

Aus dem Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin Berlin-Buch

Arbeitsgruppe: „Neuronale Stammzellen“

Dissertation

Effekte der Blockade des NMDA- Rezeptors auf die adulte hippocampale Neurogenese

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dominique Sebastian Petrus

aus Heidelberg

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. G. Kempermann
2. Prof. Dr. med. J. Priller
3. Priv.-Doz. Dr. C. Redecker

Datum der Promotion: 30. Januar 2009

Widmung

Ich widme diese Arbeit meiner Frau Ulrike, meinem Bruder Philippe, meinem Vater Hartmut, meiner Mutter Marlies und Susanne Argus.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung	10
1.1 Neurogenese im adulten Gehirn	10
1.2 Neurogenese im adulten Hippocampus	12
1.3 Effekte von Neurotransmittern auf die Neurogenese	15
1.3.1 Serotonin	15
1.3.2 Stickstoffmonoxid (NO)	16
1.3.3 γ -Aminobuttersäure (GABA)	16
1.3.4 Glutamat	18
1.4 Problemstellung	21
2 Material und Methoden	25
2.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung	25
2.2 Versuchsaufbau und Versuchsbedingungen	26
2.2.1 Versuchspläne	26
2.2.2 Injektionen	27
2.3 Gewebepräparation	28
2.4 Immunofluoreszenz	28
2.4.1 Primärantikörper	30
2.4.2 Sekundärantikörper	30
2.5 BrdU Immunohistochemie	30
2.6 Quantifizierung von BrdU+ Zellen	31
2.7 Quantifizierung von 1-, 2- und 3-fach markierten BrdU+ Zellen in der Immunofluoreszenz	31

2.8	Verhaltensbeobachtung der Tiere mit dem modifizierten Krampfanfall-Score nach Racine und Golarai et al.	32
2.9	Statistik	33
2.10	Methodenkritik	33
2.10.1	BrdU als Proliferationsmarker	33
2.10.2	Verhaltensbeobachtung mit dem modifizierten Krampfanfall-Score nach Racine und Golarai et al.	35
2.10.3	Lösung von Thalidomid in 0.9%iger Kochsalzlösung	36
3	Ergebnisse	37
3.1	<u>Versuch 1:</u>	
	<i>Beschreibung der Ergebnisse in den Gruppen 1h, 24h und 4 Wochen mit und ohne MK801</i>	37
3.1.1	MK801 führt zu mehr BrdU+ Zellen	37
3.1.2	MK801 führt zu mehr Zellen mit einem höheren Reifungsgrad	40
3.1.3	MK801 führt zu mehr überlebenden Neuronen im Langzeitversuch, zeigt aber keinen beobachtbaren Langzeiteffekt auf die Neubildung reifer Astrozyten	41
3.2	<u>Versuch 2:</u>	
	<i>Beschreibung der Ergebnisse in den Versuchsgruppen Diazepam mit und ohne MK801</i>	42
3.2.1	Diazepam führt zu mehr BrdU+ Zellen, jedoch führt MK801 in Kombination mit Diazepam zu keinem signifikanten Anstieg der Zellzahl	42
3.2.2	Neurogenese durch Diazepam führt nicht zu Zellen mit einem höheren Reifungsgrad	44
3.2.3	MK801 führt in der Experimentalgruppe mit Diazepam nicht zu Zellen mit einem höheren Reifungsgrad	45

3.3	<u>Versuch 3:</u>	
	<i>Beschreibung der Ergebnisse in den Versuchsgruppen</i>	
	<i>Thalidomid mit und ohne MK801</i>	46
3.3.1	Thalidomid führt zu mehr BrdU+ Zellen	46
3.3.2	Thalidomid führt zu mehr Zellen mit einem höheren Reifungsgrad	46
3.3.3	Thalidomid führt in Kombination mit MK801 zu einem starken Anstieg der Progenitorzellen	48
3.4	Verhaltensbeobachtung mit dem modifizierten Krampfanfall-Score nach Racine und Golarai et al.	49
4	Diskussion	53
4.1	Zusammenfassung diskutierter Ergebnisse	53
4.1.1	<i>Experiment 1 (1h, 24h, 4 Wochen MK801)</i>	53
4.1.2	<i>Experiment 2 (Diazepam)</i>	53
4.1.3	<i>Experiment 3 (Thalidomid)</i>	54
4.1.4	<i>Anfallsmonitoring mit dem modifizierten Krampfanfall-Score nach Racine und Golarai et al.</i>	54
4.2	Diskussion der Ergebnisse nach aktueller Studienlage	55
4.2.1	<i>Experiment 1 (1h, 24h, 4 Wochen MK801)</i>	55
4.2.2	<i>Experiment 2 (Diazepam)</i>	58
4.2.3	<i>Experiment 3 (Thalidomid)</i>	64
4.3	Hypothesen und Ausblick	68
4.3.1	<i>Experiment 1 (1h, 24h, 4 Wochen MK801)</i>	68
4.3.2	<i>Experiment 2 (Diazepam)</i>	70
4.3.3	<i>Experiment 3 (Thalidomid)</i>	72
5	Zusammenfassung	74
	Literaturverzeichnis	76
	Danksagung	84

Lebenslauf	85
Publikationen	91
Eidesstattliche Erklärung	92

Abkürzungsverzeichnis

AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure
bFGF	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl. basic fibroblast growth factor)
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridine
Ca ²⁺	Calcium
CGP 37849	kompetitiver NMDA-Rezeptor-Antagonist
CPP	3-(2-Carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid
CPS	Kälteschutzlösung
CR	Calretinin
DAB	Diaminbenzidine
DABCO	Diazabicyclo-octane
DCX	Doublecortin
DG	Gyrus dentatus
5,7-DHT	5,7-Dihydroxytryptamin
Engl.	Englisch
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
ERK	extrazelluläre signalregulierte Kinase
GABA	γ -Aminobuttersäure
GCL	Körnerzellschicht
GFAP	saures Gliafaserprotein (engl. glial fibrillary acidic protein)
GFP	grün fluoreszierendes Protein (engl. green fluorescent protein)
1h	1 Stunden Gruppe
24h	24h Stunden Gruppe
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HWZ	Halbwertszeit
i.p.	intraperitoneal
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potential
KG	Körpergewicht
LaGetSi	Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Zusammenarbeit
I-AP4	synthetischer Agonist, der an einem bestimmten Glutamatrezeptortyp bindet
LSD	least-significant-difference Test
LTP	Langzeit-Potenzierung (engl. long term potentiation)

LY451646	AMPA-Rezeptor-Verstärker
M	molar
MF	Moosfasern
mGluR	metabolischer Glutamatrezeptor
MK801	dizocilpine maleate; nicht-kompetitiver NMDA-Rezeptor-Antagonist
mV	Millivolt
NaCl 0.9%	physiologische Kochsalzlösung
NeuN	neuronaler Kern (engl. neuronal nuclei)
2N HCl	Salzsäure (Konzentration: 2 mol pro Liter)
NMDA	N-methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NSE	neuronenspezifische Enolase
OB	Bulbus olfactorius
PFA	Paraformaldehyd
Preg-S	Pregnelonon-sulfat
PSA-NCAM	hoch-polysialisiertes Zelladhäsionsmolekül
RMS	Rostral Migratory Stream
SGL	subgranuläre Zone
SSRI	Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (engl. selective serotonin reuptake inhibitor)
SVZ	subventrikuläre Zone
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
Thalidomid	α -Phthalimidoglutarimid
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor alpha
TOAD-64	Turned On After Division, Gewicht 64 kDa
TRAIL	TNF-assoziiierter-Apoptose-induzierender-Ligand
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (engl. vascular endothelial growth factor)
4 Wochen	4 Wochen Gruppe
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Neurogenese im adulten Gehirn

Der Gedanke, dass es sich teilende Zellen im adulten Gehirn gibt, war bis Mitte der 60er Jahre des letzten Jahrhunderts undenkbar. Im Jahre 1913 wurde durch Santiago Ramon y Cajal der Gedanke geprägt, dass Neuronen nur während der pränatalen Entwicklungsphase gebildet werden (Ming and Song 2005). Für die Identifikation von Neuronen benutzte Cajal damals die sog. golgische Färbetechnik. Trotz kritischer Anmerkungen seinerzeit von Allen (Allen 1912) und Hamilton (Hamilton 1901), die eine Neubildung von Neuronen im adulten Gehirn vermuteten, war damals keine Methode bekannt, die Hypothese adulter Neurogenese zu untermauern (Ming and Song 2005). Erst durch die von Sidman et al. (Sidman, Miale et al. 1959) eingeführte Färbemethode mit [³ H] Thymidin, welches in der S-Phase des Zellzyklus in die DNA sich teilender Zellen eingefügt und somit autoradiographisch detektiert werden kann, konnten Studien über die adulte Neurogenese durchgeführt werden (Ming and Song 2005). Anfang der 60er Jahre konnte J. Altman in seinen ersten autoradiographischen Studien aufzeigen, dass es sich teilende Gehirnzellen bei verschiedenen Spezies gibt (Altman 1962; Altman and Das 1965; Altman and Das 1965; Altman 1966; Altman and Das 1967). Die Arbeiten Altmans sowie die darauf folgenden von Kaplan et al. (Kaplan and Hinds 1977; Kaplan 2001), stießen zunächst auf negative Reaktionen und kritische Publikationen, welche die Hypothese der Neuronenneubildung im adulten Gehirn ablehnten (Rakic 1985).

Letztendlich hat sich die wissenschaftliche Meinung etabliert, dass Neurogenese im adulten Gehirn sicher existent ist (Abrous, Koehl et al. 2005; Ming and Song 2005; Kempermann 2006). Die Forschung darüber gliedert sich momentan in zwei Teilströmungen:

Die eine Forschungsströmung konzentriert sich auf die Isolierung neuronaler Stammzellen und die Analyse derer Funktionen, um zukünftig die Basis für ein Eingreifen in diese Mechanismen zu schaffen (Abrous, Koehl et al. 2005). Die zweite Strömung möchte die funktionelle Relevanz der Neurogenese für die Gehirnfunktion,

vor allem im Gyrus dentatus (DG) des Hippocampus, begreifen (Abrous, Koehl et al. 2005).

Trotz der allgemeinen Akzeptanz von Neurogenese im adulten Gehirn ist die Frage nach der genauen Lokalisation von Neurogenese Gegenstand reger Diskussion. Auf der einen Seite gilt Neurogenese im DG des Hippocampus (Altman 1963; Altman and Das 1965; Eriksson, Perfilieva et al. 1998; Gould, Reeves, Fallah et al. 1999; Kornack and Rakic 1999; Gould, Vail et al. 2001; Seri, Garcia-Verdugo et al. 2001) und dem System: subventrikuläre Zone (SVZ)-Rostral Migratory Stream (RMS)-Bulbus olfactorius (OB) als gesichert (Altman 1963; Privat and Leblond 1972; Kaplan 1985; Gould, Reeves, Fallah et al. 1999; Gould, Reeves, Graziano et al. 1999; Bernier, Vinet et al. 2000; Gould, Vail et al. 2001; Kornack and Rakic 2001; Pencea, Bingaman et al. 2001). Auf der anderen Seite ist es umstritten, ob es Neurogenese im Neokortex gibt. Schon die frühen Arbeiten von J. Altman (Altman 1962; Altman 1963; Altman and Das 1966) und Kaplan (Kaplan 1981; Kaplan 1985; Kaplan 2001) geben Hinweise auf Zellneubildung im Neokortex von Ratten und Katzen. Neuere Arbeiten von Gould et al. (Gould, Vail et al. 2001) zeigen Neurogenese im anterioren Neokortex der Ratte und im präfrontalen, inferio-temporalen und postero-parietalen Kortex von Rhesusaffen (Gould, Reeves, Graziano et al. 1999; Gould, Vail et al. 2001). Im Gegensatz dazu existieren zahlreiche Arbeiten, die keinen Anhalt für Neurogenese in Mäuse- (Magavi, Leavitt et al. 2000; Ehninger and Kempermann 2003) oder in Affen-Kortizes (Magavi, Leavitt et al. 2000; Rakic 2002) geben. Zu den nicht-neurogenen Regionen des Gehirns wird nach heutigem Kenntnisstand das Rückenmark gezählt, dort neugebildete Zellen sind nach Arbeiten von Horner et al. ausschließlich glialen Ursprungs (Horner, Power et al. 2000).

1.2 Neurogenese im adulten Hippocampus

Wie schon beschrieben, gilt der Gyrus dentatus (DG) des Hippocampus als eine Region des adulten Gehirns verschiedener Spezies, in der sicher Neurogenese stattfindet (Altman 1963; Altman and Das 1965; Eriksson, Perfilieva et al. 1998; Gould, Reeves, Fallah et al. 1999; Kornack and Rakic 1999; Gould, Vail et al. 2001; Seri, Garcia-Verdugo et al. 2001).

Die Struktur des Hippocampus wird durch ein Netzwerk aus einer Verschaltung von jeweils 3 Synapsen gebildet (Amaral and Witter 1989; Abrous, Koehl et al. 2005):

Multimodale Eingänge des Neokortex erreichen den DG über den entorhinalen Kortex (diese Afferenz des Hippocampus wird als sog. „perforant pathway“ bezeichnet), von dort werden die Signale an das Areal C3 durch Moosfasern übertragen. Von C3 aus zieht das Netzwerk über die sog. Schaffer-Kollateralen zur Region CA1 und dem Subiculum, um dann wieder über den entorhinalen Kortex zu Assoziationsarealen des Kortex weitergeleitet zu werden (Amaral and Witter 1989; Abrous, Koehl et al. 2005). Die Zellen proliferieren in der subgranulären Zone (SGL), diese Schicht liegt zwischen dem Hilus und der Körnerzellschicht (GL); von der SGL ausgehend wandern die Zellen und reifen zu Neuronen aus (Amaral and Witter 1989; Abrous, Koehl et al. 2005).

Den Arbeiten von Kempermann et al. (Kempermann, Jessberger et al. 2004) folgend, lassen sich verschiedene Stadien der Neurogenese im DG des Hippocampus durch eine bestimmte Zellmorphologie und ein bestimmtes Anfärbeverhalten der Zellen in der Immunofluoreszenz charakterisieren.

Adulte Neurogenese beginnt mit der Teilung einer Stammzelle, welche den Ausgangspunkt für drei sich immer weiter teilende und differenzierende Progenitorzellen (Stufe 2-4) darstellt (Kempermann, Jessberger et al. 2004). Alle diese Entwicklungsstufen führen letztendlich zu einem Verlassen des Zellzyklus (Stufe 5) in eine postmitotische Stufe, in der die Einbindung der neuen Zellen in Netzwerke stattfindet und die Entscheidung über das Langzeitüberleben der Zelle getroffen wird (Kempermann, Jessberger et al. 2004). Auf der Stufe 6 sind die Zellen terminal ausdifferenziert und werden zu Körnerzellen (Kempermann, Jessberger et al. 2004). In diesem Kreislauf der Zellneubildung entstehen Neurone, Astrozyten und Endothelien parallel und können nur durch unterschiedliches Anfärbeverhalten (entsprechend den

unterschiedlichen Oberflächenmolekülen) und durch ihre Zellmorphie unterschieden werden (Kempermann, Jessberger et al. 2004). Um diese Zellen nun praktisch differenzieren zu können, ist es wichtig das Färbeverhalten der verschiedenen Entwicklungsstufen der Zellen der Neurogenese sowie gliale, astrozytäre oder endotheliale Marker zu kennen.

Die erste Stufe (Stammzelle) ist durch eine Koexpression von BrdU und Nestin-GFP gekennzeichnet (Kempermann, Jessberger et al. 2004). Nestin ist ein Klasse IV intermediäres Filament, welches in neuronalen Progenitorzellen gebildet wird (Yamaguchi, Saito et al. 2000). Diese Stammzelle hat eine radiale Morphologie, mit weiten Zellausläufern, und erfüllt in diesem Stadium die Kriterien einer Gliazelle (Kempermann, Jessberger et al. 2004). Aus dieser Stammzelle entwickeln sich verschiedene Progenitorzellen:

Die Typ-2 Zellen (Typ-2a und Typ-2b) sind durch Koexpression von BrdU und Nestin-GFP gekennzeichnet, jedoch ist eine von beiden Doublecortin (DCX) negativ (Typ-2a Zelle: BrdU+, Nestin-GFP+, DCX-) und eine DCX positiv (Typ-2b Zelle: BrdU+, Nestin-GFP+, DCX+) (Kempermann, Jessberger et al. 2004). Die Morphologie von Typ-2 Zellen ist durch kurze Ausläufer charakterisiert, die in ihrem Verlauf tangential zum DG orientiert sind (Kempermann, Jessberger et al. 2004).

Typ-3 Zellen, die man am besten als Neuroblasten beschreiben kann, sind Nestin-GFP negativ, aber BrdU und DCX positiv (Typ-3 Zelle: BrdU+, Nestin-GFP-, DCX+) (Kempermann, Jessberger et al. 2004). DCX ist ein X-chromosomal kodiertes Protein, welches während der embryonalen Entwicklung des ZNS und in neuronalen Vorläuferzellen gebildet wird. DCX zeigt an, dass die Entwicklung der Progenitorzelle schon weiter fortgeschritten ist und gilt deshalb zur Markierung sog. unreifer Neurone oder Neuroblasten als etabliert (Kempermann, Jessberger et al. 2004). Typ-3 Zellen zeichnen sich zudem durch einen eher runden Zellkern im Vergleich zu Typ-2 Progenitorzellen aus (Kempermann, Jessberger et al. 2004).

Die Stufe 5 (postmitotische Stufe) ist erreicht, wenn die Zellen Calretinin oder NeuN auf ihrer Zelloberfläche ausbilden (Kempermann, Jessberger et al. 2004). Calretinin ist ein Calcium-bindendes Protein, welches zwischenzeitlich auf postmitotischen Neuronen exprimiert wird (Brandt, Jessberger et al. 2003). Es kann frühestens nach einem Tag durch Färbung entdeckt werden (Brandt, Jessberger et al. 2003). NeuN ist der am

weitesten verbreitete Marker für postmitotische neuronale Stadien (Kempermann, Jessberger et al. 2004).

Die letzte Stufe (Stufe 6) ist dadurch gekennzeichnet, dass die Expression von Calretinin auf der Zelloberfläche zu Calbindin umschlägt (Kempermann, Jessberger et al. 2004). Calbindin ist auf allen reifen Körnerzellen zu finden, jedoch kann die Färbung allein durch Calbindin keine Auskunft über die volle Ausreifung der Zelle geben (Kempermann, Jessberger et al. 2004). Nach 4-7 Wochen sind die neu gebildeten Körnerzellen funktionell nicht mehr von älteren Körnerzellen unterscheidbar, dennoch sind die Details über die letzte Reifungsstufe, die zur Integration in den Zellverband führt, bisher unbekannt (Kempermann, Jessberger et al. 2004).

Als weitere Marker im Kreislauf der parallelen Entwicklung nicht-neuronaler Zellen im DG sind unter anderem S100 β und GFAP als Marker für reife Astrozyten sowie BrdU+ Zellen ohne Koexpression mit anderen neuronalen oder astrozytären Markern für Endothelien oder andere Arten von Zellen von Bedeutung (Steiner, Kronenberg et al. 2004). S100 β stellt bis zum heutigen Zeitpunkt einen der verlässlichsten und spezifischsten Marker für Astrozyten dar (Savchenko, McKanna et al. 2000), darüber hinaus gilt S100 β als etablierter Marker für reife Astrozyten (Kempermann, Jessberger et al. 2004). Ein weiterer wichtiger Marker für Astrozyten ist das saure Gliafaserprotein (GFAP) (Filippov, Kronenberg et al. 2003).

1.3 Effekte von Neurotransmittern auf die Neurogenese

1.3.1 Serotonin

Der Einfluss des Neurotransmitters Serotonin auf die Neurogenese kann nur sehr differenziert, in Anbetracht der Effekte über seine verschiedenen Rezeptoren, betrachtet werden. Die Arbeit von Radley et al. (Radley and Jacobs 2002) gibt Anhaltspunkte dafür, dass der 5-HT(1A)-Rezeptor eine wichtige Rolle in der Zellproliferation des Hippocampus spielt. Durch die selektive Blockade dieses Rezeptors kam es zu einer 30%igen Reduktion der BrdU+ Zellen im DG des Hippocampus. In die gleiche Richtung deutet die Arbeit von Banasr et al. (Banasr, Hery et al. 2004), welche durch die Aktivierung des 5-HT(1A)-Rezeptors eine bis zu 50%ige Erhöhung der BrdU+ Zellen im DG des Hippocampus sowie in der SVZ aufzeigen konnte. Die Funktion der Rezeptorsubtypen 5-HT(2A) und 5-HT(2C) muss allerdings sehr differenziert betrachtet werden. Durch die Aktivierung des 5-HT(2A)-Subtyps (vornehmlich im Plexus choroideus des Ventrikelsystems lokalisiert) kam es zu einer Zellvermehrung um bis zu 56% in der SVZ. Dagegen kam es bei der Blockade des 5-HT(2C) Subtyps zu einer Reduktion der neugebildeten Zellen in der subgranulären Zone (SGL) des DG um 63% (Banasr, Hery et al. 2004). Die kurze und Langzeit-Gabe von Agonisten der 5-HT(1A) und 5-HT(2C) Rezeptorsubtypen führen konsistent zu einer Erhöhung der Zellproliferation im DG des Hippocampus und dem olfaktorischen System (Banasr, Hery et al. 2004). Die Arbeit von Brezun et al. (Brezun and Daszuta 2000) unterstreicht ebenfalls die wesentliche Bedeutung des serotonergen Systems auf die Neurogenese. Durch die Injektion von 5,7-Dihydroxytryptamin (5,7 DHT; ein häufig verwandtes Neurotoxin) in die dorsalen und medialen Raphekerne kam es durch die Deprivation des Hippocampus von der Innervation durch Serotonin (5-HT) zu einer signifikanten Steigerung der PSA-NCAM- sowie der BrdU+ Zellen im DG des Hippocampus (Brezun and Daszuta 2000). All diese Effekte waren reversibel sobald der DG wieder durch 5-HT reinnerviert wurde (Brezun and Daszuta 2000).

Einen weiteren klinisch interessanten Aspekt bringt die Arbeit von Encinas et al. ein (Encinas, Vaahtokari et al. 2006). In dieser Arbeit wurde die Neurogenese unter der Behandlung mit dem selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI) Fluoxetin, aus der Klasse der Antidepressiva, beobachtet. Durch 15-tägige Vorbehandlung mit

Fluoxetin, kam es bei einem Abstand von 24h zwischen Applikation der Färbesubstanz BrdU und Perfusion der Tiere, zu einer Steigerung der Zellzahl im DG um 41%. Encinas et al. konnten diese Zellen als vorwiegend Typ-2a Zellen identifizieren, die sich im Langzeitversuch auch zu Neuronen entwickelten (Encinas, Vaahtokari et al. 2006). Die Gabe von Fluoxetin hatte interessanterweise keinen Effekt auf die Neurogenese in der SVZ, sondern nur auf die Neurogenese des DG (Encinas, Vaahtokari et al. 2006).

Zusammenfassend können wir sagen, dass die serotonerge Innervation der neurogenen Zonen des Gehirns eine wichtige Rolle spielt, die sich sehr differenziert durch dessen Effekte an den verschiedenen Rezeptorsubtypen auswirkt.

1.3.2 Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid, das durch die NO-Synthetase aus der Aminosäure L-Arginin gebildet wird, ist ein freies Radikal, welches im Gehirn als Neurotransmitter fungiert (Alderton, Cooper et al. 2001). In ihrer Arbeit beschreiben Zhang et al. (Zhang, Zhang et al. 2001), dass es durch die Applikation eines NO-Donors ((Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)aminio]diazene-1-ium-1,2-diolate (DETA/NOONOate)) zu einer signifikanten Steigerung der Neurogenese und Zellmigration im DG des Hippocampus und der SVZ bei Ratten kommt. Außerdem konnte bei Mäusen gezeigt werden, dass es in der SVZ und der RMS neuronale Vorläuferzellen gibt (hier mit BrdU oder PSA-NCAM markiert), die unter dem Einfluss von NO stehen (Moreno-Lopez, Noval et al. 2000).

1.3.3 γ -Aminobuttersäure (GABA)

γ -Aminobuttersäure (GABA) ist das biogene Amin der Glutaminsäure und stellt den wichtigsten hemmenden Neurotransmitter des zentralen Nervensystems (ZNS) dar. GABA wird mit Hilfe der Glutamat-Decarboxylase direkt aus Glutamat gebildet. Es verfügt über zwei ionotrope (GABA_A und GABA_C) und einen metabotropen Rezeptor (GABA_B). Die Neurogenese betreffend, ist die Datenlage über GABA widersprüchlich. Tozuka et al. (Tozuka, Fukuda et al. 2005) konnte zeigen, dass es durch die Applikation von GABA-Agonisten vermehrt zu terminaler Ausdifferenzierung neuronaler Progenitorzellen kommt. Die Arbeit von Ge et al. (Ge, Goh et al. 2006) zeigt, dass die

Neurogenese des DG durch tonische und phasische Aktivität gabaerger Aktivierung gesteuert wird. Die Depolarisation von neugebildeten Neuronen durch GABA erwies sich als essentiell wichtig für eine regelrechte Innervation der Neurone und somit deren Vernetzung im DG, zuerst durch gaba- und anschließend glutamaterge Synapsen (Ge, Goh et al. 2006). Dieser frühe gabaerge Einfluss auf die neugebildeten Neurone hat neben der Netzbildung im DG einen wesentlichen Einfluss auf die Ausdifferenzierung der Zellen (Ge, Goh et al. 2006). Ein ähnliches Ergebnis wurde in der Arbeit von Wang et al. (Wang, Kempermann et al. 2005) beobachtet. Neugebildete Neurone in der adulten Neurogenese erhalten zuerst funktionelle Synapsen des gabaergen Systems (Wang, Kempermann et al. 2005). In diesem Stadium der frühen Innervation wirkt GABA durch seine Erhöhung des intrazellulären Cl^- -Spiegels als exzitatorischer Transmitter (Wang, Kempermann et al. 2005). Die durch GABA vermittelte synaptische Aktivität führt vermehrt zu Aktionspotentialen und erhöht den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel in den neuen Neuronen durch Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle (Wang, Kempermann et al. 2005). Dieser frühe exzitatorische Einfluss übt einen wichtigen Einfluss auf die Kontrolle von Reifung und Netzbildung der neuen Neurone aus (Wang, Kempermann et al. 2005). Dennoch verändert sich der Einfluss von GABA im Laufe der neuronalen Entwicklung: LTPs werden in reifen Körnerzellen des DG durch GABA unterdrückt, ein Effekt der neugebildete junge Neurone unbeeinflusst lässt (Wang, Scott et al. 2000).

