GABAerger Aktivität durch Perfusion des Gewebes mit ACSF und $5\mu\text{M}$ Bikukulin trat jedoch eine LTP erheblich stärker Amplitude auf, welche zudem unabhängig vom Vorhandensein adulter Neurogenese war (Abb. 4.5). Die Erklärung für dieses Ergebnis ist der geringe Anteil junger, unreifer Zellen an der Gesamtheit von Körnerzellen, wodurch der fehlende Beitrag der ersteren maskiert wird. Die Induzierbarkeit einer starken LTP bei Blockung GABAerger Einflüsse belegt das Fehlen einer negativen Wirkung der TMZ-Applikation auf die bereits vorhandenen, reifen Körnerzellen.

Die Induzierbarkeit einer starken und stabilen LTP in der Region CA1 war sowohl in Tieren der Kontrollgruppe als auch nach Applikation von TMZ reliabel vorhanden und bestätigt somit das zuvor für die reifen, bereits funktional integrierten Körnerzellen gefundene Ergebnis einer fehlenden negativen Beeinflussung der für das Entstehen einer LTP notwendigen molekularen Mechanismen (Abb. 4.6).

5.1.8 Das fehlende Auftreten entzündlicher Prozesse nach erfolgter TMZ Behandlung stellt einen erheblichen Vorteil gegenüber der Nutzung ionisierender Strahlung zur Suppression adulter Neurogenese dar.

Die räumlich fokussierte Bestrahlung des HC mit ionisierenden Strahlen ist eine weitere Methode zur Ablation adulter Neurogenese. Dabei tritt stets in Folge der Bestrahlung eine akute Entzündungsreaktion auf, welche die Stammzellnische der SGZ in einem erheblichen Umfang schädigt und so die Zellproliferation dauerhaft beeinträchtigt [Monje et al., 2003].

Wichtiger Mediator entzündlicher Prozesse im Gehirn sind die Mikroglia, welche zunächst in einem Ruhezustand (*ramified*) vorliegen, durch pathologische Stimuli aktiviert werden und einen starken inhibitorischen Einfluss auf die Vorgänge adulter Neurogenese nehmen. Daher muss die vermehrte Anwesenheit aktivierter Mikrogliazellen auch in Folge einer TMZ-Behandlung nach Möglichkeit ausgeschlossen werden.

In der molekularen Aktivierungskaskade der Mikroglia tritt das kalziumbindende Protein Iba-1 sehr frühzeitig auf, weshalb es für einen sensitiven Nachweis entzündlicher Prozesse besonders geeignet ist. Die in der vorliegenden Studie durchgeführte, auf dem immunohistologischen Nachweis von Iba-1 beruhende, quantitative Analyse aktivierter Mikrogliazellen zeigte für keine der verwen-

deten TMZ-Dosen eine Veränderung der Anzahl und Morphologie Iba-1⁺ Mikroglia im DG gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 4.4 und 4.5). Es ist daher davon auszugehen, dass in Folge einer TMZ-Injektion keine akuten entzündlichen Prozesse auftreten, welche die adulte hippocampale Neurogenese über die Ablation der proliferativen Vorläuferzellen hinaus negativ beeinflussen.

Gegenüber der äußerst effektiven und räumlich fokussierten Bestrahlung ist dies bei der Nutzung von TMZ als pharmakologischem, interventionellem Ansatz in Verbindung mit einer späteren Verhaltensanalyse als erheblicher Vorteil zu werten.

5.1.9 Ein Vergleich mit anderen Ansätzen zur Suppression adulter hippocampaler Neurogenese offenbart die Vorteile einer multizyklischen TMZ Applikation.

Im Vergleich mit im Kontext früherer Studien zur Ablation adulter Neurogenese verwendeter Ansätze werden einige Vorzüge, aber auch Limitationen der hier erfolgreich etablierten TMZ-Applikation deutlich. Ein bereits zuvor verwendeter pharmakologischer Ansatz ist die Applikation des ebenfalls methylierend wirkenden, klinisch jedoch weitgehend irrelevanten Zytostatikums Methylazoxymethanol (MAM) [Shors et al., 2001, 2002, Bruel-Jungerman et al., 2005]. Inzwischen wurde die begrenzte Effektivität dieses Ansatzes belegt, welche bei einer Reduktion BrdU⁺ Zellen im DG um ca. 60% (7 mg/kg MAM) liegt [Dupret et al., 2005]. Zudem besitzt die Behandlung mit MAM gravierende Nebenwirkungen in Form von Kachexien, Muskelatrophien, ausgeprägtem Fellverlust und allgemeiner Passivität. Dies stellt die Verwertbarkeit in Folge einer MAM-Applikation durchgeführter Verhaltenstests erheblich in Frage. Dem MAM-Ansatz steht mit der multizyklischen Anwendung von TMZ eine erheblich höhere Effektivität (TMZ: >90%, MAM <60%) sowie das Fehlen dauerhafter und schwerwiegender Nebenwirkungen gegenüber. Dabei ist davon auszugehen, dass diese Unterschiede sowohl dem erheblich moderneren pharmakologischen Standard des TMZ als auch dem differenzierteren, multizyklischen Applikationsparadigma geschuldet sind.

Die fokale Bestrahlung der SGZ mit ionisierenden Strahlen ist mit einer Reduktion von >95% die effektivste Methode zur Ablation proliferativer Aktivität. Zudem können aufgrund der räumlich eng begrenzten, nicht-systemischen Wirkung sekundäre Effekte auf die Leistungsfähigkeit in späteren Verhaltenstests zunächst weitestgehend ausgeschlossen werden. In Folge des Einwirkens ionisierender Strahlung kommt es jedoch stets zum Auftreten einer ausgeprägten Entzündungsreaktion in den betroffenen Hirnarealen, welche sich durch die Beschädigung der Stammzellnische nachhaltig negativ auf die Prozesse adul-

ter Neurogenese auswirkt [Monje et al., 2003]. Die proliferativen Zellen im DG gehen also nicht nur in Folge der durch die ionisierende Strahlenwirkung verursachte DNA-Schädigungen in den Apoptoseprozess über. Zudem birgt die Zerstörung der unter physiologischen Bedingungen für den Erhalt einer in Bezug auf adulte Neurogenese permissiven Mikroumgebung durch inflammatorische Prozesse das erhebliche Risiko unerwünschter und nicht sinnvoll interpretierbarer Nebeneffekte auf die hippocampale Funktion.

Somit muss die Bestrahlung des HC als Ansatz zur Ablation adulter Neurogenese als ambivalent hinsichtlich seines Nutzens für die Beurteilung der funktionalen Relevanz adult generierter Neurone angesehen werden. Die Applikation von TMZ hat hier den Vorteil des Ausbleibens durch inflammatorische Prozesse ausgelöster, persistenter Schädigungen der Stammzellnische der SGZ. Dies ist insbesondere im Hinblick auf solche Versuchsparadigmen relevant, bei denen eine effiziente Suppression adulter Neurogenese nur transient erfolgen soll.

Rene Hen und Kollegen verwenden in ihren Studien einen genetischen Ansatz zur effektiven und selektiven Suppression adulter Neurogenese im HC von Mäusen [Saxe et al., 2006, 2007]. Dabei wird ein transgener Mausstamm erzeugt, bei dem sich unter der Steuerung des GFAP-Promotors das Gen für die Thymidinkinase des Herpes Virus befindet, so dass es bei GFAP⁺ Zellen zu einer Koexpression dieses viralen Proteins kommt. Durch die Anwesenheit der viralen Thymidinkinase werden die betreffenden Zellen sensitiv für die apoptoseinduzierende Wirkung von Ganciclovir (GCV). Dies führt zu einer effektiven, mit der nach einem Einsatz ionisierender Strahlen vergleichbaren Suppression mitotischer Aktivität im DG.

Neben den durch die GCV-Applikation induzierten hämatologischen und allgemeinen Nebenwirkungen besteht ein weiterer Nachteil des Ansatzes in der Ablation aller GFAP⁺ Zellen im Gehirn des betreffenden Organismus, so dass auch die teilungsaktiven B-Zellen der SVZ betroffen sind. Da die GFAP⁺ Stammzellen der SVZ und SGZ nicht nur Nachkommen der neuronalen, sondern auch der glialen Entwicklungslinie hervorbringen, kommt es über die bloße Ablation neuer Neurone hinaus zu einer Beeinflussung der Anzahl von Oligodendrozyten und Astrozyten in der jeweiligen Stammzellnische.

Ferner birgt die für eine Verwendung von GCV erforderliche Anwesenheit eines GFAP-TK Konstruktes in der DNA der getesteten Mäuse das in besonderer Weise unvorhersehbare Problem einer Veränderung des Verhaltensphänotyps. Auch wenn direkte Interaktionen des eingebrachten DNA-Fragments mit der Wirts-DNA unwahrscheinlich sind, ist eine indirekte Beeinflussung des beobachteten Verhaltensphänotyps möglich. Ein eindrucksvolles Beispiel ist das

Nestin-GFP Konstrukt von Yamaguchi et al., bei dem sich unter Kontrolle des Nestin-Promotors das Gen für das *green fluorescent protein* (GFP) befindet [Yamaguchi et al., 2000]. Die bloße Anwesenheit dieses Konstruktes sowie des GFP in den Nestin⁺ Zellen resultiert in einem gegenüber Tieren des ursprünglichen Stammes erheblich veränderten Verhaltensphänotyp.

Im Vergleich mit den bisher für die Ablation adulter Neurogenese verwendeten Methoden stellt TMZ also hinsichtlich seiner großen Effektivität und den geringen Nebenwirkungen im Kontext zahlreicher experimenteller Paradigmen eine gute Alternative dar. Besonders bei Fragestellungen, welche eine transiente, aber effektive und hinsichtlich der Nebenwirkungen günstige Suppression adulter Neurogenese erfordern, empfiehlt sich die Applikation von TMZ. Eine vorherige genetische Manipulation der behandelten Tiere ist nicht erforderlich und erlaubt somit die einfache Anwendung auf unterschiedlichste Genotypen. Als interventioneller Ansatz zur Suppression adulter Neurogenese in idealiter verbleibt jedoch die künftige Verfügbarkeit eines hochspezifischen und effektiven, genetischen, konditionalen Knock-out Modells.

5.2 Die Suppression adulter Neurogenese resultiert in quantitativen und qualitativen Veränderungen des räumlichen Lernens.

Zur allgemeinen Bewertung der Lernleistung in der MWM getesteter Tiere wird zunächst eine Auswahl quantitativer Standardparameter verwendet. Diese umfasst die für das Auffinden der Zielplattform benötigte Latenzzeit, die Länge des hierfür zurückgelegten Schwimmpfades sowie die relative Aufenthaltsdauer in den einzelnen Quadranten der Versuchsarena. Die Evaluation dieser Größen ermöglicht eine Beurteilung der allgemeinen Lernleistung sowie im begrenzten Umfang auch der qualitativen Aspekte des in der MWM gezeigten Verhaltens.

5.2.1 Die behandelten Tiere können die MWM grundsätzlich erlernen, zeigen jedoch eine insgesamt signifikant geringere Lernleistung.

Das Vorliegen einer eindeutigen Lernkurve sowohl für die bis zum Erreichen der Zielplattform benötigten Latenzzeit als auch für die dabei zurückgelegte Schwimmdistanz schließen eine allgemeine hippokampale Dysfunktion aus. Auch eine in Folge der systemischen TMZ Applikation beeinträchtigte Funktion anderer für das Erlernen der MWM relevanter Hirnareale kann somit negiert werden, was eine weitere Stärkung des hier etablierten pharmakologischen An-

satzes zur Ablation adulter Neurogenese bedeutet.

Die behandelten Tiere zeigten zwar eine insgesamt signifikant schlechtere Lernleistung, jedoch erreichten sie insbesondere für die erste Zielposition am Ende der ersten Versuchsphase mit den Kontrollen vergleichbare Schwimmzeiten und -distanzen (Abb. 4.15 A und B). Am Ende der zweiten Phase des Versuchs unterscheiden sich beide Gruppen dann hochsignifikant voneinander, was zunächst einen Hinweis auf ein spezifisch nach dem Verschieben der Zielplattform auftretendes Phänomen darstellt.

5.2.2 Die Analyse der relativen Aufenthaltsdauer in den Quadranten der MWM offenbart im Kontext signifikanter Umweltveränderungen eine reduzierte kognitive Flexibilität in Folge einer supprimierten adulten Neurogenese.

Das Vorliegen eines signifikanten, in der zweiten Versuchsphase nach dem Wechsel der Zielposition auftretenden Effektes geht aus den Daten für die relative Aufenthaltsdauer in den einzelnen Quadranten des MWM Pools deutlicher hervor. In Abb. 4.16 A fällt zunächst die mit ca. 55% deutlich über dem Zufallsniveau liegende, relative Aufenthaltswahrscheinlichkeit beider Gruppen im ersten Zielquadranten auf. Diese nahm an Tag zwei zunächst ab, um sich dann an Tag drei wiederum für beide Gruppen bei 44% (TMZ) bzw. 46% (CTR) zu stabilisieren.

Als Erklärung für die am ersten Tag scheinbar so große Präferenz für den NE-Quadranten dient die im Nachhinein unglückliche Tatsache, dass sich die Startposition zu diesem Zeitpunkt in demselben Quadranten befand und somit dort die Tiere konsequenterweise einen erheblichen Teil ihrer frühen Suchbewegungen ausführten. In dieser Hinsicht können die erhobenen Daten für den NE-Quadranten am ersten Versuchstag an dieser Stelle nicht für eine sinnvolle Bewertung der Entwicklung einer räumlichen Präferenz herangezogen werden. Für den später erstellten Okkupationsplot gilt diese Einschränkung jedoch ausdrücklich nicht. Im Verlauf des gesamten Experiments sind Start- und Zielquadrant für keinen weiteren Versuch identisch. Die nach dem ersten Tag beobachteten Präferenzen können somit zweifelsfrei als erlernt angesehen werden.

Für die Tage zwei und drei wurde eine Zunahme der Aufenthaltswahrscheinlichkeit im ersten Zielquadranten beobachtet, die Tiere beider Gruppen entwickelten also eine deutlich über dem Zufallsniveau liegende räumliche Präferenz für die Zielplattform. Erwartungsgemäß hielten sich beide Gruppen zu diesen Zeitpunkten nur mit einer relativ geringen, zumeist unter dem Zufallsniveau liegenden Wahrscheinlichkeit in den übrigen drei Quadranten des MWM-Pools auf (Abb. 4.16 B und 4.17 A und B).

Die Abnahme der spatialen Präferenz für den vorigen Zielquadranten in Folge der Veränderung der Plattformposition sowie die Entwicklung einer neuen Präferenz für den aktuellen Zielquadranten spiegelt die Flexibilität einer kognitiven Repräsentation relevanter Stimuluskonfigurationen der Versuchsarena und ihrer Umgebung wider. Wie Abb. 4.16 A und B zeigen, war eine solche Flexibilität bei Tieren der Kontrollgruppe deutlich vorhanden: Die Präferenz für den vorigen Zielquadranten sank innerhalb eines Tages von 45% (Ende Tag drei) auf das Zufallsniveau (Tag vier) und lag auch an Tag fünf mit 28% nicht erheblich über diesem Wert. Gleichzeitig stieg die Aufenthaltswahrscheinlichkeit für den neuen Zielquadranten von 6% (Tag drei) rapide bis auf 29% (Tag vier) bzw. 41% (Tag fünf) an, was eine schnelle und plastische Modifikation der relevanten synaptischen Gewichte im Enkodiermechanismus des DG widerspiegelt. Die Kontrolltiere haben sich also schnell und effizient an die veränderte Situation anpassen können.

Dies gilt jedoch nicht für die Gruppe mit effektiver Suppression adulter Neurogenese im DG: Hier zeigen Abb. 4.16 A und B eine verzögerte und dadurch signifikant weniger effiziente Anpassung der räumlichen Präferenz an die veränderten Versuchbedingungen. Sowohl das Vergessen der ersten Zielposition als auch die Entstehung einer neuen räumlichen Präferenz in Folge einer Veränderung der Position der Zielplattform erfolgte verlangsamt mit einer im Vergleich zu den Kontrollen durchschnittlichen Verzögerung von etwas mehr als einem Tag. Da das Versuchsprotokoll nach dem Wechseln der Zielplattformposition nur noch zwei weitere Versuchstage vorsah, konnten die TMZ-Tiere das Leistungsniveau der unbehandelten Gruppe nicht erreichen. Das Vorliegen eines signifikanten DAY*GROUP Interaktionseffektes für die relative Aufenthaltsdauer in allen betrachteten MWM Quadranten belegt die hinsichtlich der Gruppen differenzierte Dynamik und Effektivität in der Entwicklung räumlicher Präferenzen.

Für das Verhalten hinsichtlich der beiden Nicht-Zielquadranten liegen sich von den bereits besprochenen deutlich unterscheidende Befunde vor (Abb. 4.17 A und B): Im Gegensatz zu den für die Zielquadranten erhobenen Daten trat hier keinerlei Verschiebung zwischen den beiden getesteten Gruppen auf. Die absoluten Aufenthaltswahrscheinlichkeiten unterschieden sich nur an den Tagen drei und fünf signifikant voneinander, jedoch fiel dieser Unterschied geringer aus als der durchschnittliche Unterschied für die Zielquadranten. Das auf die beiden Zielquadranten beschränkte Auftreten signifikanter Verzögerungen bezüglich des Vergessens bzw. der Ausbildung räumlicher Präferenzen erlaubt daher den Ausschluss eines unspezifischen Lern- oder Verhaltendefektes.

5.2.3 Die Suppression adulter Neurogenese resultiert in zwei kausal zusammenhängenden, spezifischen Effekten.

Zusammenfassend können also zwei Effekte der Ablation adulter hippocampaler Neurogenese auf das von den Tieren in der MWM gezeigte Lernverhalten identifiziert werden. Zum Einen erscheint zunächst die Lernleistung sowohl hinsichtlich der benötigten Zeit und der Länge des zurückgelegten Schwimmpfades als auch der Entwicklung einer spatialen Präferenz für den jeweiligen Zielquadranten signifikant gegenüber den Kontrollen allgemein reduziert. Dies gilt für beide Phasen des Versuchs - vor und nach Verschieben der Zielplattform - sowie für alle Kombinationen von Start- und Zielquadranten. Von entscheidender Bedeutung ist hier dennoch, dass die behandelten Tiere den MWM Test grundsätzlich erlernen können und dabei z.T. das Niveau der Kontrollgruppe erreichen.

Darüber hinaus findet sich als zweiter Effekt eine spezifische Beeinträchtigung der Plastizität in der effektiven Nutzung kognitiver spatialer Repräsentationen der jeweils aktuellen Zielposition und relevanter Umgebungsstimuli im DG. Nach Verschieben der Zielplattform manifestiert sich diese durch das Auftreten einer für die Zielquadranten spezifischen Verzögerung in der Entwicklung einer räumlichen, auf das aktuelle Ziel bezogenen Präferenz und resultiert in einer gegenüber den Kontrolltieren entsprechend verzögerten Lernkurve nach Verschiebung der Zielplattform.

Beide Beobachtungen können in einen kausalen Zusammenhang gebracht werden: Das weniger effektive Ausbilden einer spatialen Präferenz und eine verminderte Plastizität in deren Anwendung, insbesondere auch nach Verschieben der Zielposition um 180°, resultieren in längeren Schwimmzeiten, größeren zurückgelegten Wegstrecken und mithin in einer allgemein schlechteren Gesamtleistung.

5.2.4 Die quantitative Analyse der MWM Daten scheint die Prädiktion des Modells von Wiskott et al. zu bestätigen, qualitative Aspekte bleiben jedoch unberücksichtigt.

Aus der Perspektive des Modells von Wiskott et al. erscheint damit eine wesentliche Prädiktion des Modells bereits erfüllt: Durch das Auftreten einer veränderten und neuartigen Situation tritt im DG der behandelten Tiere das Problem einer katastrophalen Interferenz der in den ersten drei Tagen etablierten mit den für die neue Situation optimierten Enkodierungsmustern auf. In Folge dieser Interferenz ist - aus Sicht des Modells - das Erlernen einer neuen Plattformposition erschwert und von geringerer Effektivität als bei einer Kom-

pensation dieses Effektes durch adulte Neurogenese.

Das quantitative Datenmaterial der klassischen MWM Analyse in Form der bis jetzt diskutierten Größen erlaubt noch keine hinreichend differenzierte Aussage über die Validität einer Bestätigung dieser Prädiktion und ihrer Begründung. So können als Ursachen der beobachteten Lerndefizite neben der gewünschten Suppression adulter Neurogenese auch subtile Veränderungen qualitativer Aspekte des Erlernens der MWM angenommen werden, welche ihrerseits wieder auf eine Beeinflussung extrahippokampaler Hirnareale und funktionaler Schaltkreise durch die TMZ Applikation zurückzuführen sind. Da das Erlernen der MWM einen komplexen Prozess mit Beteiligung zahlreicher, verschiedener funktionaler Systeme darstellt, kann eine solche Beeinflussung auch durch die verschiedenen, im Rahmen der Evaluierung möglicher Nebenwirkungen der TMZ Applikation durchgeführten physiologischen und behavioralen Tests nicht vollständig verneint werden.

5.2.5 Die Darstellung der Aufenthaltswahrscheinlichkeit im Okkupationsplot erlaubt eine Beurteilung der Qualität des Lernvorgangs und bestätigt die zuvor gefundenen Effekte einer supprimierten adulten Neurogenese.

Um zunächst einen präziseren Einblick in die Entwicklung spatialer Präferenzen im Verlauf des Experimentes zu gewinnen, wurde ein Okkupationsplot der MWM Arena für beide Gruppen erstellt, welcher aufgrund des Wegfallens der Beschränkung auf lediglich vier Quadranten eine effektivere und zugleich intuitivere Analyse des räumlichen Lernprozesses erlaubt (Abb. 4.18 A und B). Die Daten für die Aufenthaltswahrscheinlichkeit in den einzelnen Quadranten konnten erwartungsgemäß bestätigt werden.

Die Kontrollgruppe zeigte ein idealtypisches Verhalten in der MWM (Abb 4.18 A): Zunächst deckten die Tiere im ersten Versuch des ersten Tages mit ihrem Schwimmpfad nahezu die gesamte Pooloberfläche ab. Die Plattform wurde allenfalls zufällig gefunden und aus Sicht der Tiere erschienen alle Positionen der Arena gleichwertig. Bereits im zweiten Versuch jedoch war der Aufenthalt auf den Zielquadranten beschränkt. Folglich sind also bereits durch einen nur kurzen Aufenthalt auf der Plattform hinreichend starke, neuronale Repräsentationen sowohl prozeduraler als auch spatialer Aspekte des zu erlernenden MWM Versuchs in Form entsprechender synaptischer Modifikationen im HC und anderer beteiligter Areale entstanden, um die perzipierten Aktivitätsmuster in geeigneter Weise zu enkodieren und das von den Mäusen gezeigte Verhalten zielgerichtet steuern zu können. In den übrigen Versuchen des ersten Tages reduzierte sich der beschwommene Bereich auf die unmittelbare Nachbarschaft

der Zielplattform.

Aus der Perspektive des Modells von [Wiskott et al., 2006] findet also eine fortwährende Konsolidierung des im DG implementierten Enkodiermechanismus auf der Grundlage einer Redundanzverstärkung repetitiver, relevanter Stimuluskonfigurationen statt, wodurch die Effizienz der Enkodierung und mithin die Nutzbarkeit der gespeicherten Informationen erhöht wird.

Zu Beginn des zweiten Tages erschienen die Suchmuster zunächst tendenziell stärker verteilt, jedoch mit einer bestehenden, eindeutigen Präferenz für das Ziel im NE Quadranten. Da die Versuchstiere die Nacht in ihren Haltungskäfigen unter standardisierten Haltungsbedingungen verbrachten und somit kein beliebiger Zugang zu den Stimuli der MWM Arena oder des Versuchsraumes bestand, kann hier von einem partiellen Verblässen der im Laufe des ersten Versuchstages etablierten hippocampalen Repräsentationen ausgegangen werden. Da die Dauerhaftigkeit der synaptischen Modifikationen im HC von der Intensität, Häufigkeit und Dauer der repräsentierten Stimuli abhängt, reicht die Exposition im Verlauf der sechs Versuche des ersten Tages nicht aus, um eine über mehrere Tage stabile Modifikation der synaptischen Verbindungen im DG zu bewirken.

Andererseits fanden die Tiere sehr schnell zu den bereits erlernten Verhaltensmustern zurück: Die Elemente des an der Enkodierung beteiligten neuronalen Netzwerkes werden rasch aufgrund der zwischen ihnen durch LTP verstärkten synaptischen Transmission kollektiv aktiviert. Daher begannen die Mäuse nicht wieder wie am ersten Tag, sondern profitierten von den im Laufe der ersten sechs Versuche ausgebildeten Veränderungen relevanter, synaptischer Verbindungen.

Die Versuche des zweiten Tages resultieren in einer weiteren Verstärkung der entsprechenden Netzwerkeile im DG, wobei repetitive, über alle Tage und Versuchsdurchgänge konstante Elemente konsequenterweise am meisten profitieren. Auf diese Weise nimmt das Versuchsprotokoll in erheblichem Maße Einfluss auf die modifikativen Prozesse an den Synapsen beteiligter hippocampaler Neurone. Dies wird später von zentraler Bedeutung für die Abgrenzung des dargestellten MWM Versuchs von scheinbar ähnlichen Versuchen mit differenten Ergebnissen sein (s.u.).

