#### 3 Resultate

## 3.1 Bei Mäusen, die in einer reizreichen Umgebung leben, nimmt die relative Größe der infrapyramidalen Moosfaserprojektion zu.

Die reizreiche Lebensumgebung ist ein physiologischer Stimulus der Neurogenese (Kempermann et al., 1997b). Die Effekte der reizreichen Lebensumgebung auf die Neurogenese beruhen vorwiegend auf einer Zunahme des Überlebens neu gebildeter Nervenzellen. In unserem Experiment lebten die Tiere der Enriched–Gruppe (ENR) fünf Wochen lang in der reizreichen Lebensumgebung, bevor sie während der sechsten Woche täglich eine BrdU-Injektion erhielten. Nach der letzten BrdU Injektion lebten sie weitere 28 Tage in der reizreichen Umgebung. Die Ergebnisse der Zellzählung zeigten einen Anstieg BrdU – positiver Zellen (Kontrollgruppe (CTL):  $1095,6 \pm 56,97$ ; ENR:  $2443 \pm 105$ , P = 0,001). Vier Wochen nach der letzten BrdU Injektion war der Unterschied in der Zahl BrdU-positiver Zellen, die einen neuronalen Phänotyp zeigten, zwischen den beiden Gruppen noch deutlicher (CTL:  $866,71 \pm 51,4$ ; ENR:  $2042,18 \pm 91,99$ ; P < 0,0001).

Auch die Moosfaserverteilung zeigte Unterschiede zwischen den Gruppen. Der relative Anteil der IMF an der gesamten Moosfaserprojektion war signifikant größer bei den Tieren, die in der reizreichen Lebensumgebung lebten (P = 0,031). Die absolute und relative Größe der anderen ausgemessenen Regionen wie dem Hilus (absolut P = 0,744; relativ P = 0,8028) und der suprapyramidalen Moosfaserprojektion (SP-MF) (absolut P = 0,4062; relativ P = 0,2007) zeigten keine Unterschiede zwischen den Gruppen (siehe Tabelle 1).

Eine Regressionsanalyse mit dem relativen Anteil der IMF als abhängiger und der Zahl der neuen Nervenzellen als unabhängiger Variabel zeigten eine deutliche Korrelation ( $R^2 = 0.469$ ; P = 0.02). Die anderen Moosfaserfelder korrelierten bei der Regressionsanalyse nicht signifikant mit der Zahl der neu gebildeten Nervenzellen (Hilus:  $R^2 = 0.057$ , P = 0.4785; SP-MF:  $R^2 = 0.307$ , P = 0.0771).

Diese Ergebnisse unterstützen unsere Hypothese, dass die Größe der IMF selektiv und dynamisch durch einen neurogenen Stimulus reguliert wird.

Tabelle 1:

Α

MF Volume	P-Wert	
Enriched Standard		
environment	Laborbedingungen	
1,0265 ± 0,1	$0,9856 \pm 0,054$	0,744
1,4147 ± 0,067	1,3301 ± 0,069	0,4062
0,5272 ± 0,0419	$0,4372 \pm 0,0203$	0,1038
Anteil des Unter	feldes am gesamten	P-Wert
	feldes am gesamten sfaserfeld	P-Wert
	•	P-Wert
Moos	sfaserfeld	P-Wert
Moos Enriched	sfaserfeld Standard	P-Wert 0,8028
Moos Enriched environment	Standard Laborbedingungen	
	Enriched environment 1,0265 ± 0,1 1,4147 ± 0,067	environment Laborbedingungen 1,0265 ± 0,1 0,9856 ± 0,054 1,4147 ± 0,067 1,3301 ± 0,069

Tabelle 1: A zeigt die absolute Größe der einzelnen Moosfaserunterfelder. B zeigt den Anteils einzelner Moosfaserunterfelder an der Größe des gesamtern Moosfasertraktes (HIL + SP-MF + IMF). Dabei zeigt sich ein relativ größerer IMF (P = 0,031) bei Tieren der ENR-Gruppe. Leben in einer reizreichen Umgebung führt nicht nur zur Zunahmen adulter Neurogenese, sondern auch zu einer Zunahme der Größe der IMF.