Auf der anderen Seite zeigen Arbeiten von Mayo et al. (Mayo, Lemaire et al. 2005) mit Pregnelonon-sulfat (Preg-S)-Infusionen an älteren Ratten, welches eine negativ allosterische Wirkung am $GABA_A$ -Rezeptor haben soll, eine verstärkte Neurogenese. Der mit zunehmenden Alter abnehmende Spiegel von Preg-S wurden mit einem Verlust hippocampaler Stimulation sowie mit kognitiven Defiziten in Verbindung gebracht (Mayo, Lemaire et al. 2005). Die Arbeit von Nixon et al. (Nixon and Crews 2004) konnte keine Steigerung der Neurogenese durch die Droge Diazepam feststellen. Im Unterschied zur Arbeit von Mayo et al. (Mayo, Lemaire et al. 2005) handelt es sich bei Diazepam um einen Synergisten am $GABA_A$ -Rezeptor, d.h. Diazepam kann die Wirkung von GABA nur in Anwesenheit des Neurotransmitters verstärken.

Dennoch geben mehrere Studien Anhaltspunkte dafür, dass GABA (u.a. auch in Kombination mit Glutamat) eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und Proliferation

neuronaler Vorläuferzellen einnimmt (LoTurco, Owens et al. 1995; Antonopoulos, Pappas et al. 1997; Haydar, Wang et al. 2000; Nguyen, Malgrange et al. 2003; Tozuka, Fukuda et al. 2005; Wang, Kempermann et al. 2005; Ge, Goh et al. 2006). Darüber hinaus scheint GABA im Zusammenspiel mit Glutamat eine wichtige Rolle im Kommunikationsweg des DG mit der Region CA3 über die sog. Moosfasern zu spielen (Crawford and Connor 1973; Acsady, Kamondi et al. 1998; Walker, Ruiz et al. 2001; Bergersen, Ruiz et al. 2003; Gutierrez 2003). In diesem Zusammenhang wird vor allem ein modulierender Einfluß von GABA auf die überwiegend dominierenden glutamaterg erregenden Ströme der Moosfasern diskutiert.

1.3.4 Glutamat

Die Rolle des Glutamat als Neurotransmitter und sein Einfluss auf die Neurogenese im adulten Gehirn muss, ähnlich dem Serotonin, in Bezug auf seine Wirkung an den verschiedenen Rezeptorsubtypen differenziert betrachtet werden. Die wichtigsten ionotropen Rezeptoren des Glutamat stellen der N-methyl-D-Aspartat (NMDA)-, der α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure (AMPA)- und der Kainat-Rezeptor dar. Darüber hinaus existieren noch weitere metabotrope glutamaterge Rezeptoren, die z.B. wichtigen regulatorischen Einfluss auf die Signalübertragung im Moosfasersystem haben (Gutierrez 2003). Der Großteil der Neurogeneseforschung mit Glutamat beschränkt sich bisher überwiegend auf Studien mit dem NMDA- und dem AMPA-Rezeptor.

Bevor jedoch der Einfluss des Glutamat auf die Neurogenese nach Rezeptoren differenziert erforscht wurde, stellte Cameron et al. in einer Arbeit fest (Cameron, McEwen et al. 1995), dass es durch die Läsion des entorhinalen Kortex und somit der Zerstörung der Afferenz des glutamatergen System zum DG des Hippocampus (dem sog. „perforant pathway“) zu einer Steigerung der Zellproliferation kam. Sie folgerten daraus, dass das glutamaterge System in Bezug auf die Neurogenese im DG einen inhibitorischen Einfluss haben muss (Cameron, McEwen et al. 1995).

Auf Rezeptorebene aufgeschlüsselt, zeigten Arbeiten über den AMPA-Rezeptor, dass es bei einmaliger sowie chronischer Applikation des AMPA-Rezeptor-Verstärkers LY451646 zu einer Steigerung der Zellproliferation um 30% (bei einmaliger Gabe) bzw.

45% (bei chronischer Applikation) der BrdU+ Zellen im DG kam (Bai, Bergeron et al. 2003). Die Zellvermehrung trat u.a. vor allem in Zellen auf, die zu Clustern angeordnet waren.

Die Arbeit von Jessberger et al. (Jessberger, Romer et al. 2005) an einem Krampfanfallmodell durch Aktivierung des Kainat-Rezeptors zeigte nach 9 Tagen eine deutliche Erhöhung der Neurogenese in den mit Kainat (35mg/kg KG) behandelten Tieren (C57BL6 nestin-gfp Mäuse). Weiterhin kam es im Rahmen dieser Neurogenese zu einer verstärkten Vernetzung der neu gebildeten Zellen (Jessberger, Romer et al. 2005). In den Differentialfärbungen dominierten nach 9 Tagen in dieser Arbeit vor allem die Typ-3 Zellen, jedoch wurde kein signifikanter Unterschied bezüglich der CR+ Zellen sowie GFAP+ Zellen (Astrozyten) gesehen (Jessberger, Romer et al. 2005). Interessanterweise waren die Nestin-GFP+ Zellen des DG unbeeinflusst von dieser durch Krampfanfall-induzierten Neurogenese (Jessberger, Romer et al. 2005).

Weitaus mehr Studien wurden allerdings über den NMDA-Rezeptor durchgeführt. Die Blockade des NMDA-Rezeptors in Studien von Cameron et al., mit einem nicht-kompetitiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten, dem sog. MK801 (hier in Konzentration von 1 mg/kg KG) führt bei Ratten bereits nach wenigen Stunden zu einer signifikanten Steigerung der Zellzahl im DG des Hippocampus (Cameron, McEwen et al. 1995; Cameron, Tanapat et al. 1998). Des Weiteren bestätigt die Arbeit von Halim et al. (Halim, Weickert et al. 2004) diese Ergebnisse bei Ratten mit einer Steigerung der BrdU+ Zellen um 300% bei identischer Konzentration von MK801. Ähnliche Ergebnisse konnten bei Spitzhörnchen (1 mg/kg KG MK801) (Gould, McEwen et al. 1997) und Wüstenrennmäusen (3 x 3 mg/kg KG MK801) (Bernabeu and Sharp 2000) beobachtet werden. Durch die Applikation des kompetitiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten CGP 37849 in einer Dosierung von 5 mg/kg KG kam es im DG ebenfalls zu einer Erhöhung der Zellzahl und zu einer Dichtezunahme der Körnerzellen (Cameron, McEwen et al. 1995).

Spiegelbildlich führt die Applikation von NMDA in einer Konzentration von 30 mg/kg KG zu einer Abnahme der Zellzahl im DG von Ratten (Cameron, McEwen et al. 1995; Cameron, Tanapat et al. 1998). Bei Wülmäusen konnte durch die Applikation von Estradiol die NMDA-Rezeptor-Aktivität erhöht und dadurch die Neurogenese gehemmt werden (Ormerod, Falconer et al. 2003). Diese Ergebnisse decken sich mit denen der

Zellkultur in der Studie von LoTurco et al. (LoTurco, Owens et al. 1995), in der die Applikation von Glutamat die Bildung von embryonalen kortikalen Zellen herabsetzte.

Verschiedene Arbeiten haben untersucht, welche Arten von Zellen die Blockade des NMDA-Rezeptors durch MK801 hervorbringt (Gould, McEwen et al. 1997; Nacher, Rosell et al. 2001; Okuyama, Takagi et al. 2004). Es wurden Neurone beschrieben, die auf ihrer Zelloberfläche NSE, Doublecortin (DCX), TOAD-64 oder NeuN exprimierten. Die Arbeit von Okuyama et al. (Okuyama, Takagi et al. 2004) konnte sogar zeigen, dass (gemessen an der extrazellulären signalregulierten Kinase (ERK)-Aktivität) es sich bei den neugebildeten Neuronen um funktionelle Neuronen handelt, die auf die Aktivierung durch NMDA ansprechen. Der Arbeit von Deisseroth et al. (Deisseroth, Singla et al. 2004) folgend, bedeutet das, dass neugebildete Neuronen durch die Aktivität der ERK Anschluss an das glutamaterge Erregungssystem erhalten.

1.4 Problemstellung

Eine Fragestellung meiner Arbeit beschäftigt sich mit der Beschreibung der Neurogenese im Gyrus dentatus (DG) des Hippocampus der Maus unter Einfluss von MK801. Der Taxonomie der Neurogenese von Kempermann et al. (Kempermann, Jessberger et al. 2004) folgend, gibt es bisher keine systematische Beschreibung der Neurogenese unter der Blockade des NMDA-Rezeptors mit MK801. Zudem beschränken sich die meisten Arbeiten nur auf späte Untersuchungszeitpunkte (Nacher, Rosell et al. 2001; Okuyama, Takagi et al. 2004). In Experimenten mit frühen Messzeitpunkten (Cameron, McEwen et al. 1995; Cameron, Tanapat et al. 1998; Bernabeu and Sharp 2000) fehlt die detaillierte Beschreibung der Neurogenese auch in Abgrenzung zu Astrozyten, Glia- und anderen Zellen. Dies gab den Anstoß dazu, in einem Zeitreihenexperiment, die hoch-akuten (1h), akuten (24h) und Langzeiteffekte (4 Wochen) von MK801 auf die Neurogenese zu untersuchen. Wir haben für dieses Experiment ein spezielles Tiermodell gewählt, nämlich das der C57BL6 nestin-gfp Maus, um in Anlehnung an die Arbeit von Yamaguchi et al. (Yamaguchi, Saito et al. 2000) eine Differenzierung der neuronalen Progenitorzellen besser realisieren zu können.

Das zweite Experiment befasst sich mit der Frage, ob es möglich ist, die Veränderungen der Neurogenese reaktiv auf MK801 durch die Aktivierung des gabaergen Systems zu modulieren. Hierfür wählten wir Diazepam, einen Synergisten am GABA_A-Rezeptor. Der Aspekt der Modulation der Effekte von MK801 auf die Neurogenese durch GABA ist bisher nicht beschrieben und unklar. Ebenso wenig existiert der Taxonomie Kempermanns (Kempermann, Jessberger et al. 2004) folgend eine systematische Beschreibung der Neurogenese unter dem Einfluss von Diazepam.

Verschiedene Arbeiten (Gilbert and Mack 1990; Feinberg, Campbell et al. 1995; Mastropalo, Rosse et al. 2004) konnten zeigen, dass MK801 ein lebhaft-agitiertes Verhalten (sog. „popping behaviour“) in Versuchstieren verursacht. Des Weiteren konnte durch Feinberg et al. (Feinberg, Campbell et al. 1995) gezeigt werden, dass es durch MK801 zu spike-wave Aktivität im EEG bei behandelten Versuchstieren kommt. Wir leiten daraus ab, dass es durch MK801 zu einer Erregung oder Krampfaktivität in diesen Tieren kommt, welche sich deutlich anhand des Verhaltens und der Veränderung von Gehirnströmen im EEG nachweisen lässt. Wir haben uns deshalb auf die Suche

nach einer Substanz begeben, die diese Erregung wirkungsvoll unterdrücken kann. Verschiedene Arbeiten (Nixon and Crews 2004; Tutka, Mroz et al. 2005; Wang, Zhou et al. 2005) zeigen auf, dass Diazepam in einer Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht (KG) wirkungsvoll verschiedenste Arten von Erregung oder Krampfanfällen kontrollieren kann. Dies hat uns dazu veranlasst Diazepam in unserem Versuch als modulierende Substanz zu verwenden. Diazepam wirkt synergistisch mit GABA am GABA_A-Rezeptor, d.h. nur in Anwesenheit von GABA kann Diazepam die Wirkung von GABA verstärken.

Die Idee zum dritten Experiment ergab sich aus der Arbeit von Marjanovic et al. (Marjanovic, Stojanov et al. 2003). In dieser Fallstudie wurde ein 10 Jahre altes Mädchen, das seit seinem fünften Lebensjahr an einer sog. Rasmussen Enzephalitis litt, mit Thalidomid behandelt.

Die Rasmussen Enzephalitis ist durch die klinische Trias aus epilepsia partialis continua, einem langsam fortschreitenden intellektuellen Abbau und einer Hemiparese mit radiologischen Zeichen einer halbseitigen, unspezifischen Atrophie einer Großhirnhemisphäre charakterisiert (Marjanovic, Stojanov et al. 2003). Die Enzephalitis beginnt meist in der Kindheit und bei Hirnbiopsien zeigt sich das Bild einer chronische Enzephalitis (Marjanovic, Stojanov et al. 2003). Die genaue Ursache dieser Erkrankung ist jedoch unklar. Es werden virale und autoimmune Ursachen diskutiert. Manche Patienten weisen hohe Antikörpertiter gegen Glutamatrezeptoren auf, was die Hypothese einer Autoimmunreaktion unterstützt (Marjanovic, Stojanov et al. 2003).

Antiepileptische Therapien, Steroide, Immunglobuline, Virostatika oder Plasmapherese zeigten bei diesem Krankheitsbild nur einen eingeschränkten Erfolg – als ultima ratio wird diesen Patienten die Entfernung einer Großhirnhemisphäre vorgeschlagen (Marjanovic, Stojanov et al. 2003). Bei diesem Mädchen kam nach zahlreichen nur begrenzt erfolgreichen Therapieversuchen mit verschiedensten Antiepileptika, Hochdosissteroiden, Virostatika und nach chirurgischer Entfernung epileptogener Areale α -Phthalimidoglutarimid (Thalidomid) in einer Dosierung von 300 mg/d zum Einsatz. Die Ergänzung der bereits bestehenden Therapien durch Thalidomid verbesserte die neurologischen Einschränkungen des Mädchens und senkte die Anzahl der Krampfanfälle auf 10 pro Tag (Marjanovic, Stojanov et al. 2003). Dieses Mädchen war zum Zeitpunkt der Fallstudie 13 Jahre alt und hat durch ihre o.g. Therapien in Kombination mit Thalidomid (seit 3 Jahren) neurologisch und bezüglich ihrer Krampfanfälle ein stabiles Level erreicht (Marjanovic, Stojanov et al. 2003). Auch bei

dieser Patientin konnten Antikörper gegen den Glutamatrezeptorsubtyp 3 nachgewiesen werden. Die Titerhöhe bei positiven Patienten (mit Antikörpern) wird bei der Rasmussen Enzephalitis mit Krankheitsaktivität assoziiert (Marjanovic, Stojanov et al. 2003). Die Beteiligung des Glutamatrezeptors an diesem womöglich autoimmunen Krankheitsprozess der Rasmussen Enzephalitis sowie die Verbesserung der Krampfanfälle und neurologischen Einschränkungen durch Thalidomid gaben für uns den Ausschlag dazu, Thalidomid in unserem Modell als modulierenden Faktor zu verwenden. Wir wollten durch Thalidomid unsere Ergebnisse mit der Substanz Diazepam, die mit einer höheren Spezifität Erregung und Krampfanfälle sicher zu kontrollieren vermag, auf der Verhaltensebene bzw. auf histologischer Ebene kontrastieren.

Thalidomid stellt für uns einen ganz neuen Ansatz für die Untersuchung von Neurogenese dar. Thalidomid mit seinen vielfältigen Einflüssen auf Transkriptionsfaktoren (vorwiegend NF-kappa-b), auf Angiogenesefaktoren wie VEGF und bFGF unter der Kontrolle des Zytokins TNF-alpha, sowie Effekten auf CD8+ T-Zellen, auf IL-6 und IL-8, auf den TNF-assoziierten-Apoptose-induzierenden-Liganden (TRAIL), Apoptose-Protein-2, der Fas-Induktion, der Caspase-8 Aktivität (Melchert and List 2007) eröffnet uns ein weites Spektrum bisher unerforschter Einflüsse auf die adulte Neurogenese. Der Fallstudie von Marjanovic et al. (Marjanovic, Stojanov et al. 2003) folgend hat Thalidomid durch seine Wirkung auf die o.g. Faktoren Einfluss auf Epilepsie, Übererregung und neurologische Defizite im Rahmen der Rasmussen Enzephalitis. Zunächst wollten wir den Einfluss von Thalidomid deskriptiv in seinem Einfluss auf die Neurogenese im DG zeigen. Weiterhin wollten wir beobachten, welchen Einfluss Thalidomid auf die Neurogenese unter Blockade des NMDA-Rezeptors durch MK801 hat.

Wir betreten mit diesem in-vivo Versuch absolutes Neuland, möchten aber durch die Beschreibung der Neurogenese durch Thalidomid mögliche klinische Implikationen für die mit Thalidomid behandelten Patienten (vorwiegend in der Krebstherapie) aufzeigen und zu weiterer Forschung dahingehend anstoßen. Weiterhin erscheint es uns bei der Kombination von Thalidomid mit MK801 wichtig, ob und in wie weit es durch Thalidomid möglich ist, den erregenden Einfluss auf die Versuchstiere durch Blockade des NMDA-Rezeptors zu verändern. Dies wollten wir deskriptiv auf histologischer und auf Verhaltensebene analysieren. Dies könnte Anstoß dazu geben, die Wirkung von

Thalidomid bei anderen, therapieresistenten Epilepsien oder neurologischen Defiziten zu erforschen und einzusetzen.

Um den Effekt der verschiedenen Substanzen auf der Verhaltensebene messen zu können, beobachteten wir die Tiere anhand des etablierten Krampfanfall-Scores von Racine und Golarai et al. (Racine 1972; Golarai, Greenwood et al. 2001). Dieses Messinstrument haben wir durch die Messung der Anfalllatenz (Seizure latency; Zeit der Injektion bis zum Beginn der Erregung/Krampfanfall) erweitert.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Für unser Experiment haben wir die transgene C57BL6 nestin-gfp Maus verwendet, in der durch regulatorische Veränderungen am Nestin-Gen vermehrt Nestin-GFP in neuronalen Progenitorzellen gebildet wird. Die Verwendung dieses Mausmodells soll die Reliabilität des Versuchsergebnisses und die Differenzierung der verschiedenen Neuronenvorläuferstufen verbessern (Yamaguchi, Saito et al. 2000; Sawamoto, Nakao et al. 2001). Die Mäuse wurden speziell für die Versuche im Tierstall der Arbeitsgruppe Kempermann im Max-Delbrück-Centrum (MDC) für Molekulare Medizin in Berlin-Buch (Deutschland) gezüchtet. Alle Mäuse waren zu Beginn des Experiments 12 Wochen alt und weiblichen Geschlechts. Jede Versuchs- oder Kontrollgruppe bestand aus 5 Tieren die nach dem Zufallsprinzip den jeweiligen Gruppen zugeordnet wurden (insgesamt wurden in unserem Experiment 50 Tiere verwendet).

Alle Tiere wurden in einem Raum des Tierversuchskomplexes des MDC Berlin-Buch mit 12-h-Tag/Nacht-Rhythmus und unbegrenztem Zugang zu Wasser und Futter gehalten. Weiterhin wurden die Tiere durch ein spezielles Zu- und Abluftsystem mit Frischluft versorgt. Die Käfige wurden jede Woche gereinigt, Streu und Wasser wurden ausgetauscht. Die Standardversuchsbedingungen der Versuchstiere sind in [Abb. 1](#) illustriert.

Alle lokalen und internationalen Richtlinien zur Tierhaltung wurden eingehalten. Der Tierversuchsantrag Nr. [G0051/06](#) wurde im Jahr 2006 vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit genehmigt (LaGetSi).



Abb. 1: C57BL6 nestin-gfp Mäuse unter Standardversuchsbedingungen

2.2 Versuchsaufbau und Versuchsbedingungen

2.2.1 Versuchspläne

Der Versuchsaufbau kann der Tab. 1 entnommen werden.

Gruppe	t0	t1(1h)	t2	t3
1h MK801/1h Kontrolle	MK801/0.9% NaCl	BrdU	Perfusion 1h nach t1	
24h MK801/24h Kontrolle	MK801/0.9% NaCl	BrdU	Perfusion 24h nach t1	
4 Wochen MK801/ 4 Wochen Kontrolle	MK801/0.9% NaCl	BrdU	BrdU 24h und 48h nach t1	Perfusion 29Tage nach t1

Vorbehandlung mit Thalidomid (X)

Gruppe	Tag -6	Tag -5	Tag -4	Tag -3	Tag -2	Tag -1	Tag 0 (t0)	Tag +1
24h Thalidomid/ Thalidomid Kontrolle	X	X	X	X	X	X	X und MK801/0.9% NaCl, BrdU 1h nach t0	Perfusion 24h nach BrdU- Injektion
24h Diazepam/ Diazepam Kontrolle							5min vor t0 Diazepam, bei t0 MK801/0.9% NaCl, BrdU 1h nach t0	Perfusion 24h nach BrdU- Injektion

Tab. 1: Experimentalgruppen und Behandlungen

2.2.2 Injektionen

Den Versuchstieren wurde, wie dem Behandlungsplan der Tab. 1 zu entnehmen ist, jeweils 50 mg/kg Körpergewicht (KG) 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) intraperitoneal (i.p.) injiziert. Durch BrdU wird DNA in der S-Phase markiert. Der Arbeit von Nowakowski et al. (Nowakowski and Hayes 2000) folgend, besitzt BrdU, verglichen zu [³ H] Thymidin, gleichwertige Färbereigenschaften. Die Konzentration von 50 mg/kg KG BrdU wurde in Anlehnung an zahlreiche Vorstudien gewählt (Kempermann, Kuhn et al. 1997; Kempermann, Kuhn et al. 1997; Brandt, Jessberger et al. 2003; Filippov, Kronenberg et al. 2003; Steiner, Kronenberg et al. 2004).

Den Tieren der Experimentalgruppen (1h MK801, 24h MK801, 24h Diazepam, 24h Thalidomid und 4 Wochen MK801) wurde jeweils 1 mg/kg KG dizocilpine maleate (MK801, Sigma; Deutschland) in physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0.9%) i.p. gespritzt. MK801 ist ein nichtkompetitiver N-methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor-Antagonist. Vezzani et al. (Vezzani, Serafini et al. 1989) konnte zeigen, dass MK801 nach i.p.-Applikation bereits nach 10-30 min seine maximale Wirkungskonzentration im Gehirn erreicht und danach schnell wieder abgebaut wird.

α -Phthalimidoglutarimid (Thalidomid (+/- T144-1G, Sigma Aldrich; Deutschland)) wurde durch 0.5% Carboxymethylcellulose (niedrige Viskositätsklasse, Sigma Aldrich; Deutschland) mit 0.9%iger NaCl in Lösung gebracht. Diese Methode wurde in Anlehnung an die Arbeit von Rupnick et al. gewählt (Rupnick, Panigrahy et al. 2002). Die Tiere erhielten, ebenfalls Bezug nehmend auf diese Arbeit, der Tab. 1 folgend eine einmalige Injektion von 150 mg/kg KG Thalidomid i.p. pro Tag.

Diazepam (Ratiopharm; Deutschland) wurde nach Tab. 1 einmalig in der Dosierung 10 mg/kg KG i.p. appliziert. Verschiedene Studien wie die von Nixon et al. und Wang et al. (Nixon and Crews 2004; Wang, Zhou et al. 2005) haben gezeigt, dass Diazepam in dieser Dosierung ausreichend Krampfanfälle oder Erregung bei Versuchstieren kontrollieren kann.

2.3 Gewebepreparation

Die Tiere wurden am Ende des jeweiligen Experiments mit Ketamin i.p. final anästhesiert und transkardial perfundiert. Die Perfusion wurde mit Paraformaldehyd (PFA) in 4%iger Lösung mit 0.1 M Phosphatpuffer durchgeführt. Die Gehirne wurden dem Schädel entnommen, eine Nacht bei 4°C in 4%iger PFA-Lösung nachfixiert und am nächsten Tag in 30%iger Succroslösung eingelegt bis sie darin absanken. Von den Gehirnen wurden dann auf einem durch Trockeneis gekühlten Schneideschlitten (Leica, Bensheim; Deutschland) 40µm-dicke koronare Schnitte angefertigt und in eine kälteschützende Lösung (CPS) aus 25% Ethylenglycol, 25% Glycerin und 0.05 M Phosphatpuffer zur Lagerung bei -20 °C übertragen. Diese Methode der Präparation entspricht der zahlreicher Vorarbeiten (Brandt, Jessberger et al. 2003; Kempermann, Gast et al. 2003; Steiner, Kronenberg et al. 2004).

2.4 Immunofluoreszenz

Für die BrdU-Färbung im Rahmen der Immunofluoreszenzfärbung wurde die DNA durch die Behandlung der Schnitte mit 2N HCl für 30min bei 37°C denaturiert. Die Schnitte wurden dann in 0.1 M Boratpuffer (pH 8.5) gewaschen und danach ausgiebig mit Tris-gepufferter Kochsalzlösung gespült (TBS; pH 7.4). Primäre und sekundäre Antikörper wurden in TBS gelöst, dem 0.1% Triton X-100, 0.1% Tween 20 und 3%iges Esel-Serum zugesetzt worden war (sog. TBS-plus). Die Schnitte wurden mit dem Primärantikörper bei 4°C für 48h inkubiert, danach mit TBS und TBS-plus gewaschen und dann mit dem Sekundärantikörper in TBS-plus für 4h bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Schnitte nochmals mit TBS gewaschen und mit einem Gemisch aus Polyvinylalkohol und Diazabicyclo-octane (DABCO) auf Objektträgern eingedeckelt. Diese Methode entspricht ebenfalls der zahlreicher Vorarbeiten (Brandt, Jessberger et al. 2003; Kempermann, Gast et al. 2003; Steiner, Kronenberg et al. 2004).

Unsere Gruppen 1h Kontrolle, 1h MK801, 24h Kontrolle, 24h MK801, Diazepam Kontrolle, 24h Diazepam, Thalidomid Kontrolle sowie 24h Thalidomid wurden mit jeweils zwei Dreifach-Färbungen differenziert. Einerseits mit der Färbung BrdU/Nestin-

GFP/Doublecortin (DCX) und andererseits mit der Färbung BrdU/Nestin-GFP/Calretinin (CR). Die Langzeitgruppen (4 Wochen Kontrolle und 4 Wochen MK801) wurden durch die Färbungen mit BrdU/Nestin-GFP/S100 β und BrdU/Nestin-GFP/NeuN analysiert. Dabei war jeweils der Rotkanal durch BrdU, der Grünkanal durch Nestin-GFP und je nach Färbung der Blaukanal durch DCX, Calretinin, S100 β oder NeuN in der Immunofluoreszenz belegt.