Am dritten Tag sind die synaptischen Modifikationen hinreichend stark und dauerhaft um bereits im ersten Versuch des Tages in einem eindeutig zielgerichteten Verhalten zu resultieren. Die räumliche Präzision hat nach drei Tagen am Ende der ersten Versuchsphase nahezu ein Maximum erreicht; die getesteten Kontrolltiere haben die MWM also effektiv erlernt.

Bei den behandelten Tieren ergab sich ein anderes Bild (Abb. 4.18 B): Ob-

wohl auch die Mäuse mit supprimierter adulter Neurogenese das Auffinden der unsichtbaren Zielplattform nach drei Versuchstagen reliabel erlernten, traten an den ersten beiden Versuchstagen spezifische Unterschiede auf. So erfolgte die Ausbildung einer präzisen räumlichen Präferenz deutlich langsamer und erst am dritten Versuchstag wurde ein mit der Kontrollgruppe vergleichbares Niveau erreicht. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass sich die TMZ-Tiere insbesondere an Tag zwei überwiegend in den zentralen Bereichen des MWM-Pools aufhielten. Dieses Verhalten wurde für die Kontrollen nur als kurzzeitiger Zwischenzustand beobachtet und dementsprechend schnell durch zielgerichtetere Suchmuster ersetzt. In Folge einer TMZ-Applikation ist also offenbar bereits in der Akquisitionsphase die Fähigkeit der betroffenen Tiere beeinträchtigt, neuronale Repräsentationen räumlicher Relationen aus der MWM Arena effektiv für eine zielgerichtete und präzise Navigation zu nutzen.

Nach erfolgter Verschiebung der Plattformposition um 180° relativ zum Mittelpunkt des Pools traten die Unterschiede zwischen den beiden getesteten Gruppen besonders deutlich hervor. Die rasche und effiziente Umorientierung der Kontrolltiere stand in direktem Gegensatz zu einer dominanten, perseverierenden Präferenz der behandelten Mäuse für die erste Plattformposition. Offenbar waren letztere anders als unbehandelte Tiere nicht in der Lage die im Laufe der bereits absolvierten Versuchstage etablierten Repräsentationen räumlicher Relationen im Enkodiernetzwerk des DG flexibel an die veränderten Umgebungsbedingungen und Stimuluskonfigurationen anzupassen und zu nutzen. Auch nach zwei Versuchstagen war eine Präferenz für das neue Ziel nur rudimentär in einigen wenigen Tieren der TMZ-Gruppe vorhanden. Der Enkodiermechanismus passt sich also nur langsam und weitestgehend ineffektiv an die veränderte Situation an. Am Ende des fünften Versuchstages erreichten zumindest einige wenige Tiere der behandelten Gruppe ein mit der Kontrollgruppe vergleichbares Niveau.

Wie zuvor dargestellt, ist der molekulare Mechanismus einer synaptischen Modifikation im DG intakt. Daher kann eine allgemeine Reduktion synaptischer Modifikabilität im DG als Ursache des beobachteten Verhaltens ausgeschlossen werden. Eine ausreichend große Plastizität des Enkodiernetzwerkes in Form junger Neurone kann mithin als notwendige Voraussetzung für die rasche und effiziente Entwicklung räumlich präzise auf die unmittelbare Zielregion eingeschränkter Suchmuster angenommen werden. Weitere Belege für eine solche Relevanz adult generierter Granulozyten bei der Progression der Suchmuster in Richtung einer zunehmenden Abhängigkeit vom HC werden weiter unten im Kontext der qualitativen Analyse der Benutzung verschiedener Suchstrategien besprochen.

Die Analyse der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten im Verlauf des MWM Experiments belegt also die beiden bereits zuvor für die klassische, quantitative Betrachtung gefundenen Effekte einer allgemeinen Beeinträchtigung der Lernfähigkeit und einer signifikanten Reduktion der Plastizität in der Formung und Anwendung neuronaler Repräsentationen von Stimuluskonfigurationen im HC. Der Vergleich der innerhalb der einzelnen Versuchstage gezeigten Aufenthaltswahrscheinlichkeiten liefert zudem eindeutige Hinweise auf einen qualitativen Unterschied beider Gruppen hinsichtlich des stattfindenden Lernprozesses.

Es muss also, auch aufgrund der oben diskutierten quantitativen Daten die Frage gestellt werden, ob die beobachteten Unterschiede in Folge der Suppression adulter Neurogenese tatsächlich auf spezifische Veränderungen in der Anwendung hippocampusabhängiger Suchmuster des MWM Lernens zurückzuführen sind oder aber die behandelten Tiere grundsätzlich andere, sogar hippocampusunabhängige Verhaltensstrategien nutzen.

5.2.6 Die algorithmusbasierte qualitative Analyse der im MWM-Versuch genutzten Suchstrategien hat sich als sinnvoll und zuverlässig erwiesen.

Das Konzept einer computergestützten qualitativen Analyse des von Mäusen in der MWM gezeigten Verhaltens hat sich in der Umsetzung und Anwendung auf die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten bewährt. Belegt wird dies durch eine außerordentliche Reliabilität des verwendeten Algorithmus (>95% korrekte Klassifikationen in 4320 Einzelversuchen) und die hohe Spezifität der gefundenen Gruppenunterschiede.

Wie aus Abb. 4.19 A und B hervorgeht, fand bei den Tieren beider Gruppen die sequentielle Nutzung zunehmend hippocampusabhängiger Suchstrategien statt. Diese kann, ebenso wie das effektive Überwinden des Thigmotaxisstadiums in den ersten Versuchen, als Beweis einer intakten exekutiven Funktion auch in den Gehirnen behandelter Mäuse interpretiert werden: Analog zu den bereits für den Okkupationsplot besprochenen Befunden nahm die Nutzung effizienter, räumlicher und hippocampusabhängiger Strategien zum Ende eines jeden Tages hin signifikant zu, um nach Ablauf der Versuche des dritten Tages ein Maximum zu erreichen.

Die bereits zuvor dargestellte Vorstellung von sich entwickelnden neuronalen Repräsentationen im DG die MWM erlernender Mäuse wird durch die qualitativen Befunde in besonderer Weise gestützt, da sie eine sinnvolle Verknüpfung quantitativer Messgrößen mit den qualitativen Aspekten des Lernprozesses erlauben. Auf dieser Grundlage können tragfähige Argumente für eine Hypothese bezüglich der im Verlauf der Durchführung eines MWM Experiments stattfin-

denden kognitiven Prozesse im HC formuliert werden, da die distinkten Merkmale der einzelnen Strategien jeweils spezifische kognitive Korrelate bedingen. Verbindendes Element im Verlauf des Lernprozesses ist die mit einer stetigen Steigerung der Effizienz korrelierte Zunahme der Abhängigkeit des gezeigten Suchverhaltens von einer intakten HCF.

5.2.7 Die Tiere beider Gruppen verwenden in der MWM das gesamte Spektrum verfügbarer Suchstrategien.

Die oben aufgeworfene Frage nach einer potentiellen Rolle extrahippokampaler Verhaltens- und Lernstrategien bei der Entstehung allgemeinerer Unterschiede in der Lernleistung beider getesteter Gruppen kann nun eindeutig verneint werden, da die Tiere beider Gruppen das gesamte Spektrum verfügbarer Suchmuster in grundsätzlich analoger Weise anwendeten und sich hinsichtlich der Häufigkeit der Anwendung eben gerade in Bezug auf die hippocampusunabhängigen Formen nicht signifikant unterschieden. Dieses wichtige Ergebnis ist nicht zuletzt auch im Zusammenhang mit den im Rahmen der Etablierung des TMZ als Ansatz zur Suppression adulter Neurogenese erhobenen Daten aus diversen physiologischen und behavioralen Tests zu sehen.

5.2.8 Signifikante Gruppenunterschiede treten spezifisch nur dann auf, wenn das gezeigte Verhalten einen intakten Hippokampus erfordert.

Der Spezifität der beobachteten signifikanten Unterschiede in der Benutzung der jeweiligen Strategien an den einzelnen Versuchstagen unterstreicht einmal mehr eine fehlende Beeinflussung extrahippokampaler Hirnregionen und -funktionen durch die TMZ-Behandlung: Insbesondere bei den beiden explizit hippocampusunabhängigen Strategien THIGMOTAXIS und RANDOM SEARCH fehlten signifikante Unterschiede. Zählt man, und es gibt wie unter 3.10 dargestellt berechnete Gründe hierfür, die CHAINING Strategie ebenfalls zu der Gruppe der zuvor genannten einfacheren Suchmuster, waren von den acht klassifizierten Strategieformen genau jene drei hippocampusunabhängigen nicht signifikant unterschiedlich (siehe hierzu auch Abb. 4.19 B und 4.20). Die Gruppenunterschiede traten mithin spezifisch nur dann auf, wenn das Verhalten der Tiere eine Beteiligung des HC erforderte.

Das gerichtete Ansteuern der vorherigen Zielposition nimmt innerhalb der in dieser Studie klassifizierten Suchmuster insofern eine Sonderstellung ein, als dass es sich nicht um eine eigene Strategieform im eigentlichen Sinne handelt. Vielmehr steht hier das Festhalten an einer nicht mehr aktuellen Zielposition

im Vordergrund, welche unter der Nutzung gerichteter Strategien angesteuert wird.

Wie bereits aus den bisher diskutierten Daten hervorgegangen ist, zeigten die TMZ-Tiere eine ausgeprägte perseverierende Präferenz für die alte Lage der Zielplattform, worin sie sich hochsignifikant von den Kontrolltieren unterschieden. Somit bestätigt auch die qualitative Analyse das Vorhandensein eines hochsignifikanten Effektes hinsichtlich einer verminderten Plastizität der das effektive Ansteuern der Plattform betreffenden neuronalen Repräsentationen im DG nach Verschiebung des Zieles.

5.2.9 Die gefundenen Gruppenunterschiede in der Lernleistung beruhen auf einer gruppenspezifischen Frequenz der Anwendung der einzelnen Suchstrategien; in qualitativer Hinsicht unterscheiden sich die jeweils gezeigten Strategien jedoch nicht.

Da nun die allgemein vorhandenen Gruppenunterschiede in der Lernleistung nicht auf extrahippokampale Mechanismen zurückzuführen sind, erscheint eine eingehendere und vergleichende Bewertung der gruppenspezifischen Anwendung einzelner Suchstrategien sinnvoll. Abb. 4.20 erlaubt einen direkten Vergleich der Anwendung jeweils einzelner Strategien. Während sich beide Gruppen bei den frühen, hippokampusunabhängigen Suchmustern nicht unterschieden, zeigten die behandelten Tiere eine im Vergleich zur Kontrollgruppe verlangsamte und hinsichtlich der späteren Suchmuster spezifisch eingeschränkte Progression zu den hoch effizienten, hippokampusabhängigen Strategien. Dies galt für beide Phasen des MWM Experiments, vor und nach Verschieben der Plattformposition.

Wichtig ist die Beobachtung, dass die TMZ Tiere sowohl für das SCANNING als auch für das DIRECTED SEARCH PRESENT GOAL höhere Maxima bei den über die Versuche jeweils eines Tages gemittelten Häufigkeiten der Anwendung erreichten (Abb. 4.20 C und D). Komplementär hierzu erreichten Mäuse der behandelten Gruppe an keinem Zeitpunkt des Experiments die Maxima der Kontrolltiere bei den kognitiv anspruchsvolleren, spatial präzisen Strategien (Abb. 4.20 E und F). Mithin zeigte sich eine selektive Beeinträchtigung der Tiere mit supprimierter adulter Neurogenese in der Fähigkeit, explizit hippokampusabhängige und räumlich präzise Suchstrategien in der MWM einzusetzen.

Andererseits schienen sie jedoch in der Lage zu sein, diese Einschränkungen durch den vermehrten Einsatz weniger effizienter, jedoch im speziellen Kontext der MWM bereits zielgerichteter Strategien zumindest zum Teil erfolg-

reich kompensieren zu können. Die räumliche Begrenztheit der Arena und die grundsätzliche Simplizität des Versuchsaufbaus dürften für eine solche Kompensation hilfreiche Faktoren darstellen. Auf diese Weise erreichten auch die behandelten Tiere zumindest am Ende der ersten Versuchsphase an Tag drei eine mit den Kontrolltieren vergleichbare Leistung.

Aus dem Muster der Anwendung einzelner Strategien geht darüber hinaus hervor, dass eine erneute, gleichartige Kompensationsreaktion auch in der Reversal-Phase des Experiments grundsätzlich stattfand. Aufgrund der auf lediglich zwei weitere Versuchstage begrenzten Dauer dieser Versuchsphase konnten hier jedoch nur die Ansätze einer solchen Reaktion beobachtet werden. Nach dem Verschieben der Plattform manifestierte sich zunächst die perseverierende Präferenz für das vorherige Ziel in dominanter Weise (Abb. 4.20 G), so dass die Ausrichtung auf das neue Ziel verspätet und nur langsam erfolgte (Abb. 4.20 C und D). Eine Relevanz der dargestellten Kompensationsmechanismen unter natürlicheren Bedingungen kann bezweifelt werden.

5.2.10 Die Konvolutionsanalyse bestätigt das Vorhandensein eines Kompensationsmechanismus bei den behandelten Tieren, in dessen Verlauf auch hippocampusunabhängige Strategien auftreten können.

Eine andere Perspektive hinsichtlich der qualitativen Analyse der MWM Daten nimmt die Konvolutionsanalyse ein. Bei ihr steht die Frage im Vordergrund, ob die von den Tieren beider Gruppen im Experiment gezeigte Lernleistung auf eine qualitative Verbesserung in der Anwendung der einzelnen Strategien zurückzuführen ist, oder aber eine schnelle Progression zu den per se effizientesten Strategien als ursächlich für die Verkürzung der zum Auffinden der Plattform benötigten Zeit angesehen werden kann.

Die vorliegenden Ergebnisse belegen für die erste Phase des Experiments, dass die behandelten Tiere primär von einer Steigerung der Qualität in der Anwendung der jeweils gezeigten Strategien profitierten, wohingegen die Kontrolltiere ihre gute Gesamtleistung durch eine effiziente Progression erreichten. Eine Interpretation dieses Befundes kann sinnvoll nur in Verbindung mit den zuvor diskutierten Daten zur selektiven und gruppenspezifisch differenzierten Nutzung der einzelnen Strategien erfolgen.

Die Suppression adulter hippocampaler Neurogenese resultiert in einer quantitativen und qualitativen Stärkung einfacher, nur z.T. hippocampusabhängiger Strategien, was die oben genannte Kompensationsreaktion um einen interessanten Aspekt erweitert: Die in Folge des Kompensationsversuchs auftretenden Veränderungen in den gezeigten Strategien resultierten häufig in Suchmustern,

welche in signifikanter Weise von den aus dem normalen Progressionsprozess bekannten Formen abwichen. In einigen Fällen schienen die betroffenen Tiere eine Praxisstrategie einzusetzen, welche weitestgehend hippocampusunabhängig ist.

Über die diesen, aus der Kompensationsreaktion hervorgehenden Suchmuster zugrunde liegenden kognitiven Mechanismen kann hier keine abschließende Aussage gemacht werden. Hervorzuheben ist allerdings, dass die im Verlauf der Kompensationsreaktion auftretenden Muster hinsichtlich ihrer Effektivität eng an die spatialen Gegebenheiten eines begrenzten MWM Pools gebunden sind. Hingegen sind die von den Kontrolltieren gezeigten Strategien von diesem weitestgehend unabhängig und stellen somit allgemein gültige Lösungen des in der MWM gestellten Problems dar.

5.2.11 Quantitative und qualitative Analyse belegen das Auftreten zweier kausal zusammenhängender, spezifischer Effekte einer supprimierten adulten Neurogenese im MWM Experiment.

Zusammenfassend können in Folge einer Suppression adulter Neurogenese mit hin zwei in ihrer Ausprägung spezifische Veränderungen beschrieben werden. Der erste Effekt ist von subtiler Natur und betrifft Veränderungen qualitativer Aspekte des Akquisitionprozesses in der MWM. Besonders relevant sind hier Situationen, in welchen eine detaillierte Repräsentation von Stimuluskonfigurationen für die Entwicklung einer erfolgreichen Suchstrategie bedeutsam wird. Die betroffenen Tiere reagierten auf diese nachteiligen Veränderungen mit einer auf spezifische Aspekte des Verhaltens begrenzten Kompensationsreaktion, welche eine weitestgehend vergleichbare Netto-Lernleistung im Vergleich mit den Kontrollen erlaubte. Dabei kam es zu einem verstärkten Einsatz weniger effektiver und auch weniger hippocampusabhängiger Strategien. Im Rahmen der Kompensationsreaktion ist das Auftreten hippocampusunabhängiger Praxisstrategien möglich.

Substanzielle Modifikationen der die Umwelt konstituierenden Stimuluskonfigurationen führten jedoch zum Versagen einer solchen Kompensation und resultierten in einem zweiten, zunächst dominant erscheinenden Effekt einer perseverierenden Präferenz für zuvor erlernte effektive Verhaltensstrategien. Diese Verringerung funktionaler Plastizität trat nach Exposition des Organismus gegenüber einer, in für das Verhalten relevanten Eigenschaften veränderten Umwelt zu Tage und manifestierte sich in einer weitestgehend ineffektiven Anpassung der behandelten Tiere an die veränderte Situation. Die diskutierten Ergebnisse wurden im Rahmen der vorliegenden Studie mehrfach reproduziert.

5.3 Die beobachteten Effekte einer supprimierten adulten Neurogenese sind hochspezifisch.

Die Verwendung eines systemisch wirksamen Pharmakons wie dem hier applizierten TMZ bedingt grundsätzlich die Möglichkeit einer unspezifischen Wirkung auf verschiedene Hirnregionen und daraus resultierender Veränderungen des beobachteten Verhaltens. Wie in Abschnitt 5.1 bereits dargestellt, kann eine grundsätzliche Beeinträchtigung kognitiver Funktionen in Folge unspezifischer Wirkungen des TMZ bei den behandelten Tieren weitestgehend ausgeschlossen werden.

5.3.1 Die qualitative Analyse der benutzten Strategien dient zugleich als interne Kontrolle und schliesst unspezifische Wirkungen des TMZ aus.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Analyse der von den Mäusen im MWM Experiment gezeigten Suchstrategien erlaubt zudem eine fundierte Aussage hinsichtlich etwaiger qualitativer Unterschiede zwischen den getesteten Gruppen und kann so als weitere, hochsensitive interne Kontrolle für das Ausschliessen unspezifischer Nebenwirkungen angesehen werden.

Gegen eine unspezifische Beeinflussung des von den Tieren in der MWM gezeigten Verhaltens spricht nunmehr nicht nur das Vorliegen einer eindeutigen Lernkurve für beide Gruppen, sondern auch die identischen qualitativen Eigenschaften der verwendeten Suchmuster. Unter den qualitativen Eigenschaften der Suchstrategien sind hier zunächst deren grundlegende Charakteristika zu verstehen und nicht ein Maß für die Effizienz der Anwendung eines gegebenen Suchmusters wie im Kontext der Konvolutionsanalyse. Somit ist sichergestellt, dass die behandelten Tiere auch unter Vorliegen einer TMZ Behandlung die unter normalen Bedingungen verwendeten Strategien anwenden und nicht etwa alternative, grundsätzlich verschiedene Suchmuster kompensatorisch nutzen, wie sie in Folge unspezifischer Beeinträchtigungen des sensorischen oder motorischen Apparates auftreten [Wolfer et al., 2000]. Beispiele für solche alternativen und von einem normalen Lernverhalten in MWM abweichenden Muster sind das Praxislernen sowie das dominante Auftreten von mehr oder weniger stark ausgeprägten Derivaten des CYCLINGS.

Das Entstehen der jeweiligen Charakteristika einer bestimmten Strategie hängt von der effektiven Interaktion verschiedener kognitiver, sensorischer und motorischer Systeme ab. Die Anwendung qualitativ identischer Suchstrategien ist somit ein gewichtiges Argument gegen eine unspezifische Wirkung des TMZ auf andere Hirnregionen außerhalb des HC.

5.3.2 Die beobachteten Effekte fügen sich plausibel in den Kontext einer Interaktion des HC mit anderen Hirnarealen, besonders dem orbitofrontalen Kortex ein.

Das Phänomen einer perseverierenden Präferenz für eine zuvor erlernte Zielposition im Rahmen eines MWM Experiments bzw. für das Neu-Erlernen einer beliebigen Lernaufgabe unmittelbar nach einer erfolgreichen ersten Akquisition findet sich als Phänotyp in derselben Weise bei Läsionen des orbitofrontalen Kortex (OFC, bei Primaten) bzw. des mittleren präfrontalen Kortex (mPFC, bei Nagetieren) [Boulougouris et al., 2007, Barker et al., 2007]. Obwohl eine Wirkung des TMZ auf die Funktion des OFC/mPFC aufgrund eines fehlenden plausiblen Mechanismus unwahrscheinlich ist (s.o.) und zudem eine solche Spezifität einer unerwünschten Nebenwirkung nur schwer zu begründen wäre, muss die erhebliche Ähnlichkeit beider Phänotypen im Kontext der vorliegenden Studie diskutiert werden.

In Nagetieren existiert kein expliziter OFC wie z.B. bei Primaten. Die homologen Bereiche im Gehirn der Maus definieren sich über die Projektionsfelder des mediodorsalen Thalamus und umfassen die dorsalen und ventralen Teile des agranularen insulären Kortex sowie die lateralen und ventrolateralen Regionen des orbitalen Kortex [Schoenbaum et al., 2001]. Im Folgenden wird die Bezeichnung OFC im Sinne einer Vereinheitlichung auch für das entsprechende Nagetieranalogon verwendet.

Als besonders prominente Verbindungen des OFC treten reziproke Bahnen zum basolateralen Komplex der Amygdala auf [Shi et al., 1998]. Eine starke efferente Projektion zieht zum ventralen Striatum und erlaubt eine gerichtete Beeinflussung des gezeigten Verhaltens [Haber et al., 1995]. Ein Zugang der medialen und ventralen Bereiche orbitofrontaler Kortexes sowie prä- und infralimischer Kortexes zur HCF besteht über Projektionen zum Subikulum [Verwer et al., 1997] (Abb. 5.1). Auf diese Weise kann vom OFC auf die ganze Vielfalt sensorischer Informationen, aktueller wie gespeicherter Inhalte, zugegriffen und das gezeigte Verhalten gesteuert werden [Roesch et al., 2006].

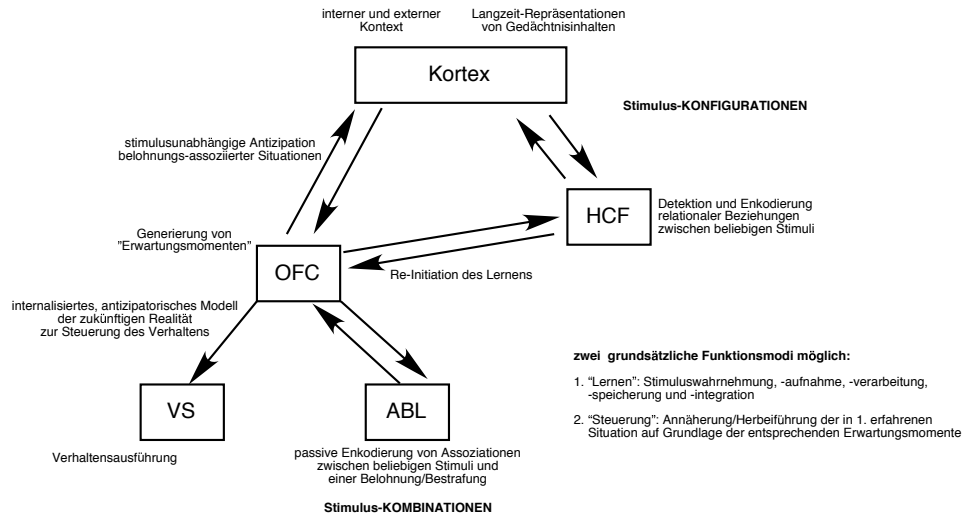


Abbildung 5.1: **Generierung situationspezifischer Erwartungsmomente**
 ABL = basolateraler Komplex der Amygdala, HCF = hippocampale Formation, OFC = orbitofrontaler Kortex, VS = ventrales Striatum. (nach [Roesch et al., 2006]).

Aus der dargestellten Konnektivität des OFC ergibt sich eine besondere Funktion dieser Region als Verbindungselement zwischen den Arealen des limbischen Systems und dem Kortex, wodurch eine Integration einfacher assoziativer Informationen aus der Amygdala mit gespeicherten Gedächtnisinhalten und aktuellen relationalen Informationen hinsichtlich perzipierter Stimuli ermöglicht wird. Der aktuellen Sichtweise folgend generiert der OFC aus der Integration einfacher Stimulus-Belohnungs-Assoziationen mit dem aktuellen extern-sensorischen und einem internen, verhaltens-implikativen Kontext explizite, antizipatorische Erwartungsmomente [Roesch et al., 2006]. Diese können dann auch unabhängig von der aktuellen Verfügbarkeit der entsprechenden Stimuli als Basis für die Formulierung verhaltenssteuernder Direktiven genutzt werden, welche auf das Erhalten bzw. Vermeiden der entsprechenden Belohnung abzielen. Dabei werden die relevanten Erwartungsmomente kontinuierlich mit dem aktuell vorliegenden Kontext verglichen, wodurch das Verhalten entsprechend modifiziert und ggfs. ein neuer Lernprozess initiiert werden kann.

