

Aus der Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin
und dem Max-Delbrück-Centrum für
Molekulare Medizin, Berlin-Buch

DISSERTATION

**Adulte Neurogenese im murinen
Hippocampus:
Phasenspezifische Calretininexpression in
unreifen Neuronen**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Moritz Daniel Brandt

aus Essen

Gutachter: 1.: Priv.-Doz. Dr. med. G. Kempermann

2.: Prof. Dr. E. Fuchs

3.: Prof. Dr. rer. nat. H. G. Kuhn

Datum der Promotion: 22.09.2006

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	7
1.1 DIE ENTDECKUNG DER ADULTEN NEUROGENESE	7
<i>Chronologie einer wissenschaftlichen Entwicklung</i>	7
1.2 HEUTIGER WISSENSSTAND ÜBER DIE ADULTE NEUROGENESE	9
1.2.1 Neuronale Stammzellen	9
Identifizierung verschiedener proliferierender Subtypen neuronaler Vorläuferzellen:	11
1.2.2 Mögliche Funktion der neu gebildeten Neurone	13
1.2.3 Regulationsmechanismen der adulten Neurogenese	15
1.2.3.1. Beeinflussung der Neurogenese durch eine reizreiche Umgebung	16
1.2.3.2 Beeinflussung der Neurogenese durch körperliche Aktivität	18
1.2.3.3 Beeinflussung der Neurogenese durch Kainat-induzierte Anfälle.....	19
1.3 PROBLEMSTELLUNG UND VERSUCHSAUFBAU	21
2 MATERIAL UND METHODEN	23
2.1 VERSUCHSTIERE	23
2.2 VERSUCHSAUFBAU UND –BEDINGUNGEN	23
2.2.1 Allgemeine Tierhaltungsbedingungen	23
2.2.2 Experimentelles Design	23
2.2.3 Bedingungen einer reizreichen Lebensumgebung	25
2.2.4 Standardlaborbedingungen	26
2.2.5 Bedingungen körperlicher Aktivität (Runner)	26
2.2.6 Auslösung von Krampfanfällen durch Kainsäureinjektion	27
2.2.7 BrdU	27
2.2.7.1 Allgemeines	27
2.2.7.2 Applikation.....	27
2.3 GEWEBEPRÄPARATION	28
2.3.1 Narkose	28
2.3.2 Perfusion	28
2.3.3 Entnahme des Gehirns	28
2.3.4 Nachfixierung	28
2.3.5 Anfertigung und Lagerung von Schnittserien der Gehirne	29
2.4 IMMUNHISTOCHEMIE	29
2.4.1 Vorbehandlung	29
2.4.2 Immunhistochemie	29
2.4.3 Antikörper	31
2.4.3.1 Primärantikörper	31
2.4.3.2 Sekundärantikörper	33
2.5 QUANTITATIVE UND QUALITATIVE ANALYSE DER IMMUNMARKIERTEN ZELLEN	33
2.5.1 Quantifizierung BrdU- bzw. Calretinin-positiver Zellen	33