## 3.2 Die Stimulation der Neurogenese durch Kainat-induzierte Krampfanfälle führt zu einem absoluten und relativen Größenzuwachs der infrapyramidalen Moosfaserprojektion.

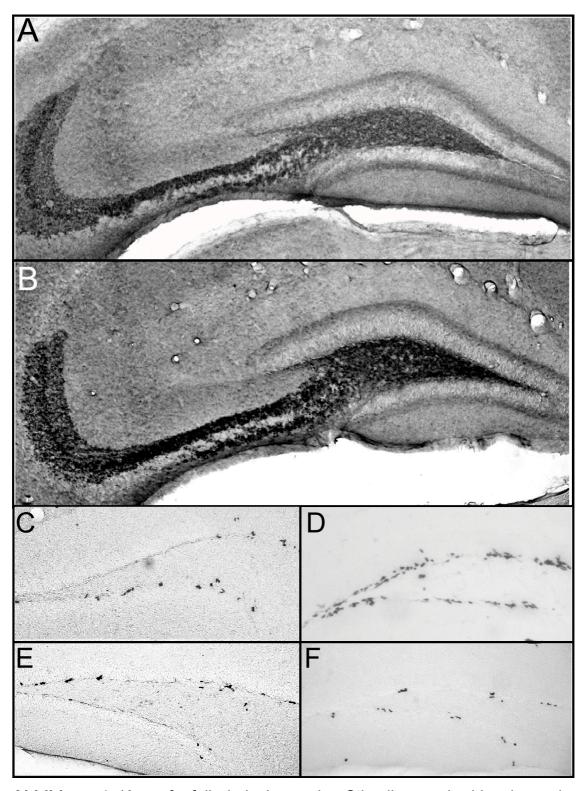
Epileptische Aktivität des Hippokampus führt zu einem deutlichen Zuwachs der Zahl neugeborener Zellen im Gyrus dentatus (Bengzon, Kokaia et al. 1997; Parent, Yu et al. 1997; Gray and Sundstrom 1998; Scott, Wang et al. 1998). In Anbetracht einer möglichen Korrelation zwischen einer durch Krampfanfälle induzierten Neurogenese und der Größe der Moosfaserfelder, erhielten die Tiere eine einmalige BrdU-Injektion, einen Tag bevor sie getötet wurden. Die Ergebnisse früherer Studien bestätigend (Gray and Sundstrom 1998; Nakagawa, Aimi et al. 2000) fanden wir 7 Tage nach Kainatinjektion eine sehr deutliche Steigerung der Proliferation (P < 0,001). Tiere der Kontrollgruppe hatten 764  $\pm$  30, Tiere der Anfallsgruppe hatten 4623  $\pm$  659 BrdU-positive Zellen pro Körnerzellschicht. Dieser initiale Anstieg der Zellproliferation spiegelte sich noch nicht in einem Anstieg der Zahl früher postmitotischer Calretinin-exprimierender Zellen wieder (P = 0,052). Die Zahl der Calretinin-positiven Zellen der Tiere der Anfallsgruppe war 2772  $\pm$  414 und die der Kontrollgruppe war 688  $\pm$  279.

Zum zweiten Zeitpunkt (T2), 15 Tage nach KA Injektion, war die proliferative Aktivität wieder zum Normalniveau zurückgekehrt. Die Zahl der BrdU-positiven Zellen zeigte keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Kontrolltiere hatten 974  $\pm$  106 BrdU - positive Zellen, Tiere der Anfallsgruppe hatten 1194  $\pm$  230 positiv Zellen (P = 0,4006) pro Körnerzellschicht. Doch die Zahl Calretinin-exprimierenden Zellen war zu diesem Zeitpunkt deutlich erhöht. Kontrolltiere hatten 3049  $\pm$  338, Tiere der Anfallsgruppe hatten 6020  $\pm$  272 CR-positive Zellen pro Körnerzellschicht (P < 0,0001).