Die neuronale Aktivität im OFC repräsentiert also nicht bloß eine in der Vergangenheit reliable Assoziation einer spezifischen Stimuluskombination mit einem bestimmten affekt-relevanten Ereignis, sondern die antizipatorische Erwartung des Organismus, ob unter den gegenwärtigen Umständen bei Ausführung der abgeleiteten Verhaltensdirektiven dasselbe Ereignis mit hoher Wahrscheinlichkeit erneut auftritt und die Belohnung erhalten werden kann. Dies erlaubt dem Tier sein Verhalten flexibel zu steuern und Belohnungen aktiv

aufzusuchen bzw. Bestrafungen zu vermeiden und zwar auch dann, wenn kein unmittelbarer sensorischer Zugang zu den jeweils mit dem Ereignis assoziierten Stimuli besteht.

Eine Läsion des OFC resultiert mithin in der Unfähigkeit der betroffenen Tiere ihre Erwartungsmomente an eine Veränderung des Kontexts anzupassen und ihre Verhaltensstrategien effektiv zu modifizieren. Dies gilt auch für Transsektionen der Fimbria-Fornix als wichtigster Verbindung des OFC mit der HCF [Whishaw et al., 1986, 1992]. Phänotypisch tritt diese Beeinträchtigung - unabhängig von dem jeweils verwendeten Testparadigma - als perseverierendes und nunmehr ineffektives Anwenden eines zuvor erlernten Verhaltens in Erscheinung. Die Belege für die Validität dieses Funktionsmodells des OFC sind vielfältig (für eine Übersicht siehe [Roesch et al., 2006]).

Bezogen auf die konkrete Situation im Verlauf des MWM Experiments geschieht also Folgendes: Innerhalb weniger Versuche erlernen die Mäuse die Assoziation Plattform + Ausgang = Belohnung. Diese sehr einfache Verknüpfung findet vor allem in der Amygdala statt und ist um so stärker, je häufiger der Versuch unter gleichen Bedingungen wiederholt wird [Saddoris et al., 2005]. Da die Tiere auch bei nicht selbstständigem Erreichen der Plattform auf dieselbe gesetzt werden, ist das Knüpfen dieser Assoziation unabhängig von der Effektivität der eingesetzten Suchstrategien.

Im OFC erfolgt nun die Integration mit dem relevanten Kontext zu welchem im Falle der MWM besonders die wahrgenommenen visuellen Landmarken gehören. Aufgrund des in der vorliegenden Arbeit verwendeten MWM Protokolls verbleibt die Position der Zielplattform relativ zu den verfügbaren visuellen Landmarken jeweils für zahlreiche Versuche konstant. Die so vorliegende spezifische, räumliche Konfiguration wird in dieser Zeit fester Bestandteil des im DG befindlichen Enkodiermechanismus (s.o.). Sie etabliert sich so als konstanter Bestandteil der vom OFC als Kontext mit der Plattform-Belohnungs-Assoziation verknüpften Informationen. Daher können die Tiere auf der Grundlage der entsprechenden Erwartungsmomente unter Antizipation der dort befindlichen Belohnung die Plattform nach kurzer Zeit zielgerichtet ansteuern.

Ein Wechsel der Plattformposition im Rahmen der *reversal*-Variante des MWM Experiments bedingt im Falle eines intakten DG eine effektive Adaptation des Enkodiermechanismus an die veränderten Stimuluskonfigurationen, wodurch auch die dem OFC zur Verfügung stehenden Kontextinformationen nach kurzer Zeit der veränderten Situation entsprechen und so die Erzeugung modifizierter, effektiver Verhaltensstrategien erlauben [Wiskott et al., 2006]. Erfolgt die Adaptation des DG wie in den TMZ behandelten Tieren nicht, erfolgt die Enkodierung der aus der veränderten Situation perzipierten Informa-

tionen unter Zuhilfenahme eines nun ineffektiven Enkodiermechanismus. Dem OFC stehen daher nun keine korrekt enkodierten und im Gedächtnis repräsentierten Kontextinformationen mehr zur Verfügung, weshalb konsequenterweise auch die resultierenden Erwartungsmomente hinsichtlich der nun vorliegenden Situation fehlerhaft sind, bzw. den zuvor gelernten Mustern ähneln. Der beobachtete Phänotyp einer perseverierenden Anwendung vor dem Verändern der Plattformposition erlernter Verhaltensstrategien entspricht somit seiner Form nach exakt dem nach einer OFC-Läsion dokumentierten Verhalten, obwohl die Ursache im DG der HCF zu finden ist.

Der in der vorliegenden Studie erhobene Befund spezifischer Defizite im Rahmen des *reversal*-Lernens steht also in keinen Widerspruch zu einer intakten Funktion des OFC. Vielmehr stellen die beobachteten Daten also nicht nur die Bestätigung eines theoretischen Modells zur funktionalen Relevanz adulter Neurogenese im DG dar, sie fügen sich auch zwanglos und plausibel in den größeren funktionalen Kontext einer Interaktion der HCF mit anderen Hirnregionen ein.

5.3.3 Die pharmakologische Suppression adulter Neurogenese resultiert in einem Phänotyp, welcher in vergleichbarer Weise auch nach altersbedingten oder pathologischen Veränderungen des cholinergen Systems beobachtet wird.

Acetylcholin (ACh) moduliert die glutamaterge und GABAerge Neurotransmission im HC und dient der Etablierung des Thetarhythmus *in vivo*. Die vom medialen Septum und dem Nucleus basalis Meynert zur HCF ziehenden Fasern bilden die cholinergen Hauptafferenzen des HC. Anatomisch erreichen sie diesen primär als Teil der Fimbria/Fornix. Das cholinerge System ist für einen effektiven Wechsel zwischen den beiden grundlegenden Arbeitsmodi des HC, dem Enkodieren neuer Informationen und dem Abrufen bereits gespeicherter Inhalte von entscheidender Bedeutung und darüber hinaus an der Regulation der Überlebenswahrscheinlichkeit adult generierter Neurone im DG beteiligt [der Borght et al., 2005a, Cooper-Kuhn et al., 2004].

Im Verlauf des normalen Alterungsprozesses, jedoch vor allem im Kontext der Alzheimer Demenz (AD) kommt es zu einer zunehmenden Degeneration cholinergischer Neurone des basalen Vorderhirns. Konsequenterweise reduziert sich so auch der inhibitorische Einfluss des AChs auf die autoassoziative Aktivität des rekurrenten CA3 Netzwerk, so dass der relative Einfluss neuer, vom DG stammender Informationen im HC abnimmt [Wilson et al., 2006]. Phänotypisch manifestiert sich dieser Umstand in einer signifikant erhöhten Rigidität bereits gespeicherter Inhalte und einer damit verbundenen Plastizitätsreduk-

tion bei der Exposition gegenüber einer veränderten Umwelt. In dieser Hinsicht gleichen die in Folge eines normalen Alterungsprozesses auftretenden Beeinträchtigungen den in der vorliegenden Studie beobachteten Veränderungen in Folge einer TMZ Applikation. Aufgrund dieser Ähnlichkeit muss hier diskutiert werden, ob für die oben dargestellten Befunde eine Suppression adulter Neurogenese im DG oder aber eine unspezifische Wirkung auf Strukturen des basalen Vorderhirns verantwortlich zeichnet.

Die antiproliferative Wirkung des TMZ entfaltet sich systemisch in allen Regionen des Gehirns und im übrigen Organismus. Eine spezifische, auf die cholinergen Kerne des medialen Septums oder den Nucleus basalis Meynert beschränkte Wirkung ist daher aufgrund des Wirkungsmechanismus des TMZ als unwahrscheinlich anzunehmen. Eine allgemeine Inhibition cholinergischer Neurone wie z.B. im Hirnstamm ist ebenfalls auszuschließen, da keine schwerwiegenden allgemeinen, physiologischen oder verhaltensbiologischen Veränderungen beobachtet werden.

Im Kontext signifikant beeinträchtigter Gedächtnisfunktionen in alten oder an AD erkrankten Gehirnen beginnt der cholinerge Einfluss auf die adulte Neurogenese im HC eine bivalente Rolle zu spielen. Die gezielte Ablation cholinergischer Neurone im medialen Septum resultiert hier - neben einer drastisch erhöhten Rigidität zuvor gespeicherter Gedächtnisinhalte in Folge einer nicht mehr effektiv inhibierten, autoassoziativen Aktivität der CA3 Pyramidenzellen - in einer signifikanten Reduktion der Überlebenswahrscheinlichkeit adult generierter Neurone im DG. Der auftretende Phänotyp umfasst wie bei den TMZ behandelten Mäusen primär eine Beeinträchtigung des *reversal*-Lernens. Verbindendes Element ist das Vorliegen einer signifikant geringeren Anzahl adult generierter Körnerzellen im DG, entweder in Folge einer reduzierten cholinergen Aktivität oder aber aufgrund der antiproliferativen Wirkung des TMZ.

Das Auftreten eines weitestgehend übereinstimmenden Phänotypen muss als Argument für einen entscheidenden Beitrag reduzierter adulter Neurogenese im DG bei der Entstehung der gefundenen Defizite aufgefasst werden. Die zusätzliche Schwächung des relativen Einflusses neuartiger Aktivitätsmuster aufgrund der in Folge des ACh Mangels verminderten Inhibition der intrinsischen Aktivität des CA3 Netzwerkes verstärkt den Effekt einer Plastizitätsreduktion noch, was sich auch in den z.T. stärker defizitären Phänotypen von Organismen mit einer Dysfunktion des cholinergen Systems widerspiegelt [Wilson et al., 2006].

Wie bereits zuvor für Läsionen des OFC dargestellt, fügen sich somit die in der vorliegenden Studie erhobenen Befunde gut in das bereits zur Thematik einer alterungsbedingten Dysfunktion des cholinergen Systems vorhandene Datenmaterial ein. Demgegenüber kann eine Wirkung der TMZ Applikation auf

das serotonerge, dopaminerge oder adrenerge System ausgeschlossen werden.

5.3.4 Die Entwicklung eines vergleichbaren Phänotyps in Folge einer Inaktivierung von CD4⁺ T-Lymphozyten und bei p27^{-/-} KO Mäusen bestätigt die kausale Beziehung zwischen einer supprimierten adulten Neurogenese und dem beobachteten Plastizitätsdefizit.

Eine Bestätigung der Spezifität des in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Phänotypen ergibt sich aus der Beobachtung grundsätzlich ähnlicher Verhaltensdefizite in der MWM bei Mäusen nach Inaktivierung CD4⁺ T-Lymphozyten [Wolf S.A., 2007]. Die Eradikation CD4⁺ peripherer T-Lymphozyten resultiert in einer signifikanten Reduktion adulter hippocampaler Neurogenese. Im MWM Test zeigten die betroffenen Tiere eine spezifische Beeinträchtigung des *reversal*-Lernens, was eine klare Analogie zu den in der vorliegenden Studie erhobenen Befunden darstellt. Von besonderer Bedeutung ist hier die Tatsache, dass die Suppression adulter Neurogenese im HC im Kontext einer grundsätzlich anderen Fragestellung erfolgt, jedoch in einem vergleichbaren Phänotypen resultiert.

In p27^{-/-} KO Mäusen können sich die neugeborenen Zellen der SGZ nicht zu funktionsfähigen, rekrutierbaren Granulozyten differenzieren, was im Endergebnis zu einer signifikant reduzierten adulter Neurogenese im DG führt. Da diese Tiere im Rahmen eines Projektes der Arbeitsgruppe Kempermann untersucht wurden, konnte das MWM-Verhalten unter Verwendung des auch in der vorliegenden Arbeit entwickelten Klassifikationsalgorithmus analysiert werden. Die p27^{-/-} Tiere zeigen eine signifikante Beeinträchtigung des *reversal*-Lernens in der MWM und damit einen vergleichbaren Phänotypen [Hoerster H., 2007]. Auch wenn diese Ergebnisse noch einer statistischen Überarbeitung bedürfen, unterstützen sie die Spezifität und Validität der in der vorliegenden Studie erhobenen Befunde.

5.4 Aus den erhobenen Daten und der Analyse des MWM Protokolls kann eine allgemeine funktionale Hypothese abgeleitet werden.

Die verfügbare Literatur zur funktionalen Relevanz adulter Neurogenese im HC ist sehr umfangreich. Wie zuvor unter 2.2.6 dargestellt, erweist sich die Vielfalt der unter Nutzung verschiedenster Paradigmen erhobenen experimentellen Daten z.T. als widersprüchlich. Eine durchgängig einheitliche Hypothese zu Funktion der neugeborenen Zellen fehlt, so dass sowohl bei der Interpretation bereits durchgeführter als auch bei der Planung zukünftiger Experimente keine gemeinsame Strategie existiert. Die spezifischen Anforderungen des in der vorliegenden Studie verwendeten Versuchsprotokolls an die Netzwerke der HCF können jedoch in Verbindung mit theoretischen Vorstellungen hinsichtlich deren Funktion und den hier erhobenen Daten zu Ableitung einer fundierten, allgemeinen Hypothese zur Funktion adulter hippocampaler Neurogenese verwendet werden.

Die im Folgenden vorgeschlagene Hypothese basiert auf der detaillierten Betrachtung und einem Vergleich der jeweils benutzten Protokolle einer beispielhaften Auswahl von räumlichen Lernparadigmen. Aus zunächst nur subtil erscheinenden, jedoch in Hinsicht auf die an das Tier im Verlauf des Experiments gestellten Herausforderungen entscheidenden Unterschiede ergeben sich im Kontext der Verfügbarkeit bzw. des Fehlens plastischer, adult generierter Neurone die beobachteten Phänotypen.

Da in der vorliegenden Arbeit nur Tiere des Stammes C57BL6 verwendet werden ist das beobachtete Verhalten grundsätzlich zunächst als speziesspezifisch aufzufassen. Daher wird die vorgeschlagene Hypothese beispielhaft an zwei verschiedenen MWM Experimenten anderer Autoren diskutiert und auf einen *place-recognition* Test als alternatives Beispiel für das räumliche Referenzgedächtnis (Langzeitgedächtnis) angewendet. Abschließend dient eine neuere Studie von [Saxe et al., 2007] als Ausgangspunkt für eine Diskussion der Bedeutung der aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit abgeleiteten Hypothese für das räumliche Arbeitsgedächtnis (Kurzzeitgedächtnis).

5.4.1 Hypothese: Adulte hippocampale Neurogenese ermöglicht das effektive Erlernen neuer verhaltensrelevanter Regeln im Kontext einer bekannten Umgebung, für die bereits erlernte Regeln existieren.

Eine Prädiktion des oben vorgestellten Modells von [Wiskott et al., 2006] lautet, dass eine weitgehende Ablation adulter Neurogenese im HC zu einer signifikant beeinträchtigten Fähigkeit des betroffenen Organismus führt, sein Verhalten effektiv an neuartige Umweltbedingungen anzupassen. Diese Prädiktion wird durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente grundlegend bestätigt.

Wie oben dargestellt, dient der DG als Enkodiermechanismus, welcher die effiziente Speicherung und Nutzung der den HC aus dem EC erreichenden Informationen ermöglicht. Signifikantes Merkmal der hippocampalen Informationsverarbeitung ist die Repräsentation und Nutzung von Stimuluskonfigurationen aus der wahrgenommenen Umwelt. Als Stimuluskonfigurationen treten nicht nur Verknüpfungen räumlich arrangierter Objekte auf, sondern, nach erfolgter Integration einfacher Assoziationen aus der Amygdala mit relevanten Kontextinformationen (im OFC (Abb. 5.1)) auch Relationen von Orten und verhaltensrelevanten Ereignissen, wie z.B. das Auffinden der Zielplattform in der MWM.

Nimmt ein Tier an einem Versuch teil, werden nach erfolgter Redundanzkompression und Erzeugung eines schwachbesetzten Codes im kompetitiven Netzwerk des DG alle relevanten Relationen in einer entsprechenden Modifikation beteiligter synaptischer Verbindungen repräsentiert. Das wiederholte Auftreten derselben Stimuluskonfigurationen resultiert in einer stärkeren Potenzierung der entsprechenden synaptischen Verbindungen gegenüber solchen, welche anderen, nicht repetitiv auftretenden Konfigurationen zugeordnet sind [Changeux et al., 1976]. Neuartige Stimuluskonfigurationen werden primär durch junge und plastische Körnerzellen kodiert, wohingegen die bereits eine LTP-verstärkte Verbindung eingegangenen Zellen weiterhin ihre jeweiligen Relationen repräsentieren [Rolls, 1994, Dupret et al., 2007]. Mittelfristig besteht jedoch auch bei den maturierten Körnerzellen über eine LTD die Möglichkeit einer Veränderung ihrer synaptischen Gewichte [Rolls, 1996].

Als allgemeine Hypothese zur Funktion adulter Neurogenese im DG kann mithin das Ermöglichen des effektiven Erlernens neuartiger verhaltensrelevanter Regeln postuliert werden. Dies gilt jedoch nur im Kontext dem jeweiligen Organismus bekannter Umgebungen und, wenn für diese bereits zuvor erlernte, auf reliablen Regularitäten basierende Regeln existieren. Müssen aufgrund

signifikanter Veränderungen der Umgebung für das Ausbilden effektiver Verhaltensstrategien neuartige, von den bereits bestehenden abweichende Regeln neu erlernt werden, sind hierzu verfügbare, adult generierte Granulozyten für eine spezifische Adaptation des im DG implementierten Enkodiermechanismus erforderlich.

In der folgenden Darstellung von Stimuluskonfigurationen werden im Sinne einer besseren Anschaulichkeit nur die wichtigsten für das Erlernen der MWM erforderlichen Stimuli berücksichtigt. Relevant sind alle möglichen Start- und Zielpositionen, eine beliebige Anzahl externer visueller Landmarken sowie die jeweilige relative, räumliche Lage dieser Elemente zueinander. Der exakte Mechanismus einer neuronalen Repräsentation der Stimuluskonfigurationen im Enkodiernetzwerk des DG kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht detailliert betrachtet, jedoch auch zunächst im Rahmen der vorliegenden Arbeit vernachlässigt werden, da hier nur die grundsätzliche funktionale Relevanz adult generierter Neurone von Interesse ist.

5.4.2 Das MWM Protokoll nach Wolfer et al. erlaubt die Formung fester verhaltensrelevanter Regeln auf der Grundlage der Konfiguration visueller Landmarken, welche im Falle einer Zielverschiebung durch neue Regeln ersetzt werden müssen.

Für das in der vorliegenden Studie verwendete Wolfer-Lipp Protokoll sind Start- und Zielposition jeweils für alle sechs Einzelversuche eines Tages konstant [Wolfer et al., 1998]. Daher treten die Relationen zwischen allen in diesen Versuchen eines Tages relevanten Stimuli wiederholt auf und es kommt im Verlauf des Experiments zu einer signifikanten Verstärkung der entsprechenden synaptischen Verbindungen im DG. Aus der Perspektive des Tieres stellen diese Stimuluskonfigurationen eine reliabel auftretende und für eine effektive Verhaltenssteuerung geeignete Regularität dar. Eben solche werden im DG detektiert und als Grundlage für eine effektive Kodierung von Informationen verwendet, da sich in ihnen die statistischen Eigenschaften der eingehenden multimodalen sensorischen Informationen spiegeln. Die effektive Repräsentation stabiler, regulär auftretender Stimuluskonfigurationen ist eine notwendige Voraussetzung für die Formulierung situationsspezifischer Verhaltensstrategien auf der Grundlage der Integration einfacher Stimulus-Belohnungsassoziationen mit dem jeweiligen Kontext im OFC (s.o.).

An Tag zwei des MWM Experiments wird lediglich die Startposition verändert, alle anderen Stimuluskonfigurationen sind weiterhin gültig. Im Verlauf der an diesem Tag stattfindenden sechs Einzelversuche werden also einige diejenigen synaptischen Verbindungen erneut durch das wiederholte Auftreten der

jeweiligen Relationen verstärkt, bei denen bereits am ersten Versuchstag eine robuste LTP induziert wurde. In dem vorliegenden Beispiel sind das die Relationen zwischen den externen Landmarken und der Zielplattform. Die Induktion einer LTP für die Verbindung des zweiten Startpunktes mit der Zielposition erfolgt in einer für den Startpunkt des ersten Tages vergleichbaren Stärke und erfordert als neuartiger Aspekt der Umgebung die Verfügbarkeit plastischer Körnerzellen. Liegen diese wie bei den TMZ Tieren nicht in einem ausreichenden Umfang vor, kann die Effizienz der spatialen Navigation in der MWM nicht in vollem Umfang gesteigert werden. Dies wird durch die oben vorgestellten Daten sowohl quantitativ als auch qualitativ belegt.

Das Auftreten einer spezifischen Kompensationsreaktion stellt hier einen weiteren Aspekt einer in Folge der Ablation adulter Neurogenese auftretenden Reduktion der funktionalen Plastizität im DG dar: Geht man von einer Beeinträchtigung der Fähigkeit aus auch neuartige, die gesamte Situation nicht grundlegend verändernde Stimuluskonfigurationen in effektiver Weise für den Entwicklungsprozess zunehmend präziser Suchstrategien nutzen zu können, ist das Auftreten signifikanter Effekte gerade dann zu erwarten, wenn normalerweise der Übergang zu den Suchmustern erfolgt, welche eine flexible Nutzung differenzierter Repräsentationen von Stimuluskonfigurationen erfordern. Tatsächlich markiert der kompensatorisch quantitativ und qualitativ modifizierte Einsatz der SCANNING und DIRECTED SEARCH Strategien das Fehlen einer erfolgreichen Progression zu den präzisesten und effektivsten Suchmustern.

Am dritten Versuchstag gestalten sich die Ereignisse hinsichtlich der neuronalen Repräsentation von Relationen analog zu denen des zweiten Tages, so dass unmittelbar vor der Verschiebung der Zielposition folgende Situation im DG vorliegt: Die Relationen zwischen den externen Landmarken und der Zielposition finden sich im Enkodiermechanismus aufgrund ihres massiv repetitiven Auftretens gegenüber allen anderen im Versuchsverlauf vorkommenden Stimuluskonfigurationen in einer signifikant größeren Stärke repräsentiert. Da es sich beim DG um ein kompetitives Netzwerk handelt, kommt es zu einer dauerhaften Modifikation der entsprechenden synaptischen Gewichte exklusiv zwischen solchen Körnerzellen, welche die aus Sicht des Tieres als regulär aufzufassenden Konfigurationen repräsentieren [Rolls, 1996]. Dabei kann davon ausgegangen werden, dass im Verlauf der drei Tage bzw. 18 Versuche andauernden Phase des Experiments eine bestimmte Gruppe adult generierter und plastischer Körnerzellen funktional in das neuronale Netzwerk des DG integriert wird [Changeux et al., 1976, Dupret et al., 2007, Kee et al., 2007].

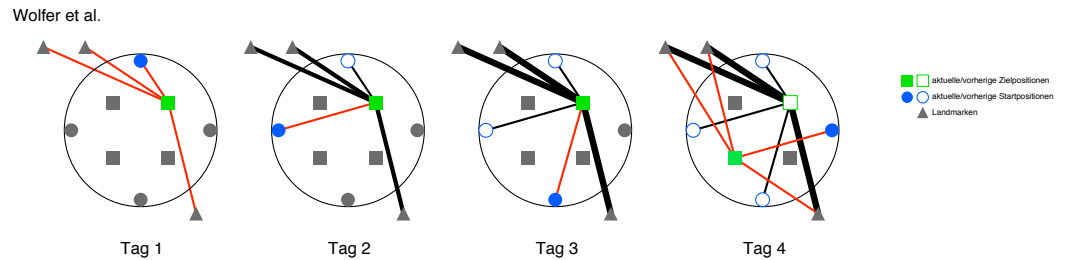


Abbildung 5.2: Stimuluskonfigurationen bei [Wolfer et al., 1998]

Dargestellt sind die ersten vier Versuchstage. Neu auftretende Relationen sind rot dargestellt, repetitive in schwarz. Die Dicke der Verbindungslinien ist zur Anzahl der Wiederholungen direkt proportional.

Die schematische Darstellung der Verhältnisse des vierten Tages lässt das nun auftretende Problem offensichtlich werden (Abb. 5.2). Im Gegensatz zu den drei Tagen der ersten Versuchsphase ändert sich jetzt neben dem Startpunkt auch die Position des Ziels und seiner Relation zu externen Landmarken. Da die Stimuluskonfigurationen der alten Zielposition jedoch als reliable Regularität prominent im Enkodiermechanismus des DG repräsentiert sind, muss die nun vorliegende Abweichung von eben dieser Regel vor dem Hintergrund einer effektiven Anpassung der verwendeten Verhaltensstrategien an die neue Situation auf orthogonale Weise behandelt werden. Hierfür sind junge und plastische Körnerzellen notwendig, um die neuartigen Aspekte der zwar ähnlichen, jedoch signifikant veränderten Verhältnisse zu kodieren.

Sind solche jungen Zellen jedoch nicht in einem ausreichenden Umfang verfügbar, kann der Enkodiermechanismus nicht effektiv an die veränderte Statistik der modifizierten Umgebung angepasst werden. In Folge dieses Plastizitätsdefizits kommt es zu der oben dargestellten perseverierenden Präferenz für die erste Zielposition, da nun im Kontext veränderter Stimuluskonfigurationen auch die auf der Funktion des HC basierenden und im OFC als Kontextinformation zur Generierung effektiver Verhaltensstrategien genutzten Inhalte nach Anwendung eines inadäquaten Enkodiermechanismus im DG fehlerhaft vorliegen. Das betreffende Tier generiert seine Handlungsstrategien mithin auf der Grundlage inkorrektener Kontextinformationen.

5.4.3 Das erfolgreiche Erlernen der ersten MWM Phase fällt zeitlich mit der Entfernung überschüssiger junger Neurone im DG durch Apoptose zusammen.