Diese Färbungen wurden durchgeführt, um die Neurogenese in den verschiedenen Gruppen der Taxonomie von Kempermann et al. folgend (Kempermann, Jessberger et al. 2004), wie in der Einleitung beschrieben, darstellen zu können. Zusammenfassend ist in Tab. 2 eine Übersicht der wichtigsten Marker der verschiedenen neuronalen Reifungsstufen zu finden.

Marker der Immunofluoreszenz neuronaler und astrozytärer Entwicklung

Stufen neuronaler Reifung		BrdU	Nestin-GFP	DCX	Calretinin	NeuN	Calbindin	GFAP	S100 β
Typ-1 (Stammzelle)		+	+						
Typ-2	Typ-2a	+	+	-					
	Typ-2b	+	+	+					
Typ-3 (Neuroblasten)		+		+					
Typ-5 (postmitotisch)		+	+/-		+	+			
Typ-6 (terminal ausdifferenziert)		+					+		
Astrozyten		+						+	+

Tab. 2: Zusammenfassung wichtiger Marker der Immunofluoreszenz in der Differenzierung neuronaler und astrozytärer Reifungsstadien nach Kempermann et al. (Kempermann, Jessberger et al. 2004)

Legende Tab.2: +: Zelle ist positiv in der Färbung mit dem jeweiligen Marker der Immunofluoreszenz
 -: Zelle ist negativ in der Färbung mit dem jeweiligen Marker der Immunofluoreszenz

2.4.1 Primärantikörper

Für unser Experiment wurden folgende Primärantikörper und Antikörperkonzentrationen (in TBS-plus verdünnt) verwendet:

Anti-BrdU (Ratte, 1:500; Harlan Seralab), anti-GFP (Hase, 1:200; Acris), anti-GFP (Ziege, 1:200; Acris), anti-Calretinin (Ziege, 1:250; Chemicon), anti-Doublecortin (Ziege, 1:200; Santa Cruz Biotech), anti-NeuN (Maus, 1:100; Chemicon) und anti-S100 β (Hase, 1:2500; Swant).

2.4.2 Sekundärantikörper

Es wurden folgende Sekundärantikörper und Antikörperkonzentrationen (in TBS-plus verdünnt) in unserem Experiment verwendet:

Anti-Ratte Rhodamine X (rot), anti-Hase FITC (grün), anti-Schaf FITC (grün), anti-Maus Cy5 (blau), anti-Ziege Cy5 (blau) und anti-Hase Cy5 (blau).

Alle Antikörper wurden in einer Konzentration von 1:250 verwendet und von der Firma Jackson ImmunoResearch (vertrieben von Dianova) bezogen.

2.5 BrdU Immunohistochemie

Zur Vorbereitung auf die Immunohistochemie mit BrdU wurden die Schnitte mit 0.6% H₂O₂ vorbehandelt um endogene Gewebssperoxidasen zu blockieren. Danach wurden sie gewaschen und in 2N HCl für 30min bei 37°C behandelt. Anschließend wurden die Schnitte in 0.1 M Boratpuffer (pH 8.5) gespült, wie bereits unter 2.4 beschrieben. Die Schnitte wurden dann mit dem Primärantikörper anti-BrdU (Ratte, 1:500 (in TBS-plus); Biozol) über Nacht bei 4°C inkubiert, am nächsten Tag mit TBS und TBS-plus gespült und anschließend 2h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper anti-rat biotin SP (Esel, 1:250 (in TBS-plus); Dianova) inkubiert. ABC-Reagenz (Vectastatin Elite; Vector Laboratories) wurde für 1h vor Inkubation mit dem Sekundärantikörper in einer Dosierung von 9 μ l pro ml TBS-plus verabreicht. Diaminbenzidine (DAB, Sigma; Deutschland) wurde in einer Konzentration von 0.25 mg/ml in TBS mit 0.01% H₂O₂ und

0.04% Nickelchlorid zur Färbung eingesetzt. Diese Methode entspricht der zahlreicher Vorarbeiten (Kempermann, Gast et al. 2003; Steiner, Kronenberg et al. 2004).

2.6 Quantifizierung von BrdU+ Zellen

Von allen Tieren wurde eine eins-aus-sechs Serie (entnommene Schnittreihen sind somit 240µm voneinander entfernt) mit DAB gefärbt. BrdU+ Zellen wurden entlang des rostrocaudalen Verlaufs der Körnerzellschicht (GCL) des gesamten Hippocampus durchgezählt, wie es schon in verschiedenen Vorarbeiten beschrieben wurde (Filippov, Kronenberg et al. 2003; Kempermann, Gast et al. 2003; Steiner, Kronenberg et al. 2004). Die Resultate wurden mit 6 multipliziert um die geschätzte Gesamtzahl der BrdU+ Zellen im GCL zu erhalten.

2.7 Quantifizierung von 1-, 2- und 3-fach markierten BrdU+ Zellen in der Immunofluoreszenz

Eine eins-aus-zwölf Serie von hippocampalen Schnitten wurde jedem Tier entnommen und Dreifach-, wie unter 2.4 beschrieben, gefärbt. Fünfzig BrdU+ Zellen in der GCL wurden im Hinblick auf die Koexpression von BrdU mit glialen oder neuronalen Markern unter Verwendung eines konfokalen Laserscanmikroskops (Leica TCS SP2, Bensheim; Deutschland) analysiert. Der jeweilige Quotient der 1-, 2- oder 3-fach gefärbten Zellen wurde mit 2 multipliziert um den Anteil der Zellen auf 100% darzustellen. Anschließend wurden diese Verhältniswerte auf die Gesamtzahl der Zellen der verschiedenen Versuchsgruppen hochgerechnet. Alle Bilder wurden im sequentiellen Scanmodus aufgenommen und in Adobe Photoshop CS2 für Windows bearbeitet.

2.8 Verhaltensbeobachtung der Tiere mit dem modifizierten Krampfanfall-Score nach Racine und Golarai et al.

Für unser Experiment haben wir den Krampfanfall-Score nach Racine und Golarai et al. (Racine 1972; Golarai, Greenwood et al. 2001) verwendet und durch die Krampfanfallslatenz (Seizure latency; Zeit der Injektion bis zum Beginn der Erregung/des Krampfanfalls) erweitert. Der Score setzt sich aus 5 Anfallsklassen und dem sog. Status epilepticus zusammen (Golarai, Greenwood et al. 2001).

- I Tiere bewegen sich nicht mehr
- II Myoklonische Zuckungen von Kopf und Nacken, begleitet von kurzem Zucken der Vorder- und Hinterbeine
- III Unilaterale klonische Krampfaktivität
- IV Bilaterale tonisch-klonische Krampfaktivität der Vorderfüße
- V Generalisierte tonisch-klonische Krampfaktivität mit Aufbäumen und Verlust des Haltetonus.

Der sog. Status epilepticus ist hier durch länger als 5 Minuten anhaltende tonisch-klonische Krampfaktivität aller 4 Extremitäten definiert (Golarai, Greenwood et al. 2001). Die Verhaltensbeobachtung wurde von geschulten medizinischen Assistenten für eine Stunde nach der Injektion von MK801 in den Gruppen 24h Thalidomid, 24h Diazepam und in der Gruppe 4 Wochen MK801 (als Beispiel einer Gruppe mit MK801 ohne andere Einflüsse) durchgeführt. Die Tiere wurden einzeln in transparenten Käfigen beobachtet.

2.9 Statistik

Alle numerischen statistischen Analysen wurden mit SPSS 11.5.1 für Windows durchgeführt. Für alle Vergleiche wurden Varianzanalysen (ANOVA) durchgeführt, least-significant-difference (LSD) als post-hoc-Test wurde wenn möglich angewandt. Differenzen wurden ab einem $p < 0.05$ (einseitig) als statistisch signifikant bewertet. Im Falle der Auswertung der Anfallsklassen des Krampfanfall-Scores nach Racine und Golarai et al. wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Hier wurde ein Ergebnis ab einem $p < 0.025$ (zweiseitig) als statistisch signifikant bewertet.

2.10 Methodenkritik

2.10.1 BrdU als Proliferationsmarker

Ältere Studien über das Anfärbeverhalten von Neuronen wurden mit [³ H] Thymidin durchgeführt, welches in der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingefügt wurde. Mitotisch aktive Zellen konnten somit autoradiographisch identifiziert werden (Abrous, Koehl et al. 2005). Allerdings wird in neueren Arbeiten fast ausschließlich 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU), ein Thymidin-Analog, anstelle von [³ H] Thymidin verwendet (Nowakowski, Lewin et al. 1989). Dem Paper von Nowakowski et al. (Nowakowski and Hayes 2000) folgend besitzen beide Substanzen vergleichbar gute Färbeeigenschaften für mitotisch aktive Zellen. Weiterhin fällt BrdU durch vergleichbar niedrigere Kosten, schnellere Verarbeitung der Gehirnschnitte und die Möglichkeit der stereologischen Analyse auf (Abrous, Koehl et al. 2005). Allerdings ist die Zahl der durch BrdU markierten Zellen stark von der jeweiligen Applikationsform (oral, retroviral, intraperitoneal), der Anzahl der BrdU-Injektionen sowie der Zeit zwischen Applikation und der Perfusion der Tiere abhängig (Abrous, Koehl et al. 2005). Hierbei ist insbesondere erwähnenswert, dass in Bezug auf die orale und die retrovirale Applikationsform große Unsicherheit bezüglich der tatsächlich jeweils aufgenommenen Menge an BrdU des einzelnen Tieres herrscht. Weiterhin gestaltet sich die Auswertung der BrdU+ Zellen als sehr schwierig, wenn die Tiere in einer sehr kurzen Zeit nach einer BrdU-Applikation getötet werden, da die neuen Zellen/Neurone dann klein, irregulär geformt und stark geballt auftreten (Abrous, Koehl et al. 2005).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass BrdU ab einer Dosis von 150 mg/kg KG über 5 Tage neurotoxische Effekte auf ältere Ratten hat, welche zu Gewichtsverlust und Orientierungslosigkeit führen können (Drapeau, Mayo et al. 2003). Der Sachverhalt, dass BrdU teratogene Effekte aufweist (Kolb, Pedersen et al. 1999; Sekerkova, Ilijic et al. 2004) und der oben beschriebene neurotoxische Effekt, wirft natürlich das Problem auf, dass BrdU selbst die Funktion der markierten Zellen zu verändern scheint.

Ein weiteres Problem ist, dass wir mit einer einmaligen Dosis von 50 mg/kg KG BrdU (wie in unserem Experiment) nur einen Teil der neu gebildeten Zellen markieren können. Dies kann aufgrund der fehlenden Darstellung sich teilender, nicht-angefärbter Zellen zu einem ausbleibenden Effekt der Behandlung auf die Proliferation der Zellen führen, da er nicht entdeckt werden kann (Cameron and McKay 2001). Dieser Schwierigkeit kann durch mehrere Injektionen kleiner Dosen von BrdU Abhilfe geschaffen werden. Allerdings führen höhere Dosen an BrdU auch vermehrt zu Färbung apoptotischer und nicht-proliferierender Zellen, die DNA reparieren und können somit falsch positive Ergebnisse liefern (Grassi Zucconi and Giuditta 2002).

Um das Problem der Identifikation von neuronalen Progenitorzellen zu beseitigen, haben wir in unserem Experiment die C57BL6 nestin-gfp Maus verwendet. Hierbei handelt es sich um ein transgenes Mausmodell, bei dem in den Tieren durch regulatorische Veränderungen am Nestin-Gen vermehrt Nestin-GFP in neuronalen Progenitorzellen gebildet wird. Auf die Arbeiten von Yamaguchi et al. und Sawamoto et al. bezug nehmend (Yamaguchi, Saito et al. 2000; Sawamoto, Nakao et al. 2001) wird dadurch die Beobachtung von Neurogenese vereinfacht und führt zu reproduzierbareren Ergebnissen. Diese Verbesserung bezieht sich den Autoren folgend insbesondere auf die Erfassung von Veränderungen der Neurogenese in Reaktion auf verschiedenste Einflüsse. Nestin-GFP ist sehr spezifisch für die neurogenen Regionen des Gehirns (SVZ, RMS, OB, DG) und kann sehr einfach in neugebildeten Zellen nachgewiesen werden, weshalb dieses Tiermodell ein sehr wertvolles Instrument in der Beschreibung der Neurogenese darstellt (Yamaguchi, Saito et al. 2000; Sawamoto, Nakao et al. 2001).

2.10.2 Verhaltensbeobachtung mit dem modifizierten Krampfanfall-Score nach Racine und Golarai et al.

Wir haben in unserem Experiment den Krampfanfall-Score von Racine und Golarai et al. (Racine 1972; Golarai, Greenwood et al. 2001) verwendet und durch die sog. Anfallslatenz (Seizure latency; Zeit der Injektion bis zum Beginn der Erregung/des Krampfanfalls) ergänzt. Durch dieses Monitoring wollten wir die Unterschiede auf Verhaltensebene zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen dokumentieren. Dieser Beobachtungsscore stellt in der Messung von Krampfanfällen eine Standardmethode dar (Golarai, Greenwood et al. 2001). Allerdings bleiben wir in dieser Arbeit den Beweis schuldig, dass die Injektion von MK801 Krampfanfälle im klassischen Sinne auslöst. Dennoch zeigen zahlreiche Arbeiten (Feinberg, Campbell et al. 1995; Mastropalo, Rosse et al. 2004), dass es unter MK801 zu spike-wave Aktivität im EEG und einem lebhaft-agitierten Verhalten in Versuchstieren kommt. Diese Verhaltensänderung zeigte sich auch bei unseren Versuchstieren deutlich. Da wir in unserem Experiment durch die Behandlung mit Diazepam, als etablierte Substanz zur Kontrolle von Krampfanfällen und Erregung, deutliche Effekte auf die durch MK801 induzierte Erregung beobachtet haben, sehen wir trotz des ausstehenden Beweises von Krampfaktivität im EEG bei unseren Versuchstieren dieses Beobachtungsinstrument als gerechtfertigt an.

2.10.3 Lösung von Thalidomid in 0.9%iger Kochsalzlösung

Wir haben in Anlehnung an die Arbeit von Rupnick et al. (Rupnick, Panigrahy et al. 2002) 10 Tiere mit Thalidomid in einer Konzentration von 150 mg/kg KG i.p. pro Tag über eine Woche vorbehandelt. Allerdings gestaltete sich die Lösung von Thalidomid (von Natur aus hydrophob), dass in unserem Versuch mit 0.5%iger Carboxymethylcellulose (niedrige Viskositätsklasse) mit 0.9%iger NaCl in Lösung gebracht wurde als problematisch, da zumeist keine vollständige Auflösung des Thalidomid durch die Carboxymethylcellulose zu erreichen war. Dieses Problem könnte den Versuch insofern beeinflussen, als dass die tatsächliche Dosierung der täglichen applizierten Menge an Thalidomid nicht exakt abgeschätzt werden kann. Es wäre sicherlich Gegenstand folgender Experimente Thalidomid optimaler in Lösung zu bringen um Dosis-Wirkungsaussagen exakter treffen zu können.

3 Ergebnisse

3.1 Versuch 1:

Beschreibung der Ergebnisse in den Gruppen 1h, 24h und 4 Wochen mit und ohne MK801

In unserem ersten Experiment haben wir die Effekte von MK801 auf die Neubildung von Zellen im Gyrus dentatus (DG) des Hippocampus der C57BL6 nestin-GFP Maus (Yamaguchi, Saito et al. 2000) untersucht. Wir haben dabei den hoch-akuten (nach 1h), akuten (nach 24h) und den Langzeiteffekt (nach 4 Wochen) von MK801 auf die Neurogenese untersucht und durch Färbungen analysiert (siehe Abschnitt 2.4). Der detaillierte Versuchsablauf kann der Tab. 1 im Abschnitt Material und Methoden entnommen werden.

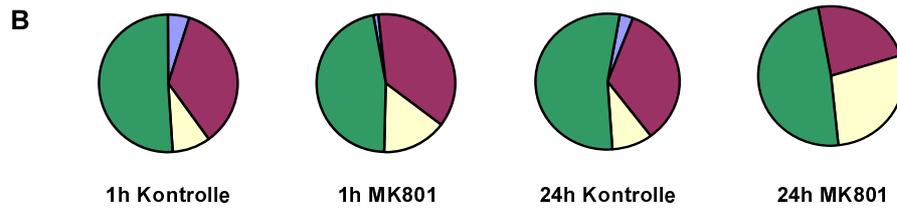
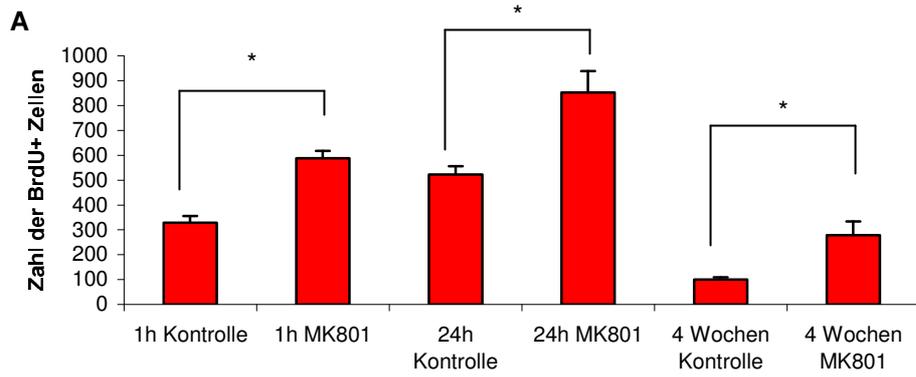
3.1.1 MK801 führt zu mehr BrdU+ Zellen

Die grafische Darstellung der Daten dieses Abschnitts ist in Abb. 2 (A) zu finden.

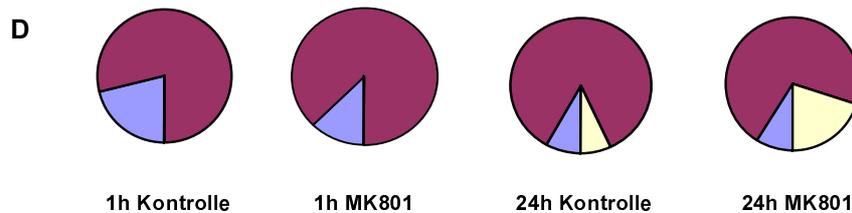
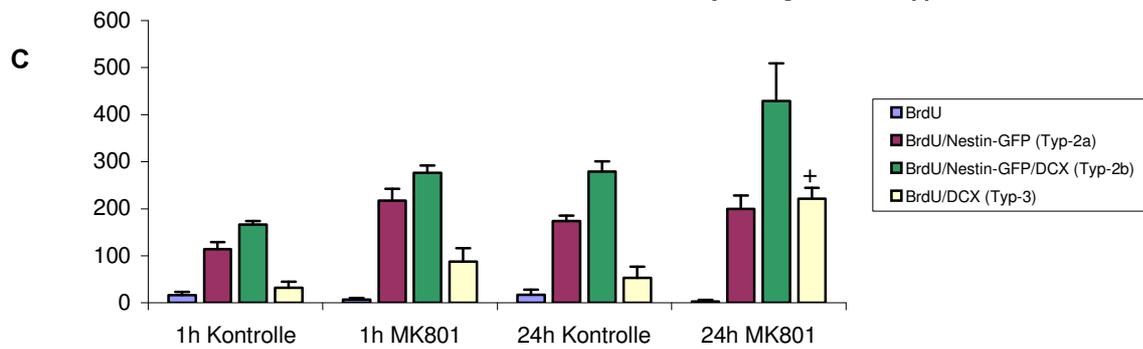
BrdU+ Zellen waren in der Gruppe 1h MK801 (588 ± 66) signifikant um 78% erhöht im Vergleich zur 1h Kontrollgruppe (329 ± 65) ($p < 0.004^*$). Ebenso konnten wir eine Erhöhung der Zellzahl um 63% in der Gruppe 24h MK801 (853 ± 191) verglichen mit der 24h Kontrolle (523 ± 76) ($p < 0.000^*$) feststellen. Abb. 6 (M+N) zeigt im Vergleich der Gruppen 1h Kontrolle und 24h MK801 eine native Färbung mit BrdU (DAB).

In den 4 Wochen Gruppen kam es insgesamt gesehen zu einer Abnahme der absoluten Zellzahl. Dennoch konnten wir einen signifikanten Anstieg der Zellzahl in der Gruppe 4 Wochen MK801 (278 ± 128) beobachten verglichen mit der 4 Wochen Kontrolle (100 ± 21) ($p < 0.042^*$). Dies entspricht einer Steigerung der Zahl der BrdU+ Zellen um 178% in der Versuchsgruppe 4 Wochen MK801.

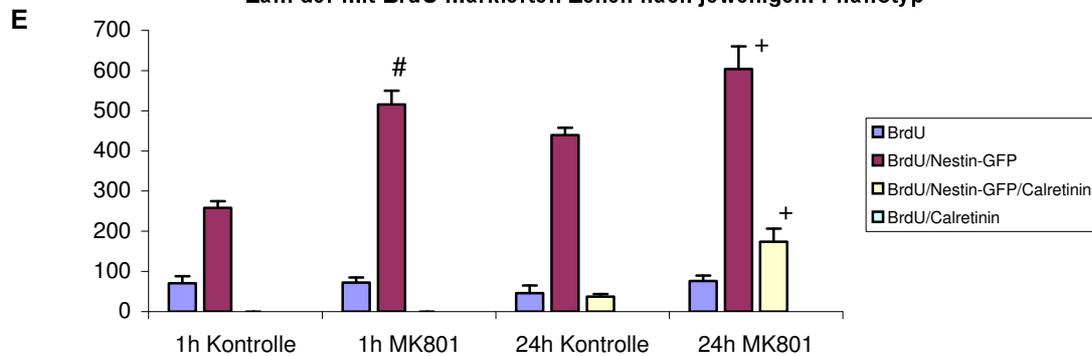
Zusammenfassend stellen wir fest, dass MK801 zu einem deutlichen Anstieg der Zellzahl in den Versuchsgruppen unseres Experiments geführt hat, ein Effekt der selbst noch nach 4 Wochen nachweisbar ist.



Zahl der mit BrdU-markierten Zellen nach jeweiligem Phänotyp



Zahl der mit BrdU-markierten Zellen nach jeweiligem Phänotyp



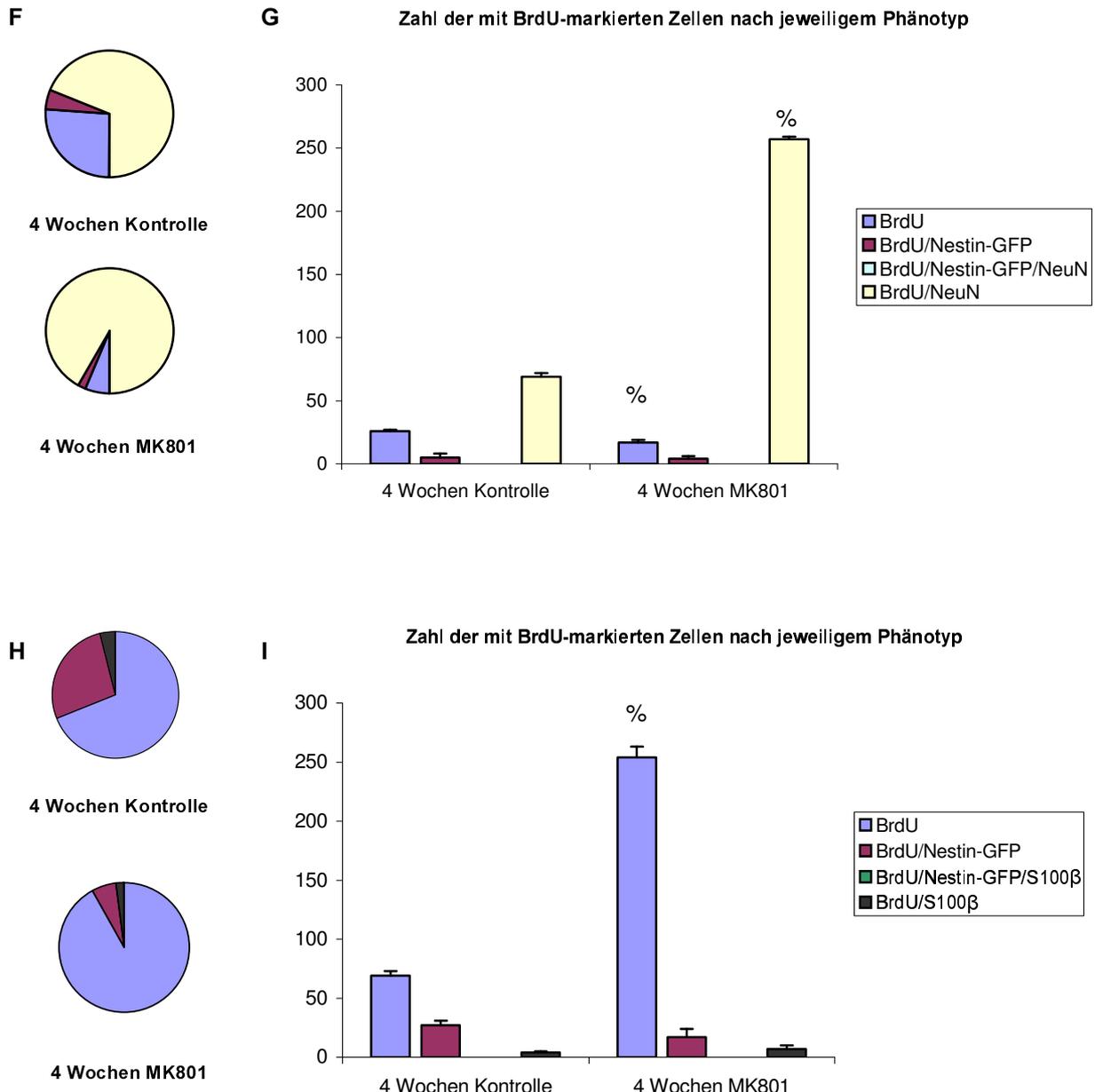


Abb. 2:

Darstellung der Relativ- und Absolutdaten in den Gruppen 1h, 24h und 4 Wochen (A-I)

Bei den Gruppen zu den Zeitpunkten 1h und 24h wurden die Daten der Färbung mit BrdU (DAB), BrdU/Nestin-GFP/DCX und BrdU/Nestin-GFP/Calretinin dargestellt; bei den 4 Wochen Gruppen die Färbungen mit BrdU (DAB), BrdU/Nestin-GFP/NeuN und BrdU/Nestin-GFP/S100β. B., D., F und H zeigen relative Daten; A., C., E., G und I absolute Daten.