Zum dritten Zeitpunkt (T3), 28 Tage nach KA Injektion, zeigten sich weder bei der Zahl BrdU-positiver noch bei der Zahl Calretinin-positiver Zellen statistisch signifikante Unterschiede. Kontrolltiere hatten 977  $\pm$  137, Tiere der Anfallsgruppe hatten 1369  $\pm$  145 BrdU-positive Zellen pro Körnerzellschicht (P = 0,1009).

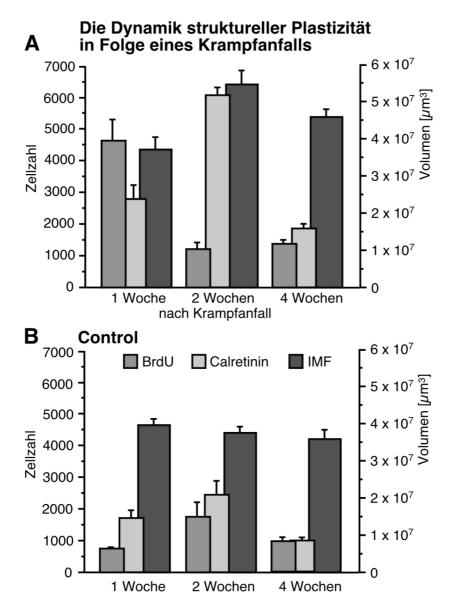
Um zu überprüfen, ob sich die Dynamik der durch einen Krampfanfall induzierten Neurogenese und dem dadurch bedingten Auswachsen der Axone neu gebildeter Nervenzellen in einer Veränderung der Größe der IMF widerspiegelt, analysierten wir die Moosfaserverteilung an den drei verschiedenen Zeitpunkten nach der KA bzw. NaCl Injektion. Wie erwartet, fanden wir zum ersten Zeitpunkt (T1) keine Unterschiede in der Größe des Hilus, der suprapyramidalen oder der infrapyramidalen Moosfaserprojektion. Zu diesem Zeitpunkt hatte die Stimulation der Neurogenese noch nicht zu einer ausreichenden Entwicklung axonaler Fortsätze geführt, um sich entlang des Moosfasertraktes auszubreiten. Im Gegensatz dazu fanden wir zu T2, dass der zu T1 beobachtete Anstieg der Zellproliferation und der daraufhin erfolgte Anstieg der Zahl unreifer CR-exprimierender Neurone zu einer Vergrößerung der IMF führte. Die Größe des Hilus oder der suprapyramidalen Moosfaserprojektion zeigte hingegen keine Unterschiede. Auch 28 Tage nach dem Krampfanfall war die IMF im Vergleich zu Kontrolltieren größer (P = 0,062). Dies weist darauf hin, dass die axonalen Fortsätze für einen Zeitraum von zwei Wochen bestehen bleiben (siehe Tabelle 2 und Abbildungen 4 und 5).

Eine Regressionsanalyse mit der Größe der IMF als abhängige Variabel und der Zahl der Calretinin-positiven Zellen zu T2 als unabhängiger Variabel ergab eine signifikante positive Korrelation ( $R^2$  = 0,342; P = 0,018). Die anderen Felder korrelierten hingegen nicht signifikant mit der Zahl Calretinin-exprimierender Zellen (SP-MF ( $R^2$  = 0,025; P = 0,5275); Hilus ( $R^2$  = 0,11; P = 0,1779)). Eine ähnlich deutliche Korrelation fanden wir bei einer Regressionsanalyse zwischen der Größe der IMF 28 Tage und der Zahl BrdU positiver Zellen 7 Tage nach KA bzw. NaCl Injektion ( $R^2$  = 0,506; P = 0,0141).