Haben die Tiere eine Aufgabe erlernt, werden keine weiteren neuen Neurone zur Repräsentation mehr benötigt und überzählige Zellen durch apoptotische Pro-

zesse entfernt [Dupret et al., 2007]. Bedeutsam ist im Vergleich der Publikation von [Dupret et al., 2007] mit der vorliegenden Studie die Vergleichbarkeit des von den getesteten Tieren zum Erlernen der MWM mit dem bis zum Beginn der Apoptoseprozesse verstreichenden Zeitraumes. Hierdurch wird die Hypothese der Entstehung eines auf die vorliegende Stimuluskonfiguration abgestimmten Enkodiermechanismus und dessen zunehmende Stabilisation über zahlreiche Versuche hinweg aufgrund der wiederholten Verfügbarkeit relevanter Stimuli grundsätzlich unterstützt.

5.4.4 Die Anwendung der vorgeschlagenen Hypothese auf verschiedene MWM Protokolle erlaubt eine sinnvolle Interpretation zunächst widersprüchlich erscheinender Ergebnisse in einem gemeinsamen Kontext.

Um eine sinnvolle Einordnung der hier erhobenen Befunde in den Kontext bereits zur funktionalen Relevanz adulter Neurogenese durchgeführter Studien anderer Autoren zu ermöglichen, muss ein Vergleich auch mit zunächst widersprüchlich erscheinenden Ergebnissen durchgeführt werden. Exemplarisch werden hier die MWM Daten der Studien von [Saxe et al., 2006] und [Madsen et al., 2003] zur Diskussion der aus den Daten der vorliegenden Arbeit abgeleiteten Hypothese herangezogen, da die jeweils benutzten Protokolle verbreitet für MWM Anwendung finden.

Die Ablation adulter Neurogenese durch den Einsatz ionisierender Strahlung oder eines genetischen Konstruktes resultierte in den Studien von [Saxe et al., 2006] und [Madsen et al., 2003] nicht in signifikanten Veränderungen des von den Tieren gezeigten Lernverhaltens und ihrer Leistung in der MWM. Dieses Ergebnis steht zunächst in Widerspruch zu den hier vorgestellten Daten. Eine detaillierte Analyse des von den Autoren der zitierten Studien verwendeten Versuchsprotokolle zeigt jedoch, dass die zunächst unerheblich erscheinenden Unterschiede zu dem in der vorliegenden Studie benutzten Protokoll vor dem Hintergrund der vorgeschlagenen Hypothese eine signifikante Bedeutung erhalten. Aufgrund dieser Hypothese können die zunächst widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse beider Studien zur funktionalen Relevanz adulter Neurogenese in einem gemeinsamen Rahmen sinnvoll interpretiert werden.

5.4.5 Das MWM Protokoll nach Saxe et al. beinhaltet zahlreiche, in schneller Abfolge stattfindende Veränderungen der räumlichen Konfiguration verhaltensrelevanter Stimuli, wodurch die Formung fester Regeln verhindert wird.

Das von [Saxe et al., 2006] verwendete Protokoll entspricht dem DMP Protokoll nach [Steele et al., 1999] (s.o.) und unterscheidet sich in mehrfacher Hinsicht von dem in der vorliegenden Arbeit durchgeführten MWM Experiment (Tabelle 5.1). Quantitativ werden an nur vier Versuchstagen, lediglich vier (33% weniger) und zudem nur 60 s lange (um 50% kürzere) Einzelversuche durchgeführt. Das Intervall zwischen den Versuchen (ITI) ist hingegen 15 min kürzer, was vor allem auf den erheblich geringeren Zeitbedarf für einen vollständigen Gruppendurchlauf zurückzuführen ist. Von besonderer Bedeutung sind die qualitativen Unterschiede. So erfolgt der Wechsel der Startpositionen nicht singulär

am Anfang eines jeden Versuchstages, sondern zu Beginn jedes Einzelversuchs. Die Position der Zielplattform ist nicht für zunächst drei und dann wieder zwei Versuchstage konstant; sie ändert sich für jeden Versuchstag.

	Saxe et al.	Wolfer et al.	Madsen et al.
Versuche pro Tag	4	6	5
Versuchstage pro Woche	4	5(4)	5
maximale Versuchsdauer	60 s	120 s	60 s
Zeit zwischen den Versuchen (ITI)	15 min	25 min	5 min
Wechsel der Plattformposition	jeden Tag	nach 3 (2) Tagen	niemals
Wechsel der Startposition	für jeden Versuch	für jeden Tag	für jeden Versuch

Tabelle 5.1: Vergleich der MWM Protokolle Saxe et al., Wolfer et al. und Madsen et al.

Zusammengefasst ist also die durchschnittliche Frequenz signifikanter Änderungen der durch den Versuchsaufbau und -ablauf konstituierten Umgebungsbedingungen und Stimuluskonfigurationen erheblich höher als für das Protokoll von [Wolfer et al., 1998]. Werden nun die Repräsentationen aller relevanten Stimuluskonfigurationen im DG der getesteten Tiere in analoger Weise zu dem in der vorliegenden Arbeit durchgeführten MWM Versuch dargestellt, ergibt sich ein grundsätzlich verschiedenes Bild (Abb. 5.3).

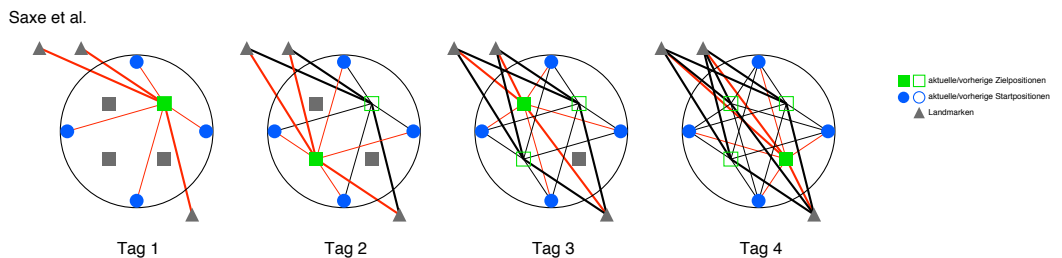


Abbildung 5.3: Stimuluskonfigurationen bei [Saxe et al., 2006]

Erstmalig auftretende Stimuluskonfigurationen sind rot dargestellt. Die Dicke der Verbindungslinien ist zur jeweiligen Expositionszeit direkt proportional.

Aufgrund des häufigen Wechsels der Start- und Zielpunkte liegt mit Ausnahme des spatialen Arrangements externer Landmarken untereinander (nicht dargestellt) keine eindeutig repetitive Konfiguration von Stimuli vor. Aus der Perspektive der getesteten Tiere fehlt somit eine eindeutige Regularität hinsichtlich des Auftretens reliabler und für das Lösen der Lernaufgabe hilfreicher

Konfigurationen von Umgebungsvariablen. Da jede Zielposition nur für die vier Einzelversuche eines einzelnen Versuchstages gültig ist, muss bei der Exposition gegenüber einer bezüglich der Plattformposition veränderten Versuchsbedingung keine bereits vorhandene und durch eine starke LTP manifestierte Regel verändert werden. Für das von [Saxe et al., 2006] verwendete DMP Protokoll gilt vielmehr: Der häufige Wechsel, die Instabilität der spatialen Relationen zwischen externen Landmarken, Start- und Zielpunkten ist die Regel und eben nicht das zumindest über einen gewissen Zeitraum stabile Vorliegen distinkter Stimuluskonfigurationen.

Die oben aufgezeigten Differenzen bei den quantitativen Parametern des Versuchsprotokolls können zu diesem Effekt in erheblichem Maße beitragen, da auch sie die Entstehung von Repräsentationen reliabler Regularitäten nicht in einem mit dem Protokoll nach [Wolfer et al., 1998] vergleichbaren Umfang positiv beeinflussen.

5.4.6 Ein Vergleich der MWM Protokolle offenbart eine mögliche Rolle von über Nacht stattfindenden Konsolidierungsmechanismen.

Interessant ist darüber hinaus eine mögliche Rolle von über Nacht stattfindenden Konsolidierungsmechanismen bei der Entstehung des in den TMZ Tieren beobachteten Plastizitätsdefizits [Sirota et al., 2003]. Da die Position der Zielplattform bei Benutzung des Wolfer Protokolls über mindestens zwei Tage hinweg stabil verbleibt, könnte das erneute Aktivieren von bereits während des Vortages etablierten und potenzierten sowie in den Ruhephasen zwischen den Versuchstagen konsolidierten synaptischen Verbindungen zu einer besonderen Stabilisierung solcher spezifischer Repräsentationen führen. Das DMP Protokoll bietet diese Möglichkeit nicht, da zwar möglicherweise eine Konsolidierung, jedoch keine Reaktivierung der entsprechenden Aktivitätsmuster am nächsten Versuchstag erfolgt.

5.4.7 Das MWM Protokoll nach Madsen et al. enthält keinerlei Veränderung der räumlichen Konfiguration visueller Stimuli und bildet so den ersten Teil des in der vorliegenden Studie durchgeführten Experiments nach.

Andere Autoren beobachteten auch unter Verwendung eines alternativen Protokolls keine signifikante Veränderung in Folge einer Ablation adulter Neurogenese [Madsen et al., 2003]. In dieser Studie werden die Tiere über einen Zeitraum von fünf Tagen getestet. An jedem Versuchstag werden fünf Einzel-

versuche mit einer maximalen Dauer von 60 s durchgeführt. Die Startposition wechselt mit jedem Einzelversuch, wohingegen die Position der Zielplattform für die Dauer des gesamten Experiments konstant bleibt (Tabelle 5.1). Dies entspricht zu einem guten Teil der ersten Phase des in der vorliegenden Arbeit durchgeführten MWM Experiments, bevor die Plattform verschoben wird. Somit tritt eben jene Situation gar nicht erst auf, in der für eine effektive Adaptation das Abweichen von einer zuvor gelernten Regel erfolgen muss (Abb. 5.4).

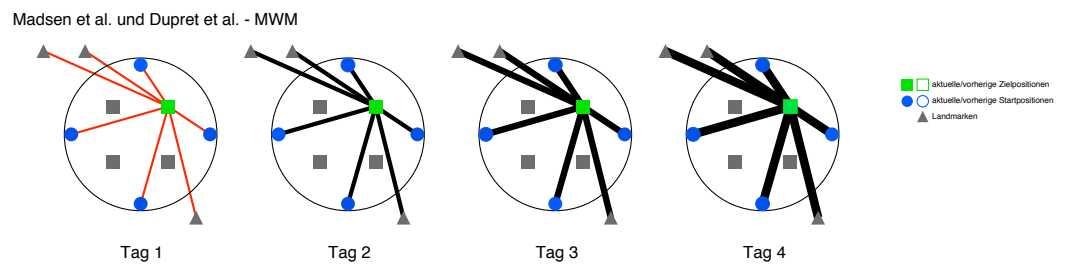


Abbildung 5.4: **Stimuluskonfigurationen bei [Madsen et al., 2003] und [Dupret et al., 2007]**

Erstmalig auftretende Stimuluskonfigurationen sind rot dargestellt. Die Dicke der Verbindungslinien ist zur jeweiligen Expositionszeit direkt proportional.

Da Madsen et al. keine qualitative Analyse der Daten durchführten, konnten die bereits früh in in der Akquisitionsphase für die TMZ Tiere beobachteten qualitativen Unterschiede nicht beschrieben werden. Von besonderer Bedeutung ist hier jedoch ein wichtiges Detail in der Darstellung der von den jeweiligen Gruppen gezeigten Latenzzeit (Abb. 5.5).

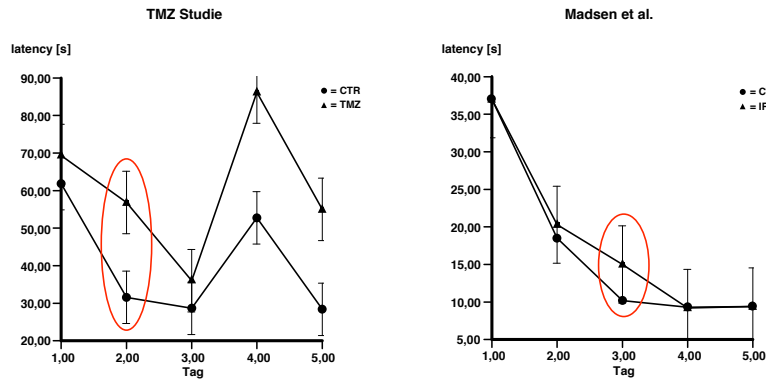


Abbildung 5.5: Latenzzeiten bei der vorliegenden Arbeit und [Madsen et al., 2003]

Transiente signifikante Unterschiede zwischen Gruppen in der mittleren Akquisitionsphase für die erste Plattformposition sind rot eingekreist. Die *reversal*-Phase des in der vorliegenden Arbeit durchgeführten MWM Experiments ist für den Vergleich nicht von Bedeutung.

Hier zeigt sich an den Tag drei ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, welcher zum Ende des Experiments hin wieder verschwindet. Diese signifikante und vorübergehend auftretende Differenz zwischen den Gruppenleistungen findet sich in analoger Weise in den Daten des in der vorliegenden Studie durchgeführten Experiments und konnte hier aufgrund der qualitativen Analyse eingehender charakterisiert werden. Die signifikant geringere Lernleistung in einem Teil der Akquisitionsphase der MWM erklären sich für die TMZ-behandelten Tiere durch deren beeinträchtigte Fähigkeit einer effektiven Progression hin zu den höchstwertigsten Suchstrategien. Ebenso gezeigt wurde für die TMZ Gruppe eine effektive Kompensationsreaktion, wodurch die behandelten Tiere für die erste Plattformposition eine mit den Kontrolltieren vergleichbare Lernleistung zeigen. Eine solche am Ende des Experiments identische Lernleistung wird auch bei Madsen et al. gefunden. Obwohl kein Zugang zu dem originalen Datenmaterial besteht, erscheint es als wahrscheinlich, dass der von [Madsen et al., 2003] beschriebene Verlauf der Schwimmzeiten auf denselben qualitativen und quantitativen Effekten beruht, wie sie zuvor für die TMZ-behandelten Tiere dargestellt wurden. Da die Ablation adulter Neurogenese im HC bei Madsen et al. durch den Einsatz ionisierender Strahlung erfolgte, stellt diese (wahrscheinliche) Analogie der Effekte unabhängig von der verwendeten Ablationsmethode ein Argument für eine alleinige Abhängigkeit der beobachteten funktionalen Defizite von einer nicht ausreichenden Verfügbarkeit adult generierter, plastischer Körnerzellen im DG dar.

5.4.8 Die vorgeschlagene Hypothese kann auch erfolgreich zur Interpretation eines place recognition Tests als alternatives Paradigma für räumliches Lernen angewendet werden.

Die beiden diskutierten Studien von [Madsen et al., 2003] und [Saxe et al., 2006] können als exemplarisch für alle MWM Experimente betrachtet werden. Eine Anwendung der hier vorgeschlagenen Hypothese ist auch auf andere räumliche Lernparadigmen erfolgreich möglich und soll für das Paradigma des *place recognition* Tests bei [Madsen et al., 2003] dargestellt werden.

Grundprinzip dieses Versuchs ist das Erkennen einer spezifischen Veränderung in der Konfiguration des Y-förmigen Versuchsapparates (Abb. 5.6). Allgemein wird angenommen, dass die Modifikation der räumlichen Verhältnisse innerhalb der Versuchsarena zu einer gerichteten Reinitiation des Explorationsverhaltens führt und sich die Tiere daher signifikant häufiger nahe des räumlich veränderten Ortes aufhalten.

Im Beispiel des diskutierten Experiments wird zunächst ein Arm der Y-Arena verschlossen, was eine erhebliche Veränderung gegenüber der Situation in der Adaptationsphase darstellt. Konsequenterweise halten sich die getesteten Tiere nach erneuter Öffnung des Arms im Normalfall signifikant häufiger in dem selbigen auf, da die stattgefundenen Modifikation ein Explorationsverhalten induziert. Voraussetzung hierfür ist eine Wahrnehmung der Umgebungsveränderung seitens der Tiere auf der Grundlage der Existenz entsprechender Erwartungsmomente im OFC, welche wiederum auf präzisen Kontextinformationen des HC beruhen.

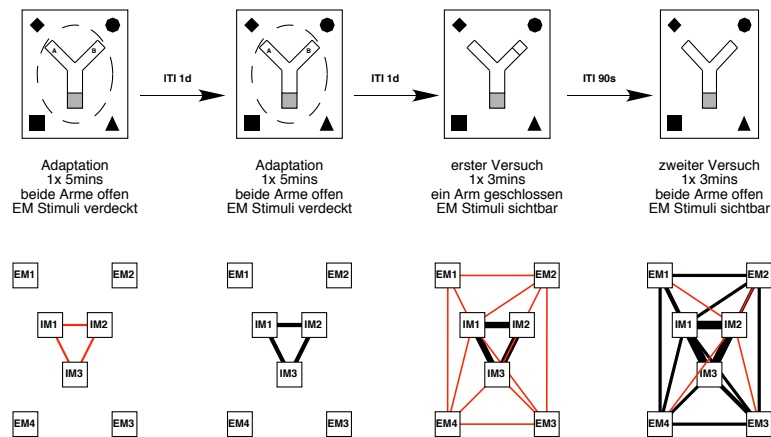


Abbildung 5.6: **Stimuluskonfigurationen für das *place recognition* Experiments nach [Madsen et al., 2003]**

Erstmalig auftretende Stimuluskonfigurationen sind rot dargestellt. Die Dicke der Verbindungslinien ist zur jeweiligen Expositionszeit direkt proportional. IM = intra-maze Stimulus, EM = extra-maze Stimulus.

Entscheidend sind auch hier - wie zuvor bei den diskutierten MWM Experimenten - zunächst wenig bedeutend erscheinende Details des benutzten Versuchsprotokolls. Die Tiere werden vor Beginn des eigentlichen Experiments an den Versuchsaufbau gewöhnt, indem sie an zwei aufeinanderfolgenden Tagen für jeweils fünf Minuten in das Labyrinth eingesetzt werden, wobei die freie Sicht auf außerhalb des Apparates befindliche visuelle Landmarken versperrt ist. In dieser Zeit entwickeln die Tiere bereits eine recht präzise und stabile Repräsentation der räumlichen Verhältnisse innerhalb des vollständig frei zugänglichen Y-Labyrinths [Per Andersen, 2006]. Im Rahmen der zuvor vorgeschlagenen Hypothese bedeutet dies, dass sich der Enkodiermechanismus des DG ebenfalls entsprechend anpasst. Interessant ist hier der Umstand, dass zwischen beiden Adaptationsphasen ein Intervall von einem Tages liegt und somit eine Konsolidierung über Nacht erfolgen kann [Sirota et al., 2003]. Für das in der vorliegenden Arbeit durchgeführte MWM Experiment stellt eben dies, wie bereits zuvor gezeigt, einen wichtigen Unterschied zu den anderen diskutierten Experimenten dar.

Einen weiteren Tag nach der erfolgten Adaptation beginnt der eigentliche *place recognition* Test. Externe visuelle Stimuli sind nun sichtbar, einer der Arme des Labyrinths ist jedoch verschlossen. Wie die roten Verbindungslinien in Abb. 5.6 zeigen, treten neu zu kodierende spatiale Konfigurationen nur zwischen den offenen Armen des Labyrinths und den nun verfügbaren exter-

nen Stimuli auf. Die bereits prominent vorhandene Konfiguration zwischen den internen Elementen des Versuchsaufbaus bleiben hiervon unberührt. Vielmehr findet sogar noch eine weitere Verstärkung eines großen Teils dieser Repräsentation statt. Wird nun das dritte Kompartiment des Labyrinths nach 90 s geöffnet kommt eine weitere neue Konfiguration zwischen diesem Teil des Versuchsaufbaus und den externen Stimuli hinzu.

Betrachtet man die dargestellten Vorgänge aus der Perspektive der vorgeschlagenen Hypothese wird die Problematik im Falle einer supprimierten adulten Neurogenese deutlich: Innerhalb der ersten zwei Tage erfolgt über einen gegenüber den eigentlichen Versuchsdurchgängen längeren Zeitraum (2x 300 s und 2x 180 s) eine repetitive Exposition gegenüber einer bestimmten Stimuluskonfiguration, welche einen wesentlichen und zentralen Bestandteil des Versuchsaufbaus darstellt. Die so entstandene neuronale Repräsentation der im generellen Kontext der Versuchssituation aus Sicht des Tieres reliabel verfügbaren Stimuluskonfigurationen wird, wie oben dargestellt, vom OFC zur Formulierung eines situativen Erwartungsmoments genutzt, auf welchem dann das gezeigte Verhalten basiert. Da diese Repräsentation recht stabil und darüberhinaus auch im Enkodiermechanismus des DG manifestiert ist, müssen im Falle des Auftretens neuartiger Konfigurationen wie am ersten Versuchstag weitere plastische Körnerzellen für eine der veränderten Statistik entsprechende Enkodierung rekrutiert werden. Stehen keine oder nicht ausreichend adult generierte Zellen hierfür bereit, kann die neue Situation im DG nicht effektiv in orthogonaler Weise enkodiert und innerhalb des assoziativen Netzwerkes von CA3 repräsentiert werden.

Im Falle des Y-Labyrinths sind die sich hieraus ergebenden Konsequenzen gering, da ja die im Verlauf der Adaptationsphase geleistete Anpassung an die zentralen internen Elemente der Arena im Unterschied zur Situation im MWM Experiment nahezu alle relevanten Verhaltensweisen ermöglicht. Das Vorliegen nicht-orthogonal enkodierter Kontextinformationen im OFC resultiert mithin nicht wie im Falle der MWM in einem grundsätzlich falschen, perseverierenden Verhalten. Ein solches führt im Kontext des Y-Labyrinths lediglich zu der "Annahme" des Tieres, alle Teile der Arena seien frei zugänglich. Die Reinitiation des Explorationsverhaltens bleibt konsequenterweise aus, da aufgrund einer ineffektiven Enkodierung der neuartigen Situation im ersten Versuch das Detail eines nun verschlossenen Arenakompartiments im OFC nicht zu einer Anpassung des Verhaltens genutzt werden kann. Die bereits erlernte Verhaltensstrategie für den Fall uneingeschränkt frei zugänglicher Labyrintharme wird beibehalten. Ist dieser Zustand 90 s später im zweiten Versuch dann tatsächlich hergestellt, ändert sich für die Tiere mit supprimierter adulter Neurogenese

hinsichtlich ihres Erwartungsmoments nichts: Der in der Adaptationsphase akquirierte Enkodiermechanismus funktioniert erneut einwandfrei und liefert nun auch wieder korrekte Kontextinformationen. In gewisser Weise haben die betroffenen Tiere die kurzzeitige Veränderung gar nicht bemerkt.

Zusammenfassend kann somit festgehalten werden, dass in Analogie zu dem in der vorliegenden Arbeit durchgeführten MWM Experiment im Kontext einer Ablation adulter hippocampaler Neurogenese erneut die Perseveration eines zuvor erlernten Verhaltens spezifisch in solchen Situationen auftritt, in denen sich zwar die Statistik der Gesamtsituation nicht verändert, verhaltensrelevante Details jedoch signifikanten Änderungen unterworfen sind. Dies entspricht exakt der Situation in der MWM nach [Wolfer et al., 1998] und unterstützt somit die vorgeschlagene Hypothese zur funktionalen Relevanz adulter hippocampaler Neurogenese auch unter Verwendung eines alternativen Testparadigmas.

5.4.9 Die Anwendung der vorgeschlagenen Hypothese auf das Radial Arm Maze Paradigma ergibt eine plausible Erklärung scheinbar paradoxer, positiver Effekte einer supprimierten Neurogenese für das räumlichen Kurzzeitgedächtnis.

Die zuvor diskutierten Daten betreffen sowohl das räumliche Kurzzeitgedächtnis ([Steele et al., 1999, Saxe et al., 2006]) als auch das entsprechende Referenz- oder Langzeitgedächtnis ([Wolfer et al., 1998, Madsen et al., 2003]). Unter Benutzung des *Radial Arm Maze* Paradigmas konnten [Saxe et al., 2007] einen zunächst paradox erscheinenden Effekt der Ablation adulter Neurogenese auf die vom Kurzzeitgedächtnis abhängige Lernleistung in Form einer signifikanten Verbesserung desselben beschreiben. Dabei zeigte sich, dass dieser positive Effekt nur dann auftritt, wenn aufgrund des spezifischen Versuchsprotokolls besonders hohe Anforderungen hinsichtlich der zu speichernden Inhalte und ihrer Interferenz an die Tiere gestellt werden. Liegt keine Interferenz vor, resultiert das Fehlen adult generierter Neurone nicht in einer signifikanten Verbesserung der Lernleistung.

Die Daten der Studie von [Saxe et al., 2007] scheinen zunächst in einem direkten Gegensatz zu der oben aufgestellten Hypothese zu stehen, da diese eine funktionale Relevanz der neugeborenen Zellen im Kontext der Enkodierung repetitiv auftretender, langfristiger Regeln postuliert. Ein positiver Effekt der Ablation adulter Neurogenese auf das spatiale Kurzzeitgedächtnis ist daher zunächst nicht zu erwarten.