Die Farblegende der relativen und absoluten Daten entsprechen sich und ist immer bei den Absolutdaten dargestellt.

Legende Abb. 2: * : signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen
 # : signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe und **1h Kontrolle**
 + : signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe und **24h Kontrolle**
 % : signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe und **4 Wochen Kontrolle**

3.1.2 MK801 führt zu mehr Zellen mit einem höheren Reifungsgrad

Die grafische Darstellung der nachfolgend beschriebenen Daten sind in Abb. 2 (B-E) zu finden.

Unser relatives Resultat der Färbung mit Calretinin wies eine Erhöhung der Typ-2 Zellfraktion in der Gruppe 1h MK801 ($88\% \pm 5$) verglichen mit der 1h Kontrolle ($79\% \pm 8$) ($p < 0.14$) auf. Die Färbung dieser beiden Gruppen mit Calretinin wird in Abb. 6 (C+D) gezeigt. Die DCX-Färbung zeigte in den relativen Daten ebenfalls eine Erhöhung der Typ-3 Fraktion in der 1h MK801 Gruppe ($15\% \pm 11$) im Vergleich zur 1h Kontrolle ($9\% \pm 7$) ($p < 0.28$). Eine Illustration dieses Ergebnisses zeigt die Abb. 6 (A+B). Die absoluten Ergebnisse deuten in die gleiche Richtung im Sinne einer signifikanten Steigerung der Typ-2 Zellen (in der Färbung mit Calretinin) in der Gruppe 1h MK801 (516 ± 77) gegen die Kontrolle (257 ± 38) ($p < 0.000^*$). In den absoluten Zahlen der DCX-Färbung beobachteten wir eine Steigerung der Typ-2a (217 ± 56 vs. 114 ± 33 ; $p < 0.011^*$), Typ-2b (277 ± 36 vs. 167 ± 16 ; $p < 0.17$) und Typ-3 Zellen (88 ± 63 vs. 32 ± 30 ; $p < 0.17$) in der 1h MK801 Gruppe jeweils verglichen mit der Kontrolle.

Die Gruppe 24h MK801 zeigte in den relativen Daten der DCX-Färbung eine Steigerung der Typ-3 Zellfraktion verglichen mit der 24h Kontrolle ($28\% \pm 11$ vs. $9\% \pm 9$; $p < 0.002^*$). Abb. 6 (E-F) zeigt einen Vergleich dieser Gruppen in der Färbung mit DCX. In der Calretinin-Färbung war eine Steigerung des relativen Anteils der BrdU/Nestin-GFP/Calretinin+ Zellen in der Gruppe 24h MK801 ($20\% \pm 7$) verglichen mit der Kontrolle ($7\% \pm 3$) ($p < 0.000^*$) festzustellen. Diese Färbung ist in Abb. 6 (G+H) illustriert. In den Absolutzahlen zeigte sich das gleiche Bild: Die DCX-Färbung zeigte eine Steigerung der Zellzahl des Typs-2b (428 ± 179 vs. 279 ± 50 ; $p < 0.059$) und des Typs-3 (221 ± 52 vs. 53 ± 53 ; $p < 0.000^*$) in der Gruppe 24h MK801 (verglichen mit der Kontrolle). In der zweiten Färbung mit Calretinin war ein Anstieg der Zellen des Typs-2 (604 ± 125 vs. 440 ± 39 ; $p < 0.006^*$) und der BrdU/Nestin-GFP/Calretinin+ Zellen (174 ± 71 vs. 37 ± 16 ; $p < 0.000^*$) in der 24h MK801 Gruppe (gegen die Kontrolle) zu beobachten.

Wir haben, um auch den Experimenten mit Diazepam und Thalidomid vorzugreifen, keine Färbung von BrdU allein mit Calretinin ohne Koexpression von Nestin-GFP beobachten können, da unser längster Untersuchungszeitpunkt mit dieser Färbung bei 24h lag. Der Arbeit von Corish et al. folgend (Corish and Tyler-Smith 1999), liegt die geschätzte HWZ von GFP bei 26h. Weitere Arbeiten (Brandt, Jessberger et al. 2003;

Kempermann, Jessberger et al. 2004; Steiner, Kronenberg et al. 2004) beschreiben, dass diese Überlappung jedoch nicht länger als 2 bis 3 Tage bestehen bleibt.

Zusammenfassend stellen wir fest, dass die Erhöhung der Zellzahl durch MK801 in den Gruppen 1h und 24h zu vergleichsweise höheren Reifungsgraden der neuronalen Vorläuferzellen führt. Dies zeigt sich in den 1h Gruppen überwiegend tendenziell und in den 24h Gruppen durch signifikante Unterschiede.

3.1.3 MK801 führt zu mehr überlebenden Neuronen im Langzeitversuch, zeigt aber keinen beobachtbaren Langzeiteffekt auf die Neubildung reifer Astrozyten

Die grafische Darstellung dieser Daten ist in Abb. 2 (F-I) zu finden.

Die Färbung mit NeuN wies in der relativen Datenlage eine Steigerung der BrdU/NeuN+ Zellfraktion in der Gruppe 4 Wochen MK801 ($92\% \pm 2$) verglichen zur 4 Wochen Kontrolle ($69\% \pm 7$) ($p < 0.000^*$) auf. Dies ist in Abb. 6 (K+L) illustriert. Die absoluten Daten zeigen im Einklang dazu ebenso signifikant mehr BrdU/NeuN+ Zellen in der Gruppe 4 Wochen MK801 (257 ± 5) verglichen zur Kontrolle (69 ± 7) ($p < 0.000^*$).

Wir können daraus konkret ableiten, dass in den relativen und absoluten Daten ein Langzeiteffekt von MK801, der zu mehr überlebenden Neuronen nach 4 Wochen führt, sichtbar ist.

Die Färbung mit S100 β zeigte nach 4 Wochen weder in den relativen Daten (4 Wochen MK801: $2\% \pm 3$ vs. 4 Wochen Kontrolle: $4\% \pm 2$; $p < 0.31$) noch in den absoluten Daten (4 Wochen MK801: 7 ± 7 vs. 4 Wochen Kontrolle: 4 ± 2 ; $p < 0.43$) einen signifikanten Unterschied bezüglich BrdU/S100 β + Zellen im Vergleich beider 4 Wochen Gruppen. In der Abb. 6 (I+J) ist ein Vergleich dieser Gruppen in der Färbung mit S100 β illustriert.

Wir folgern daraus, dass MK801 keinen beobachtbaren Langzeiteffekt auf die Neubildung von Astrozyten nach 4 Wochen hat.

3.2 Versuch 2:

Beschreibung der Ergebnisse in den Versuchsgruppen Diazepam mit und ohne MK801

In unserem zweiten Experiment wollten wir herausfinden, ob es möglich ist, den Effekt von MK801 auf die Neurogenese nach 24h durch das gabaerge System zu modulieren. Dies wurde durch die Injektion von Diazepam realisiert, welches die hemmende Wirkung von γ -Aminobuttersäure (GABA) am Rezeptor verstärkt, und somit einen GABA-Synergisten darstellt. Die Zellen wurden mit den gleichen Färbungen differenziert wie in unserem ersten Experiment (siehe Abschnitt 2.4). Der detaillierte Versuchsablauf kann der Tab. 1 im Abschnitt Material und Methoden entnommen werden.

3.2.1 Diazepam führt zu mehr BrdU+ Zellen, jedoch führt MK801 in Kombination mit Diazepam zu keinem signifikanten Anstieg der Zellzahl

Die diskutierten Daten können der Abb. 3 (A) entnommen werden.

Im Vergleich der Diazepam Kontrolle (845 ± 84) mit der 24h Kontrollgruppe (523 ± 76), konnten wir beobachten, dass Diazepam zu einer signifikant höheren Zahl von BrdU+ Zellen führt ($p < 0.001^*$). Wenn wir nun die Gruppe 24h Diazepam (984 ± 113) mit deren Kontrolle (845 ± 84) vergleichen ($p < 0.11$), können wir keine signifikante Erhöhung der Zellzahl durch MK801 in der Experimentalgruppe (24h Diazepam) feststellen.

Wir folgern daraus, dass Diazepam zwar selbst zu einer Erhöhung der BrdU+ Zellen führt, dennoch kommt es hier durch den Einfluss von MK801 nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Zellzahl in der Gruppe 24h Diazepam.

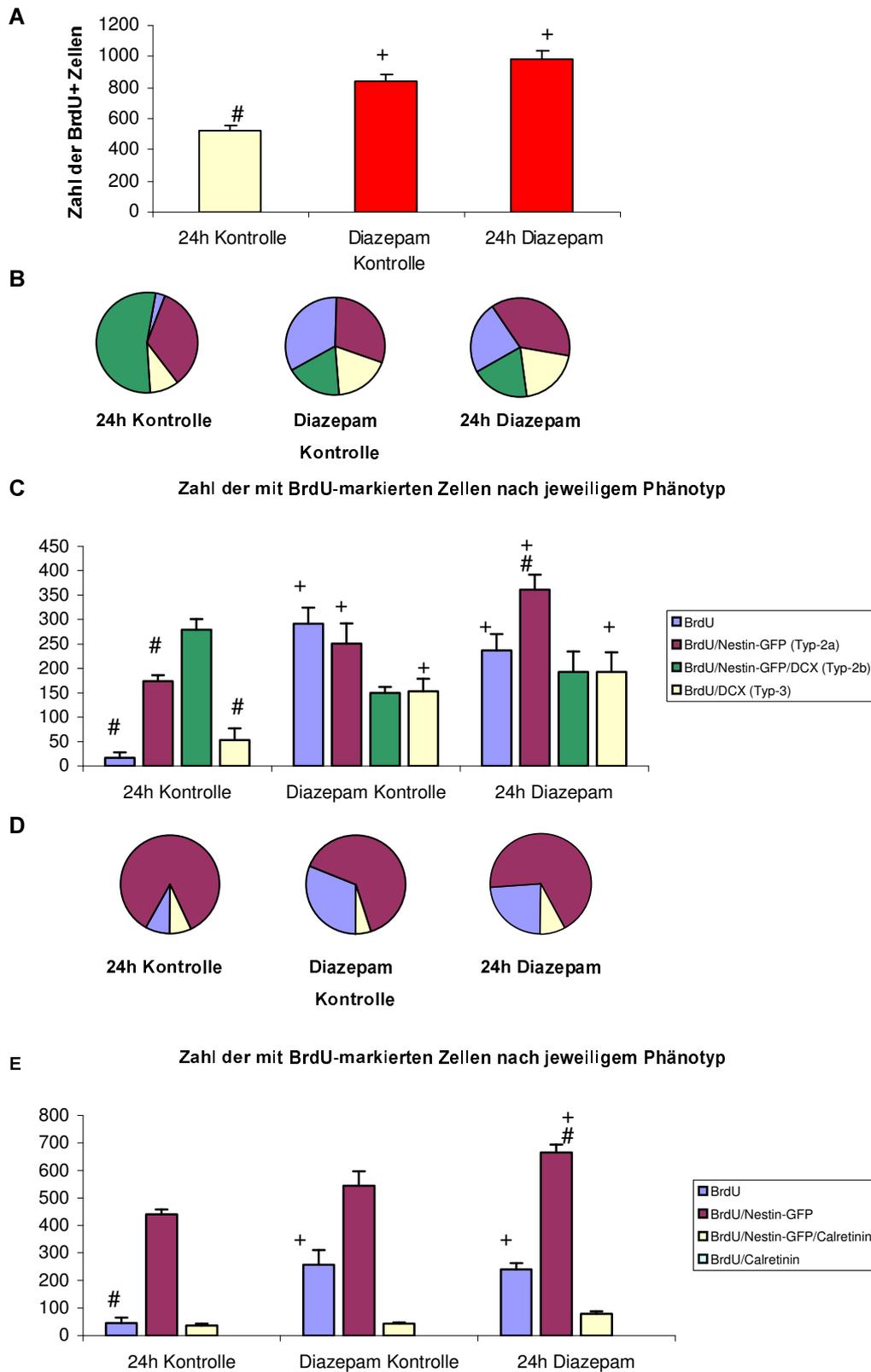


Abb. 3:

Darstellung der Relativ- und Absolutdaten in den Gruppen mit Diazepam (A-E)

Bei den Gruppen mit Diazepam wurden die Daten der Färbungen mit BrdU (DAB), BrdU/Nestin-GFP/DCX und BrdU/Nestin-GFP/Calretinin dargestellt. B und D zeigen relative Daten; A, C und E absolute Daten.

Die Farblegende der relativen und absoluten Daten entsprechen sich und ist immer bei den Absolutdaten dargestellt.

Legende Abb. 3: # : signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe und **Diazepam Kontrolle**
 + : signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe und **24h Kontrolle**

3.2.2 Neurogenese durch Diazepam führt nicht zu Zellen mit einem höheren Reifungsgrad

Die grafische Darstellung der Daten ist in Abb. 3 (B-E) zu finden.

Die Färbung mit DCX erbrachte in der relativen Datenlage keinen signifikanten Unterschied im Anteil der Typ-3 Zellen in der Gruppe Diazepam Kontrolle ($18\% \pm 6$) verglichen zu der 24h Kontrolle ($9\% \pm 9$) ($p < 0.12$). Eine Darstellung dieser Gruppen in der Färbung mit DCX ist in Abb. 6 (E; 24h Kontrolle) und Abb. 7 (a; Diazepam Kontrolle) zu finden. Ebenso war kein signifikanter Unterschied bezüglich der Fraktion von BrdU/Nestin-GFP/Calretinin+ Zellen im Vergleich der Gruppen Diazepam Kontrolle ($5\% \pm 1$) und 24h Kontrolle ($7\% \pm 3$) zu beobachten ($p < 0.4$). Diese Gruppen sind in Abb. 6 (G; 24h Kontrolle) und Abb. 7 (c+c'; Diazepam Kontrolle) illustriert.

In den absoluten Zahlen zeigte sich in der DCX-Färbung eine höhere Anzahl von Typ-3 Zellen in der Diazepam Kontrolle (153 ± 58) vs. 24h Kontrolle (53 ± 53) ($p < 0.018^*$), in der zweiten Färbung mit Calretinin zeigte sich allerdings kein Unterschied im Anteil der BrdU/Nestin-GFP/Calretinin+ Zellen (Diazepam Kontrolle: 44 ± 9 vs. 24h Kontrolle: 37 ± 16 ; $p < 0.765$). Den signifikanten Unterschied der Typ-3 Zellen in den absoluten Daten zwischen diesen Gruppen erklären wir in diesem Zusammenhang damit, dass die Diazepam Kontrollgruppe hier schon a priori über fast die doppelte Anzahl an Zellen im Vergleich mit der 24h Kontrollgruppe verfügt.

Zusammengefasst bedeutet dies, dass die BrdU+ Zellen, die durch die Applikation von Diazepam entstehen, sich nicht aus Zellen mit einem höheren Reifungsgrad zusammensetzen (wie wir in unserem ersten Experiment unter dem alleinigen Einfluss von MK801 beobachtet haben), sondern vorwiegend aus Progenitorzellen vom Typ-2, Typ-2a und BrdU+ Zellen ohne weitere gliale oder neuronale Marker.

3.2.3 MK801 führt in der Experimentalgruppe mit Diazepam nicht zu Zellen mit einem höheren Reifungsgrad

Die grafische Darstellung dieser Daten ist in Abb. 3 (B-E) zu finden.

Die erste Färbung mit DCX ergab im relativen Datenbild in Betrachtung der Typ-3 Zellen keinen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe 24h Diazepam ($20\% \pm 9$) und der Diazepam Kontrolle ($18\% \pm 6$) ($p < 0.77$). Einen Vergleich dieser Gruppen zeigt die Abb. 7 (a-b'). Ein ähnliches Ergebnis zeigt sich relativ in der Calretinin-Färbung bezüglich der BrdU/Nestin-GFP/Calretinin+ Zellen (24h Diazepam: $8\% \pm 2$ vs. Diazepam Kontrolle: $5\% \pm 1$; $p < 0.24$), dies kann in Abb. 7 (c-d') nachvollzogen werden. Die Absolutdaten sind hier deckungsgleich in Betrachtung der Typ-3 (24h Diazepam: 193 ± 90 vs. Diazepam Kontrolle: 153 ± 58 ; $p < 0.32$) sowie der BrdU/Nestin-GFP/Calretinin+ Zellen (24h Diazepam: 79 ± 20 vs. Diazepam Kontrolle: 44 ± 9 ; $p < 0.16$).

Wir stellen fest, dass der Effekt von MK801, eine Verschiebung zu höheren Stadien der Reifung in den Zellen zu induzieren, durch das gabaerge System (durch die Applikation von Diazepam) verhindert werden kann.

3.3 Versuch 3:

Beschreibung der Ergebnisse in den Versuchsgruppen Thalidomid mit und ohne MK801

Unser drittes Experiment befasste sich mit der Frage, ob durch die Behandlung mit Thalidomid eine Modulation der Neurogenese durch MK801 zu erreichen ist. Die Zellen wurden mit den gleichen Färbungen differenziert wie in unseren vorausgegangenen Experimenten (siehe Abschnitt 2.4). Der detaillierte Versuchsablauf kann der Tab. 1 des Abschnitts Material und Methoden entnommen werden.

3.3.1 Thalidomid führt zu mehr BrdU+ Zellen

Die Darstellung der diskutierten Daten ist in der Abb. 4 (A) zu finden.

Im Vergleich der Gruppe Thalidomid Kontrolle (992 ± 75) mit der Gruppe 24h Kontrolle (523 ± 76) ($p < 0.000^*$) können wir einen signifikanten Anstieg der BrdU+ Zellen zugunsten der Thalidomid Kontrollgruppe um 90% feststellen. Zudem war eine signifikante Steigerung der Zellzahl im Vergleich der Gruppen 24h Thalidomid (1427 ± 297) und dessen Kontrolle (992 ± 75 ; $p < 0.000$) um 44% zu sehen.

Dies bedeutet, dass Thalidomid selbst zu einer Steigerung der BrdU+ Zellen führt. Weiterhin führt die Kombination von Thalidomid mit MK801 nochmals zu einer deutlichen Zunahme der Zahl von BrdU+ Zellen.

3.3.2 Thalidomid führt zu mehr Zellen mit einem höheren Reifungsgrad

Die grafische Darstellung dieser Daten ist in Abb. 4 (B-E) zu finden.

Die Färbung mit DCX zeigt konsistent in der relativen (Thalidomid Kontrolle: $34\% \pm 10$ vs. 24h Kontrolle: $9\% \pm 9$; $p < 0.000^*$) sowie absoluten Datenlage (Thalidomid Kontrolle: 336 ± 76 vs. 24h Kontrolle: 53 ± 53 ; $p < 0.000^*$), dass Thalidomid zu einem signifikant höheren Anteil von Typ-3 Zellen führt. Diese Gruppen sind in der Färbung mit DCX in Abb. 6 (E; 24h Kontrolle) und Abb. 7 (e; Thalidomid Kontrolle) illustriert.

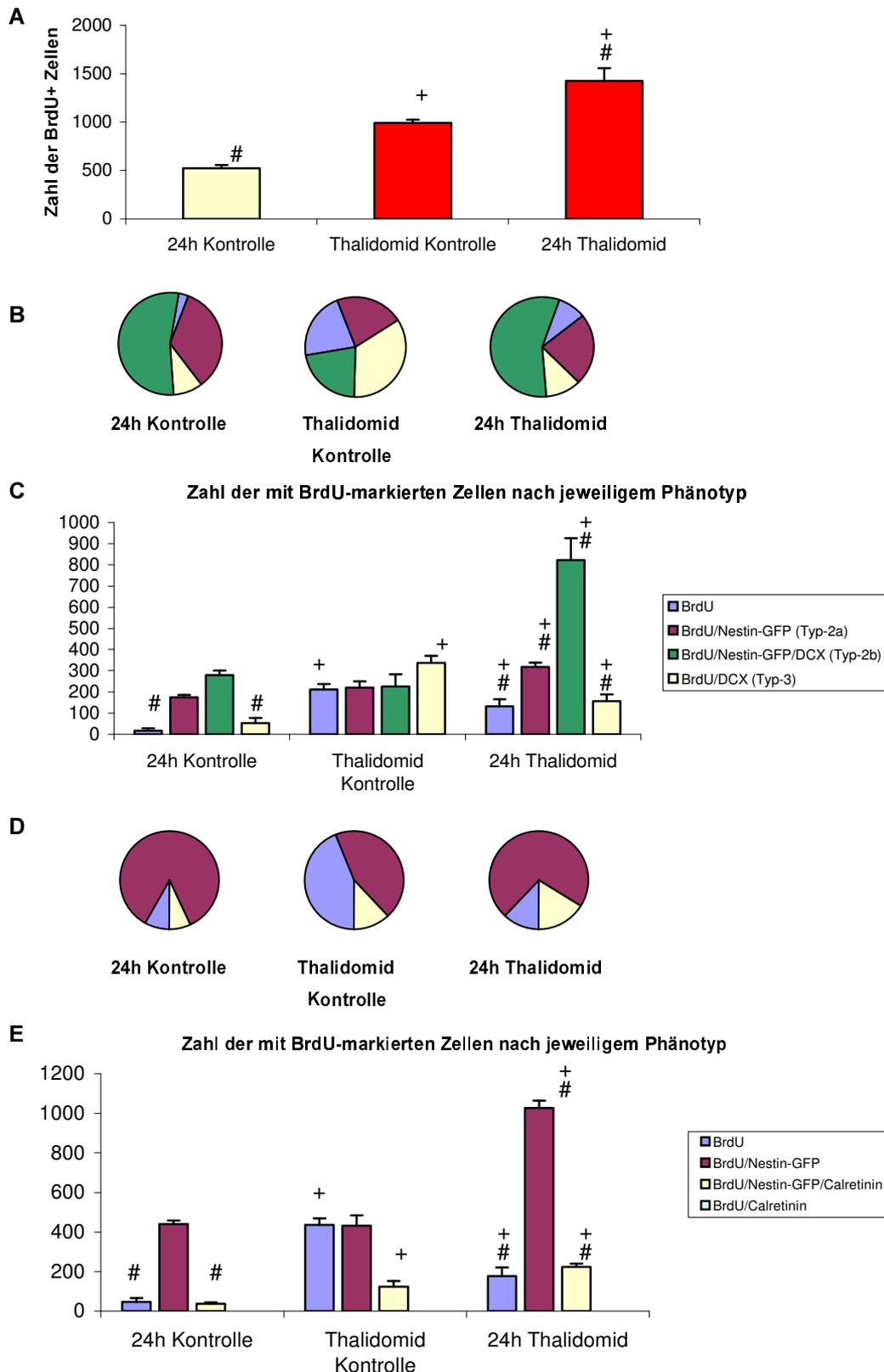


Abb. 4:

Darstellung der Relativ- und Absolutdaten in den Gruppen mit Thalidomid (A-E)

Bei den Gruppen mit Thalidomid wurden die Daten der Färbungen mit BrdU (DAB), BrdU/Nestin-GFP/DCX und BrdU/Nestin-GFP/Calretinin dargestellt. B und D zeigen relative Daten; A, C und E absolute Daten. Die Farblegende der relativen und absoluten Daten entsprechen sich und ist immer bei den Absolutdaten dargestellt.

Legende Abb. 4: # : signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe und **Thalidomid Kontrolle**
 + : signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe und **24h Kontrolle**

Ähnliches beobachteten wir bezüglich der BrdU/Nestin-GFP/Calretinin+ Zellen in der Färbung mit Calretinin relativ (Thalidomid Kontrolle: $12\% \pm 7$ vs. 24h Kontrolle: $7\% \pm 3$; $p < 0.032^*$) und absolut (Thalidomid Kontrolle: 123 ± 65 vs. 24h Kontrolle: 37 ± 16 ; $p < 0.001^*$) zugunsten der Thalidomid Kontrollgruppe. Der Vergleich dieser Gruppen in der Färbung mit CR kann in Abb. 6 (G; 24h Kontrolle) und Abb. 7 (g; Thalidomid Kontrolle) gesehen werden.

Thalidomid selbst führt unserer Beobachtung nach zu einem höheren Reifungsgrad der neu gebildeten neuronalen Zellen.

3.3.3 Thalidomid führt in Kombination mit MK801 zu einem starken Anstieg der Progenitorzellen

Die grafische Darstellung der Daten ist in Abb. 4 (B-E) zu finden.

Die DCX-Färbung zeigte eine Steigerung der Typ-2b Zellfraktion im relativen (24h Thalidomid: $57\% \pm 8$ vs. Thalidomid Kontrolle: $22\% \pm 11$; $p < 0.000^*$) und absoluten Datenbild (24h Thalidomid: 822 ± 233 vs. Thalidomid Kontrolle: 225 ± 130 ; $p < 0.000^*$) zugunsten der Gruppe 24h Thalidomid. Ebenso zeigte die Färbung mit Calretinin (CR) eine Steigerung der Typ-2 Fraktion in den relativen (24h Thalidomid: $72\% \pm 6$ vs. Thalidomid Kontrolle: $44\% \pm 12$; $p < 0.000^*$) und den absoluten Daten (24h Thalidomid: 1028 ± 81 vs. Thalidomid Kontrolle: 432 ± 117 ; $p < 0.000^*$). Bei der Fraktion der BrdU/GFP-Nestin/Calretinin+ Zellen war relativ (24h Thalidomid: $16\% \pm 3$ vs. Thalidomid Kontrolle: $12\% \pm 7$; $p < 0.178$) und absolut (24h Thalidomid: 223 ± 37 vs. Thalidomid Kontrolle: 123 ± 65 ; $p < 0.000^*$) ebenfalls eine signifikante Steigerung zugunsten der Gruppe 24h Thalidomid zu beobachten.

Kontrovers dazu zeigte die Färbung mit DCX bezüglich der Typ-3 Zellen eine Abnahme dieser Zellen relativ (24h Thalidomid: $11\% \pm 5$ vs. Thalidomid Kontrolle: $34\% \pm 10$; $p < 0.000^*$) und absolut (24h Thalidomid: 156 ± 71 vs. Thalidomid Kontrolle: 336 ± 76 ; $p < 0.000^*$) in der Gruppe 24h Thalidomid. Die Färbung dieser beiden Gruppen mit DCX ist in Abb. 7 (e+f), die mit CR in Abb. 7 (g+h) illustriert.

Wir können zusammenfassend feststellen, dass Thalidomid in Kombination mit MK801 zu einem starken Anstieg vor allem der Progenitorzellen (Typ-2, Typ-2b Zellen) führt. Die Ergebnisse bezüglich reiferer neuronaler Stadien sind uneinheitlich mit einem Abfall

der Typ-3 und einem Anstieg der BrdU/Nestin-GFP/Calretinin+ Zellen in der Gruppe 24h Thalidomid.