**Abbildung 4:** Krampfanfälle induzieren eine Stimulierung der hippokampalen Neurogenese und führen zu Veränderungen der Größe des infrapyramidalen Moosfaseranteils. (A) zeigt den Moosfasertrakt von Kontrolltieren, (B) 14 Tage nach einem Krampfanfall. Die Zahl BrdU positiver Zellen nimmt in der ersten

Woche nach einem Krampfanfall deutlichen zu (D), nähert sich aber innerhalb von 28 Tagen der Proliferationsrate von Kontrolltieren (C) wieder an. Die Größe der IMF zeigt in der zweiten Woche nach dem Krampfanfall eine deutliche Größenzunahme, die auch 4 Wochen nach dem Krampfanfall fortbesteht.



**Abbildung 5:** Epileptische Aktivität induziert die adulte Neurogenese und verändert die Größe der infrapyramidalen Moosfaserprojektion (IMF). Während der ersten Woche nach dem Krampfanfall kommt es zu einer Zunahme der Zahl BrdU-positiver Zellen (A). Die Proliferationsrate kehrt im Verlauf von 28 Tagen zum Niveau der Kontrollgruppe (B) zurück. Die neugeborenen Zellen reiften zu Calretinin-positiven Zellen heran und führten zu einer deutlichen Zunahme der

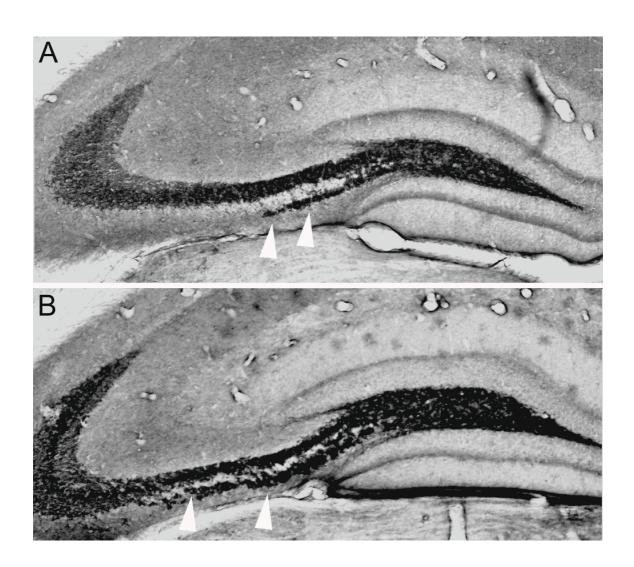
Zahl dieser Zellen und der Größe der IMF. Das Volumen der IMF war im Vergleich zur Kontrollgruppe (B) auch 28 Tage nach dem Krampfanfall vergrößert. Dies weist darauf hin, dass die neuen Axone zumindest über Wochen bestehen bleiben.

### 3.3 Die beiden Progenitorstämme des RI-Sets BXD, C57BL/6 und DBA, zeigen deutliche Unterschiede hinsichtlich der Moosfaserverteilung, der Neurogenese und des räumlichem Gedächtnisses.

Die beiden Progenitorstämme des BXD-Sets zeigen auffällige Unterschiede der Moosfaserverteilung. Während C57BL/6 Mäuse eine größere IMF und einen größeren Hilus als DBA Mäuse haben, besitzen DBA Mäuse eine größere SP-MF (siehe Abbildung 6 und 7)

Die von Kempermann 2002 durchgeführte Studie zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Mausstämmen C57BL/6 und DBA hinsichtlich der adulten Neurogenese. C57BL/6 hatte eine mehr als doppelt so hohe Proliferationsrate in der subgranulären Zone als DBA Mäuse (P = 0,0023). Vier Wochen nach der letzten BrdU Injektion war die Zahl der BrdU-markierten Zellen, die einen neuronalen Phänotyp angenommen haben, in C57BL/6 Mäusen fast viermal so hoch (P = 0,0003).