Aufgrund einer langen Adaptationsphase an den vollständig frei zugänglichen Versuchsaufbau hat sich bei den getesteten Tieren im OFC ein Erwartungsmoment etabliert, nachdem alle Arme des Labyrinths grundsätzlich eine erreich-

bare Belohnung enthalten. Beginnt nun der eigentliche Versuch, muss diese Erwartung auf einige wenige und nur unter bestimmten Umständen geöffnete Arme reduziert werden. Dieser Prozess beinhaltet die Reinitiierung des hippocampalen Lernmodus um die Kontextinformationen entsprechend zu aktualisieren und so die Erzeugung neuer Erwartungsmomente zur effektiven Steuerung des Verhaltens zu generieren (vergl. Abb. 5.1). Das von [Saxe et al., 2007] verwendete Versuchsprotokoll erzeugt eine z.T. erhebliche Interferenz zwischen den zu unterscheidenden Stimuluskonfigurationen, was eine stark artifizielle und im evolutiven Kontext der Tiere in dieser Form nicht vorhandene Situation darstellt. Da die Interferenz der zwar repetitiv auftretenden, jedoch mit hoher Frequenz wechselnden Relationen auch den Adaptationsvorgang im DG betrifft, erzeugt dieser eine ambivalente und daher zur Erzeugung orthogonaler, situationsspezifischer Kontextinformationen nur eingeschränkt geeignete Einkodierung. Auf der Grundlage solcherart ineffektiv prozessierter Kontextinformation können keine verlässlichen Erwartungsmomente entstehen und die resultierende Leistung der Tiere ist entsprechend schlecht.

Sind keine verfügbaren adult generierten Körnerzellen vorhanden, kann auch der Einkodiermechanismus im DG nicht verändert werden und es bleibt in letzter Konsequenz auch bei den im Verlauf der Adaptationsphase erworbenen Erwartungsmomenten. Offenbar kann eine allgemeine, den gesamten Versuchsapparat repräsentierende Kontextinformation unter solchen Bedingungen in signifikant besserer Weise zu einer effizienten Verhaltensteuerung beitragen, als auf einem ambivalenten Einkodiermechanismus beruhende Informationen. Das Experiment stellt mithin ein Beispiel für eine Situation dar, in der die üblicherweise sinnvolle Kodierung von Regeln zunächst nicht in einem effektiveren Verhalten resultiert, sondern vielmehr die Anwendung alternativer und geeigneterer Strategien blockiert.

Der dargestellte Mechanismus steht im Einklang mit den in der vorliegenden Arbeit erhobenen und interpretierten Daten und basiert auf der oben vorgeschlagenen Hypothese einer funktionalen Relevanz adulter Neurogenese. Erneut wird die Interdependenz zwischen den Adaptations- und Einkodierungsvorgängen im DG, der integrierenden Funktion des OFC sowie der spezifischen Rolle adulter Neurogenese deutlich, was die Notwendigkeit einer Berücksichtigung der Funktion weiterer, an hippocampusabhängigen Lernprozessen beteiligter Strukturen für ein fundiertes Verständnis der Funktion adult generierter Körnerzellen unterstreicht.

5.4.10 Der Kern der vorgeschlagenen Hypothese wird durch die in Studien anderer Autoren aufgezeigte Bedeutung einer wiederholten Exposition gegenüber gleichen Stimuluskonfigurationen für die effektive Formung eines Langzeitgedächtnisses bestätigt.

Eine Reihe von Studien belegt eine Relevanz adult generierter Granulozyten im DG für die Ausbildung eines leistungsfähigen Langzeitgedächtnisses [Bruehl-Jungerman et al., 2005, Sisti et al., 2007]. In den zitierten Arbeiten wird nicht nur die bloße Notwendigkeit verfügbarer junger Neurone im HC demonstriert, es zeigt sich auch, dass ein langsames, über einen längeren Zeitraum erfolgreiches Lernen zu einem stabileren und dauerhafteren Langzeitgedächtnis führt. Desweiteren korreliert die Gedächtnisleistung in diesem Fall direkt mit der Anzahl adult generierter und überlebender Zellen im DG. Wichtig ist hier die Tatsache einer Erhöhung der Überlebenswahrscheinlichkeit durch die Qualität des Lernprozesses und nicht umgekehrt.

Diese Ergebnisse unterstützen die hier vorgeschlagene Hypothese ebenfalls in voller Hinsicht. Das in qualitativer Hinsicht höherwertigere und langsamere Erlernen von Inhalten entspricht der oben beschriebenen Repräsentation repetitiv und über mehrere Tage auftretender Regeln im Enkodiermechanismus des DG, wodurch eine besonders effektive Speicherung der Informationen in CA3 ermöglicht wird. Müssen jedoch in kurzer Zeit viele verschiedene Regeln erlernt werden, kann das hippokampale System dieses zwar leisten, jedoch kann die Speicherung in CA3 über das Enkodiernetzwerk des DG nicht durch das Hinzufügen junger Granulozyten effektiv angepasst werden, weshalb die Informationsspeicherung weniger effizient verläuft. Solchermaßen "schnellgespeicherte" Inhalte gehen auch signifikant schneller verloren; auch weil eine spätere Reaktivierung über einen spezifischen Kodiermechanismus im DG nicht möglich ist.

5.4.11 Der Genotyp hat eine grundlegende Bedeutung für die Entwicklung qualitativer Aspekte der Akquisitionphase in der MWM.

Genetische Determinanten adulter Neurogenese korrelieren mit der Akquisitionleistung diverser, genotypisch unterschiedlicher und in der MWM getesteter Mausstämmen, wohingegen die Leistung in Probetrials nicht aufgrund eines bestimmten Genotyps vorausgesagt werden kann [Kempermann et al., 2002]. Im Kontext der hier erhobenen Befunde bezüglich spezifischer qualitativer Veränderungen auch in der Akquisitionsphase nach erfolgter Suppression adulter

Neurogenese kann eine solche Korrelation zwischen molekulargenetischen und verhaltensbiologischen Faktoren auf eine fundiertere Grundlage gestellt werden.

Eine genotypisch bedingte, geringe Neurogeneserate in adulten Tieren resultiert in einer signifikanten Reduktion für eine Rekrutierung verfügbarer plastischer Körnerzellen im DG. Da eine solche, genetisch bedingte Situation die gesamte Ontogenese des betrachteten Organismus betrifft, sind per se genutzte kompensatorische Modifikationen des gezeigten Verhaltens zu erwarten und auch wahrscheinlich. Sie ermöglichen Tieren eine unauffällige und das Überleben sichernde Lebensweise, ihr spezifischer Beitrag und dessen Qualität müssen hier offene Fragen bleiben. Werden die Tiere nun mit einer komplexen und stark artifiziellen Lernsituation wie der MWM konfrontiert, reichen die üblicherweise aktiven Kompensationsmechanismen nicht mehr aus und es kommt zu spezifischen Defiziten hinsichtlich der gezeigten Lernleistung. Da der Enkodiermechanismus des DG vor allem für die effektive, orthogonale Speicherung ähnlicher aber dennoch signifikant unterschiedlicher Informationen zuständig ist, treten Effekte einer Dysfunktion wie bereits oben erörtert besonders bei der Akquisition neuer und veränderlicher Lernsituationen auf.

Wie bereits für die MWM Daten von [Madsen et al., 2003] zuvor dargelegt wurde, existieren mit den hier erhobenen Daten und der daraus abgeleiteten Hypothese gute Argumente für die Annahme maskierter, qualitativer Veränderungen der von den betroffenen Tieren im Verlauf der Akquisition gezeigten Verhaltensstrategien. Direkte Ursache hierfür ist bei allen Beispielen eine signifikante Reduktion der Anzahl für eine Integration verfügbarer plastischer Körnerzellen.

5.4.12 Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen das Modell nach Wiskott et al., lassen jedoch einige Modifizierungen als notwendig erscheinen.

Auch wenn eine wichtige Prädiktion des Modells von [Wiskott et al., 2006] durch die vorliegende Studie bestätigt wird, stimmen die dargestellten Ergebnisse mit verschiedenen Aspekten seiner Umsetzung nicht überein. So ist die eindeutige Trennung neuer und neuartiger Stimuli per se nicht mehr möglich, sondern hängt vielmehr davon ab, ob der jeweilige Stimulus Teil einer bereits erlernten oder aber noch zu erlernenden Regel ist. Entscheidend scheint hier also nicht die Qualität des Stimulus an sich, sondern die Situation zu sein in der die Wahrnehmung stattfindet. Aus dieser von der des Modells verschiedenen Perspektive muss die Funktion adult generierter Körnerzellen im DG zwar im Detail anders beschrieben werden, ihre grundlegende Bedeutung für das Entstehen funktionaler Plastizität bleibt jedoch erhalten.

In dem Modell von [Wiskott et al., 2006] werden die Beiträge des OFC und anderer Hirnregionen zur Informationsverarbeitung im HC nicht berücksichtigt. Die Diskussion der Ergebnisse der vorliegenden Studie lässt jedoch die Einbeziehung dieser extrahippokampalen, jedoch im Kontext eines Lernparadigmas wie der MWM bedeutungsvollen Vorgänge als sinnvoll erscheinen. Dies gilt in besonderem Maße für die Reinitiierung des Lernmodus im DG nach Detektion einer Abweichung von einer zuvor erlernten Regel.

Hiermit eng verknüpft ist die Thematik der Modellierung der Veränderung beteiligter synaptischer Gewichte im Netzwerk des HC. Im Verlauf der Diskussion wurde bereits auf die mögliche Rolle anderer Hirnregionen, sowie modulativer Systeme (z.B. cholinerges System) hingewiesen. Die Implementation solcher differenzierter Lernregeln zumindest auf der Ebene einzelner Synapsengruppen ist nicht trivial und muss vor dem Hintergrund elektrophysiologischer Daten erfolgen, dürfte sich jedoch bei der erfolgreichen Modellierung wichtiger Detailsaspekte hippokampalen Lernens als wertvoll erweisen.

5.5 Schlussbetrachtung und Ausblick

5.5.1 Die Fragestellung konnte erfolgreich bearbeitet werden.

Die multizyklische Applikation des Zytostatikums TMZ ermöglicht bei Erhaltung eines aus histologischer, physiologischer und verhaltensbiologischer Perspektive unauffälligen Allgemeinzustands die effektive Suppression adulter Neurogenese in Tieren eines beliebigen Mausstammes. In der vorliegenden Arbeit wird eine funktionale Relevanz adulter hippokampaler Neurogenese im Kontext eines räumlichen *reversal*-Lernens bestätigt und charakterisiert. Der rechnergestützte qualitative Analyseansatz hat sich dabei im Sinne einer schnellen und reliablen Datenprozessierung bewährt und stellt insbesondere als zweite "interne" Kontrolle ein wertvolles Werkzeug zur Beurteilung etwaiger unspezifischer Nebeneffekte der TMZ-Applikation dar.

Die Anwendung einer aus den erhobenen Daten abgeleiteten Hypothese bei der Interpretation nicht nur der MWM Experimente anderer Autoren, sondern auch weiterer Lernparadigmen fügen die dargestellten Befunde sehr gut sowohl in den Zusammenhang hippokampaler Informationsverarbeitung als auch allgemeiner, unter Mitwirkung verschiedener kortikaler Bereiche stattfindender Aspekte von Lernvorgängen ein (Abb. 5.7).

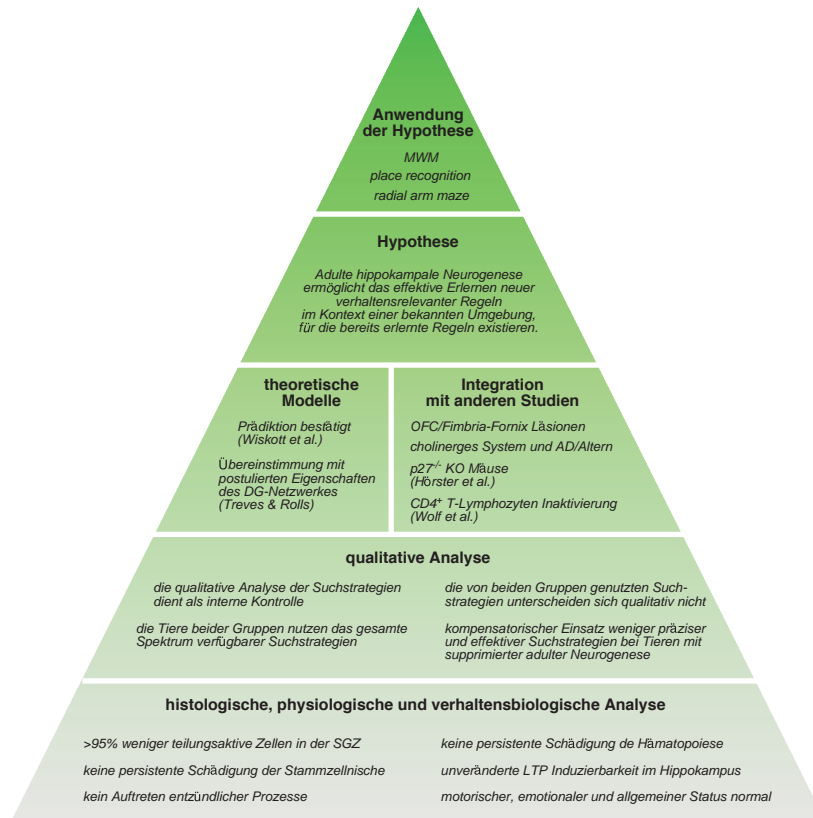


Abbildung 5.7: **Ableitung einer allgemeinen Hypothese und Zusammenhang der Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit**

Adulte hippocampale Neurogenese erscheint somit nicht nur als ein funktional auf den DG beschränktes Phänomen, sondern viel mehr als grundlegendes Element einer effizienten Adaptation von Lernvorgängen an das Auftreten neuartiger Gesetzmäßigkeiten in der wahrgenommenen Umwelt, was wiederum als obligat für ein situationsspezifisch modifiziertes Verhalten anzusehen ist.

5.5.2 Eine klinische Relevanz der erhobenen Befunde ist wahrscheinlich, kann jedoch nicht bewiesen werden.

Wichtig ist bei der Beurteilung einer möglichen klinischen Relevanz der hier erhobenen Befunde der Hinweis auf Studien zu persistierenden kognitiven Beeinträchtigungen bei Erwachsenen in Folge einer Behandlung mit Zytostatika (auch bereits im Kindesalter) im Rahmen einer Krebstherapie [Schagen et al., 2002, 2006]. Bei der gegenwärtigen Datenlage kann eine direkte Analogie der in der vorliegenden Arbeit beobachteten Effekte einer Ablation adulter hippocampaler Neurogenese und solcher kognitiver Beeinträchtigungen beim Menschen

nicht postuliert werden. Dennoch stellen die hier diskutierten Daten einen geeigneten Ausgangspunkt für die Frage nach der funktionalen Relevanz adulter Neurogenese beim Menschen und insbesondere ihrer Rolle bei der Genese diverser pathologischer Zustände dar. Dies gilt für die langzeitlichen Konsequenzen einer zytostatischen Behandlung im Kindesalter ebenso wie für Veränderungen des Gehirns im Verlauf des Alterungsprozesses [Wilson et al., 2006] oder die Depression [Kempermann, 2002].

5.5.3 Aus der Diskussion der hier durchgeführten Experimente und ihrer Ergebnisse ergeben sich neue interessante Fragestellungen.

Bei der Durchführung und Auswertung der in dieser Arbeit dargestellten Experimente ergeben sich weiterführende Fragestellungen, die hier nicht oder nur unvollständig beantwortet werden können. Eine wichtige Frage ist z.B. die nach einer möglicherweise persistenten Schädigung der Stammzellnische in der SGZ aufgrund einer multizyklischen TMZ Behandlung. Die Daten bereits durchgeführter, jedoch statistisch nicht vollständig analysierter MWM Experimente, bei denen die getesteten Tiere mit mehreren Zielverschiebungen konfrontiert werden zeigen, dass das Problem einer perseverierenden Präferenz für eine zuvor erlernte Zielposition über ein Zeitraum von bis zu fünf Wochen nach Applikation der letzten TMZ Injektion bestehen bleibt (Abb. 5.7). Vor dem Hintergrund einer präferentiellen Rekrutierung 5-13 Tage alter, adult generierter Körnerzellen in die bestehenden Schaltkreise und einer vollständigen Erholung der Proliferativen Aktivität des Knochenmarks besteht daher die Möglichkeit einer nachhaltigen Schädigung des proliferativen Potentials in der SGZ. Ob dies im Sinne einer selektiven Eradikation der putativen Stammzellen (Typ-1) geschieht, auf Veränderungen der vaskulären Nische in Folge einer prolongierten Beeinträchtigung der Angiogenese zurückzuführen ist oder aber auf einer Schädigung der Gliazellsituation beruht, muss in weiteren histologischen Experimenten untersucht werden. Darüberhinaus existiert die Möglichkeit einer signifikanten Veränderung der stattfindenden Informationsverarbeitung im Sinne einer fortgesetzten Nutzung alternativer Prozessierungsmechanismen.

Bemerkenswert ist der Umstand, dass zwischen der Größe der Änderung der Zielposition und der Schwere der Perseveranz offensichtlich ein Zusammenhang besteht. Immer dann, wenn die Plattform um 180° verschoben wird, ist der Effekt signifikant größer als bei einer Verschiebung um 90°. Die funktionale und neurophysiologische Grundlage für diese Abhängigkeit ist unklar.

Desweiteren zeigen Tiere, welche zuvor in einer reizangereicherten Umgebung gehalten werden, nicht nur eine erwartungsgemäß hohe Effizienz ihrer Adap-

tationsfähigkeit, sondern auch eine Tendenz zu einem häufigeren Einsatz von Praxis- und Pfadintegrationsstrategien (Abb. 5.8). Eine mögliche Erklärung sind die im Vergleich mit einer natürlichen Umgebung stark reduktionistischen räumlichen Verhältnisse in der MWM Arena, wodurch die Effizienz zugunsten solcher Strategien gegenüber einer allozentrischen, räumlichen Navigation signifikant erhöht wird.

Als Lackmus-Test für die Allgemeingültigkeit der in Folge einer Ablation adulter Neurogenese beobachteten Defizite kann die Kombination zweier räumlicher Testparadigmen dienen: Ein MWM Test wird mit einem Barnes maze Versuch kombiniert. Dabei sollen die Tiere zunächst ihre "Plastizitätsreserve" in einem der Tests aufbrauchen, um sich dann an dem jeweils anderen Versuchsaufbau zu versuchen. Beide Paradigmen sind sich recht ähnlich, stellen jedoch für die getesteten Tiere hinreichend unterschiedliche Umgebungen in dem Sinne dar, als daß keine identischen Verhaltensstrategien verwendet werden können. Dennoch besteht auch hier die Möglichkeit eines zu großen Unterschieds der verwendeten Tests, so daß die zu erlernenden Regeln hinreichend verschieden sind, um im DG per se ohne eine Beteiligung adult generierter Zellen in orthogonaler Weise verarbeitet zu werden.

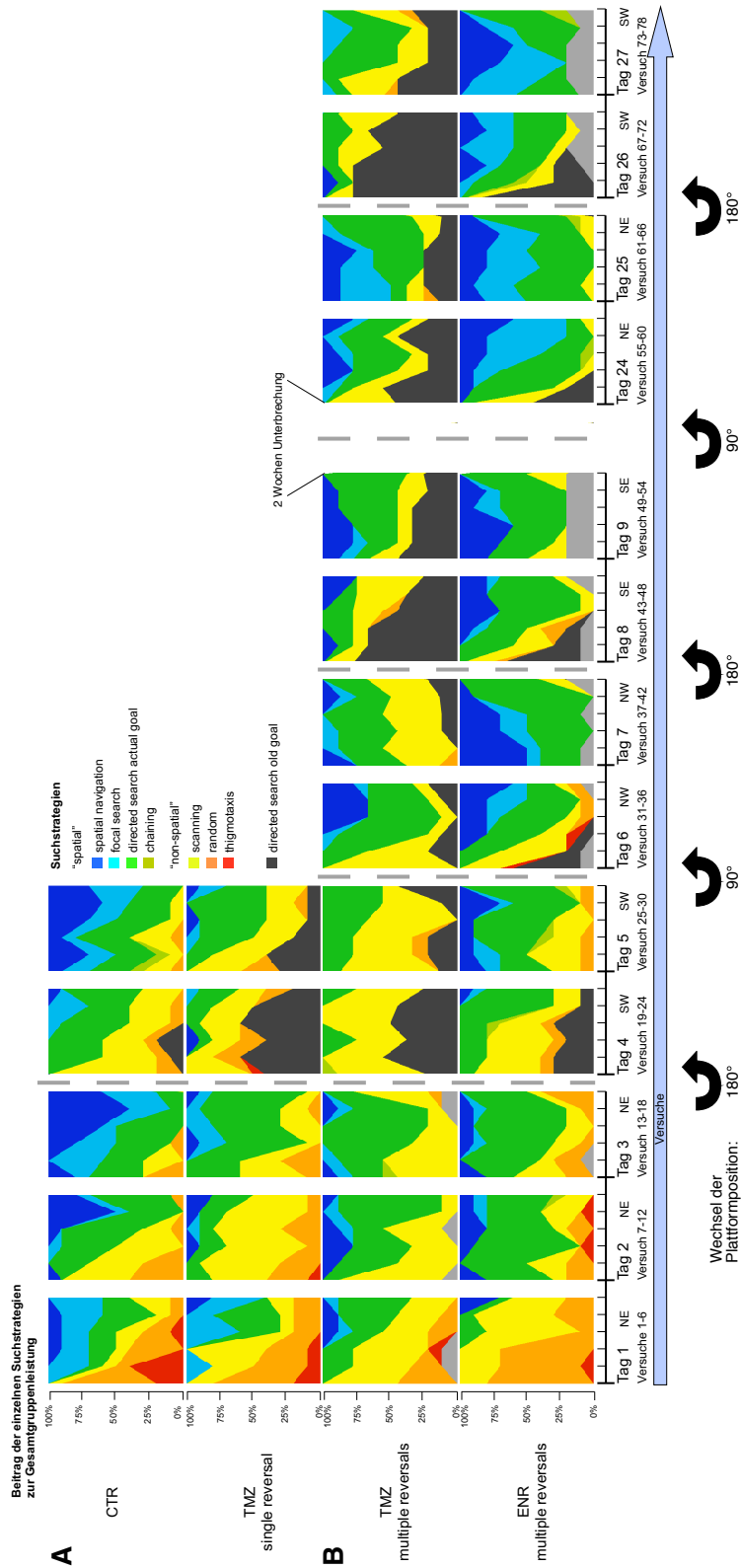


Abbildung 5.8: MWM Experiment mit multiplen Zielverschiebungen (A) Genutzte Strategien im MWM Versuch mit einer und (B) multiplen Verschiebungen der Zielplattform. Dargestellt sind die relativen Beiträge der jeweiligen Suchstrategien zur Gruppenleistung. Unterbrechung des Experiments für zwei Wochen nach dem neunten Versuchstag. Verschiebung der Zielplattform abwechselnd um 180° bzw. 90°.

Besondere Beachtung verlangt das Zusammenspiel der HCF mit dem OFC und anderen Hirnregionen im Kontext von Lernvorgängen mit hippokampaler Beteiligung. Die Kenntnis des jeweiligen Beitrags des OFC oder des HC zu den beobachteten Phänotypen ist für eine fundierte Aussage hinsichtlich der präzisen funktionalen Relevanz adulter Neurogenese und die Gestaltung spezifischer Versuchsprotokolle von zentraler Bedeutung.

5.5.4 Die Korrelation präzise charakterisierter Phänotypen mit unterschiedlichen Genotypen erlaubt ein differenziertes Verständnis der Regulation adulter Neurogenese im Kontext hippokampaler Funktion.

Wie zuvor bereits im Zusammenhang mit qualitativen Aspekten der Akquisitionsphase deutlich wurde, stellt neben der Funktion anderer Hirnareale die Rolle der in die spezifische Regulation adulter Neurogenese involvierten Gene einen wertvollen Ansatzpunkt für eine präzise Charakterisierung der funktionalen Relevanz adulter Neurogenese dar. Dies gilt besonders für die Analyse verschiedener Genotypen, welche in ebenso vielfältigen Phänotypen resultieren.

In diesem Zusammenhang muss auf die Limitation des in der vorliegenden Arbeit entwickelten Klassifikationsalgorithmus hingewiesen werden. Da dieser explizit unter Verwendung von Daten getesteter C57BL6 Mäuse entwickelt wurde und zudem auf der Anwendung rigider Parameter beruht, sind nur winzige, unerheblich erscheinende Veränderungen des Phänotyps notwendig, um die Reliabilität signifikant zu reduzieren. Dies wurde besonders auch bei der oben erwähnten Analyse von $p27^{-/-}$ Mäusen deutlich.

Eine flexiblere Lösung mit dem Ziel eine große Anzahl unterschiedlicher Genotypen in der MWM testen zu können, stellt die Erkennung redundant auftretender Muster durch ein selbstlernendes neuronales Kohonen-Netzwerk dar. Dieses bietet zudem den wichtigen Vorteil redundante Verhaltensmuster in verschiedenen Lernparadigmen selbstständig erkennen zu können. Bei der Suche nach neuen, durch adulte hippokampale Neurogenese vermittelten qualitativen Aspekten der Akquisition neuartiger Informationen kommt eben solchen noch unbekanntem Verhaltensmuster eine elementare Bedeutung zu. Erste positive Ergebnisse unter Verwendung eines einfachen Prototyps lassen diesen Weg als sehr vielversprechend erscheinen.

Die Korrelation der so gewonnenen verhaltensbiologischen Informationen mit Daten zur Expression an der Regulation adulter Neurogenese beteiligter Gene bei verschiedenen Genotypen kann zu einem fundierten Verständnis der Regu-

lation und Funktion adulter Neurogenese im HC beitragen. Dies gilt besonders auch in Hinsicht auf mögliche zukünftige Ansätze regenerativer Therapien zum Wohle des Menschen.