3.4 Verhaltensbeobachtung mit dem modifizierten Krampfanfall-Score nach Racine und Golarai et al.

Für unser Experiment haben wir den Krampfanfall-Score von Racine und Golarai et al. (Racine 1972; Golarai, Greenwood et al. 2001) verwendet und durch die Anfallslatenz (Zeit der Injektion bis zum Beginn der Erregung) erweitert. Die Daten der Anfallslatenz in den verschiedenen Gruppen sind in Abb. 5 illustriert.

In der Gruppe mit MK801 allein ergab die Verhaltensbeobachtung einen Median der Anfallsklasse von V (alle Tiere wurden in die Klasse V eingestuft) und eine durchschnittliche Anfallslatenz von 142 Sekunden (s). Auf der anderen Seite zeigte sich in der Diazepam Versuchsgruppe (24h Diazepam) ein Median der Anfallsklasse von I (3 Tiere in I, 2 in Klasse II eingestuft) und eine durchschnittliche Latenz von 372s. Die Thalidomid Versuchsgruppe (24h Thalidomid) zeigte hier, wie auch die Gruppe MK801 allein, einen Median der Anfallsklasse von V (3 Tiere wurden in V eingestuft), allerdings wurde hier ein Tier in Klasse III und eines in Klasse IV eingestuft. Die Latenz betrug hier im Durchschnitt 311s.

Wir folgern aus dieser Verhaltensbeobachtung, dass Diazepam und somit die verstärkte Aktivierung des gabaergen Systems die Reaktion der Tiere auf MK801 entscheidend verändern kann. Der Mann-Whitney-U-Test zeigte im Vergleich von 24h Diazepam und MK801 allein einen signifikanten Unterschied die Anfallsklasse betreffend ($p < 0.005^*$; zweiseitig). Außerdem konnte durch Diazepam die Anfallslatenz um das 2 ½ fache verlängert werden ($p < 0.005^*$).

Ebenfalls konnten wir bei Thalidomid eine Veränderung der Reaktion der Tiere auf MK801 feststellen. In dieser Gruppe wurden zwei Tiere niedriger als Anfallsklasse V eingestuft. Hier ergab der Mann-Whitney-U-Test (24h Thalidomid vs. MK801 allein) allerdings keinen signifikanten Unterschied ($p < 0.136$; zweiseitig). Dennoch konnte durch Thalidomid die Anfallslatenz im Vergleich zur Gruppe MK801 allein nahezu verdoppelt werden ($p < 0.033^*$).

Der Mann-Whitney-U-Test zeigte zwischen den Gruppen 24h Diazepam und 24h Thalidomid ebenfalls einen signifikanten Unterschied bezüglich der Anfallsklasse ($p < 0.007^*$; zweiseitig). Allerdings konnten wir in Bezug auf die Anfallslatenz im Vergleich dieser Gruppen keinen signifikanten Unterschied feststellen ($p < 0.349$).

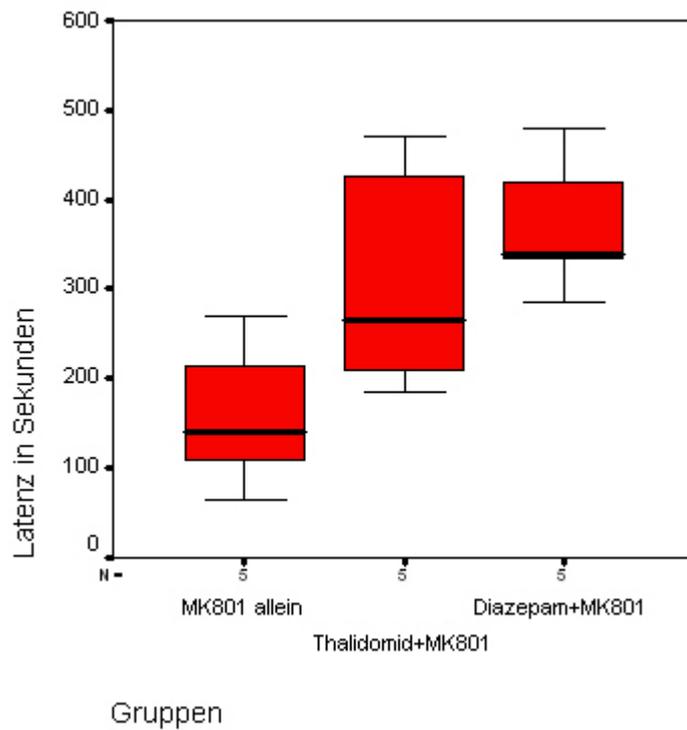


Abb. 5:

Darstellung der Anfallslatenz des modifizierten Krampfanfall-Scores nach Racine und Golarai et al.

Dargestellt wurden die Anfallslatenz (Zeit der Injektion bis zum Beginn der Erregung in Sekunden) als Boxplot in den Gruppen mit MK801 allein, Thalidomid+MK801 und Diazepam+MK801

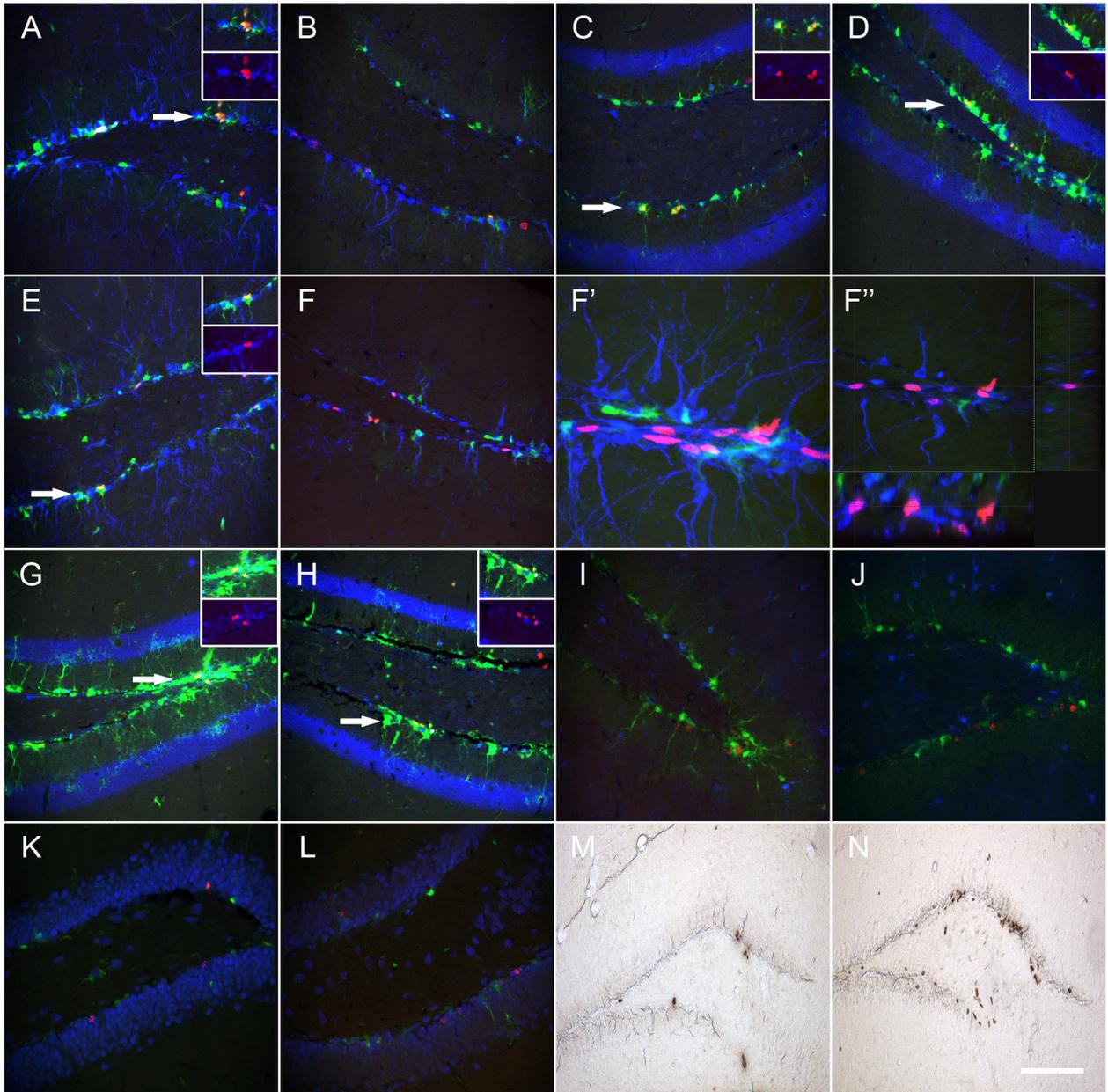


Abb. 6:

Alle Bilder (ausgenommen F' und F''), aufgenommen mit dem konfokalen Laserscanmikroskop, zeigen den Gyrus dentatus (DG) des Hippocampus der Maus. Pfeile zeigen vergrößerte Bildausschnitte; Scalebar (Maßstab; SB): 150µm.

E, F, F' und F'' zeigen Koexpression von BrdU/Nestin-GFP/DCX (DCX; rot/grün/blau); C, D, G und H zeigen Koexpression von BrdU/Nestin-GFP/Calretinin (CR; rot/grün/blau); I und J zeigen Koexpression von BrdU/Nestin-GFP/S100β (S100β; rot/grün/blau); K und L zeigen Koexpression von BrdU/Nestin-GFP/NeuN (NeuN; rot/grün/blau); M und N zeigen eine native Färbung mit BrdU (DAB).

A: zeigt 1h Kontrolle, Ausschnitt zeigt Typ-2a Zellen (DCX) B: zeigt 1h MK801 mit vornehmlich Typ-3 Zellen (DCX) C: zeigt 1h Kontrolle, Ausschnitt zeigt Typ-2 Zellen (CR) D: zeigt 1h MK801, Ausschnitt zeigt Typ-2 Zelle (CR) E: zeigt 24h Kontrolle, Ausschnitt zeigt Typ-2a Zelle (DCX) F: zeigt 24h MK801 mit vorwiegend Typ-3 Zellen (DCX) F': zeigt vorderen Teil des DG im Serienscan aus F (24h MK801) mit Darstellung mehrerer Typ-3 Zellen (DCX; SB: 20µm) F'': zeigt Messung der Farbintensität einer Typ-3 Zelle des DG-Ausschnitts aus F' (24h MK801) (DCX; SB: 30µm) G: zeigt 24h Kontrolle, Ausschnitt zeigt Typ-2 Zellen (CR) H: zeigt 24h MK801 mit Ausschnittsvergrößerung von Typ-2 und einer BrdU/Nestin-GFP/Calretinin+ Zelle (CR) I: zeigt 4 Wochen Kontrolle (S100β) J: zeigt 4 Wochen MK801, vorwiegend sind BrdU+ Zellen ohne weitere Marker zu sehen (S100β) K: zeigt 4 Wochen Kontrolle (NeuN) L: zeigt 4 Wochen MK801 mit zahlreichen BrdU/NeuN+ Zellen (NeuN) M: zeigt 1h Kontrolle (DAB) N: zeigt 24h MK801 (DAB).

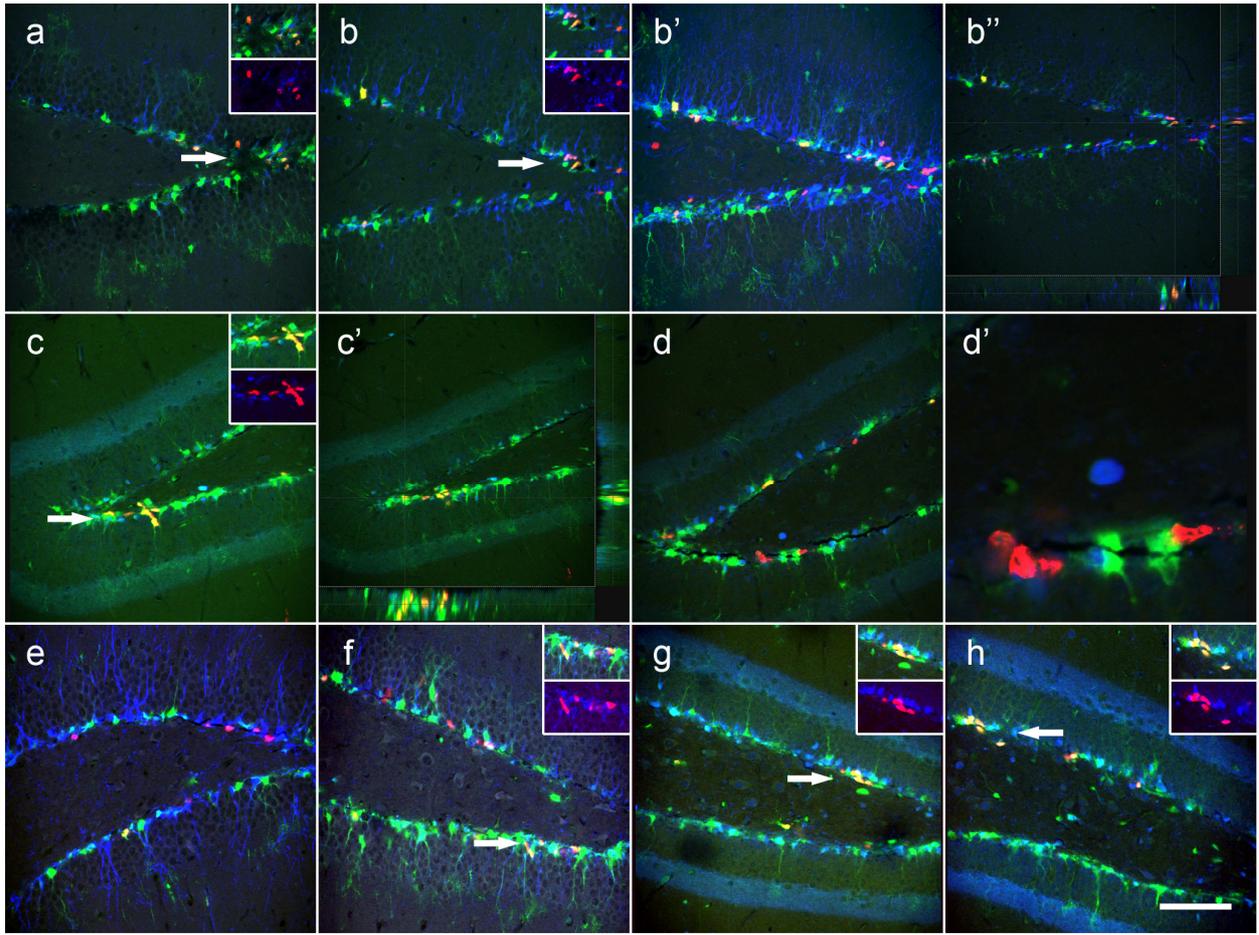


Abb. 7:

Alle Bilder (ausgenommen d'), aufgenommen mit dem konfokalen Laserscanmikroskop, zeigen den Gyrus dentatus (DG) des Hippocampus der Maus. Pfeile zeigen vergrößerte Bildausschnitte; Scalebar (Maßstab; SB): 150µm.

a, b, e und f zeigen Koexpression von BrdU/Nestin-GFP/DCX (DCX; rot/grün/blau); c, d, g und h zeigen Koexpression von BrdU/Nestin-GFP/Calretinin (CR; rot/grün/blau).

a: zeigt Diazepam Kontrolle, Ausschnitt zeigt vorwiegend Typ-2a und eine BrdU+ Zelle ohne weitere Marker (DCX) b: zeigt 24h Diazepam (mit MK801), Ausschnitte zeigt Typ-2a, Typ-2b und BrdU+ Zelle ohne weitere Marker (DCX) b': zeigt eine Scanserie des Gyrus dentatus aus b (24h Diazepam) b'': zeigt eine Messung der Farbintensität einer Typ-2a der Serie aus b' (24h Diazepam) (DCX) c: zeigt Diazepam Kontrolle, Ausschnitt zeigt hier ausschließlich Typ-2 Zellen (CR) c': zeigt die Messung der Farbintensität einer Typ-2 Zelle aus einer Serie des Ausschnitts c (Diazepam Kontrolle) (CR) d: zeigt 24h Diazepam (mit MK801) (CR) d': zeigt die Vergrößerung eines Ausschnitts aus d (24h Diazepam) (CR; SB=20µm) e: zeigt Thalidomid Kontrolle mit überwiegend Typ-3 Zellen (DCX) f: zeigt 24h Thalidomid (mit MK801) mit Ausschnittsvergrößerung mehrerer Typ-2b Zellen (DCX) g: zeigt Thalidomid Kontrolle, Ausschnitt zeigt Typ-2 Zellen (CR) h: zeigt 24h Thalidomid (mit MK801), Ausschnitt zeigt Typ-2 Zellen und eine BrdU/Nestin-GFP/Calretinin+ Zelle (CR).

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung diskutierter Ergebnisse

4.1.1 Experiment 1 (MK801 1h, 24h, 4Wochen)

Wir konnten in unserem ersten Experiment zeigen, dass es konsistent zu allen Messzeitpunkten (1h, 24h, 4 Wochen) zu einer signifikanten Steigerung der BrdU+ Zellzahl in den mit MK801 behandelten Versuchstieren kam. Weiterhin konnten wir beobachten, dass es bereits zu dem sehr frühen Messzeitpunkt von 1h nach Behandlung mit MK801 eine Tendenz zu höheren neuronalen Reifungsstufen (in diesem Fall Typ-2 und Typ-3 Zellen) gab. Diese Tendenz bildete sich dann in den 24h und 4 Wochen Gruppen noch deutlicher ab: Die Neurogenese, die durch MK801 in den behandelte Versuchstieren induziert wurde, war deutlich durch Neurone auf einem höheren Reifungsniveau geprägt. Dies bedeutet konkret eine Dominanz von Typ-3 und BrdU/GFP/Calretinin+ Zellen in der 24h Versuchsgruppe (24h MK801) bzw. von postmitotischen BrdU/NeuN+ Zellen in der 4 Wochen Versuchsgruppe (4 Wochen MK801). Zusammenfassend stellen wir fest, dass die Blockade des NMDA-Rezeptors durch MK801 bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt zu Neurogenese führt, welche sich durch verstärkte Zellreifung auszeichnet und deren Effekt auch noch nach 4 Wochen beobachtbar ist. Allerdings konnten wir keinen Langzeiteffekt von MK801 auf das Überleben von neugebildeten Astrozyten (in unserem Experiment mit S100 β markiert) entdecken.

4.1.2 Experiment 2 (Diazepam)

In unserem zweiten Experiment zeigte sich auf dem Niveau der BrdU+ Zellen, dass Diazepam selbst zu Neurogenese führt. Allerdings konnten wir durch die Applikation von MK801 in der Gruppe 24h Diazepam, die Zellzahl betreffend, keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Diazepam Kontrolle beobachten. Die Differenzialfärbungen zeigten, dass die Neurogenese durch Diazepam tendenziell nicht zu Neuronen mit einem höheren Reifungsgrad führt, sondern vorwiegend zu Typ-2, Typ-

2a und BrdU+ Zellen ohne weitere Marker. Betrachten wir den Effekt von MK801 auf unsere Diazepam Gruppen, stellen wir fest, dass hier, im Gegensatz zu unserem ersten Experiment, keine signifikante Verschiebung zu höheren Reifungsstufen der Neurone stattfand.

4.1.3 Experiment 3 (Thalidomid)

Unser drittes Experiment ergab, dass Thalidomid selbst zu Neurogenese führt. Zudem steigert die Kombination von Thalidomid mit MK801 nochmals signifikant die Zellzahl in der Versuchsgruppe (24h Thalidomid). Des Weiteren konnten wir beobachten, dass sich die Neurogenese durch Thalidomid vornehmlich durch Zellen mit einem höheren Reifungsgrad (Typ-3 und BrdU/GFP/Calretinin+ Zellen) auszeichnet. Allerdings bot sich uns bei der Kombination von Thalidomid mit MK801, was den Reifungsgrad anbelangt, ein anderes Bild: Hier fand sich in der Versuchsgruppe (24h Thalidomid) vorwiegend eine Steigerung der Typ-2, vor allem der Typ-2b Zellfraktion. Die Ergebnisse bezüglich der reiferen Zellstadien waren uneinheitlich in diesen Gruppen mit einem Abfall der Typ-3 und einem Anstieg der BrdU/GFP/Calretinin+ Zellen in der Versuchsgruppe 24h Thalidomid.

4.1.4 Anfallsmonitoring mit dem modifizierten Krampfanfall-Score nach Racine und Golarai et al.

Unser Anfallsmonitoring wies deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen nach. Die Gruppe mit MK801 allein zeigte einen Median der Anfallsklasse von V (Anfallslatenz: 142s), die Diazepamgruppe einen Median von I (Anfallslatenz: 372s) und die Gruppe mit Thalidomid einen Median von V (Anfallslatenz: 311s). Allerdings wurde in der Gruppe mit Thalidomid ein Tier in die Anfallsklasse IV und eines in Klasse III eingestuft, in der Gruppe mit MK801 allein wurden alle Tiere in Klasse V eingestuft. Die Diazepamgruppe war bezüglich der Anfallsklasse sowie der Anfallslatenz signifikant unterschiedlich zur Gruppe MK801 allein. Die Thalidomidgruppe unterscheidet sich signifikant von der Gruppe MK801 allein nur bezüglich der Anfallslatenz und nur tendenziell die Anfallsklasse betreffend. Die Gruppe

Diazepam unterscheidet sich von der Thalidomidgruppe signifikant die Anfallsklasse betreffend, jedoch unwesentlich in Betrachtung der Anfallslatenz.

4.2 Diskussion der Ergebnisse nach aktueller Studienlage

4.2.1 Experiment 1 (MK801 1h, 24h, 4 Wochen)

Mit den Ergebnissen unseres ersten Experiments mit der C57BL6 nestin-gfp Maus können wir die Arbeiten von Cameron et al. und Halim et al. mit Ratten (Cameron, McEwen et al. 1995; Cameron, Tanapat et al. 1998; Halim, Weickert et al. 2004), mit Spitzhörnchen (Gould, McEwen et al. 1997) sowie mit Wüstenrennmäusen (Bernabeu and Sharp 2000) dahingehend replizieren, als dass es durch die Behandlung mit MK801 zu einer Steigerung der Zellzahl im DG des Hippocampus kam. Insbesondere die Arbeit von Cameron et al. (Cameron, McEwen et al. 1995), die zu einem, unserem Experiment vergleichbar, frühen Zeitpunkt von 2 Stunden nach der Injektion von MK801 einen Anstieg der Zellzahl bei Ratten beobachten konnte (Zellen wurden in diesem Experiment allerdings durch [³ H] Thymidin markiert), können wir durch unsere Ergebnisse bei Mäusen und mit dem DNA-Synthesemarker BrdU stützen. Des Weiteren konnte die Arbeit von Cameron et al. einen Anstieg der [³ H] Thymidin/NSE+ Zellen durch die Behandlung mit MK801 zeigen. NSE färbt, verschiedenen Vorarbeiten folgend, im DG des Hippocampus ausschließlich Neuronen an (Cameron, McEwen et al. 1995). In unserer Arbeit konnten wir durch Differentialfärbungen zeigen, dass es in unserer mit MK801 behandelten Gruppe 1h MK801 ebenfalls eine deutliche Tendenz zu Typ-2 und Typ-3 Progenitorzellen, sprich deutlich weiterentwickelten neuronalen Progenitorzellen, gab. Dieser frühe Einfluss von MK801 lässt sich unter anderem durch die Arbeit von Vezzani et al. erklären (Vezzani, Serafini et al. 1989). Er konnte in Untersuchungen zeigen, dass MK801 10-30 min nach i.p. Injektion seine maximale Wirkungskonzentration im Gehirn erreicht und dann sehr schnell wieder eliminiert wird. Ebenso können wir mit unseren Daten die Ergebnisse von Gould et al. (Gould, McEwen et al. 1997) unterstützen, die nach 2h Überlebenszeit eine Erhöhung der BrdU+ Zellen pro mm² im DG von Spitzhörnchen durch MK801 feststellen konnten.

Die Arbeit von Halim et al. (Halim, Weickert et al. 2004) konnte bei Ratten, die mit MK801 behandelt wurden, nach 24h eine Steigerung der BrdU+ Zellzahl feststellen. Eine differenzierte Darstellung der Zelldifferenzierung 24h nach der Injektion von MK801 fehlt allerdings bisher in der Fachliteratur. Hier konnten wir zeigen, dass MK801 zu höheren Reifungsstufen der sich entwickelnden Neurone führt, d.h. in diesem Zusammenhang Typ-3 und BrdU/GFP/Calretinin+ Zellen. Dieser Effekt hält sich konstant in unserem Zeitreihenexperiment und ist auch noch nach 4 Wochen deutlich nachweisbar. Auf dem Niveau der BrdU+ Zellen haben wir noch nach 4 Wochen eine signifikante Steigerung der Zellzahl in der Versuchsgruppe beobachtet. In den Differentialfärbungen zeigte sich nach der Behandlung mit MK801 nach 4 Wochen ein signifikant höherer Anteil an postmitotischen Neuronen (durch BrdU/NeuN+ markiert) von 92%. Nacher et al. (Nacher, Rosell et al. 2001) konnte bei Ratten zeigen, dass die Zahl der BrdU+ Zellen nach einmaliger Injektion des kompetitiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten CGP43487 nach 2 und nach 7 Tagen signifikant erhöht war. Allerdings wurde in dieser Studie erst zu dem Untersuchungszeitpunkt Tag 7 eine signifikante Steigerung der mit PSA-NCAM (Marker für unreife Neuronen) gefärbten Zellen festgestellt (Nacher, Rosell et al. 2001). Zu den Messzeitpunkten 4h und 2 Tage gab es in dieser Studie zwar tendenziell eine Zunahme der Zellzahl in den Versuchsgruppen, die aber statistisch keine Signifikanz erreichte (Nacher, Rosell et al. 2001). Diese Beobachtung steht im Kontrast zu unseren Ergebnissen, wo bereits nach 2h tendenziell und nach 24h eine deutliche Steigerung der unreifen Neuronen, in unserem Experiment mit DCX oder CR angefärbt, zu beobachten war. Eine weitere Studie (Nacher, Alonso-Llosa et al. 2003) desselben Autors zeigte eine signifikante Steigerung der BrdU+ Zellen 3 Wochen nach der Behandlung mit CGP43487 von 10 Monate alten Ratten. Diese Steigerung der Zellen in der Versuchsgruppe, trotz einer insgesamt reduzierten Zellanzahl wie bei Nacher et al. (Nacher, Alonso-Llosa et al. 2003), zeigte sich bei uns ebenfalls zum Untersuchungszeitpunkt von 4 Wochen nach Behandlung mit MK801. Interessanterweise zeigt die Arbeit von Jessberger et al. (Jessberger, Romer et al. 2005), hier in einem Krampfanfallmodell durch Aktivierung des Kainat-Rezeptors, ebenfalls eine Dominanz der reiferen Progenitorzellen (Typ-3) und eine starke Tendenz zu CR+ Zellen nach 9 Tagen ($p < 0.08$). Dies wurde in der Studie durch die womöglich erhöhte Sensibilität der späten Progenitorzellen (Typ-3) für, hier durch die Aktivierung des Kainat-Rezeptor, verstärkt erregende Einflüsse im Kreislauf des DG gesehen (Jessberger, Romer et al. 2005). Die Zellen würden auf diesen Einfluss mit Proliferation

reagieren (Jessberger, Romer et al. 2005). Des Weiteren könnte es durch die Krampfaktivität zu einer Erhöhung der Ausschüttung von lokalen Wachstumsfaktoren mit aktivierendem Einfluss auf die Progenitorzellen kommen, die normalerweise den Zellzyklus verlassen würden (Jessberger, Romer et al. 2005). Es wurde in diesem Experiment nach 9 Tagen kein Effekt auf GFAP+ Zellen (Astrozytenmarker) beobachtet, ähnlich unserem Versuch, bei dem auch kein Effekt von MK801 auf mit S100 β (Astrozytenmarker) angefärbte Zellen nach einem Zeitraum von 4 Wochen zu beobachten war. Im Kontrast zu unserem Versuch wurde bei Jessberger et al. (Jessberger, Romer et al. 2005) kein Effekt der Aktivierung des Kainatrezeptors auf die Anzahl der Nestin-GFP+ Zellen wie in unserem Versuch durch die Blockade des NMDA-Rezeptors beobachtet. Dies wurde bei Jessberger et al. mit einer womöglich asymmetrischen Teilung der neuronalen Progenitorzellen erklärt (Jessberger, Romer et al. 2005).