In dieser Arbeit fanden sich deutliche Unterschiede beim Abschneiden im "Morris Wasserlabyrinthtest". C57BL/6 wählte einen direkteren und dadurch kürzeren Weg zur Plattform (P = 0,0094) als DBA. Die Zeit, die bis zum Erreichen der Plattform verstrichen war, zeigte keine signifikanten Unterschiede, was durch die unterschiedliche Schwimmgeschwindigkeit der Tiere beider Stämme erklärt wird. Am fünften Tag der Testreihe wurde die "Probe" durchgeführt: Dabei wird die Plattform entfernt und die Zeit gemessen, die das Tier an der Position verbringt, an der sich vorher die Plattform befunden hat. C57BL/6 Mäuse haben dabei nicht nur mehr Zeit (P = 0,0123), sondern auch einen größeren Anteil ihrer Schwimmstrecke (P = 0,0238) im Zielquadranten verbracht (Kempermann and Gage 2002).



**Abbildung 6:** Neben Unterschieden der Neurogeneserate bestehen zwischen den beiden Mäusestämmen C57BL/6 (B) und DBA (A) auch Unterschiede hinsichtlich der Morphologie der Moosfaserfelder. C57BL/6 haben im Vergleich zu DBA Mäusen eine größere IMF (Pfeile in A and B) und einen größeren Hilus.

Somit zeigen die beiden Progenitorstämme zusätzlich zu den bekannten Unterschieden bezüglich ihrer Neurogeneserate und ihrem Verhalten in einem hippokampusabhängigen Test (Kempermann and Gage 2002) auch Unterschiede hinsichtlich der Moosfaserverteilung (siehe Abb. 6 und Tab. 2). Diese Parametern wurden auch bei den 11 BXD Stämmen bestimmt und deren Beziehung zueinander durch die Anwendung von Korrelationsanalysen untersucht.

## 3.4 Zusammenhänge zwischen dem Abschneiden im "Morris Wasserlabyrinthtest" und der Neurogeneserate

Eine signifikante Korrelation bestand, in der von Kempermann veröffentlichten Arbeit, zwischen dem Abschneiden im "Morris Wasserlabyrinthtest" und der Zahl neugeborener Neurone. Diese Unterschiede waren besonders deutlich zwischen der Lernkurve, das heißt der Verbesserung der Leistung zwischen erstem und viertem Trainingstag hinsichtlich der Latenzzeit und der Strecke bis zum Erreichen der Plattform. Der Determinationskoeffizient (R²) für die Latenzzeit war 0,093 und für die Länge des Schwimmweges 0,0141 (P = 0,0492)(Kempermann and Gage 2002).

### 3.5 Die Größe der infrapyramidalen Moosfaserprojektion korreliert mit der Latenzzeit und der Strecke zum Erreichen der Plattform.

Tiere mit größerer IMF schwammen auf direkterem Wege zu der Plattform. So bestand eine negative Korrelation zwischen der Größe der IMF und der durchschnittlichen Strecke zum Erreichen der Plattform ( $R^2 = 0.09$ ; P = 0.0477). Daher war auch die Latenzzeit bis zum Erreichen der Plattform bei Tieren mit größerer IMF kürzer ( $R^2 = 0.14$ ; P = 0.0126).

Interessanterweise konnten auch Zusammenhänge zwischen dem Verhalten im Morris Wasserlabyrinthtest und der Größe des Hilus gefunden werden. So zeigte sich, dass die Größe des Hilus mit der Schwimmgeschwindigkeit korrelierte. Tiere mit größerem Hilus schwammen schneller ( $R^2 = 0.17$ ; P = 0.0048). Auch wenn die Größe des Hilus nicht signifikant mit der Strecke korrelierte, beeinflusste die höhere Schwimmgeschwindigkeit die Latenzzeit ( $R^2 = 0.11$ ; P = 0.0266). So erreichten Tiere mit größerem Hilus die Plattform früher.