Literaturverzeichnis

- D. N. Abrous, M. Koehl, and M. Le Moal. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev*, 85(2):523–569, Apr 2005.
- R. Alonso, G. Griebel, G. Pavone, J. Stemmelin, G. Le Fur, and P. Soubrie. Blockade of crf(1) or v(1b) receptors reverses stress-induced suppression of neurogenesis in a mouse model of depression. *Mol Psychiatry*, 9(3):278–86, 224, Mar 2004.
- J. Altman. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*, 135:1127–8, 1962a.
- J. Altman. Autoradiographic study of degenerative and regenerative proliferation of neuroglia cells with tritiated thymidine. *Exp Neurol*, 5:302–18, 1962b.
- J. Altman. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat Rec*, 145:573–91, 1963.
- J. Altman. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. iv. cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol*, 137(4):433–457, Dec 1969.
- J. Altman, G. D. Das, et al. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*, 124(3):319–335, Jun 1965.
- J. Altman, G. D. Das, et al. Postnatal neurogenesis in the guinea-pig. *Nature*, 214(5093):1098–1101, Jun 1967.
- A. Alvarez-Buylla, D. R. Buskirk, and F. Nottebohm. Monoclonal antibody reveals radial glia in adult avian brain. *J Comp Neurol*, 264(2):159–170, Oct 1987.
- A. Alvarez-Buylla, F. Nottebohm, et al. Migration of young neurons in adult avian brain. *Nature*, 335(6188):353–354, Sep 1988.

- A. Alvarez-Buylla, C. Lois, et al. Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates. *Stem Cells*, 13(3):263–272, May 1995.
- D. G. Amaral, M. P. Witter, et al. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31(3):571–591, 1989.
- P. Ambrogini, R. Cuppini, C. Cuppini, S. Ciaroni, T. Cecchini, P. Ferri, S. Sarti, and P. Del Grande. Spatial learning affects immature granule cell survival in adult rat dentate gyrus. *Neurosci Lett*, 286(1):21–24, May 2000.
- P. Ambrogini, L. Orsini, C. Mancini, P. Ferri, S. Ciaroni, and R. Cuppini. Learning may reduce neurogenesis in adult rat dentate gyrus. *Neurosci Lett*, 359(1-2):13–16, Apr 2004.
- I. Amrein, L. Slomianka, I. Poletaeva, N. Bologova, and H P. Lipp. Marked species and age-dependent differences in cell proliferation and neurogenesis in the hippocampus of wild-living rodents. *Hippocampus*, 14(8):1000–1010, 2004.
- P. Andersen, T. V. Bliss, and K. K. Skrede. Unit analysis of hippocampal population spikes. *Exp Brain Res*, 13(2):208–221, 1971.
- A. Arvidsson, Z. Kokaia, and O. Lindvall. N-methyl-d-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke. *Eur J Neurosci*, 14(1):10–18, Jul 2001.
- A. Arvidsson, T. Collin, D. Kirik, Z. Kokaia, and O. Lindvall. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med*, 8(9):963–970, Sep 2002.
- N. G. Avgeropoulos, T. T. Batchelor, et al. New treatment strategies for malignant gliomas. *Oncologist*, 4(3):209–224, 1999.
- S. D. Baker, M. Wirth, P. Statkevich, P. Reidenberg, K. Alton, S. E. Sartorius, M. Dugan, D. Cutler, V. Batra, L. B. Grochow, R. C. Donehower, and E. K. Rowinsky. Absorption, metabolism, and excretion of 14c-temozolomide following oral administration to patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res*, 5(2):309–317, Feb 1999.
- G. R. I. Barker, F. Bird, Victoria Alexander, and E. Clea Warburton. Recognition memory for objects, place, and temporal order: a disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. *J Neurosci*, 27(11):2948–2957, Mar 2007.

- P. Beale, I. Judson, S. Moore, P. Statkevich, A. Marco, D. L. Cutler, P. Reidenberg, and M. Brada. Effect of gastric pH on the relative oral bioavailability and pharmacokinetics of temozolomide. *Cancer Chemother Pharmacol*, 44(5):389–394, 1999.
- Hagstroem M Palm G Bentz, HJ. Information storage and effective data retrieval in sparse matrices. *Neural Network*, 2:289–293, 1989.
- P. J. Bernier, A. Bedard, Jonathan Vinet, Martin Levesque, and Andre Parent. Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(17):11464–11469, Aug 2002.
- M. Biebl, C. M. Cooper, J. Winkler, and H. G. Kuhn. Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett*, 291(1):17–20, Sep 2000.
- R. Biegler, R. G. Morris, et al. Blocking in the spatial domain with arrays of discrete landmarks. *J Exp Psychol Anim Behav Process*, 25(3):334–351, Jul 1999.
- V. Boulougouris, J. W Dalley, and T. W Robbins. Effects of orbitofrontal, infralimbic and prelimbic cortical lesions on serial spatial reversal learning in the rat. *Behav Brain Res*, 179(2):219–228, May 2007.
- R. Brandeis, Y. Brandys, and S. Yehuda. The use of the morris water maze in the study of memory and learning. *Int J Neurosci*, 48(1-2):29–69, Sep 1989.
- C. J. Brindley, P. Antoniow, and E. S. Newlands. Plasma and tissue disposition of mitozolomide in mice. *Br J Cancer*, 53(1):91–97, Jan 1986.
- P.L. Broadhurst. Analysis of maternal effects in the inheritance of behavior. *Animal Behavior*, 9:129–141, 1961.
- D. L Brody, D. M Holtzman, et al. Morris water maze search strategy analysis in pdapp mice before and after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol*, 197(2):330–340, Feb 2006.
- J. Brown, C. M Cooper-Kuhn, G. Kempermann, H. Van Praag, J. Winkler, F. H Gage, and H. Georg Kuhn. Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur J Neurosci*, 17(10):2042–2046, May 2003.
- E. Bruel-Jungerman, S. Laroche, and C. Rampon. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur J Neurosci*, 21(2):513–521, Jan 2005.

- D. J. Bucci, A. A. Chiba, and M. Gallagher. Spatial learning in male and female long-evans rats. *Behav Neurosci*, 109(1):180–183, Feb 1995.
- H. A. Cameron, C. S. Woolley, B. S. McEwen, and E. Gould. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience*, 56(2):337–344, Sep 1993.
- H. A. Cameron, R. D. McKay, et al. Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci*, 2(10):894–897, Oct 1999.
- V. D. Chamizo. Acquisition of knowledge about spatial location: assessing the generality of the mechanism of learning. *Q J Exp Psychol B*, 56(1):102–113, Feb 2003.
- J. P. Changeux, A. Danchin, et al. Selective stabilisation of developing synapses as a mechanism for the specification of neuronal networks. *Nature*, 264(5588):705–712, 1976.
- S. K. Chowdhury, D. Laudicina, N. Blumenkrantz, M. Wirth, and K. B. Alton. An lc/ms/ms method for the quantitation of mtic (5-(3-n-methyltriazene-1-yl)-imidazole-4-carboxamide), a bioconversion product of temozolomide, in rat and dog plasma. *J Pharm Biomed Anal*, 19(5):659–668, Apr 1999.
- N. J. Cohen, L. R. Squire, et al. Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. *Science*, 210(4466):207–210, Oct 1980.
- C. M Cooper-Kuhn, J. Winkler, and H. Georg Kuhn. Decreased neurogenesis after cholinergic forebrain lesion in the adult rat. *J Neurosci Res*, 77(2):155–165, Jul 2004.
- F. S. Corotto, J. A. Henegar, and J. A. Maruniak. Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain. *Neurosci Lett*, 149(2):111–4, 1993. 0304-3940 (Print) Journal Article.
- J. C. Crabbe, D. Wahlsten, and B. C. Dudek. Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science*, 284(5420):1670–1672, Jun 1999.
- S. Dalm, J. Grootendorst, E. R. de Kloet, and M. S. Oitzl. Quantification of swim patterns in the morris water maze. *Behav Res Methods Instrum Comput*, 32(1):134–139, Feb 2000.

- J. M. Daniel, S. L. Roberts, and G. P. Dohanich. Effects of ovarian hormones and environment on radial maze and water maze performance of female rats. *Physiol Behav*, 66(1):11–20, Mar 1999.
- G. D. Das, J. Altman, et al. Postnatal neurogenesis in the cerebellum of the cat and tritiated thymidine autoradiography. *Brain Res*, 30(2):323–330, Jul 1971.
- B. J. Denny, R. T. Wheelhouse, M. F. Stevens, L. L. Tsang, and J. A. Slack. Nmr and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with dna. *Biochemistry*, 33(31):9045–9051, Aug 1994.
- K. Van der Borght, J. Mulder, J. N Keijsers, B. J L Eggen, P. G M Luiten, and E. A Van der Zee. Input from the medial septum regulates adult hippocampal neurogenesis. *Brain Res Bull*, 67(1-2):117–125, Sep 2005a.
- K. Van der Borght, A. E Wallinga, P. G M Luiten, B. J L Eggen, and E. A Van der Zee. Morris water maze learning in two rat strains increases the expression of the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule in the dentate gyrus but has no effect on hippocampal neurogenesis. *Behav Neurosci*, 119(4):926–932, Aug 2005b.
- M. D. Dobrossy, E. Drapeau, C. Aurousseau, M. Le Moal, P. V. Piazza, and D. N. Abrous. Differential effects of learning on neurogenesis: learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date. *Mol Psychiatry*, 8(12):974–982, Nov 2003.
- R. J Douglas, K. A C Martin, et al. Neuronal circuits of the neocortex. *Annu Rev Neurosci*, 27:419–451, 2004.
- E. Drapeau, W. Mayo, C. Aurousseau, M. Le Moal, PV Piazza, and D. N. Abrous. Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(24):14385–14390, Nov 2003.
- D Dupret, MF Montaron, E Drapeau, C Aurousseau, M Le Moal, PV Piazza, and DN Abrous. Methylazoxymethanol acetate does not fully block cell genesis in the young and aged dentate gyrus. *Eur J Neurosci*, 22(3):778–783, Aug 2005.
- D. Dupret, A Fabre, MD Doebroessy, A. Panatier, JJ. Rodriguez, S. Lamarque, V Lemaire, Stephane H R Olier, PV Piazza, and DN Abrous. Spatial learning

- depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS Biol*, 5(8):e214, Aug 2007.
- D. Ehninger, G. Kempermann, et al. Regional effects of wheel running and environmental enrichment on cell genesis and microglia proliferation in the adult murine neocortex. *Cereb Cortex*, 13(8):845–851, Aug 2003.
- H. Eichenbaum, C. Stewart, and R. G. Morris. Hippocampal representation in place learning. *J Neurosci*, 10(11):3531–3542, Nov 1990.
- P. S. Eriksson, E. Perfilieva, T. Bjork-Eriksson, A. M. Alborn, C. Nordborg, D. A. Peterson, and F. H. Gage. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, 4(11):1313–1317, Nov 1998.
- R.M. French. Using semi-distributed representations to overcome catastrophic forgetting in connectionist networks. In *Proceedings of the 13th Annual Cognitive Science Society Conference, Hillsdale, NJ*, 1991.
- H. Frielingsdorf, K. Schwarz, P. Brundin, and P. Mohapel. No evidence for new dopaminergic neurons in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(27):10177–10182, Jul 2004.
- S Ge, E L K Goh, K A Sailor, Y Kitabatake, G Ming, and H Song. Gaba regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, 439(7076):589–593, Feb 2006. doi: 10.1038/nature04404. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nature04404>.
- S. A. Goldman, F. Nottebohm, et al. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(8):2390–2394, Apr 1983.
- E. Gould, H. A. Cameron, D. C. Daniels, C. S. Woolley, and B. S. McEwen. Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J Neurosci*, 12(9):3642–3650, Sep 1992.
- E. Gould, B. S. McEwen, et al. Neuronal birth and death. *Curr Opin Neurobiol*, 3(5):676–682, Oct 1993.
- E. Gould, H. A. Cameron, and B. S. McEwen. Blockade of nmda receptors increases cell death and birth in the developing rat dentate gyrus. *J Comp Neurol*, 340(4):551–565, Feb 1994.
- E. Gould, B. S. McEwen, P. Tanapat, L. A. Galea, and E. Fuchs. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and nmda receptor activation. *J Neurosci*, 17(7):2492–2498, Apr 1997.

- E. Gould, P. Tanapat, B. S. McEwen, G. Fluegge, and E. Fuchs. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(6):3168–3171, Mar 1998.
- E. Gould, A. Beylin, P. Tanapat, A. Reeves, and T. J. Shors. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci*, 2(3):260–265, Mar 1999a.
- E. Gould, A. J. Reeves, M. Fallah, P. Tanapat, C. G. Gross, and E. Fuchs. Hippocampal neurogenesis in adult old world primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(9):5263–5267, Apr 1999b.
- E. Gould, A. J. Reeves, M. S. Graziano, and C. G. Gross. Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science*, 286(5439):548–552, Oct 1999c.
- E. Gould, N. Vail, M. Wagers, and C. G. Gross. Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(19):10910–10917, Sep 2001.
- A. J. Gower, Y. Lamberty, et al. The aged mouse as a model of cognitive decline with special emphasis on studies in nmri mice. *Behav Brain Res*, 57(2):163–173, Nov 1993.
- A. Graziano, L. Petrosini, and A. Bartoletti. Automatic recognition of explorative strategies in the morris water maze. *J Neurosci Methods*, 130(1):33–44, Nov 2003.
- J. R. Griffiths, J. D. Glickson, et al. Monitoring pharmacokinetics of anticancer drugs: non-invasive investigation using magnetic resonance spectroscopy. *Adv Drug Deliv Rev*, 41(1):75–89, Mar 2000.
- S. N. Haber, K. Kunishio, M. Mizobuchi, and E. Lynd-Balta. The orbital and medial prefrontal circuit through the primate basal ganglia. *J Neurosci*, 15(7 Pt 1):4851–4867, Jul 1995.
- N. B. Hastings, E. Gould, et al. Rapid extension of axons into the ca3 region by adult-generated granule cells. *J Comp Neurol*, 413(1):146–154, Oct 1999.
- Krogh A. Palmer R.G. Hertz, J. *Introduction to the Theory of Neural Computation*. Addison-Wesley, Redwood City, CA, 1991.
- Eckardt S Hoerster H. personal communication. *in prep.*, 2007.
- C. Janus. Search strategies used by app transgenic mice during navigation in the morris water maze. *Learn Mem*, 11(3):337–346, 2004.

- S. Jessberger, G. Kempermann, et al. Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *Eur J Neurosci*, 18(10):2707–2712, Nov 2003.
- W. Jiang, Q. Wan, Z. Zhang, W.D. Wang, Y.G. Huang, Z.R. Rao, and X. Zhang. Dentate granule cell neurogenesis after seizures induced by pentylenetetrazol in rats. *Brain Res*, 977(2):141–148, Jul 2003.
- B. J. Jones and D. J. Roberts. A rotarod suitable for quantitative measurements of motor incoordination in naive mice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Exp Pathol Pharmacol*, 259(2):211, 1968.
- M. S. Kaplan, J. W. Hinds, et al. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*, 197(4308):1092–1094, Sep 1977.
- N. Kee, C. M. Teixeira, A. H. Wang, and P. W. Frankland. Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat Neurosci*, 10(3):355–362, Mar 2007. doi: 10.1038/nn1847. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nn1847>.
- G. Kempermann. Regulation of adult hippocampal neurogenesis - implications for novel theories of major depression. *Bipolar Disord*, 4(1):17–33, Feb 2002.
- G. Kempermann, H. G. Kuhn, and F. H. Gage. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386(6624):493–495, Apr 1997.
- G. Kempermann, E. P. Brandon, and F. H. Gage. Environmental stimulation of 129/svj mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Curr Biol*, 8(16):939–942, 1998a.
- G. Kempermann, H. G. Kuhn, and F. H. Gage. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci*, 18(9):3206–3212, May 1998b.
- G. Kempermann, F. H. Gage, et al. Genetic determinants of adult hippocampal neurogenesis correlate with acquisition, but not probe trial performance, in the water maze task. *Eur J Neurosci*, 16(1):129–136, Jul 2002.
- G. Kempermann, D. Gast, G. Kronenberg, M. Yamaguchi, and F. H. Gage. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development*, 130(2):391–399, Jan 2003a.

- G. Kempermann, H. Neumann, et al. Neuroscience. microglia: the enemy within? *Science*, 302(5651):1689–1690, Dec 2003b.
- G. Kempermann, S. Jessberger, B. Steiner, and G. Kronenberg. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci*, 27(8): 447–452, Aug 2004.
- Gerd Kempermann. *Adult Neurogenesis*. Oxford University Press, 2006.
- T. E. Kippin, S. W. Cain, Z. Masum, and M. R. Ralph. Neural stem cells show bidirectional experience-dependent plasticity in the perinatal mammalian brain. *J Neurosci*, 24(11):2832–2836, Mar 2004.
- F. Kloosterman, T. Van Haeften, M. P. Witter, and F. H. Lopes Da Silva. Electrophysiological characterization of interlaminar entorhinal connections: an essential link for re-entrance in the hippocampal-entorhinal system. *Eur J Neurosci*, 18(11):3037–3052, Dec 2003.
- D. Koketsu, A. Mikami, Y. Miyamoto, and T. Hisatsune. Nonrenewal of neurons in the cerebral neocortex of adult macaque monkeys. *J Neurosci*, 23(3): 937–942, Feb 2003.
- D. R. Kornack, P. Rakic, et al. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(10): 5768–5773, May 1999.
- D. R. Kornack, P. Rakic, et al. Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex. *Science*, 294(5549):2127–2130, Dec 2001.
- G. Kronenberg, K. Reuter, B. Steiner, M. D. Brandt, S. Jessberger, M. Yamaguchi, and G. Kempermann. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol*, 467(4):455–463, Dec 2003.
- H. G. Kuhn, H. Dickinson-Anson, and F. H. Gage. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci*, 16(6):2027–2033, Mar 1996.
- P. Lavenex, D. G. Amaral, et al. Hippocampal-neocortical interaction: a hierarchy of associativity. *Hippocampus*, 10(4):420–430, 2000.
- B. Leuner, S. Mendolia-Loffredo, Y. Kozorovitskiy, D. Samburg, E. Gould, and T. J. Shors. Learning enhances the survival of new neurons beyond the time when the hippocampus is required for memory. *J Neurosci*, 24(34): 7477–7481, Aug 2004.

- B. Leuner, E. Gould, and T. J. Shors. Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus*, 16(3):216–24, 2006. 1050-9631 (Print) Journal Article Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Review.
- S. F. Logue, R. Paylor, and J. M. Wehner. Hippocampal lesions cause learning deficits in inbred mice in the morris water maze and conditioned-fear task. *Behav Neurosci*, 111(1):104–113, Feb 1997.
- C. Lois, A. Alvarez-Buylla, et al. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(5):2074–2077, Mar 1993.
- T. Lomo. The discovery of long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 358(1432):617–620, Apr 2003.
- T. M. Madsen, P. E G Kristjansen, T. G. Bolwig, and G. Wortwein. Arrested neuronal proliferation and impaired hippocampal function following fractionated brain irradiation in the adult rat. *Neuroscience*, 119(3):635–642, 2003.
- E. A. Markakis, F. H. Gage, et al. Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field ca3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J Comp Neurol*, 406(4):449–460, Apr 1999.
- C. Marzolini, L. A. Decosterd, F. Shen, M. Gander, S. Leyvraz, J. Bauer, T. Buclin, J. Biollaz, and F. Lejeune. Pharmacokinetics of temozolomide in association with fotemustine in malignant melanoma and malignant glioma patients: comparison of oral, intravenous, and hepatic intra-arterial administration. *Cancer Chemother Pharmacol*, 42(6):433–440, 1998.
- W. P. Mason, J. G. Cairncross, et al. Drug insight: temozolomide as a treatment for malignant glioma—impact of a recent trial. *Nat Clin Pract Neurol*, 1(2): 88–95, 2005. 1745-834X (Print) Journal Article Review.
- R. McKay. Stem cells in the central nervous system. *Science*, 276(5309):66–71, Apr 1997.
- M. J. Meaney, D. H. Aitken, S. Bhatnagar, and R. M. Sapolsky. Postnatal handling attenuates certain neuroendocrine, anatomical, and cognitive dysfunctions associated with aging in female rats. *Neurobiol Aging*, 12(1):31–38, 1991.
- R. C. Meibach, A. Siegel, et al. The origin of fornix fibers which project to the mammillary bodies in the rat: a horseradish peroxidase study. *Brain Res*, 88(3):508–512, May 1975.

- C. Mirescu, E. Gould, et al. From neurotoxin to neurotrophin. *Nat Neurosci*, 7(9):899–900, Sep 2004.
- C. Mirescu, E. Gould, et al. Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus*, 16(3):233–238, 2006.
- M. L. Monje, H. Toda, and T. D. Palmer. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science*, 302(5651):1760–1765, Dec 2003.
- R. Morris. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*, 11(1):47–60, May 1984.
- R. G. Morris, P. Garrud, J. N. Rawlins, and J. O’Keefe. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297(5868):681–683, Jun 1982.
- R.G.M. Morris. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation*, 12:239–260, 1981.
- M. Moscovitch, R. S. Rosenbaum, A. Gilboa, D. R. Addis, R. Westmacott, C. Grady, M. P. McAndrews, B. Levine, S. Black, G. Winocur, and L. Nadel. Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory. *J Anat*, 207(1):35–66, Jul 2005.
- L. Nadel. The hippocampus and space revisited. *Hippocampus*, 1(3):221–229, Jul 1991.
- M. P. Namaka, M. Sawchuk, S. C. MacDonald, L. M. Jordan, and S. Hochman. Neurogenesis in postnatal mouse dorsal root ganglia. *Exp Neurol*, 172(1):60–69, Nov 2001.
- E. S. Newlands, M. F. Stevens, S. R. Wedge, R. T. Wheelhouse, and C. Brock. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treat Rev*, 23(1):35–61, Jan 1997.
- L. De No. Studies on the structure of the cerebral cortex. ii. continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neurol.*, 46:113–77, 1934.
- J. O’Keefe. Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp Neurol*, 51(1):78–109, Apr 1976.
- J. O’Keefe, J. Dostrovsky, et al. The hippocampus as a spatial map. preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res*, 34(1):171–175, Nov 1971.

- J. O'Keefe, D. H. Conway, et al. Hippocampal place units in the freely moving rat: why they fire where they fire. *Exp Brain Res*, 31(4):573–590, Apr 1978.
- J. O'Keefe, N. Burgess, et al. Geometric determinants of the place fields of hippocampal neurons. *Nature*, 381(6581):425–428, May 1996.
- R. C. O'Reilly, J. L. McClelland, et al. Hippocampal conjunctive encoding, storage, and recall: avoiding a trade-off. *Hippocampus*, 4(6):661–682, Dec 1994.
- T. D. Palmer, J. Takahashi, and F. H. Gage. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci*, 8(6):389–404, 1997.
- T. D. Palmer, E. A. Markakis, A. R. Willhoite, F. Safar, and F. H. Gage. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci*, 19(19):8487–8497, Oct 1999.
- T. D. Palmer, A. R. Willhoite, and F. H. Gage. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol*, 425(4):479–494, Oct 2000.
- J. M. Parent. The role of seizure-induced neurogenesis in epileptogenesis and brain repair. *Epilepsy Res*, 50(1-2):179–189, Jun 2002.
- J. L. Peirce, E. J. Chesler, R. W. Williams, and L. Lu. Genetic architecture of the mouse hippocampus: identification of gene loci with selective regional effects. *Genes Brain Behav*, 2(4):238–252, Aug 2003.
- David Amaral Tim Bliss John O'Keefe Per Andersen, Richard Morris, editor. *The Hippocampus Book*. Oxford, 2006.
- V. C. Piatti, M. S. Esposito, and A. F. Schinder. The timing of neuronal development in adult hippocampal neurogenesis. *Neuroscientist*, 12(6):463–468, Dec 2006.
- J. Raber, Y. Fan, Y. Matsumori, Z. Liu, P. R. Weinstein, J. R. Fike, and J. Liu. Irradiation attenuates neurogenesis and exacerbates ischemia-induced deficits. *Ann Neurol*, 55(3):381–389, Mar 2004a.
- J. Raber, R. Rola, A. LeFevour, D. Morhardt, J. Curley, S. Mizumatsu, S. R. VandenBerg, and J. R. Fike. Radiation-induced cognitive impairments are associated with changes in indicators of hippocampal neurogenesis. *Radiat Res*, 162(1):39–47, Jul 2004b.