Auf der anderen Seite konnten weitere Arbeiten zeigen, dass durch die Gabe von NMDA-Agonisten die Neurogenese in verschiedenen Spezies gehemmt werden kann (Cameron, McEwen et al. 1995; LoTurco, Owens et al. 1995; Cameron, Tanapat et al. 1998; Ormerod, Falconer et al. 2003). Wir können daraus, wie auch andere Arbeiten zuvor, schlussfolgern, dass die Neurogenese im DG des Hippocampus unter dem hemmenden Einfluss von Glutamat durch seine Wirkung am NMDA-Rezeptor steht (Abrous, Koehl et al. 2005; Ming and Song 2005).

Welchen Sinn könnte nun die Bildung dieser neuen Neurone durch die Blockade des NMDA-Rezeptors haben? Wir müssen den Hippocampus als wesentliche Eingangsregion (Eichenbaum 1997) zur Prozessierung von expliziten Informationen zwecks Lernen und Behalten begreifen. Dies kann nur durch ein differenziertes Zusammenspiel verschiedener Neurotransmitter und Umwelteinflüssen vonstatten gehen (Abrous, Koehl et al. 2005). Neue Neurone gliedern sich in den hippocampalen Schaltkreis ein, erhalten Synapsen aus dem „medial perforant pathway“ (dem wichtigsten erregenden Eingangsweg in den Hippocampus) und die Axone der neu gebildeten Neurone wachsen mit dem Ziel der CA3 Region des Hippocampus (Doetsch and Hen 2005). Ausgewachsene Neurone siedeln sich im inneren Drittel der Körnerzellschicht an. Während ihrer Ausdifferenzierung wird ihre Verschaltung immer komplexer und sie wachsen weiter in die molekulare Zellschicht ein (Doetsch and Hen 2005). Junge Neurone sind nachweisbar elektrophysiologisch aktiv und unterscheiden

sich deutlich von Neuronen, die schon länger in den Zellverband integriert sind. Sie können durch sehr kleine Amplituden elektrischen Stroms über niederschwellig aktivierbare Ca^{2+} -Kanäle aktiviert werden und reagieren schneller auf LTPs (Doetsch and Hen 2005).

Das Ergebnis des Anfallsmonitorings, dass konsistent in allen Tieren eine hohe Erregungsaktivität auf der Verhaltensebene zeigte, deckt sich mit mehreren Quellen der Fachliteratur (Feinberg, Campbell et al. 1995; Mastropalo, Rosse et al. 2004), die zeigen konnten, dass MK801 zu spike-wave Aktivität im EEG führt und ein lebhaft-agitiertes Verhalten (sog. popping behaviour) auslöst.

4.2.2 Experiment 2 (Diazepam)

Unser Ergebnis, dass Diazepam selbst zu Neurogenese führt, steht kontrovers zum Ergebnis der Arbeit von Nixon et al. (Nixon and Crews 2004), in dem keine Zunahme der Neurogenese bei Ratten durch die Behandlung mit dem GABA-Synergisten Diazepam beobachtet werden konnte. Allerdings zeigte eine andere Arbeit von Tozuka et al. (Tozuka, Fukuda et al. 2005), dass es durch die Applikation von GABA-Agonisten über GABA-Rezeptoren an neuronalen Typ-2 Progenitorzellen zur Erhöhung der Konzentration des Transkriptionsfaktors Neuro D kommt. Neuro D ist ein stimulierender Faktor der neuronalen Differenzierung, wodurch es vermehrt zu terminaler Ausdifferenzierung von Körnerzellen im DG des Hippocampus kommt (Liu, Pleasure et al. 2000). Unsere Daten zeigen, dass die Neurogenese unter Einfluss von GABA-Synergisten (Diazepam) vornehmlich zu Typ-2, Typ-2a und BrdU⁺ Zellen ohne weitere Marker führt. Es bleibt aber als wesentlich zu bemerken, dass Diazepam nur die Wirkung von GABA selbst am GABA_A -Rezeptor verstärken kann und diesen nicht allein stimulieren kann – dies stellt einen wesentlichen Unterschied zu Experimenten mit direkten GABA-Agonisten dar. Dennoch stellen wir fest, dass die Neurogenese unter dem Einfluss von Diazepam deutlich gegenüber der Kontrollgruppe erhöht ist. Dieses Ergebnis wird durch die Arbeit von Ge et al. (Ge, Goh et al. 2006) unterstützt, der feststellen konnte, dass der frühe Einfluss von GABA auf neu gebildete Neurone eine wichtige Rolle für deren weitere Differenzierung und Einbindung ins Netzwerk des DG spielt (Ge, Goh et al. 2006). Zudem konnte die Arbeit von Wang et al. (Wang,

Kempermann et al. 2005) zeigen, dass auf neuronalen Typ-2 Zellen GABA_A-Rezeptoren exprimiert werden, die über Synapsen erregt werden können.

Einen weiteren interessanten Faktor in diesem Zusammenhang beschreibt die Arbeit von Mayo et al. (Mayo, Lemaire et al. 2005). Hier wurde der Faktor Pregnenolon sulfat (Preg-S), ein endogenes Steroid, untersucht, dessen Konzentration im Hippocampus positiv proportional im Zusammenhang zu verbesserter kognitiver Leistungsfähigkeit in älteren Ratten steht (Mayo, Lemaire et al. 2005). Durch eine intrahippocampale Infusion von Preg-S kam es in kognitiv eingeschränkten älteren Ratten zu einer Verbesserung bzw. Aufhebung der kognitiven Defizite (Vallee, Mayo et al. 1997). Preg-S führt, den Autoren folgend, durch eine negativ-allosterische Bindung am GABA_A-Rezeptor zu einer Steigerung der Neurogenese im DG des Hippocampus (Mayo, Lemaire et al. 2005). Wir konnten in unserem Experiment durch Diazepam, welches synergistisch mit GABA am GABA_A-Rezeptor wirkt, eine Steigerung der Neurogenese beobachten.

Unser Ergebnis, dass es durch die Aktivierung des gabaergen System zu einer Aufhebung, der durch MK801 gesehenen verstärkten neuronalen Zellreifung kommt, können wir leider nicht direkt mit einer anderen Quelle in der Fachliteratur vergleichen, da diesbezüglich keine Arbeiten vorliegen. Dennoch gibt es zahlreiche Arbeiten, die auf eine Vernetzung des glutamatergen mit dem gabaergen System im Prozess der Neurogenese hindeuten. In verschiedenen Arbeiten gab es Hinweise darauf, dass GABA und Glutamat für die Proliferation und Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen im sich entwickelnden Gehirn bedeutsam sind (LoTurco, Owens et al. 1995; Antonopoulos, Pappas et al. 1997; Haydar, Wang et al. 2000; Nguyen, Malgrange et al. 2003). GABA wirkt auf reife Neuronen inhibitorisch, allerdings kommt es bei unreifen Neuronen über den GABA_A-Rezeptor zu einer Depolarisation des Membranpotentials durch verstärkte Cl⁻-Konzentration in diesen Zellen (Ben-Ari 2002; Owens and Kriegstein 2002), einem zu diesem Entwicklungszeitpunkt exzitatorischen Einfluss (Wang, Kempermann et al. 2005). Des Weiteren konnte die Studie von LoTurco et al. (LoTurco, Owens et al. 1995) zeigen, dass GABA ebenso wie Glutamat embryogene kortikale Progenitorzellen depolarisieren kann und dadurch zu terminaler neuronaler Ausdifferenzierung führt. Die Arbeit von Tozuka et al. (Tozuka, Fukuda et al. 2005) folgerte daraus, dass es deshalb legitim sei anzunehmen, dass die Ausschüttung von GABA sowie von Glutamat im hippocampalen Netzwerk regulierenden Einfluss auf die Entwicklung neuronaler Progenitorzellen hat. Die Studie konnte weiterhin zeigen,

dass die neuronalen Progenitorzellen im DG des adulten Hippocampus neuronale Eingänge des hippocampalen Erregungskreislaufs erhalten (Tozuka, Fukuda et al. 2005). Allerdings zeigte sich dort, dass diese Eingänge gabaerg und nicht glutamaterg sind (Tozuka, Fukuda et al. 2005). Eine weitere Arbeit von Khazipov et al. (Khazipov, Esclapez et al. 2001) zeigte, dass bei der frühen Entwicklung des Hippocampus zuerst gabaerge Synapsen und darauf folgend glutamaterge Synapsen etabliert werden.

Die Erhöhung der Neurogenese durch die Blockade des NMDA-Rezeptors wurde in verschiedenen Studien aufgezeigt (Cameron, McEwen et al. 1995; Cameron, Tanapat et al. 1998; Nacher, Rosell et al. 2001; Halim, Weickert et al. 2004). Interessanterweise konnte weder Tozuka et al. (Tozuka, Fukuda et al. 2005) noch Wang et al. (Wang, Kempermann et al. 2005) eine funktionell relevante Expression von NMDA-Rezeptoren auf neuronalen Progenitorzellen (Typ-1 und Typ-2 Zellen) im DG finden. Dennoch konnte gezeigt werden, dass über NMDA-Rezeptoren in Typ-2 Zellen geringe Spannungen induziert werden können (Wang, Kempermann et al. 2005) und dadurch der neuronale Phänotyp in der Entwicklung der Neurogenese beeinflusst werden kann (Deisseroth, Singla et al. 2004). Möglicherweise ist der Einfluss der Blockade des NMDA-Rezeptors indirekt über die gabaergen Einflüsse auf den neuronalen Progenitorzellen vermittelt (Tozuka, Fukuda et al. 2005). Die Ausschüttung von GABA aus hippocampalen Interneuronen benötigt die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren (Matsuyama, Nei et al. 1997) und es konnte durch Rosenblum et al. (Rosenblum, Maroun et al. 1999) gezeigt werden, dass durch MK801 diese Ausschüttung verhindert werden kann (und somit der womöglich hemmende gabaerge Einfluss auf die Neurogenese), daher kommt es vermehrt zu hippocampaler Neurogenese (Tozuka, Fukuda et al. 2005). Die Annahme einer Blockade der Neurogenese durch GABA in diesem Zusammenhang geht mit unserem Ergebnis konform, dass durch die Injektion von Diazepam 5 Minuten vor der Applikation von MK801 dennoch eine Steigerung der Neurogenese verhindert wird. Diazepam selbst besitzt eine sehr lange Halbwertszeit (bis zu 50 Stunden in der Maus) und somit ist die kurzzeitige Blockade des NMDA-Rezeptors und die daraus resultierende fehlende gabaerge Hemmung der Interneurone auf die Neurogenese weniger relevant.

Ebenso geht die Arbeit von Platel et al. (Platel, Lacar et al. 2007) nach Arbeiten im SVZ von Mäusen davon aus, dass zwischen GABA und Glutamat eine homöostatische Beziehung in der Kontrolle von Neurogenese besteht. Als ein Beispiel dieser Beziehung

sei die Auslösung einer Ca^{2+} -abhängigen GABA Ausschüttung in Neuroblasten des SVZ durch AMPA-Rezeptoren genannt, welche durch Ausschüttung von Glutamat aus Astrozyten im SVZ verursacht werden kann (Platel, Lacar et al. 2007); GABA wirkt in diesem Zusammenhang negativ auf die Proliferation von Astrozyten im SVZ. Dieser und verschiedene andere Mechanismen, die sich durch das feine Zusammenspiel von GABA und Glutamat über deren verschiedene Rezeptoren, Sekretions- und Wiederaufnahmemechanismen auszeichnen, ermöglichen es, die verschiedenen Schritte der Neurogenese, wie der Zellneubildung und einer differenzierten Proliferation, fein zu regulieren (Platel, Lacar et al. 2007).

Ein weiterer Forschungszweig in diesem Zusammenhang beschäftigt sich mit der Vernetzung des DG (von den Körnerzellen ausgehend) mit der Region CA3 durch die sog. Moosfasern (MF). Bisher wurde angenommen, dass diese Moosfasern glutamaterg-erregende Synapsen mit Pyramidenzellen und lokalen inhibitorischen Interneuronen von CA3 bilden (Crawford and Connor 1973; Acsady, Kamondi et al. 1998). Allerdings zeigte die Übersichtsarbeit von Gutierrez (Gutierrez 2003), dass GABA in den Moosfasern eine sehr wichtige Rolle spielt. Verschiedene Arbeiten (Sandler and Smith 1991; Sloviter, Dichter et al. 1996; Bergersen, Ruiz et al. 2003) konnten durch Immunogold-Färbungen zeigen, dass in den Synapsen der Moosfasern Glutamat wie auch GABA vorhanden ist und auch deren entsprechende Rezeptoren auf der postsynaptischen Seite (Gutierrez 2003). Allerdings war die synaptische Konzentration von GABA in der MF wesentlich geringer als die von Glutamat und auch deutlich geringer als in anderen bekannten Typen von hemmenden Synapsen (Bergersen, Ruiz et al. 2003). Der Einfluss der Moosfasern erstreckt sich vornehmlich auf die Interneurone und weniger auf die Pyramidenzellen in CA3 (Acsady, Kamondi et al. 1998). Erstaunlicherweise konnten zwei weitere Arbeiten (Walker, Ruiz et al. 2001; Bergersen, Ruiz et al. 2003) zeigen, dass es möglich ist, durch MF-Aktivierung in CA3-Pyramidenzellen monosynaptisch eine gabaerge Antwort bei Meerschweinchen auszulösen. Diese gabaerge Antwort durch MF-Aktivierung zeigt die gleichen pharmakologischen und plastischen Eigenschaften wie bei glutamaterger MF-Übertragung, d.h. eine stark frequenzabhängige Signalpotenzierung und sie kann präsynaptisch durch die Aktivierung des metabolischen Glutamatrezeptors mGluR (durch I-AP4) gehemmt werden (Walker, Ruiz et al. 2001; Bergersen, Ruiz et al. 2003). Des Weiteren konnte in einem MF-Modell gezeigt werden, dass durch MF-Aktivierung

ein exzitatorisch postsynaptisches Potential (EPSP) erzeugt wird, welches durch glutamaterge Antagonisten bis auf eine kleine residuale Depolarisation (-47 mV) blockiert werden kann (Gutierrez 2003). Dieses Residuum kann durch Bicucullin (Antagonist des GABA_A-Rezeptors) vollends geblockt werden. Dies deutet darauf hin, dass die Ursache dieser Depolarisation gabaergen Ursprungs ist (Gutierrez 2003). Eine andere Arbeit zeigte durch Messung von EPSP/ inhibitorischen postsynaptischen Potential (IPSP) intrazellulär in Interneuronen der Region CA3, dass eine Aktivierung durch die Moosfasern komplett durch glutamaterge Antagonisten geblockt werden kann. Dies zeigt, dass die hemmende Wirkung auf Interneurone sowie auf Pyramidenzellen in CA3 disynaptisch übertragen wird (Gutierrez 2003). Nach Krampfanfällen, die eine MF-gabaerge Übertragung auslösen, kommt es durch die aktivierende Wirkung der Körnerzellen zu einer Summation der IPSPs über die EPSPs in den Pyramidenzellen der CA3 Region (Gutierrez and Heinemann 2001), während aber die Interneurone stark erregt werden um eine Disinhibition zu verhindern (Romo-Parra, Vivar et al. 2003).

Wie schon vorbeschrieben kann es jedoch bei MF-Aktivierung in Anwesenheit von Glutamaterezeptorantagonisten nach Krampfanfällen oder einer simulierten LTP-Stimulation zu monosynaptischen IPSPs mit der gleichen Latenz der Kontroll-EPSP kommen (Romo-Parra, Vivar et al. 2003). Die MF-GABA-Übertragung kann nur beobachtet werden, wenn Glutamaterezeptoren blockiert sind (Gutierrez 2003). Wenn dies nicht passiert, überwiegt der erregende Einfluss trotz der Anwesenheit von gabaergen Reaktionen (Gutierrez 2003).

Eine andere Studie zeigt den Einfluss von Übererregung auf den MF-GABA-Erregungskreislauf (Sokolov, Rossokhin et al. 2003). Es konnte durch die Hyperpolarisation von Pyramidenzellen aus CA3 mit 20-30 mV für 15-35 min eine supralineare Zunahme der Amplitude der EPSPs bzw. der exzitatorischen postsynaptischen Ströme (EPSC) in den MF-Eingängen beobachtet werden. Sie schlossen daraus, dass das durch Hyperpolarisation ausgelöste postsynaptische LTP Auswirkungen auf die präsynaptische Seite hatte (Sokolov, Rossokhin et al. 2003). Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die MF-GABA-Ausschüttung für die notwendige Hyperpolarisation, die dem potenzierenden Effekt durch MF-Glutamat, wie z.B. Krampfaktivität, zugrunde liegt (Sokolov, Rossokhin et al. 2003).

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass es als wahrscheinlich gilt, dass der DG ein sich selbst modulierendes Filterorgan für die Informationen aus dem entorhinalen Kortex für die Pyramidenzellschicht des Hippocampus darstellt (Gutierrez 2003).

Die Studie von Derrick et al. (Derrick, York et al. 2000) gibt Anhaltspunkte dafür, dass die Erhöhung der Neurogenese in unserem Versuch mit MK801 durch die Aktivierung von Moosfasern vonstatten gegangen sein könnte. Hier wurde gezeigt, dass es durch die hochfrequente Stimulation der Efferenz der Körnerzellen des DG (den Moosfasern), zu einer signifikanten Steigerung der Körnerzellen, aber nicht der Progenitor- oder Gliazellen im DG kam (Derrick, York et al. 2000). Die Autoren folgerten daraus, dass eine Verbindung zwischen der Aktivierung der Moosfasern und der Neurogenese im DG bestehen muss (Derrick, York et al. 2000). Dies könnte unser Ergebnis, dass die von MK801 ausgelöste Neurogenese und verstärkte Zellreifung neuronaler Progenitorzellen durch Diazepam antagonisierbar ist, durch das Zusammenspiel von Glutamat und GABA an den Moosfasern erklären. Der gabaerge Synergismus von Diazepam mit GABA am GABA_A-Rezeptor könnte in den Moosfasern durch eine Modulation der glutamatergen Übertragung zu CA3 reaktiv zu einer Suppression der Neurogenese im DG des Hippocampus führen. Außerdem könnte die verstärkte MF-gabaerge Übertragung auf CA3 in Anwesenheit von NMDA-Rezeptorantagonisten (MK801) möglicherweise die Aktivität des Glutamat über seine nicht blockierten Rezeptoren (AMPA und Kainat), die zu erhöhter Neurogenese führen können, wirksam unterdrücken. Die Studie von Bai et al. (Bai, Bergeron et al. 2003) zeigte, dass es möglich ist durch die Stimulation von AMPA-Rezeptoren eine Erhöhung der Neurogenese zu erreichen.

Die Ergebnisse der Verhaltensbeobachtung, die mit dem modifizierten Krampfanfall-Score nach Racine und Golarai et al. (Racine 1972; Golarai, Greenwood et al. 2001) erhoben wurden, zeigten einen deutlichen Effekt auf die mit MK801 und Diazepam gleichzeitig behandelte Versuchsgruppe. Die Anfallslatenz wurde deutlich gesenkt und die Anfallsklasse war, den Median betreffend, deutlich niedriger. Die Verlängerung der Anfallslatenz und die Senkung der Anfallsklasse erreichten beide, im Vergleich zur Gruppe mit MK801 allein, statistische Signifikanz. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Nixon et al. (Nixon and Crews 2004), dass Diazepam in der Dosierung von 10 mg/kg KG suffizient Erregung und Krampfanfälle kontrollieren kann. Wir folgern im Vergleich der histologischen mit den Ergebnissen der Verhaltenbeobachtung, dass

möglicherweise die Stärke der in den Tieren ausgelösten Erregung mit einer Erhöhung der Neurogenese einhergeht und dies durch Aktivierung des gabaergen Systems wirksam unterdrückt werden kann. Die Arbeit von Parent et al. (Parent, Yu et al. 1997) zeigt, dass die Auslösung von Krampfaktivität einen dramatischen Anstieg der Neurogenese in der SGZ des DG verursachen kann. Ebenso findet Jessberger et al. (Jessberger, Romer et al. 2005) in seinem Krampfanfallmodell mit Kainat eine deutliche Steigerung der Neurogenese im DG. Die durch den Krampfanfall neu gebildeten Zellen sind bis zum Zeitpunkt von 4 Wochen sichtbar und entwickeln sich zu Neuronen (Parent, Yu et al. 1997). Sie wandern dann in untypische Regionen, wie CA3, den Hilus des DG oder in die innere molekulare Zellschicht ab (Parent, Yu et al. 1997; Scharfman, Goodman et al. 2000; Dashtipour, Tran et al. 2001). Wir konnten in unserem Experiment ebenfalls einen deutlichen Anstieg der Neurogenese durch MK801 feststellen, aus der sich auch nach 4 Wochen deutlich mehr reife Neurone entwickelten.

4.2.3 Experiment 3 (Thalidomid)

Unser Ergebnis, dass Thalidomid selbst zu Neurogenese und tendenziell zu höheren Reifungsstufen der Vorläuferzellen führt, lässt sich leider nicht mit anderen Quellen der Fachliteratur vergleichen, da dazu bisher keine Arbeiten vorliegen. Dennoch bieten sich, aufgrund der vielfältigen Wirkungsmechanismen von Thalidomid, mehrere Erklärungsansätze. Dem Artikel von Melchert et al. (Melchert and List 2007) folgend wirkt Thalidomid antiangiogenetisch durch Suppression von VEGF und bFGF, hemmt die Bildung des proinflammatorischen Zytokins TNF-alpha sowie des Transkriptionsfaktors NF-kappa-b (Melchert and List 2007). Weitere Effekte beziehen sich auf die Aktivierung von CD8+ T-Zellen, der Suppression von IL-6 und IL-8, der Potenzierung der Wirkung des TNF-assoziierten-Apoptose-induzierenden-Liganden (TRAIL), der Inhibition des Apoptose-Protein-2, einer erhöhten Sensitivität der Fas-Induktion sowie einer Erhöhung der Caspase-8-Aktivität (Melchert and List 2007).

Die Arbeit von Shen et al. (Shen, Goderie et al. 2004) berichtet darüber, dass neuronale Stammzellen in einer vaskulären Nische an einem Blutgefäß sitzen sollen. Sie konnten zeigen, dass die endothelialen Zellen lösliche Faktoren sezernieren, die die Stammzellen dazu stimulieren, sich selbst zu erhalten und sich nicht weiter zu differenzieren um ihre Produktion von Neuronen zu verbessern (Shen, Goderie et al.

2004). Wie oben schon beschrieben, ist Thalidomid ein potenter Inhibitor der Vaskulogenese über die Suppression von VEGF und bFGF (Melchert and List 2007). Durch die Ausschaltung der Signale der endothelialen Zellen könnte es zu einer Induktion der Ausdifferenzierung von Stammzellen zu determinierten Zellen kommen, was die deutliche Erhöhung der Neurogenese durch Thalidomid in unserem Versuch erklären könnte.

In den Ergebnissen unserer Verhaltensbeobachtung nach dem modifizierten Krampfanfall-Score von Racine und Golarai et al. (Racine 1972; Golarai, Greenwood et al. 2001) zeigte sich, dass durch Thalidomid zwar kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe MK801 allein und der Gruppe 24h Thalidomid die Anfallsklasse betreffend zu beobachten war, dennoch wurde in der Thalidomidgruppe ein Tier in die Anfallsklasse III und eines in IV eingestuft. In der Gruppe mit MK801 allein wurden alle Tiere in die Anfallsklasse V eingestuft. Ein deutlich signifikanter Unterschied zeigte sich allerdings in Betrachtung der Anfallslatenz verglichen zur allein mit MK801 behandelten Gruppe, welche durch Thalidomid deutlich verlängert wurde. Dies weist in die gleiche Richtung wie die Fallstudie von Marjanovic et al. (Marjanovic, Stojanov et al. 2003), die bei einem 10 Jahre alten Mädchen mit dem Krankheitsbild der sog. Rasmussen Enzephalitis durch die Applikation von 300 mg Thalidomid pro Tag die Zahl der Krampfanfälle senken und die neurologischen Defizite verbessern konnte (Marjanovic, Stojanov et al. 2003). Die Feststellung der Autoren, dass die Krankheitsaktivität bei der Rasmussen Enzephalitis oft mit hohen Antikörpertitern gegen Glutamatrezeptoren assoziiert ist (Marjanovic, Stojanov et al. 2003), weist eine interessante Ähnlichkeit zu unserem Experiment auf. Bei uns wurden Glutamatrezeptoren (NMDA-Rezeptoren) durch MK801 blockiert, bei der Rasmussen Enzephalitis durch Autoimmunprozesse attackiert und somit in vergleichbarer Richtung der glutamaterge Einfluss reduziert. In beiden Fällen kam es unter dem Einsatz von Thalidomid zu einer Verbesserung der Symptome in der Verhaltensbeobachtung. Wir leiten daraus ab, dass immunologische Prozesse und deren Modulation durch Thalidomid einen wichtigen Einfluss auf die glutamaterge Übertragung zu haben scheinen, was in unserem Experiment durch eine zumindest teilweise verminderte Erregungsaktivität und einer Verlängerung der Anfallslatenz in der Gruppe mit Thalidomid zu beobachten war.