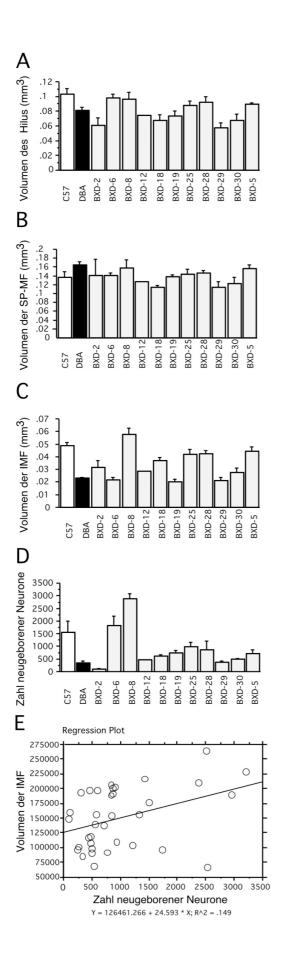


Abbildung 7: Mäuse rekombinant ingezüchteter Stämme des Sets BXD und deren Progenitorstämme C57BL/6 und DBA zeigen beachtliche Unterschiede in Hinblick auf deren Größe des Hilus (A), der SP-MF (B) und der IMF (C). Eine Regressionsanalyse (E) mit der Zahl neugeborener Nervenzellen (D) als unabängige Variabel und der Größe der IMF (C) als abhängige Variabel zeigten einen Determinationskoeffizienten (R<sup>2</sup>) von 0.15 (P = 0.0219). Dies bedeutet, dass 15 % der genetisch determinierten Varianz in der Größe IMF der durch die Zahl neugeborener Neurone erklärt werden kann.

# 3.6 In verschiedenen Mäusestämmen korrelieren Parameter der hippokampalen Neurogenese mit der Größe der infrapyramidalen Moosfaserprojektion.

Die beiden Progenitorstämme unterschieden sich außer in der Proliferation von Vorläuferzellen, dem Überleben neugeborener Zellen und dem Abschneiden in einem Hippokampus-abhängigen Lerntest auch in der Morphologie des Moosfasertraktes. Untersuchungen der Größe des Moosfasertraktes ergaben, dass die IMF der C57BL/6 Mäuse doppelt so groß war wie die der DBA Mäuse. Auch hatten C57BL/6 Mäuse einen größeren Hilus, wohingegen DBA Mäuse eine größere SP-MF hatten (siehe Tabelle 2). Da die beiden Progenitorstämme signifikante Unterschiede zwischen Parametern der hippokampalen Neurogenese, dem Lernverhalten und der Morphologie der Moosfaserprojektion zeigten, untersuchten wir die 11 Tochterstämme des BXD Sets und die Zusammenhänge zwischen diesen Faktoren (siehe Abb. 7).