- P. Rakic. Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. *Nat Rev Neurosci*, 3(1):65–71, Jan 2002.
- S. J. Ramus, J. B. Davis, R. J. Donahue, C. B. Discenza, and A. A. Waite. Interactions between the orbitofrontal cortex and hippocampal memory system during the storage of long-term memory. *Ann N Y Acad Sci*, Sep 2007.
- A. Rissanen, J. Puolivali, T. van Groen, and P. Riekkinen. In mice tonic estrogen replacement therapy improves non-spatial and spatial memory in a water maze task. *Neuroreport*, 10(6):1369–1372, Apr 1999.
- C. Rochefort, G. Gheusi, J.D. Vincent, and P.M. Lledo. Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *J Neurosci*, 22(7):2679–2689, Apr 2002.
- M Roesch, G Schoenbaum, et al. *The Orbitofrontal Cortex*. Oxford, 2006.
- R. Rola, J. Raber, A. Rizk, S. Otsuka, S. R. Vandenberg, D. R. Morhardt, and J. R. Fike. Radiation-induced impairment of hippocampal neurogenesis is associated with cognitive deficits in young mice. *Exp Neurol*, 188(2):316–330, Aug 2004.
- E.T. Rolls. *Roles of long term potentiation and long term depression in neuronal network operations in the brain*. Oxford, 1996.
- Treves A Rolls, ET. *Neural Networks and Brain Function*. Oxford, 1994.
- R. L. Roof. Neonatal exogenous testosterone modifies sex difference in radial arm and morris water maze performance in prepubescent and adult rats. *Behav Brain Res*, 53(1-2):1–10, Feb 1993.
- M. P. Saddoris, M. Gallagher, and G. Schoenbaum. Rapid associative encoding in basolateral amygdala depends on connections with orbitofrontal cortex. *Neuron*, 46(2):321–331, Apr 2005.
- M. D. Saxe, F. Battaglia, J. W. Wang, G. Malleret, D. J. David, J. E. Monckton, A. D. Garcia, M. V. Sofroniew, E. R. Kandel, L. Santarelli, R. Hen, and M. R. Drew. Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(46):17501–6, 2006. 0027-8424 (Print) Journal Article.
- M. D. Saxe, G. Malleret, S. Vronskaya, I. Mendez, A. D. Garcia, M. V. Sofroniew, E. R. Kandel, and R. Hen. Paradoxical influence of hippocampal

- neurogenesis on working memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(11):4642–4646, Mar 2007.
- S. B. Schagen, M. J. Muller, W. Boogerd, and F. S. A. M. Van Dam. Cognitive dysfunction and chemotherapy: neuropsychological findings in perspective. *Clin Breast Cancer*, 3 Suppl 3:S100–S108, Dec 2002.
- S. B. Schagen, M. J. Muller, W. Boogerd, G. J. Mellenbergh, and F. S. A. M. van Dam. Change in cognitive function after chemotherapy: a prospective longitudinal study in breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst*, 98(23):1742–1745, Dec 2006. doi: 10.1093/jnci/djj470. URL <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djj470>.
- C. Schmidt-Hieber, P. Jonas, and J. Bischofberger. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature*, 429(6988):184–187, May 2004.
- G. Schoenbaum, B. Setlow, et al. Integrating orbitofrontal cortex into prefrontal theory: common processing themes across species and subdivisions. *Learn Mem*, 8(3):134–147, 2001.
- W. B. Scoville, B. Milner, et al. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 20(1):11–21, Feb 1957.
- R. M. Seaberg, D. van der Kooy, et al. Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosci*, 26(3):125–131, Mar 2003.
- T. Seki. Expression patterns of immature neuronal markers *psa-ncam*, *crmp-4* and *neurod* in the hippocampus of young adult and aged rodents. *J Neurosci Res*, 70(3):327–334, Nov 2002.
- C. J. Shi, M. D. Cassell, et al. Cortical, thalamic, and amygdaloid connections of the anterior and posterior insular cortices. *J Comp Neurol*, 399(4):440–468, Oct 1998.
- T. J. Shors, G. Miesegaes, A. Beylin, M. Zhao, T. Rydel, and E. Gould. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*, 410(6826):372–376, Mar 2001.
- T. J. Shors, D. A. Townsend, M. Zhao, Y. Kozorovitskiy, and E. Gould. Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus*, 12(5):578–584, 2002.

- A. Sirota, J. Csicsvari, D. Buhl, and G. Buzsaki. Communication between neocortex and hippocampus during sleep in rodents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(4):2065–2069, Feb 2003.
- H. M. Sisti, A. L. Glass, and T. J. Shors. Neurogenesis and the spacing effect: learning over time enhances memory and the survival of new neurons. *Learn Mem*, 14(5):368–375, 2007. doi: 10.1101/lm.488707. URL <http://dx.doi.org/10.1101/lm.488707>.
- J. S. Snyder, N. Kee, and J. M. Wojtowicz. Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. *J Neurophysiol*, 85(6):2423–2431, Jun 2001.
- J. S. Snyder, N. S. Hong, R. J. McDonald, and J. M. Wojtowicz. A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience*, 130(4):843–852, 2005.
- L. R. Squire. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev*, 99(2):195–231, Apr 1992.
- L. R. Squire. The hippocampus and spatial memory. *Trends Neurosci*, 16(2):56–57, Feb 1993.
- L. R. Squire. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem*, 82(3):171–177, Nov 2004.
- L. R. Squire, N. J. Cohen, and J. A. Zouzonis. Preserved memory in retrograde amnesia: sparing of a recently acquired skill. *Neuropsychologia*, 22(2):145–152, 1984.
- B. B. Stanfield, J. E. Trice, et al. Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp Brain Res*, 72(2):399–406, 1988.
- R. J. Steele, R. G. Morris, et al. Delay-dependent impairment of a matching-to-place task with chronic and intrahippocampal infusion of the nmda-antagonist d-ap5. *Hippocampus*, 9(2):118–136, 1999.
- L. W. Swanson, W. M. Cowan, et al. Hippocampo-hypothalamic connections: origin in subicular cortex, not ammon’s horn. *Science*, 189(4199):303–304, Jul 1975.
- P. Tanapat, N. B. Hastings, A. J. Reeves, and E. Gould. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci*, 19(14):5792–5801, Jul 1999.

- M. J. Tisdale. Antitumor imidazotetrazines—xv. role of guanine o6 alkylation in the mechanism of cytotoxicity of imidazotetrazinones. *Biochem Pharmacol*, 36(4):457–462, Feb 1987.
- E. C. Tolman. Cognitive maps in rats and men. *The Psychological Review*, 55(4):189–208, 1948.
- L. L. Tsang, P. B. Farmer, A. Gescher, and J. A. Slack. Characterisation of urinary metabolites of temozolomide in humans and mice and evaluation of their cytotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol*, 26(6):429–436, 1990.
- M. Upchurch, J. M. Wehner, et al. Differences between inbred strains of mice in morris water maze performance. *Behav Genet*, 18(1):55–68, Jan 1988.
- D. van der Kooy, S. Weiss, et al. Why stem cells? *Science*, 287(5457):1439–1441, Feb 2000.
- H. van Praag, B. R. Christie, T. J. Sejnowski, and F. H. Gage. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(23):13427–13431, Nov 1999a.
- H. van Praag, G. Kempermann, and F. H. Gage. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*, 2(3):266–270, Mar 1999b.
- H. van Praag, A. F. Schinder, B. R. Christie, N. Toni, T. D. Palmer, and F. H. Gage. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415(6875):1030–1034, Feb 2002.
- R. W. Verwer, R. J. Meijer, H. F. Van Uum, and M. P. Witter. Collateral projections from the rat hippocampal formation to the lateral and medial prefrontal cortex. *Hippocampus*, 7(4):397–402, 1997.
- C. V. Vorhees, M. T. Williams, et al. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc*, 1(2):848–858, 2006.
- S. Wang, B. W. Scott, and J. M. Wojtowicz. Heterogenous properties of dentate granule neurons in the adult rat. *J Neurobiol*, 42(2):248–257, Feb 2000.
- I. L. Weissman, D. J. Anderson, and F. Gage. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17:387–403, 2001.

- I. Q. Wishaw, G. Mittleman, et al. Visits to starts, routes, and places by rats (*rattus norvegicus*) in swimming pool navigation tasks. *J Comp Psychol*, 100 (4):422–431, Dec 1986.
- I. Q. Wishaw, D. Fiorino, G. Mittleman, and E. Castaneda. Do forebrain structures compete for behavioral expression? evidence from amphetamine-induced behavior, microdialysis, and caudate-accumbens lesions in medial frontal cortex damaged rats. *Brain Res*, 576(1):1–11, Mar 1992.
- I. Q. Wishaw, J. A. Tomie, et al. Of mice and mazes: similarities between mice and rats on dry land but not water mazes. *Physiol Behav*, 60(5):1191–1197, Nov 1996.
- J. R. Whitlock, A. J. Heynen, M. G. Shuler, and M. F. Bear. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*, 313(5790):1093–1097, Aug 2006.
- D. E. Wilman. Prodrugs in cancer chemotherapy. *Biochem Soc Trans*, 14(2):375–382, Apr 1986.
- I. A. Wilson, M. Gallagher, H. Eichenbaum, and H. Tanila. Neurocognitive aging: prior memories hinder new hippocampal encoding. *Trends Neurosci*, 29(12):662–670, Dec 2006.
- B. Winner, C. M. Cooper-Kuhn, R. Aigner, J. Winkler, and H. G. Kuhn. Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci*, 16(9):1681–1689, Nov 2002.
- L. Wiskott, M. J. Rasch, and G. Kempermann. A functional hypothesis for adult hippocampal neurogenesis: avoidance of catastrophic interference in the dentate gyrus. *Hippocampus*, 16(3):329–343, 2006.
- Kempermann G. Wolf S.A., Steiner B. Cd4-positive peripheral t-lymphocytes as neuro-immunological link in adult hippocampal neurogenesis. *submitted to PloS*, 2007.
- D. P. Wolfer, H. P. Lipp, et al. A new computer program for detailed off-line analysis of swimming navigation in the morris water maze. *J Neurosci Methods*, 41(1):65–74, Jan 1992.
- D. P. Wolfer, H. M. Mohajeri, H. P. Lipp, and M. Schachner. Increased flexibility and selectivity in spatial learning of transgenic mice ectopically expressing the neural cell adhesion molecule 11 in astrocytes. *Eur J Neurosci*, 10(2):708–717, Feb 1998.

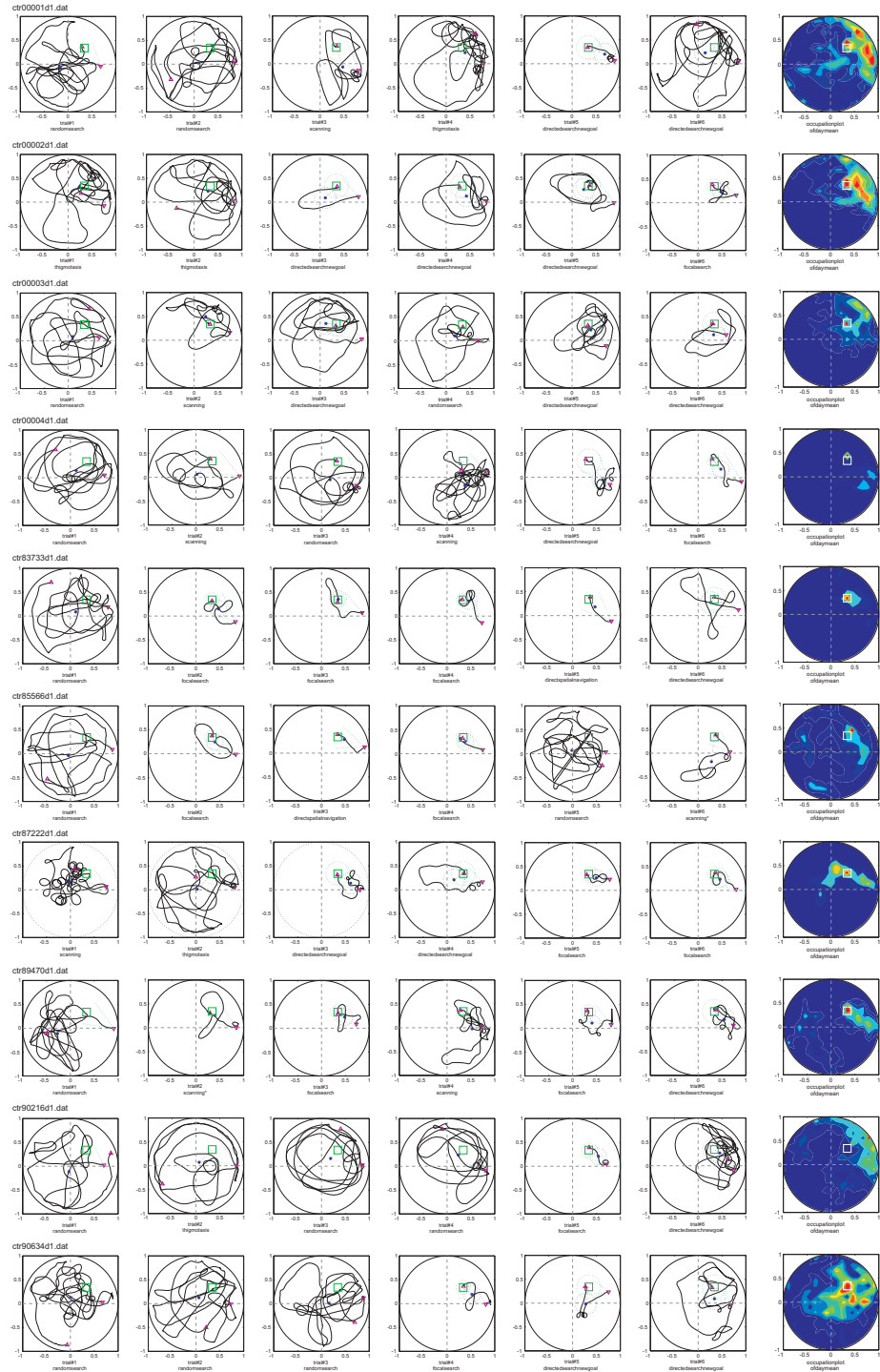
- D. P. Wolfer, H. P. Lipp, et al. Dissecting the behaviour of transgenic mice: is it the mutation, the genetic background, or the environment? *Exp Physiol*, 85(6):627–634, Nov 2000.
- D. P. Wolfer, R. Madani, P. Valenti, and H. P. Lipp. Extended analysis of path data from mutant mice using the public domain software wintrack. *Physiol Behav*, 73(5):745–53, 2001. 0031-9384 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- D.P. Wolfer, N. Plath, D. Kuhl, and H.P. Lipp. Spatial and non-spatial deficits in the watermaze distinguished by automatic identification and classification of swimming strategies. Poster SfN 2002, 2002.
- M. Yamaguchi, H. Saito, M. Suzuki, and K. Mori. Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-gfp transgenic mice. *Neuroreport*, 11(9):1991–1996, Jun 2000.
- M. Zhao, S. Momma, K. Delfani, M. Carlen, R. M. Cassidy, C. B. Johansson, H. Brismar, O. Shupliakov, J. Frisen, and A. M. Janson. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(13):7925–7930, Jun 2003.
- M. Zucchetti, C. V. Catapano, S. Filippeschi, E. Erba, and M. D'Incalci. Temozolomide induced differentiation of k562 leukemia cells is not mediated by gene hypomethylation. *Biochem Pharmacol*, 38(13):2069–2075, Jul 1989.

6 Appendix

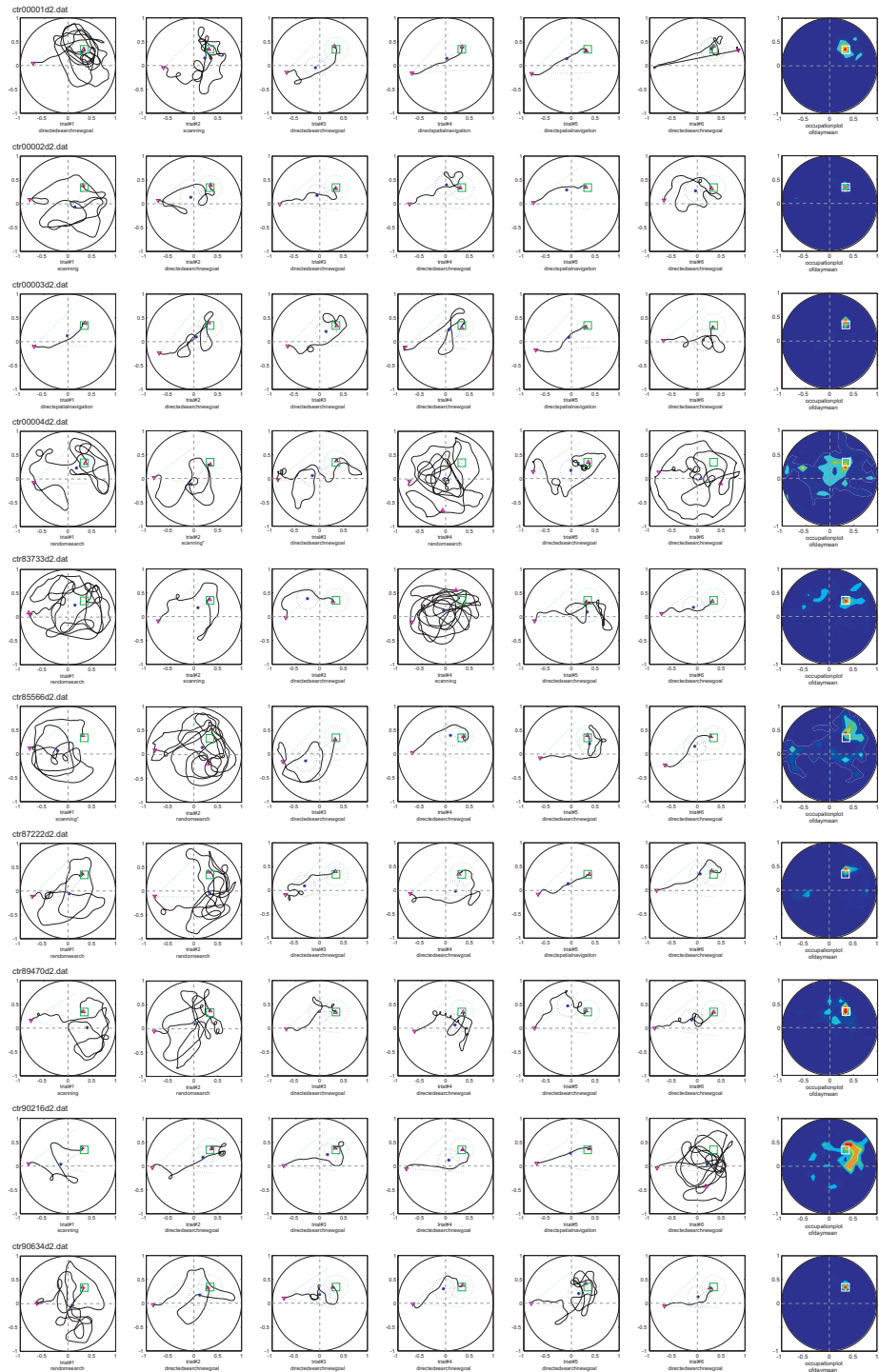
6.1 Klassifikationsergebnisse für das MWM Experiment

Im Folgenden sind die unter Benutzung des in Matlab implementierten Algorithmus erhaltenen Klassifikationsergebnisse für die einzelnen MWM Versuche dargestellt. Die jeweils letzte Spalte zeigt den Okkupationsplot des jeweiligen Tieres für alle Versuche des betreffenden Tages. Alle Daten wurden nach dem Protokoll von [Wolfer et al., 1998] erhoben.