Unser Ergebnis, dass Thalidomid in Kombination mit MK801 vornehmlich zur Entwicklung neuronaler Progenitorzellen führt, wird durch die Studie von Iosif et al.

(Iosif, Ekdahl et al. 2006) in ein interessantes Licht gerückt. Er fand heraus, dass TNF-alpha, welches von Thalidomid durch verstärkten Abbau der TNF-alpha-mRNA unterdrückt wird (Melchert and List 2007), durch seine beiden Rezeptoren TNF-alpha-R1 und R2 wirkt (Iosif, Ekdahl et al. 2006). Die Studie konnte zeigen, dass der TNF-alpha-R1 ein negativer Regulator der Proliferation von neuronalen Progenitorzellen ist (Iosif, Ekdahl et al. 2006). Der TNF-alpha-R2 wirkt den Ergebnissen zufolge eher negativ-regulierend auf die Neurogenese (Iosif, Ekdahl et al. 2006). Die Ausschaltung beider Rezeptoren in einem Knockout-Modell führt zu einer noch deutlicheren Erhöhung der Zellzahl im DG bei Mäusen (Iosif, Ekdahl et al. 2006). Hierdurch könnte sich unser Ergebnis, dass Thalidomid im Vergleich zu allen anderen Versuchs- und Kontrollgruppen zur deutlichsten Verstärkung der Zellproliferation mit Tendenz zu höheren Reifungsstufen führte, erklären, indem dieser Effekt durch die Hemmung von TNF-alpha zustande kam. Des Weiteren legt unser Ergebnis, dass Thalidomid in Kombination mit MK801 vor allem zu einer verstärkten Proliferation von neuronalen Progenitorzellen führt, eine mögliche Interaktion von Glutamat mit TNF-alpha-Rezeptoren nahe. Die Kombinationsbehandlung könnte vornehmlich einen negativen Einfluss auf den TNF-alpha-R1-Rezeptor ausüben, der negativ regulierenden Einfluss auf die Proliferation von Progenitorzellen hat.

Auf der Ebene der Erregungsbereitschaft konnte Iosif et al. (Iosif, Ekdahl et al. 2006) jedoch keine Unterschiede zwischen den TNF-alpha-R1/R2-Knockout-Mäusen und dem Wildtyp nach Status epilepticus feststellen. Allerdings zeigt eine andere Studie, dass es durch Status epilepticus zu einer erhöhten Ausschüttung von TNF-alpha kommt (De Simoni, Perego et al. 2000), welche wiederum nach Balosso et al. (Balosso, Ravizza et al. 2005) über TNF-alpha-R2-Rezeptoren Krampfanfälle vermindern sollen. Diesem Resultat widersprechen wir in unseren Beobachtungen auf der Verhaltensebene, da durch die Behandlung mit Thalidomid in unserem Modell mit MK801 eine Senkung der Anfallsklasse sowie eine Verlängerung der Anfalllatenz nach der Beobachtung mit dem modifizierten Krampfanfall-Score von Racine und Golarai et al. (Racine 1972; Golarai, Greenwood et al. 2001) erreicht werden konnte.

Thalidomid ist ebenfalls als potenter Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF-kappa-b bekannt, da er die NF-kappa-b-Kinase hemmt (Melchert and List 2007). Aktivierend scheinen auf diesen Faktor im Gehirn vor allem Glutamat (über AMPA/Kainat- und NMDA-Rezeptoren) und Neutrophine zu wirken (O'Neill and Kaltschmidt 1997). Es gilt

als wahrscheinlich, dass NF-kappa-b deshalb Anteil an der Signalübertragung während der synaptischen Aktivität und somit auch an der neuronalen Plastizität hat (O'Neill and Kaltschmidt 1997). Hier könnte, unserer Ansicht nach, ein weiterer Verbindungspunkt in der Interaktion von MK801 und Thalidomid liegen. NF-kappa-b scheint eine wichtige Rolle im Prozess der Neurogenese zu spielen, da es sowohl in sich entwickelnden Ratten- und Mäusegehirnen (Cauley and Verma 1994), als auch in adulten Neuronen des Hippocampus und des Kortex nachgewiesen wurde (O'Neill and Kaltschmidt 1997). Es gilt als gesichert, dass NF-kappa-b in Neuronen während der Neurogenese aktiviert wird und womöglich Einfluss auf die neuronale Differenzierung hat (O'Neill and Kaltschmidt 1997). Möglicherweise ist die hohe NF-kappa-b Aktivität in vielen Neuronen des Hippocampus und des Kortex teil des körpereigenen antioxidativen Programms (O'Neill and Kaltschmidt 1997). Weiterhin wurde berichtet, dass es nach Krampfanfällen durch Kainat und Pilocarpin zu einer verstärkten Aktivierung von NF-kappa-b im Hippocampus und des Kortex kommt (Unlap and Jope 1995). Dieser Effekt zeigte sich umso deutlicher bei adrenaletomierten Tieren, was den Autoren folgend zeigt, dass Glukokortikoide einen wichtigen regulierenden Einfluss auf die Effekte von NF-kappa-b haben (Unlap and Jope 1995). Weitere Studien (Barger, Horster et al. 1995; Bruce, Boling et al. 1996) deuten darauf hin, dass TNF-alpha und NF-kappa-b neuroprotektive Aufgaben wahrnehmen. Außerdem wird NF-kappa-b eine wichtige Rolle in Bezug auf neurodegenerative Erkrankungen, in denen Entzündungsreaktionen stattfinden, zugeschrieben (O'Neill and Kaltschmidt 1997).

Unser Ergebnis, dass Thalidomid (und somit eine Hemmung von TNF-alpha und NF-kappa-b) zu Neurogenese mit Tendenz zu verstärkter Zellreifung und in Kombination mit MK801 zu vornehmlich Progenitorzellen führt, lässt einen Einfluss von NF-kappa-b vermuten. In Kombination mit MK801 fällt der erregende Einfluss von Glutamat über den NMDA-Rezeptor auf NF-kappa-b weg und die Neurone differenzieren sich zum überwiegenden Teil nicht weiter als zu Progenitorzellen. Ohne MK801 und womöglich unter dem Einfluss des erregenden Glutamats führt eine Restaktivität von NF-kappa-b zu einer Zellreifung, der durch Thalidomid ausgelösten Neurogenese zu Neuroblasten und danach zu reifen Neuronen, die den Zellzyklus verlassen. Wir folgern daraus, dass NF-kappa-b wahrscheinlich wesentlich an Zellreifungsprozessen der Neurogenese beteiligt ist.

4.3 Hypothesen und Ausblick

4.3.1 Experiment 1 (MK801 1h, 24h, 4Wochen)

Wir konnten in unserem Experiment die Hypothese bestätigen, dass Glutamat über NMDA-Rezeptoren einen hemmenden Einfluss auf die Neurogenese im DG ausübt. Des Weiteren konnten wir eine deutliche Steigerung der Neurogenese durch die NMDA-Rezeptor-blockierende Substanz MK801 zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten beobachten. Arbeiten am AMPA- (Bai, Bergeron et al. 2003) sowie am Kainat-Rezeptor (Jessberger, Romer et al. 2005) haben gezeigt, dass es durch die Applikation von Agonisten an diesen Rezeptoren zu einer Steigerung der Neurogenese kommt. Es scheint hier in Bezug auf Glutamat eine Balance der Neurogenese durch seine Wirkung an den verschiedenen Rezeptoren zu bestehen. Im Detail haben wir in verschiedenen Arbeiten Anhalt für NMDA-Rezeptoren auf neuronalen Progenitorzellen, auf Moosfasern sowie auf neuronalen Interneuronen des Hippocampus (bei den Interneuronen ist die GABA-Ausschüttung von der Aktivierung des NMDA-Rezeptor abhängig). Unsere Arbeit gibt Anhalt für eine symmetrische Teilung und Entwicklung der Progenitorzellen mit Betonung der späten Reifungsstadien der Neurogenese (Typ-3 und BrdU/Nestin-GFP/CR+ Zellen), die auch nach 4 Wochen in Form von BrdU/NeuN+ Zellen zu sehen ist.

Die Frage bleibt nun, welche funktionelle Relevanz diese Neubildung von Neuronen, die nach 4 Wochen überwiegend als reife Neuronen den Zellzyklus verlassen, hat. Doetsch et al. (Doetsch and Hen 2005) folgend besitzen neue Neurone andere Eigenschaften der Migration und der neurophysiologischen Erregbarkeit, als ältere, reife, in die Körnerzellschicht integrierte Neurone. Glutamat ist der wichtigste und ubiquitär im Gehirn vorhandene erregende Neurotransmitter, dennoch kann er in diesem Punkt nicht isoliert betrachtet werden. Wir können in unserem in-vivo Experiment nur eine Mischung mit anderen die Neurogenese beeinflussende Faktoren messen. Die Relevanz der durch MK801 ausgelösten Neurogenese könnte durch Verhaltens- und Gedächtnisstudien an diesen Tieren wie beispielsweise anhand des „Morris Water maze“ (sog. Wasserlabyrinth, in dem die Versuchstiere trainiert werden Plattformen Unterwasser in einem runden Schwimmbecken zu finden; dieser Test dient vornehmlich zur Prüfung des räumlichen Lernens) geprüft und weiter quantifiziert werden. Ebenso

wäre Gegenstand weiterer Forschung, wo sich genau der Mechanismus befindet, durch den die NMDA-Blockade Neurogenese auslöst. Auf diese Frage können wir in unserer Arbeit keine exakte Antwort geben.

Weder Tozuka et al. (Tozuka, Fukuda et al. 2005) noch Wang et al. (Wang, Kempermann et al. 2005) konnten eine funktionell relevante Expression von NMDA-Rezeptoren auf neuronalen Progenitorzellen (Typ-1 und Typ-2 Zellen) im DG finden. Dennoch wurde von Wang et al. (Wang, Kempermann et al. 2005) gezeigt, dass über NMDA-Rezeptoren in Typ-2 Zellen niedrige Spannungen induziert werden können. Dadurch kann der neuronale Phänotyp der Zellen in der Entwicklung der Neurogenese beeinflusst werden (Deisseroth, Singla et al. 2004).

Nach Tozuka et al. (Tozuka, Fukuda et al. 2005) ist der Einfluss der NMDA-Blockade indirekt über die gabaergen Einflüsse auf den neuronalen Progenitorzellen vermittelt. Die Ausschüttung von GABA aus hippocampalen Interneuronen benötigt die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren (Matsuyama, Nei et al. 1997) und Rosenblum et al. (Rosenblum, Maroun et al. 1999) konnte zeigen, dass durch MK801 diese Ausschüttung verhindert werden kann (und somit der hemmende gabaerge Einfluss auf die Neurogenese in diesem Erklärungsmodell), weshalb es vermehrt zu hippocampaler Neurogenese kommt (Tozuka, Fukuda et al. 2005). Allerdings bleibt unklar, ob dies den einzigen Mechanismus darstellt. Gibt es Rezeptoren oder andere Transmitter über die MK801 an den Vorläuferzellen wirkt? Sind womöglich Gliazellen oder Oligodendrozyten an diesem Prozess beteiligt? Des Weiteren wirft die Verbindung des DG zur Region CA3 über die sog. Moosfasern viele Fragen zur Neurogenese in unserem Fall auf. Führt eine Veränderung des Eingangssignals in die Moosfasern vielleicht zu einer Erhöhung der Neurogenese? Derrick et al. (Derrick, York et al. 2000) konnte zeigen, dass es durch die Veränderung des Eingangssignals in die Moosfasern zu Neurogenese im DG kommen kann. Modifiziert die Blockade von NMDA die Körnerzellen in sofern, als dass diese dann über die Rückkopplung mit den Moosfasern eine Neurogenese im DG verursachen? Sollte dies so sein, wie funktioniert das Ganze dann im Detail? Diese Fragen könnten als Anregungen für weitere elektrophysiologische Experimente an Moosfasernmodellen und Körnerzellen in der Behandlung mit MK801 und der Messung der jeweiligen Ionenströme gesehen werden.

4.3.2 Experiment 2 (Diazepam)

Wir haben in unserem Experiment gezeigt, dass die Aktivierung des gabaergen Systems wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung und die Netzwerkbildung von neuronalen Progenitorzellen hat. Dies konnten wir durch eine deutliche Steigerung der neuronalen Progenitorzellen in unserem Experiment durch den GABA_A-Rezeptor-Synergisten Diazepam beobachten. Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass GABA in der sehr frühen Phase der Differenzierung und Netzwerkbildung junger Neurone einen wichtigen exzitatorischen Einfluss ausübt. Dieser gabaerge Einfluss scheint sich im Verlauf der Neurogenese zu wandeln, z.B. übt GABA auf reife Körnerzellen im DG die Induktion von LTPs betreffend eine hemmende Wirkung aus. Weiterhin scheint durch diesen frühen, durch Diazepam verstärkten, gabaergen Einfluss die Tendenz zu verstärkter Zellreifung bei Blockade des NMDA-Rezeptors durch MK801 verhindert worden zu sein. Einige Arbeiten geben Anhalt dafür, dass die glutamaterge synaptische Anbindung erst zeitversetzt der gabaergen folgt und von dieser auch entscheidend abhängt. Dies könnte, auch in Anbetracht der diskutierten Abläufe im Moosfaserkreislauf und der Interneurone des Hippocampus (Synergie zwischen NMDA und GABA), erklären, warum es durch das gabaerge System zu einer Aufhebung der durch MK801 induzierten Zellreifung kam.

Die modulierende Wirkung des GABA_A-Synergisten Diazepam zeigte sich am Einfluss von GABA auf neuronale Progenitorzellen (Tozuka, Fukuda et al. 2005) sowie bei elektrophysiologischen Studien am Moosfasersystem (Derrick, York et al. 2000; Gutierrez and Heinemann 2001; Walker, Ruiz et al. 2001; Bergersen, Ruiz et al. 2003; Gutierrez 2003; Romo-Parra, Vivar et al. 2003; Sokolov, Rossokhin et al. 2003). Wir konnten nachweisen, dass Diazepam selbst zu Neurogenese mit Dominanz von neuronalen Progenitorzellen und BrdU⁺ Zellen ohne weitere Marker führt. Dies wird durch verschiedene Arbeiten (Deisseroth and Malenka 2005; Tozuka, Fukuda et al. 2005; Wang, Kempermann et al. 2005; Ge, Goh et al. 2006) unterstützt, die eine frühe gabaerge Innervation neuer Neurone nachgewiesen haben, was einen wichtigem Effekt auf die Differenzierung und Einbindung in das Netzwerk des DG hat. Außerdem konnte die von MK801 in nativen Tieren induzierte verstärkte Neurogenese und Zellreifung durch den Einfluss von Diazepam verhindert werden. Fraglich ist, welcher Mechanismus dafür verantwortlich ist. Fand dieser Prozess an den neuronalen

Progenitorzellen, die selbst unter GABA-Einfluss stehen sollen statt (Tozuka, Fukuda et al. 2005) oder ist die Ursache für die GABA-Modifikationen vornehmlich im Moosfasersystem zu finden? Viele Studien zu GABA wurden in Verwendung von Glutamatrezeptorantagonisten durchgeführt, um Ionenströme von GABA besser sichtbar zu machen. Jedoch wurden hier zumeist andere Substanzen zur Blockade von NMDA-Rezeptoren verwandt wie z.B. 3-(2-Carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid (selektiver, kompetitiver NMDA-Rezeptorantagonist (CPP)) bei Sokolov et al. (Sokolov, Rossokhin et al. 2003), was einen differenzierten Vergleich zu unserem Experiment erschwert. Ebenso bleibt die von uns beschriebene Neurogenese von Diazepam durch unser Untersuchungssetting des in-vivo Experiments recht ungenau, weshalb in der Folge sicherlich der Effekt von Diazepam in der Zellkultur unter kontrollierten Bedingungen zu untersuchen wäre. Genauso verhält es sich mit dem Einfluss von Diazepam in Kombination mit MK801 auf das Moosfasersystem und auf die Eingangssignale in dieses System durch die Körnerzellen. Hier könnten elektrophysiologische Folgestudien einen differenzierteren Einblick als wir in unserem in-vivo Experiment geben. Im Hinblick auf die funktionelle Relevanz dieser Modulation durch Diazepam bzw. in Kombination mit MK801 wären sicherlich noch weitere Verhaltens- und Gedächtnisuntersuchungen hilfreich. Hat die Neurogenese durch Diazepam funktionelle Konsequenzen bzw. gibt es funktionelle Konsequenzen durch die Wirkung von MK801, die durch Diazepam veränderbar sind? Gibt es womöglich relevante Langzeitfolgen? Weiterhin wäre es wichtig zu wissen, wie sich die beobachteten Zellen nach 24h im Langzeitversuch nach 4 Wochen entwickeln, um weitere Aussagen zur Relevanz der Veränderungen durch Diazepam im Langzeitversuch treffen zu können.

4.3.3 Experiment 3 (Thalidomid)

Unser Experiment zeigte, dass Thalidomid selbst zu Neurogenese mit Tendenz zu reiferen Zelltypen und in Kombination mit MK801 zu einem enormen Zuwachs an Progenitorzellen führt. Weiterhin konnte durch Thalidomid in den Verhaltensexperimenten eine Verbesserung des lebhaft-agitierten Verhaltens sowie der Anfallslatenz, der durch MK801 ausgelösten Erregung, erreicht werden.

Zusammenfassend können wir feststellen, dass wird durch das Experiment mit Thalidomid absolutes Neuland im Bereich der Neurogenese betreten haben. Es bleiben weiterhin viele Dinge unklar, da wir keine Messung der womöglich beteiligten und angesprochenen Faktoren, die durch Thalidomid beeinflusst werden, in unserem Versuch durchgeführt haben. Durch den Einfluss von Thalidomid haben wir in unserem Versuch eine deutliche, symmetrische Erhöhung der Neurogenese mit Tendenz zu verstärkter Zellreifung beobachtet. In Kombination mit MK801 kam es zu einer verstärkten Neurogenese, allerdings mit Dominanz von Progenitorzellen (hier vor allem Typ-2b Zellen). Wir haben die mögliche Wirkung von Thalidomid über TNF-alpha, NF-kappa-b und angiogenetisch wirksame Faktoren diskutiert, bleiben aber letztendlich den Beweis einer direkten Beziehung auf die Neurogenese schuldig, da wir diese Faktoren nicht gemessen haben.

Wie schon in unserem Experiment mit Diazepam angedacht, wären Langzeitstudien von 4 Wochen notwendig, um das Schicksal der neu gebildeten Zellen besser einschätzen zu können. Ebenso erachten wir es als sinnvoll diese Veränderungen auf ihre funktionelle Relevanz in weiteren Verhaltens- und Gedächtnisstudien zu untersuchen, z.B anhand der schon genannten „Morris Water Maze“. Zur exakten Quantifizierung der Neurogenese durch Thalidomid wären sicherlich Experimente in der Zellkultur zu empfehlen, da die Lösung und Applikation von Thalidomid in-vivo, nach unserer Methode (in Anlehnung an Rupnick et al. (Rupnick, Panigrahy et al. 2002)), nicht einfach war. Des Weiteren wäre eine Messung der Spiegel der relevanten Faktoren unter regulierendem Einfluss von Thalidomid von nutzen, wie z.B. TNF-alpha und der Thalidomidspiegel selbst. Dies erscheint uns wichtig, um noch kausale Dosis-Wirkung Zusammenhänge treffen zu können. Es wäre sinnvoll den Transkriptionsfaktor NF-kappa-b im DG und in den Progenitorzellen zu quantifizieren, um bessere Zusammenhänge zur Neurogenese und Zelldifferenzierung beschreiben zu können. Die

Studie von Shen et al. (Shen, Goderie et al. 2004) zeigte auf, dass neuronale Stammzellen sehr nahe an Gefäßen in Nischen sitzen und unter der Kontrolle der endothelialen Zellen nicht weiter ausdifferenzieren, um weitere Neurone zu produzieren. Interessant wäre es diesen Sachverhalt in einem Modell mit Thalidomid zu untersuchen und die Veränderung der sezernierten Botenstoffe und deren Auswirkung auf die Stammzellen bzw. die Neurogenese zu beobachten. Außerdem wäre in diesem Zusammenhang von Interesse, zu untersuchen, ob eine Veränderung der Angiogenese durch Thalidomid konkrete Auswirkungen auf die Wanderung der Neuronen oder deren Entwicklung im Langzeitversuch hat. Daraus könnten sich u.a. funktionelle Implikationen für das Gehirn von Patienten, die mit Thalidomid meist im Rahmen einer Krebs- oder Lepratherapie behandelt werden, ableiten.

5 Zusammenfassung

Die Effekte von MK801 auf die Neurogenese im Gyrus dentatus des Hippocampus sind bisher nicht im Detail geklärt und weitgehend unklar. Wir haben in unserem Experiment versucht, diesen Effekt in einem Zeitreihenexperiment detailliert, der Taxonomie von Kempermann et al. folgend, zu beschreiben. Des Weiteren haben wir untersucht, inwieweit sich der Effekt von MK801 auf die Neurogenese einerseits durch die Aktivierung des gabaergen Systems (durch Applikation des GABA-Synergisten Diazepam) und andererseits durch Thalidomid modulieren lässt.

Wir konnten in unserem Experiment mit MK801 im Tiermodell mit der C57BL6 nestin-gfp Maus zu den Untersuchungszeitpunkten 1h, 24h und 4 Wochen konsistent eine signifikante Steigerung der BrdU+ Zellen beobachten. Diese Zellen zeigten eine Tendenz zu höheren Reifungsstufen in den Differenzialfärbungen in Form von Typ-2, Typ-3 und BrdU/GFP/Calretinin+ Zellen in den 1h und 24h Gruppen bzw. von BrdU/NeuN+ Zellen in den 4 Wochen Gruppen. In unserem zweiten Experiment mit Diazepam zeigte sich, dass Diazepam selbst Neurogenese induziert. Allerdings zeichnet sich die Neurogenese durch Diazepam nicht durch eine Tendenz zu höheren Reifungsstufen, sondern eher durch Typ-2, Typ-2a und BrdU+ Zellen ohne weitere Marker aus. Des Weiteren konnte durch die Applikation von Diazepam in Kombination mit MK801 eine Zunahme der Zellreifung der neuronalen Vorläuferzellen verhindert werden. Unser drittes Experiment hat gezeigt, dass Thalidomid selbst zu Neurogenese führt. Diese Neurogenese zeichnet sich durch höhere neuronale Reifungsstufen der Vorläuferzellen aus, d.h. hier Typ-3 und BrdU/GFP/Calretinin+ Zellen. Die Kombination von MK801 und Thalidomid führt vornehmlich zu Typ-2 und Typ-2b Zellen, die Daten hinsichtlich reifer neuronaler Vorläuferzellen waren uneinheitlich. Das Anfallsmonitoring zeigte, dass Diazepam signifikant die Anfallsklasse und Anfallslatenz der durch MK801 induzierten Erregung senkt bzw. verlängert und deutet somit in die gleiche Richtung wie unsere histologischen Daten. Durch Thalidomid war nur eine Verlängerung der Anfallslatenz zu erreichen, jedoch keine signifikante Senkung der Anfallsklasse.

Zusammenfassend folgern wir, dass es in der durch MK801 ausgelösten Neurogenese zu vermehrter Zellreifung der Vorläuferzellen kommt, welche sich durch Diazepam und Thalidomid modulieren lässt. Auf der Ebene der Glutamatrezeptoren konnten wir feststellen, dass Glutamat über den NMDA-Rezeptor, wie auch in unserem Versuch

gesehen, einen hemmenden und anderen Arbeiten folgend über den AMPA- und Kainatrezeptor einen erregenden Einfluss auf die Neurogenese ausübt. Als Wirkungsmechanismen von MK801 in seinem Einfluss auf die Neurogenese haben wir NMDA-Rezeptoren auf neuronalen Progenitorzellen, den Einfluss von NMDA-Rezeptoren auf die Ausschüttung von inhibitorischen GABA aus Interneuronen des Hippocampus und die Beteiligung von Glutamat über NMDA-Rezeptoren im Moosfaserkreislauf diskutiert. Dennoch können wir eine genaue Erklärung unserer Befunde nach unseren Experimenten nicht liefern.

Wir konnten in unserem zweiten Experiment zeigen, dass Diazepam selbst zu Neurogenese führt. Dies haben wir durch die sehr frühe Innervation von jungen Neuronen durch gabaerge Synapsen und den daraus resultierenden Einfluss auf die Differenzierung und die Einbindung in das Netzwerk des DG erklärt. Außerdem erscheint uns die Einbindung von GABA in den Moosfaserkreislauf wichtig um die Neurogenese durch Diazepam (mit Dominanz früher Progenitorzellen) zu erklären. Durch Diazepam und somit den gabaergen Einfluss war es möglich die Induktion von MK801 zu verstärkter Zellreifung zu verhindern und die Erregungs- bzw. Krampfaktivität der mit MK801 behandelten Tiere deutlich zu senken. Dieses Ergebnis erklären wir uns ebenfalls durch die Synergie von Glutamat und GABA im Moosfaserkreislauf sowie durch die sehr frühe gabaerge synaptische Innervation von neugebildeten neuronalen Progenitorzellen, die der glutamatergen Innervation vorangeht.

Thalidomid führt selbst zu Neurogenese mit Tendenz zu verstärkter Zellreifung. Die Kombination von Thalidomid mit MK801 führt vorwiegend zu neuronalen Progenitorzellen des Typs-2 und Typs-2b mit uneinheitlichen Daten der reiferen neuronalen Zellen. Auf der Ebene der Verhaltensbeobachtung lies sich eine Verlängerung der Anfallslatenz, der mit MK801 behandelten Tiere, durch Thalidomid beobachten. Als Erklärung dafür haben wir den Einfluss von TNF-alpha, NF-kappa-b sowie angiogenetischen Faktoren diskutiert. Nach den Versuchen mit Thalidomid bleiben wir letztendlich eine konkrete Erklärung unserer Befunde schuldig. Wir haben in unserem Experiment keinen der von uns diskutierten Faktoren gemessen und können nur die täglich applizierte Menge von Thalidomid in der Vorbehandlungsphase als Arbeitsgrundlage angeben.