2.5.2 <i>Quantitative und qualitative Phänotypisierung BrdU-positiver Zellen</i>	34
2.6 STATISTISCHE ANALYSEN	35
3 ERGEBNISSE	36
3.1 EXPRESSION CALCIUMBINDENDER PROTEINE IN NEU GEBILDETEN NERVENZELLEN	36
3.1.1 <i>Hintergrund und Fragestellung</i>	36
3.1.2 <i>Ergebnisse</i>	36
3.1.3 <i>Interpretation</i>	37
3.2 WELCHE ZELLEN IM GYRUS DENTATUS EXPRIEREN CR?	38
3.2.1 <i>Hintergrund und Fragestellung</i>	38
3.2.2 <i>Ergebnisse</i>	39
3.2.3 <i>Interpretation</i>	40
3.3 ZEITABHÄNGIGE PROTEINEXPRESSION IN NEU ENTSTANDENEN NERVENZELLEN	40
3.3.1 <i>Hintergrund und Fragestellung</i>	40
3.3.2 <i>Ergebnisse</i>	41
3.3.3 <i>Interpretation</i>	43
3.4 NACHWEIS KÖRNERZELL-SPEZIFISCHER MARKER IN DEN NEU ENTSTANDENEN CR-ZELLEN	44
3.4.1 <i>Hintergrund und Fragestellung</i>	44
3.4.2 <i>Ergebnisse</i>	44
3.4.3 <i>Interpretation</i>	45
3.5 CR-EXPRESSION CHARAKTERISIERT EIN POSTMITOTISCHES ENTWICKLUNGSSTADIUM UNREIFER KÖRNERZELLEN	46
3.5.1 <i>Hintergrund und Fragestellung</i>	46
3.5.2 <i>Ergebnisse</i>	46
3.5.3 <i>Interpretation</i>	47
3.6 FINDET WÄHREND DER NEURONALEN REIFUNG EIN SICHTBARER WECHSEL DES CBP STATT?	48
3.6.1 <i>Hintergrund und Fragestellung</i>	48
3.6.2 <i>Ergebnisse</i>	48
3.6.3 <i>Interpretation</i>	49
3.7 KÖRNERZELLREIFUNG IM ADULTEN GYRUS DENTATUS SPIEGELT DIE SITUATION DER POSTNATALEN ENTWICKLUNG WIDER	50
3.7.1 <i>Hintergrund und Fragestellung</i>	50
3.7.2 <i>Ergebnisse</i>	50
3.7.3 <i>Interpretation</i>	51
3.8 DIE REIFUNG NEUER KÖRNERZELLEN WIRD DURCH PHYSIOLOGISCHE UND PATHOLOGISCHE FAKTOREN BEEINFLUSST	52
3.8.1 <i>Hintergrund und Fragestellung</i>	52
3.8.2 <i>Ergebnisse: Vier Wochen nach BrdU</i>	52
3.8.2.1 <i>Quantitative Analysen nach physischer Aktivität</i>	52
3.8.2.2 <i>Quantitative Analysen nach Stimulierung durch eine reizreiche Lebensumgebung</i>	54
3.8.2.3 <i>Quantitative Analysen nach Kainat-induzierten Anfällen</i>	55
3.8.3 <i>Ergebnisse: Einen Tag nach einwöchiger BrdU-Gabe</i>	57

3.8.4 Interpretation	58
4 DISKUSSION	60
4.1 CALRETININ WIRD IM GYRUS DENTATUS NICHT NUR VON INTERNEURONEN EXPIMIERT	60
4.2 TRANSIENTE CR-EXPRESSION WÄHREND DER KÖRNERZELLREIFUNG	62
4.3 CR-EXPRESSION NACH NEUROGENESE BEEINFLUSSENDEN STIMULI	64
4.4 MÖGLICHE FUNKTION DER TRANSIENTEN CR-EXPRESSION WÄHREND DER NEUROGENESE	66
4.5 AUSBLICK: MÖGLICHE ANWENDUNGEN VON CR ALS "NEUROGENESEMARKER"	70
4.6 EINGLIEDERUNG DER HIER GEWONNENEN ERKENNTNISSE IN DEN GESAMTKONTEXT DER NEURONALEN REIFUNG WÄHREND DER ADULTEN NEUROGENESE	73
5 ZUSAMMENFASSUNG	77
LITERATURVERZEICHNIS	79
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	90

Abkürzungsverzeichnis

BrdU	2-Bromo-5-desoxyuridin
CA	Cornu ammonis
CB	Calbindin
CBP	Calcium ²⁺ bindendes Protein
CR	Calretinin
DCX	Doublecortin
EAAT	Excitatory aminoacid transporter
EGF	Epidermal growth factor
FGF	Fibroblast growth factor
GAD	Glutamatdecarboxylase
GCL	Granule cell layer (= Stratum granulosum)
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
IEG	immediate early genes
KAI	Kainsäure (Kainat)
LTP	Long term potentiation
NeuN	Neuronal nuclei
P7	postnataler Tag 7
PBS	Phosphatpuffer
SG	Stratum granulosum (des Gyrus dentatus)
SGZ	Subgranuläre Zone (des Gyrus dentatus)
SM	Stratum moleculare (des Gyrus dentatus)
SVZ	Subventrikuläre Zone