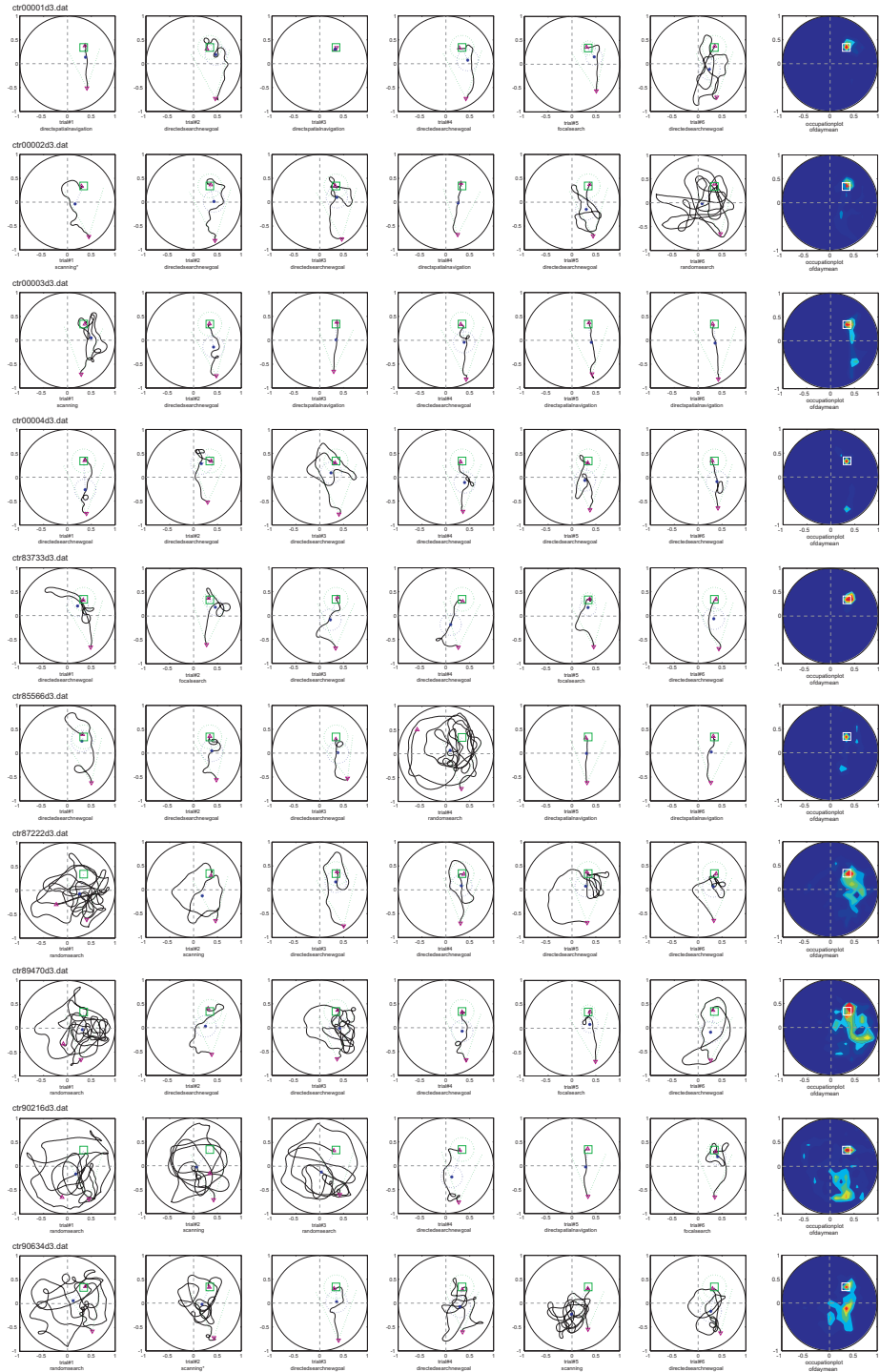
CTR Tag 1



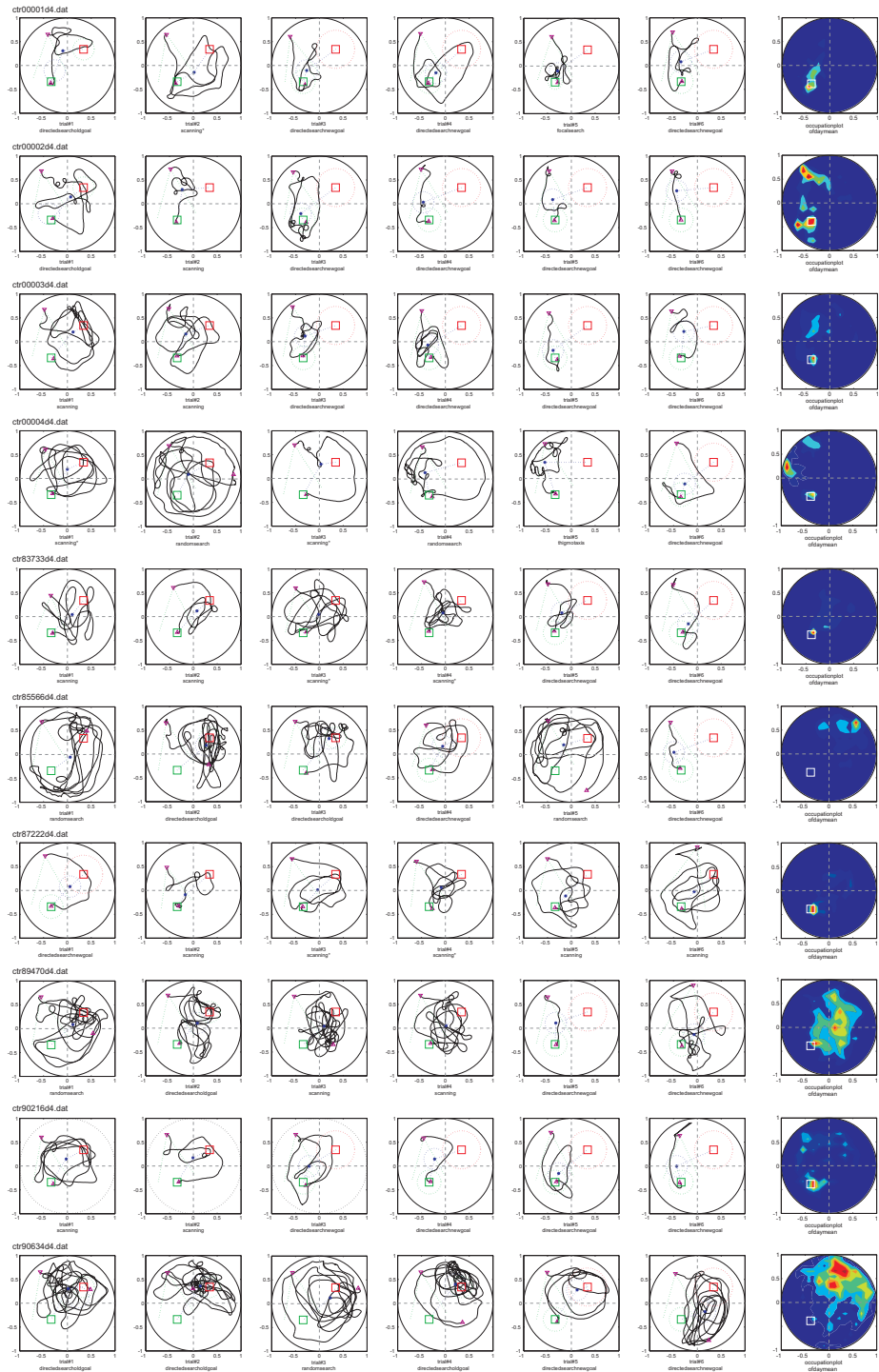
CTR Tag 2



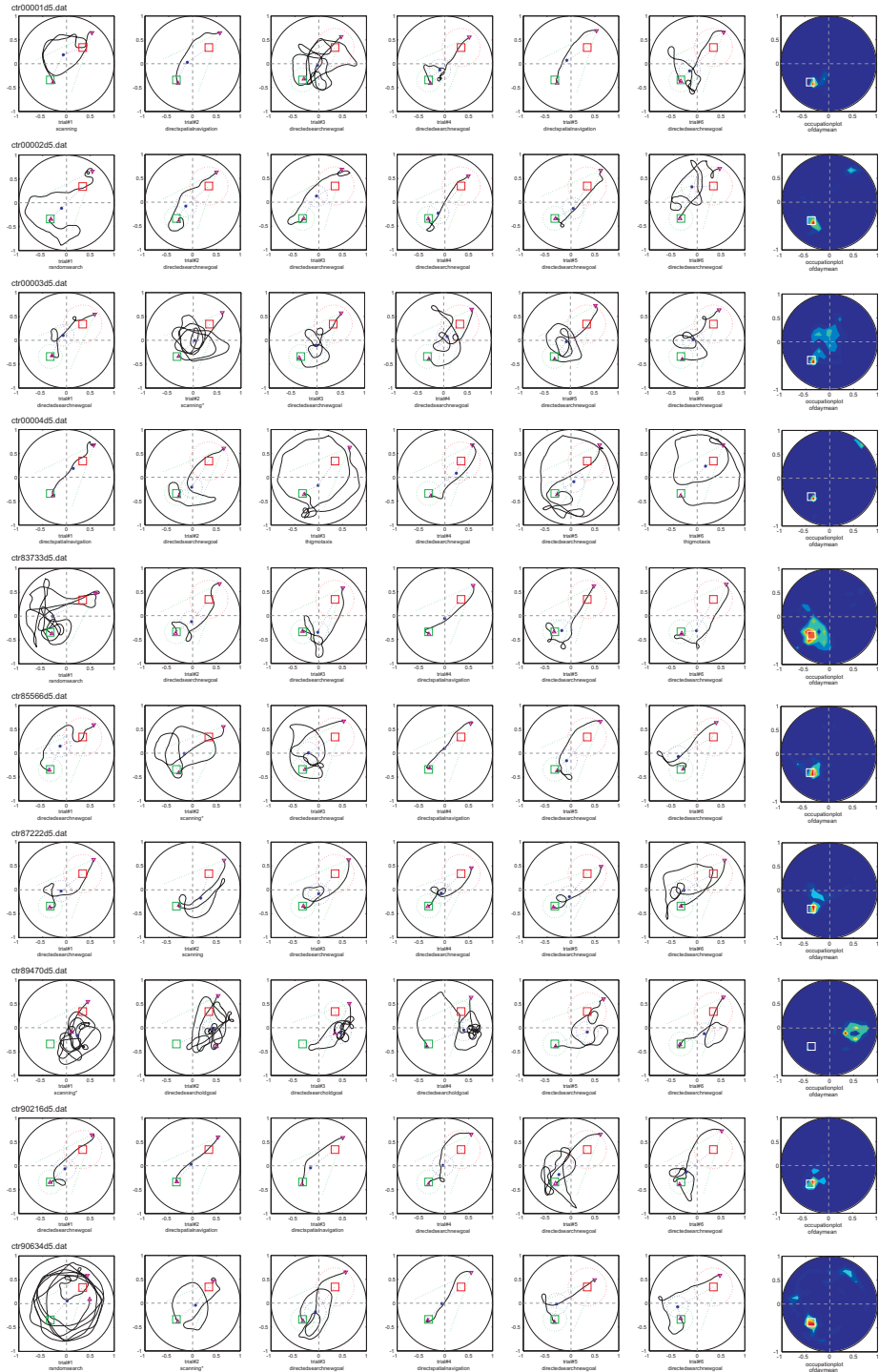
CTR Tag 3



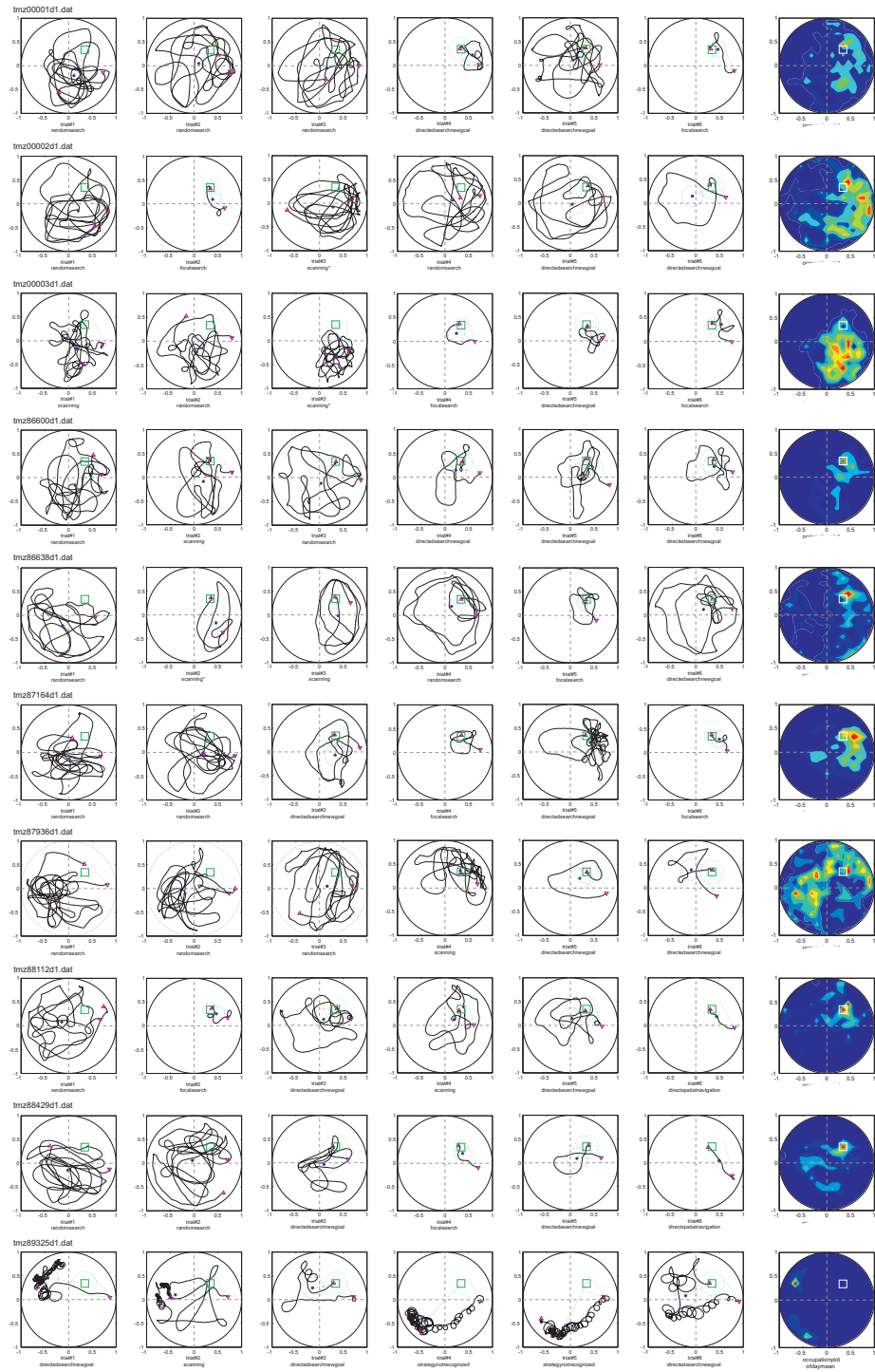
CTR Tag 4



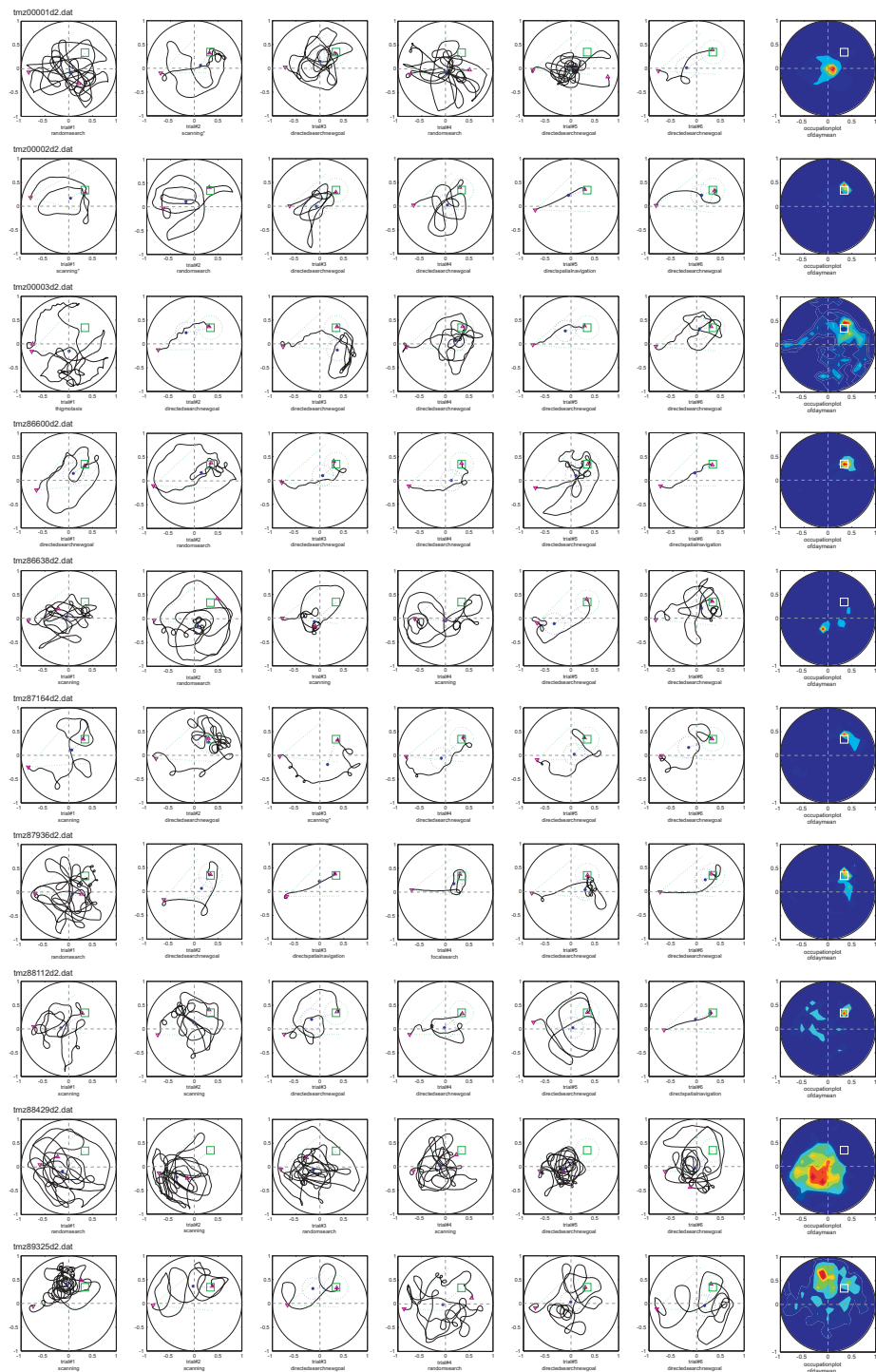
CTR Tag 5



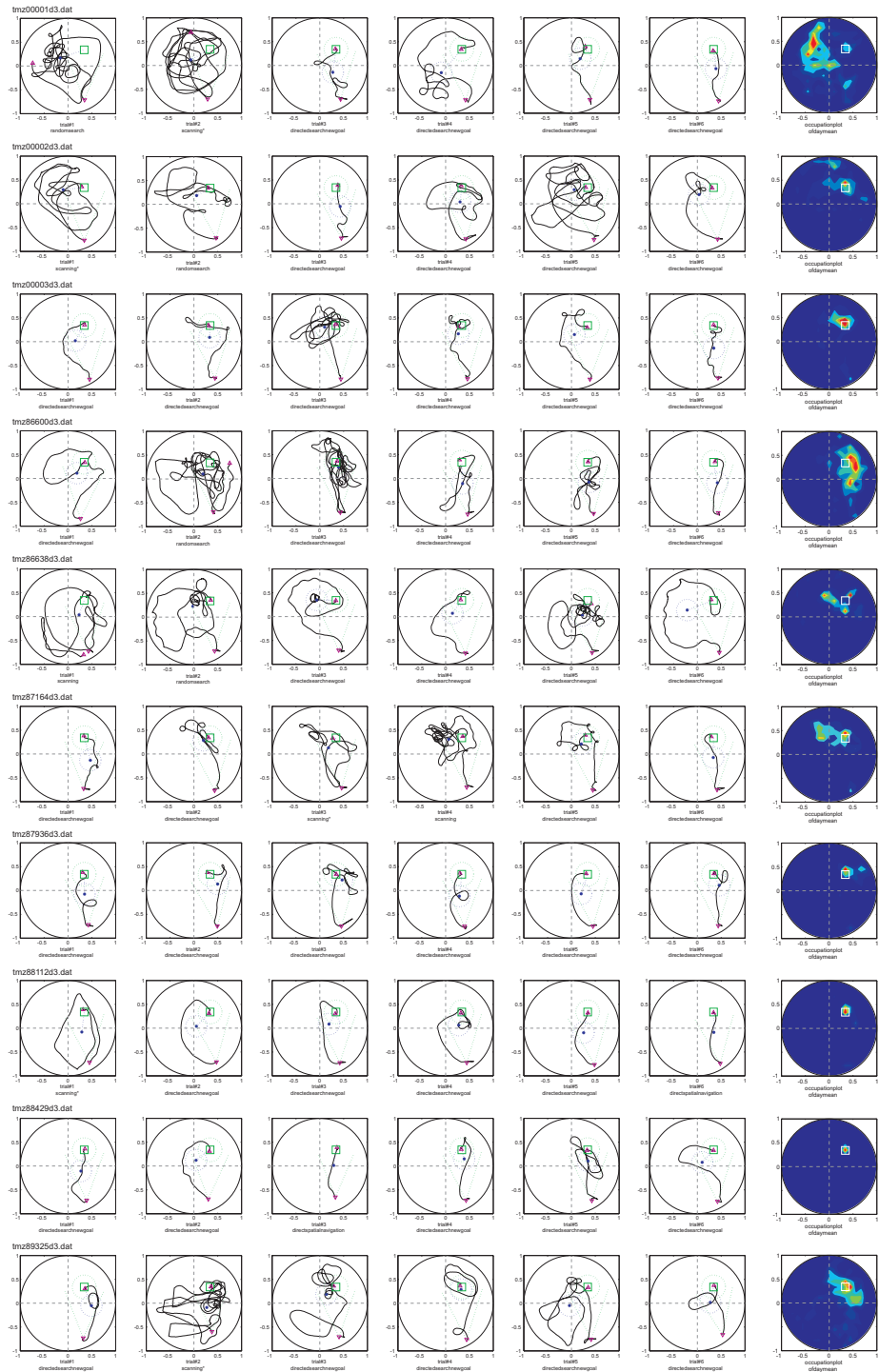
TMZ Tag 1



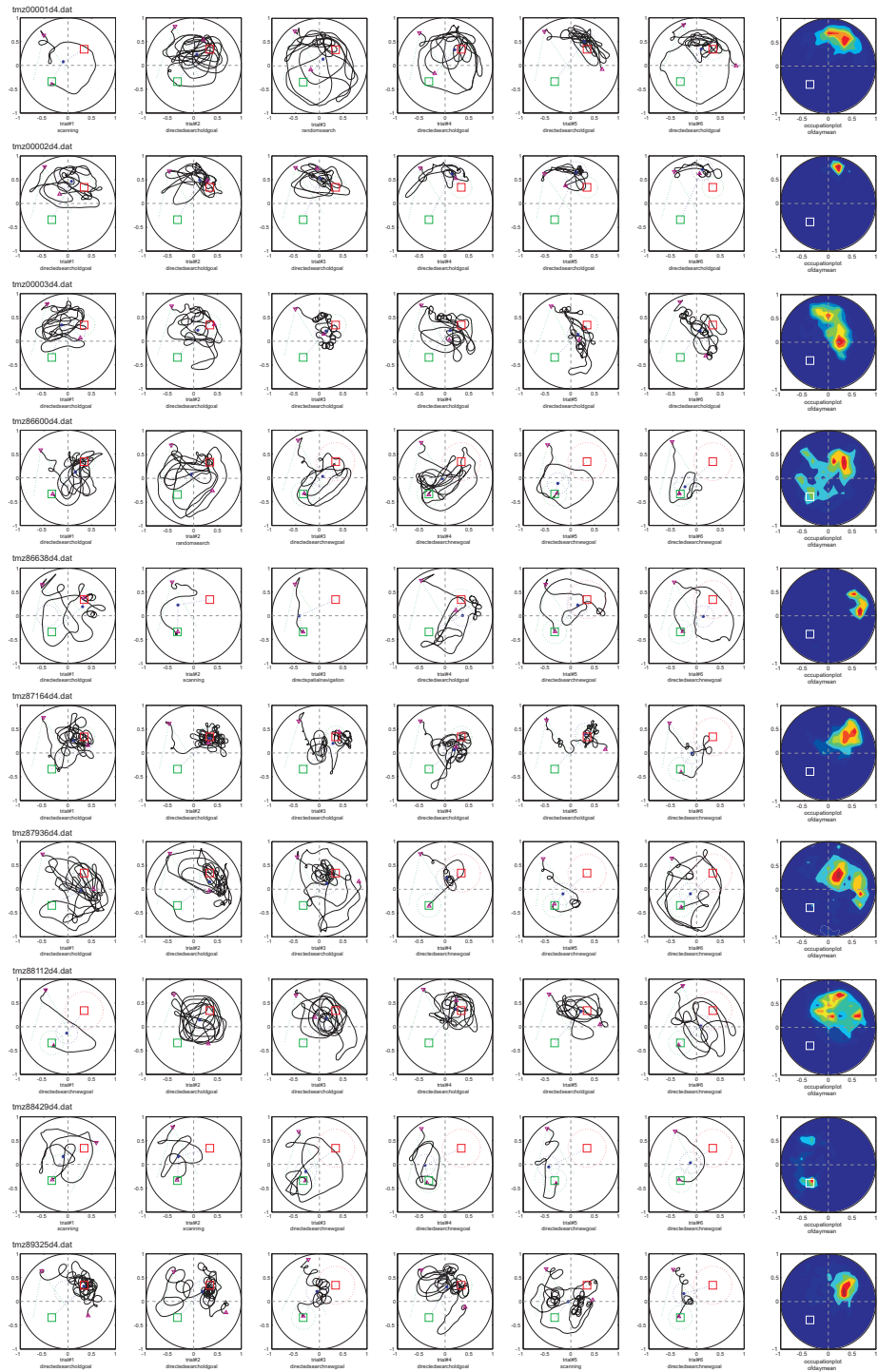
TMZ Tag 2



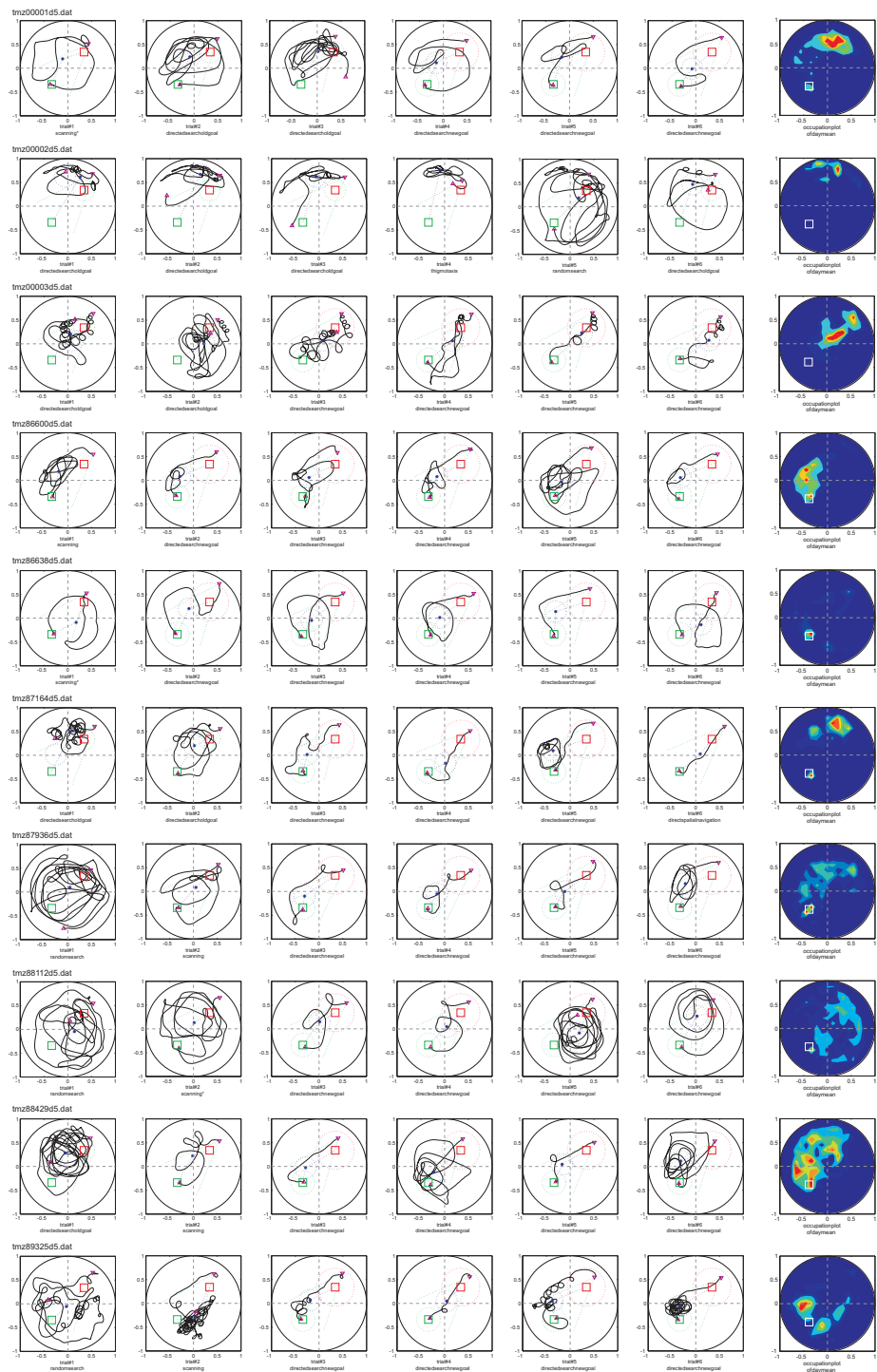
TMZ Tag 3



TMZ Tag 4



TMZ Tag 5



Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von April 2004 bis August 2007 am Max-Delbrück-Zentrum für molekulare Medizin in Berlin-Buch unter der Leitung von Prof. Dr. Gerd Kempermann angefertigt. Hiermit möchte ich Herrn Prof. Dr. Kempermann für die Überlassung des Themas sowie die Arbeitsmöglichkeit in seiner Arbeitsgruppe danken. Seine Bereitschaft große Freiräume in der Gestaltung, Umsetzung und Analyse der Experimente zu gewähren hat sich für das Gelingen der Arbeit als sehr wertvoll erwiesen.

Ganz besonders danken möchte ich auch Frau Prof. Dr. Constance Scharff für zahlreiche kritische Anmerkungen und Ihre Bereitschaft die Begutachtung der Arbeit zu übernehmen.

Mein Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Isabella Heuser und Herrn Hu-Ping Chen welche die vorliegende Arbeit im Rahmen des Graduiertenkollegs "Neuropsychiatrie und Psychologie des Alters" inhaltlich und finanziell unterstützt und ermöglicht haben.

Für kritische Fragen sowie hilfreiche Vorschläge und Anmerkungen möchte ich mich bedanken bei Prof. Dr. Jonas Frisen, Prof. Dr. Golo Kronenberg, Prof. Dr. Richard Morris, Prof. Dr. Heikki Tanila und Prof. Dr. Laurenz Wiskott.

Für die angenehme, humorvolle und äußerst impuls-vermittelnde Arbeitsatmosphäre, besonders auch im Rahmen des Graduiertenkollegs, möchte ich Sara Eckardt, Julian Hellmann, Henrik Hörster, Golo Kronenberg und Rupert Overall herzlich danken.

Mein persönlicher Dank gilt meinen Eltern für Ihre Unterstützung auf dem langen Weg zu dieser Arbeit und vor allem Flavia, die mich zu jeder Zeit mit ihrer Liebe unterstützt und mir immer wieder den Glauben an das Gelingen Arbeit zurückgegeben hat. Danke.

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe, dass sie auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Dresden, 2008

Alexander Garthe