Die Durchführung einer Korrelationsanalyse mit jeweils einem Moosfaserfeld als abhängiger Variabel und den Parametern der adulten Neurogenese als unabhängiger Variabel ergaben eine signifikante Korrelation zwischen der Größe der IMF und der Zahl der BrdU markierten Zellen, die 4 Wochen nach der letzten BrdU Injektion einen neuronalen Phänotyp zeigten (R<sup>2</sup> = 0,15 ; P = 0,0219; siehe Abb. 7). Auch die Größe des Hilus korrelierte signifikant mit der Zahl neu gebildeter Nervenzellen (R<sup>2</sup> =0,39 ; P = 0,0001), der Zahl Calretininpositiver Zellen ( $R^2$  = 0,25 , P = 0,0021) und der Zahl BrdU-positiver Zellen ( $R^2$ = 0,35 ; P = 0,0002). Die Größe der SP-MF wies jedoch keinerlei Zusammenhänge mit der Zahl neu gebildeter Zellen auf. Um auszuschließen, dass die bereits bestehenden Moosfasern die Moosfaserverteilung bestimmen, wurde die Größe der Moosfaserunterfelder mit der Gesamtzahl der Körnerzellen korreliert. Korrelationsanalysen der Gesamtkörnerzellzahl als abhängiger Variabel und einem Moosfaserunterfeld als unabhängiger Variabel ergaben keine signifikanten Zusammenhänge, Hilus:  $R^2 = 0.10$ , P = 0.0632; SP-MF:  $R^2 = 0.003$ , P = 0.752; IMF:  $R^2 = 0.02$ , P = 0.3917.. Bei den Korrelationsanalysen fiel auf, dass ein Tochterstamm – BXD-6 – nicht die oben

beobachten Zusammenhänge zwischen der Neurogeneserate und der Größe der IMF aufwies. Obwohl diese Tiere eine hohe Neurogeneserate hatten, war die IMF verhältnismäßig klein. Schloss man diesen Stamm aus den Regressionsanalysen aus, so stieg die Korrelationsrate sowohl zwischen dem IMF und BrdU-positiven Neuronen ( $R^2 = 0.37$ ; P = 0.0002), als auch zwischen IMF und der absoluten Zahl BrdU-positiver Zellen ( $R^2 = 0.33$ ; P = 0.0006) und IMF und Calretinin-positiven Zellen ( $R^2 = 0.19$ ; P = 0.0118).

Tabelle 2:

G	Gruppe	Volumen des Moosfaserfeldes (mm3x10 <sup>-2</sup> )				
		Hilus	SP-MF	IMF	Gesamte MF- Projektion	
A: Proged	nitorstämme -Sets					
C57BL/6		1,032 ± 0,07	1,36 ± 0,013	0,49 ± 0,02	2,884 ± 0,168	
DBA		0,813 ± 0,03*	1,641 ± 0,07	0,229 ± 0,08**	2,685 ± 0,058	
B: Reizreiche Umgebung						
ENR		1,026 ± 0,1	1,414 ± 0,067	0,527 ± 0,0419	2,884 ± 0,178	
CTL		$0,985 \pm 0,054$	1,330 ± 0,069	$0,437 \pm 0,0203$	2,837 ± 0,120	
C: Zeitpunkt nach Krampfanfall						
7 Tage	CTL	1,092 ± 0,05	1,232 ± 0,14	0,397 ± 0,02	2,721 ± 0,165	
_	Krampfanfall	1,116 ± 0,15	1,142 ± 0,10	$0,372 \pm 0,03$	2,630 ± 0,199	
15 Tage	CTL	$0,99 \pm 0,08$	1,491 ± 0,15	$0,374 \pm 0,02$	2,856 ± 0,132	
	Krampfanfall	1,226 ± 0,10	$1,723 \pm 0,06$	0,544 ± 0,03**	3,493 ± 0,172*	
28 Tage	CTL	$0,958 \pm 0,08$	1,331 ± 0,12	$0,358 \pm 0,02$	2,647 ± 0,173	
	Krampfanfall	$0,922 \pm 0,05$	1,621 ± 0,13	$0,460 \pm 0,02*$	3,004 ± 0,153	
(*) = P < 0,05 (**) = P < 0,001						

Tabelle 2 zeigt die absolute Größe des gesamten Moosfasertraktes und der einzelnen Unterfelder (Hilus, suprapyramidaler Moosfasertrakt und infrapyramidaler Moosfasertrakt). A zeigt die Größe gemessen bei den

Progenitorstämmen des BXD Sets, C57BL/6 und DBA, B bei Mäusen die in reizreicher Umgebung lebten und C an verschiedenen Zeitpunkten nach einem Krampfanfall.