Literaturverzeichnis

- Abrous, D. N., M. Koehl and M. Le Moal (2005). "Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology." *Physiol Rev* **85**(2): 523-69.
- Acsady, L., A. Kamondi, A. Sik, T. Freund and G. Buzsaki (1998). "GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus." *J Neurosci* **18**(9): 3386-403.
- Alderton, W. K., C. E. Cooper and R. G. Knowles (2001). "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition." *Biochem J* **357**(Pt 3): 593-615.
- Allen, E. (1912). "The cessation of mitosis in the central nervous system of albino rat." *J. Comp. Neurol.* **19**: 547-68.
- Almiron, R. S., M. F. Perez and O. A. Ramirez (2004). "MK-801 prevents the increased NMDA-NR1 and NR2B subunits mRNA expression observed in the hippocampus of rats tolerant to diazepam." *Brain Res* **1008**(1): 54-60.
- Altman, J. (1962). "Are new neurons formed in the brains of adult mammals?" *Science* **135**: 1127-8.
- Altman, J. (1963). "Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats." *Anat Rec* **145**: 573-91.
- Altman, J. (1966). "Proliferation and migration of undifferentiated precursor cells in the rat during postnatal gliogenesis." *Exp Neurol* **16**(3): 263-78.
- Altman, J. and G. D. Das (1965). "Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats." *J Comp Neurol* **124**(3): 319-35.
- Altman, J. and G. D. Das (1965). "Post-natal origin of microneurons in the rat brain." *Nature* **207**(5000): 953-6.
- Altman, J. and G. D. Das (1966). "Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions." *J Comp Neurol* **126**(3): 337-89.
- Altman, J. and G. D. Das (1967). "Postnatal neurogenesis in the guinea-pig." *Nature* **214**(5093): 1098-101.
- Amaral, D. G. and M. P. Witter (1989). "The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data." *Neuroscience* **31**(3): 571-91.
- Antonopoulos, J., I. S. Pappas and J. G. Parnavelas (1997). "Activation of the GABAA receptor inhibits the proliferative effects of bFGF in cortical progenitor cells." *Eur J Neurosci* **9**(2): 291-8.
- Bai, F., M. Bergeron and D. L. Nelson (2003). "Chronic AMPA receptor potentiator (LY451646) treatment increases cell proliferation in adult rat hippocampus." *Neuropharmacology* **44**(8): 1013-21.
- Balosso, S., T. Ravizza, C. Perego, et al. (2005). "Tumor necrosis factor-alpha inhibits seizures in mice via p75 receptors." *Ann Neurol* **57**(6): 804-12.
- Banasr, M., M. Hery, R. Printemps and A. Daszuta (2004). "Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone." *Neuropsychopharmacology* **29**(3): 450-60.

- Barger, S. W., D. Horster, K. Furukawa, et al. (1995). "Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca²⁺-accumulation." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9328-32.
- Ben-Ari, Y. (2002). "Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture." Nat Rev Neurosci **3**(9): 728-39.
- Bergersen, L., A. Ruiz, J. G. Bjaalie, D. M. Kullmann and V. Gundersen (2003). "GABA and GABAA receptors at hippocampal mossy fibre synapses." Eur J Neurosci **18**(4): 931-41.
- Bernabeu, R. and F. R. Sharp (2000). "NMDA and AMPA/kainate glutamate receptors modulate dentate neurogenesis and CA3 synapsin-I in normal and ischemic hippocampus." J Cereb Blood Flow Metab **20**(12): 1669-80.
- Bernier, P. J., J. Vinet, M. Cossette and A. Parent (2000). "Characterization of the subventricular zone of the adult human brain: evidence for the involvement of Bcl-2." Neurosci Res **37**(1): 67-78.
- Bittigau, P., M. Sifringer, K. Genz, et al. (2002). "Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(23): 15089-94.
- Brandt, M. D., S. Jessberger, B. Steiner, et al. (2003). "Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice." Mol Cell Neurosci **24**(3): 603-13.
- Brezun, J. M. and A. Daszuta (1999). "Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats." Neuroscience **89**(4): 999-1002.
- Brezun, J. M. and A. Daszuta (2000). "Serotonergic reinnervation reverses lesion-induced decreases in PSA-NCAM labeling and proliferation of hippocampal cells in adult rats." Hippocampus **10**(1): 37-46.
- Brezun, J. M. and A. Daszuta (2000). "Serotonin may stimulate granule cell proliferation in the adult hippocampus, as observed in rats grafted with foetal raphe neurons." Eur J Neurosci **12**(1): 391-6.
- Bruce, A. J., W. Boling, M. S. Kindy, et al. (1996). "Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors." Nat Med **2**(7): 788-94.
- Cameron, H. A., B. S. McEwen and E. Gould (1995). "Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus." J Neurosci **15**(6): 4687-92.
- Cameron, H. A. and R. D. McKay (2001). "Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus." J Comp Neurol **435**(4): 406-17.
- Cameron, H. A., P. Tanapat and E. Gould (1998). "Adrenal steroids and N-methyl-D-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway." Neuroscience **82**(2): 349-54.
- Cauley, K. and I. M. Verma (1994). "Kappa B enhancer-binding complexes that do not contain NF-kappa B are developmentally regulated in mammalian brain." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(1): 390-4.
- Chung, F., J. Lu, B. D. Palmer, et al. (2004). "Thalidomide pharmacokinetics and metabolite formation in mice, rabbits, and multiple myeloma patients." Clin Cancer Res **10**(17): 5949-56.
- Corish, P. and C. Tyler-Smith (1999). "Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells." Protein Eng **12**(12): 1035-40.

- Crawford, I. L. and J. D. Connor (1973). "Localization and release of glutamic acid in relation to the hippocampal mossy fibre pathway." *Nature* **244**(5416): 442-3.
- Czlonkowska, A. I., P. Krzascik, H. Sienkiewicz-Jarosz, et al. (2000). "The effects of neurosteroids on picrotoxin-, bicuculline- and NMDA-induced seizures, and a hypnotic effect of ethanol." *Pharmacol Biochem Behav* **67**(2): 345-53.
- Dashtipour, K., P. H. Tran, M. M. Okazaki, J. V. Nadler and C. E. Ribak (2001). "Ultrastructural features and synaptic connections of hilar ectopic granule cells in the rat dentate gyrus are different from those of granule cells in the granule cell layer." *Brain Res* **890**(2): 261-71.
- De Simoni, M. G., C. Perego, T. Ravizza, et al. (2000). "Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus." *Eur J Neurosci* **12**(7): 2623-33.
- Deisseroth, K. and R. C. Malenka (2005). "GABA excitation in the adult brain: a mechanism for excitation- neurogenesis coupling." *Neuron* **47**(6): 775-7.
- Deisseroth, K., S. Singla, H. Toda, et al. (2004). "Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells." *Neuron* **42**(4): 535-52.
- Derrick, B. E., A. D. York and J. L. Martinez, Jr. (2000). "Increased granule cell neurogenesis in the adult dentate gyrus following mossy fiber stimulation sufficient to induce long-term potentiation." *Brain Res* **857**(1-2): 300-7.
- Doetsch, F. and R. Hen (2005). "Young and excitable: the function of new neurons in the adult mammalian brain." *Curr Opin Neurobiol* **15**(1): 121-8.
- Drapeau, E., W. Mayo, C. Aurousseau, et al. (2003). "Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(24): 14385-90.
- Ehninger, D. and G. Kempermann (2003). "Regional effects of wheel running and environmental enrichment on cell genesis and microglia proliferation in the adult murine neocortex." *Cereb Cortex* **13**(8): 845-51.
- Eichenbaum, H. (1997). "Declarative memory: insights from cognitive neurobiology." *Annu Rev Psychol* **48**: 547-72.
- Encinas, J. M., A. Vahtokari and G. Enikolopov (2006). "Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(21): 8233-8.
- Eriksson, P. S., E. Perfilieva, T. Bjork-Eriksson, et al. (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." *Nat Med* **4**(11): 1313-7.
- Feinberg, I., I. G. Campbell and J. C. Marrs (1995). "Intraperitoneal dizocilpine induces cortical spike-wave seizure discharges in rats." *Neurosci Lett* **196**(3): 157-60.
- Filippov, V., G. Kronenberg, T. Pivneva, et al. (2003). "Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes." *Mol Cell Neurosci* **23**(3): 373-82.
- Ge, S., E. L. Goh, K. A. Sailor, et al. (2006). "GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain." *Nature* **439**(7076): 589-93.
- Gilbert, M. E. and C. M. Mack (1990). "The NMDA antagonist, MK-801, suppresses long-term potentiation, kindling, and kindling-induced potentiation in the perforant path of the unanesthetized rat." *Brain Res* **519**(1-2): 89-96.
- Golarai, G., A. C. Greenwood, D. M. Feeney and J. A. Connor (2001). "Physiological and structural evidence for hippocampal involvement in persistent seizure susceptibility after traumatic brain injury." *J Neurosci* **21**(21): 8523-37.
- Gould, E., B. S. McEwen, P. Tanapat, L. A. Galea and E. Fuchs (1997). "Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation." *J Neurosci* **17**(7): 2492-8.

- Gould, E., A. J. Reeves, M. Fallah, et al. (1999). "Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(9): 5263-7.
- Gould, E., A. J. Reeves, M. S. Graziano and C. G. Gross (1999). "Neurogenesis in the neocortex of adult primates." Science **286**(5439): 548-52.
- Gould, E., N. Vail, M. Wagers and C. G. Gross (2001). "Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(19): 10910-7.
- Grassi Zucconi, G. and A. Giuditta (2002). "Is it only neurogenesis?" Rev Neurosci **13**(4): 375-82.
- Gutierrez, R. (2003). "The GABAergic phenotype of the "glutamatergic" granule cells of the dentate gyrus." Prog Neurobiol **71**(5): 337-58.
- Gutierrez, R. and U. Heinemann (2001). "Kindling induces transient fast inhibition in the dentate gyrus--CA3 projection." Eur J Neurosci **13**(7): 1371-9.
- Halim, N. D., C. S. Weickert, B. W. McClintock, D. R. Weinberger and B. K. Lipska (2004). "Effects of chronic haloperidol and clozapine treatment on neurogenesis in the adult rat hippocampus." Neuropsychopharmacology **29**(6): 1063-9.
- Hallene, K. L., E. Oby, B. J. Lee, et al. (2006). "Prenatal exposure to thalidomide, altered vasculogenesis, and CNS malformations." Neuroscience **142**(1): 267-83.
- Hamilton, A. (1901). "The division of differentiated cells in the central nervous system of the white rat." J. Comp. Neurol. **11**: 297-320.
- Haydar, T. F., F. Wang, M. L. Schwartz and P. Rakic (2000). "Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones." J Neurosci **20**(15): 5764-74.
- Horner, P. J., A. E. Power, G. Kempermann, et al. (2000). "Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord." J Neurosci **20**(6): 2218-28.
- Iosif, R. E., C. T. Ekdahl, H. Ahlenius, et al. (2006). "Tumor necrosis factor receptor 1 is a negative regulator of progenitor proliferation in adult hippocampal neurogenesis." J Neurosci **26**(38): 9703-12.
- Jessberger, S., B. Romer, H. Babu and G. Kempermann (2005). "Seizures induce proliferation and dispersion of doublecortin-positive hippocampal progenitor cells." Exp Neurol **196**(2): 342-51.
- Kaplan, M. S. (1981). "Neurogenesis in the 3-month-old rat visual cortex." J Comp Neurol **195**(2): 323-38.
- Kaplan, M. S. (1985). "Formation and turnover of neurons in young and senescent animals: an electronmicroscopic and morphometric analysis." Ann N Y Acad Sci **457**: 173-92.
- Kaplan, M. S. (2001). "Environment complexity stimulates visual cortex neurogenesis: death of a dogma and a research career." Trends Neurosci **24**(10): 617-20.
- Kaplan, M. S. and J. W. Hinds (1977). "Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs." Science **197**(4308): 1092-4.
- Kempermann, G. (2006). Adult Neurogenesis Stem Cells and Neuronal Development in the Adult Brain. Oxford, Oxford University Press.
- Kempermann, G., D. Gast, G. Kronenberg, M. Yamaguchi and F. H. Gage (2003). "Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice." Development **130**(2): 391-9.
- Kempermann, G., S. Jessberger, B. Steiner and G. Kronenberg (2004). "Milestones of neuronal development in the adult hippocampus." Trends Neurosci **27**(8): 447-52.

- Kempermann, G., H. G. Kuhn and F. H. Gage (1997). "Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(19): 10409-14.
- Kempermann, G., H. G. Kuhn and F. H. Gage (1997). "More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment." Nature **386**(6624): 493-5.
- Khazipov, R., M. Esclapez, O. Caillard, et al. (2001). "Early development of neuronal activity in the primate hippocampus in utero." J Neurosci **21**(24): 9770-81.
- Kiaei, M., S. Petri, K. Kipiani, et al. (2006). "Thalidomide and lenalidomide extend survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." J Neurosci **26**(9): 2467-73.
- Koketsu, D., A. Mikami, Y. Miyamoto and T. Hisatsune (2003). "Nonrenewal of neurons in the cerebral neocortex of adult macaque monkeys." J Neurosci **23**(3): 937-42.
- Kolb, B., B. Pedersen, M. Ballermann, R. Gibb and I. Q. Whishaw (1999). "Embryonic and postnatal injections of bromodeoxyuridine produce age-dependent morphological and behavioral abnormalities." J Neurosci **19**(6): 2337-46.
- Kornack, D. R. and P. Rakic (1999). "Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(10): 5768-73.
- Kornack, D. R. and P. Rakic (2001). "The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(8): 4752-7.
- Liu, M., S. J. Pleasure, A. E. Collins, et al. (2000). "Loss of BETA2/NeuroD leads to malformation of the dentate gyrus and epilepsy." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(2): 865-70.
- LoTurco, J. J., D. F. Owens, M. J. Heath, M. B. Davis and A. R. Kriegstein (1995). "GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis." Neuron **15**(6): 1287-98.
- Magavi, S. S., B. R. Leavitt and J. D. Macklis (2000). "Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice." Nature **405**(6789): 951-5.
- Majumdar, S., B. Lamothe and B. B. Aggarwal (2002). "Thalidomide suppresses NF-kappa B activation induced by TNF and H₂O₂, but not that activated by ceramide, lipopolysaccharides, or phorbol ester." J Immunol **168**(6): 2644-51.
- Marjanovic, B. D., L. M. Stojanov, D. S. Zdravkovic, R. M. Kravljanc and M. S. Djordjevic (2003). "Rasmussen syndrome and long-term response to thalidomide." Pediatr Neurol **29**(2): 151-6.
- Mastroianni, J., R. B. Rosse and S. I. Deutsch (2004). "Anabasine, a selective nicotinic acetylcholine receptor agonist, antagonizes MK-801-elicited mouse popping behavior, an animal model of schizophrenia." Behav Brain Res **153**(2): 419-22.
- Matsuyama, S., K. Nei and C. Tanaka (1997). "Regulation of GABA release via NMDA and 5-HT_{1A} receptors in guinea pig dentate gyrus." Brain Res **761**(1): 105-12.
- Mayo, W., V. Lemaire, J. Malaterre, et al. (2005). "Pregnenolone sulfate enhances neurogenesis and PSA-NCAM in young and aged hippocampus." Neurobiol Aging **26**(1): 103-14.
- Melchert, M. and A. List (2007). "The thalidomide saga." Int J Biochem Cell Biol.
- Ming, G. L. and H. Song (2005). "Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system." Annu Rev Neurosci **28**: 223-50.
- Moreno-Lopez, B., J. A. Noval, L. G. Gonzalez-Bonet and C. Estrada (2000). "Morphological bases for a role of nitric oxide in adult neurogenesis." Brain Res **869**(1-2): 244-50.

- Nacher, J., G. Alonso-Llosa, D. R. Rosell and B. S. McEwen (2003). "NMDA receptor antagonist treatment increases the production of new neurons in the aged rat hippocampus." Neurobiol Aging **24**(2): 273-84.
- Nacher, J., D. R. Rosell, G. Alonso-Llosa and B. S. McEwen (2001). "NMDA receptor antagonist treatment induces a long-lasting increase in the number of proliferating cells, PSA-NCAM-immunoreactive granule neurons and radial glia in the adult rat dentate gyrus." Eur J Neurosci **13**(3): 512-20.
- Nguyen, L., B. Malgrange, I. Breuskin, et al. (2003). "Autocrine/paracrine activation of the GABA(A) receptor inhibits the proliferation of neurogenic polysialylated neural cell adhesion molecule-positive (PSA-NCAM+) precursor cells from postnatal striatum." J Neurosci **23**(8): 3278-94.
- Nixon, K. and F. T. Crews (2004). "Temporally specific burst in cell proliferation increases hippocampal neurogenesis in protracted abstinence from alcohol." J Neurosci **24**(43): 9714-22.
- Nowakowski, R. S. and N. L. Hayes (2000). "New neurons: extraordinary evidence or extraordinary conclusion?" Science **288**(5467): 771.
- Nowakowski, R. S., S. B. Lewin and M. W. Miller (1989). "Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population." J Neurocytol **18**(3): 311-8.
- Okuyama, N., N. Takagi, T. Kawai, K. Miyake-Takagi and S. Takeo (2004). "Phosphorylation of extracellular-regulating kinase in NMDA receptor antagonist-induced newly generated neurons in the adult rat dentate gyrus." J Neurochem **88**(3): 717-25.
- O'Neill, L. A. and C. Kaltschmidt (1997). "NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function." Trends Neurosci **20**(6): 252-8.
- Ormerod, B. K., E. M. Falconer and L. A. Galea (2003). "N-methyl-D-aspartate receptor activity and estradiol: separate regulation of cell proliferation in the dentate gyrus of adult female meadow vole." J Endocrinol **179**(2): 155-63.
- Owens, D. F. and A. R. Kriegstein (2002). "Is there more to GABA than synaptic inhibition?" Nat Rev Neurosci **3**(9): 715-27.
- Parent, J. M., T. W. Yu, R. T. Leibowitz, et al. (1997). "Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus." J Neurosci **17**(10): 3727-38.
- Pencea, V., K. D. Bingaman, L. J. Freedman and M. B. Luskin (2001). "Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain." Exp Neurol **172**(1): 1-16.
- Persson, M., M. Brantefjord, E. Hansson and L. Ronnback (2005). "Lipopolysaccharide increases microglial GLT-1 expression and glutamate uptake capacity in vitro by a mechanism dependent on TNF-alpha." Glia **51**(2): 111-20.
- Platel, J. C., B. Lacar and A. Bordey (2007). "GABA and glutamate signaling: homeostatic control of adult forebrain neurogenesis." J Mol Histol.
- Privat, A. and C. P. Leblond (1972). "The subependymal layer and neighboring region in the brain of the young rat." J Comp Neurol **146**(3): 277-302.
- Racine, R. J. (1972). "Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **32**(3): 281-94.
- Radley, J. J. and B. L. Jacobs (2002). "5-HT1A receptor antagonist administration decreases cell proliferation in the dentate gyrus." Brain Res **955**(1-2): 264-7.
- Rakic, P. (1985). "Limits of neurogenesis in primates." Science **227**(4690): 1054-6.

- Rakic, P. (2002). "Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis." J Neurosci **22**(3): 614-8.
- Romo-Parra, H., C. Vivar, J. Maqueda, M. A. Morales and R. Gutierrez (2003). "Activity-dependent induction of multitransmitter signaling onto pyramidal cells and interneurons of hippocampal area CA3." J Neurophysiol **89**(6): 3155-67.
- Rosenblum, K., M. Maroun and G. Richter-Levin (1999). "Frequency-dependent inhibition in the dentate gyrus is attenuated by the NMDA receptor blocker MK-801 at doses that do not yet affect long-term potentiation." Hippocampus **9**(5): 491-4.
- Rupnick, M. A., D. Panigrahy, C. Y. Zhang, et al. (2002). "Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(16): 10730-5.
- Sandler, R. and A. D. Smith (1991). "Coexistence of GABA and glutamate in mossy fiber terminals of the primate hippocampus: an ultrastructural study." J Comp Neurol **303**(2): 177-92.
- Savchenko, V. L., J. A. McKanna, I. R. Nikonenko and G. G. Skibo (2000). "Microglia and astrocytes in the adult rat brain: comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity." Neuroscience **96**(1): 195-203.
- Sawamoto, K., N. Nakao, K. Kakishita, et al. (2001). "Generation of dopaminergic neurons in the adult brain from mesencephalic precursor cells labeled with a nestin-GFP transgene." J Neurosci **21**(11): 3895-903.
- Scharfman, H. E., J. H. Goodman and A. L. Sollas (2000). "Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis." J Neurosci **20**(16): 6144-58.
- Sekerkova, G., E. Ilijic and E. Mugnaini (2004). "Bromodeoxyuridine administered during neurogenesis of the projection neurons causes cerebellar defects in rat." J Comp Neurol **470**(3): 221-39.
- Seri, B., J. M. Garcia-Verdugo, B. S. McEwen and A. Alvarez-Buylla (2001). "Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus." J Neurosci **21**(18): 7153-60.
- Shannon, E. J., M. J. Morales and F. Sandoval (1997). "Immunomodulatory assays to study structure-activity relationships of thalidomide." Immunopharmacology **35**(3): 203-12.
- Shen, Q., S. K. Goderie, L. Jin, et al. (2004). "Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells." Science **304**(5675): 1338-40.
- Sidman, R. L., I. L. Miale and N. Feder (1959). "Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone: an autoradiographic study of histogenesis in the nervous system." Exp Neurol **1**: 322-33.
- Sloviter, R. S., M. A. Dichter, T. L. Rachinsky, et al. (1996). "Basal expression and induction of glutamate decarboxylase and GABA in excitatory granule cells of the rat and monkey hippocampal dentate gyrus." J Comp Neurol **373**(4): 593-618.
- Sokolov, M. V., A. V. Rossokhin, M. K. A, et al. (2003). "Associative mossy fibre LTP induced by pairing presynaptic stimulation with postsynaptic hyperpolarization of CA3 neurons in rat hippocampal slice." Eur J Neurosci **17**(7): 1425-37.
- Steiner, B., F. Klempin, L. Wang, et al. (2006). "Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis." Glia **54**(8): 805-14.
- Steiner, B., G. Kronenberg, S. Jessberger, et al. (2004). "Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice." Glia **46**(1): 41-52.

- Tozuka, Y., S. Fukuda, T. Namba, T. Seki and T. Hisatsune (2005). "GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells." Neuron **47**(6): 803-15.
- Tutka, P., T. Mroz, K. Klucha, M. Piekarczyk and M. Wielosz (2005). "Bupropion-induced convulsions: preclinical evaluation of antiepileptic drugs." Epilepsy Res **64**(1-2): 13-22.
- Unlap, T. and R. S. Jope (1995). "Inhibition of NFkB DNA binding activity by glucocorticoids in rat brain." Neurosci Lett **198**(1): 41-4.
- Vallee, M., W. Mayo, M. Darnaudery, et al. (1997). "Neurosteroids: deficient cognitive performance in aged rats depends on low pregnenolone sulfate levels in the hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(26): 14865-70.
- Vezzani, A., R. Serafini, M. A. Stasi, et al. (1989). "Kinetics of MK-801 and its effect on quinolinic acid-induced seizures and neurotoxicity in rats." J Pharmacol Exp Ther **249**(1): 278-83.
- Walker, M. C., A. Ruiz and D. M. Kullmann (2001). "Monosynaptic GABAergic signaling from dentate to CA3 with a pharmacological and physiological profile typical of mossy fiber synapses." Neuron **29**(3): 703-15.
- Wang, L. P., G. Kempermann and H. Kettenmann (2005). "A subpopulation of precursor cells in the mouse dentate gyrus receives synaptic GABAergic input." Mol Cell Neurosci **29**(2): 181-9.
- Wang, Q., J. Wu, M. J. Rowan and R. Anwyl (2005). "Beta-amyloid inhibition of long-term potentiation is mediated via tumor necrosis factor." Eur J Neurosci **22**(11): 2827-32.
- Wang, S., B. W. Scott and J. M. Wojtowicz (2000). "Heterogenous properties of dentate granule neurons in the adult rat." J Neurobiol **42**(2): 248-57.
- Wang, Y. A., W. X. Zhou, J. X. Li, et al. (2005). "Anticonvulsant effects of phencyclone hydrochloride and other anticholinergic drugs in soman poisoning: neurochemical mechanisms." Life Sci **78**(2): 210-23.
- Yamaguchi, M., H. Saito, M. Suzuki and K. Mori (2000). "Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-GFP transgenic mice." Neuroreport **11**(9): 1991-6.
- Zhang, R., L. Zhang, Z. Zhang, et al. (2001). "A nitric oxide donor induces neurogenesis and reduces functional deficits after stroke in rats." Ann Neurol **50**(5): 602-11.

Danksagung

Hiermit möchte ich allen Helfern im Labor Kempermann Berlin-Buch danken, allen voran Golo Kronenberg, Rike Klempin, Harish Babu, Gerd Kempermann, Imke Vollmer und Ruth Segner. Des Weiteren bedanke ich mich bei Christine Winter und den Doktoranden der Arbeitsgruppe Experimentelle Psychiatrie CCM für die nette Unterstützung.

Auf privater Seite gilt mein Dank meiner Frau Ulrike für die Unterstützung in diesen Jahren und Susanne Argus sowie meinen Lektoren Golo Kronenberg, Klaus Goldhahn, meiner Mutter Marlies und meiner Frau.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Publikationen

- Steiner, B., C. Winter, K. Hosman, E. Siebert, G. Kempermann, D. S. Petrus and A. Kupsch (2006). "Enriched environment induces cellular plasticity in the adult substantia nigra and improves motor behavior function in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease." Exp Neurol **199**(2): 291-300.
- Winter, C., A. von Rumohr, A. Mundt, D. Petrus, J. Klein, T. Lee, R. Morgenstern, A. Kupsch and G. Juckel (2007). "Lesions of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area enhance depressive-like behavior in rats." Behav Brain Res **184**(2): 133-41.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die Dissertation „Effekte der Blockade des NMDA-Rezeptors auf die adulte hippocampale Neurogenese“ von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, dass sie auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind. Diese Dissertation ist bislang nicht veröffentlicht, und sie wurde noch von keiner anderen Fakultät abgelehnt.