

Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. J. Deckert

**Adulte hippocampale Neurogenese
bei psychischen Erkrankungen**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Mathias Johannes Finger
aus Würzburg

Würzburg, November 2007

Referent: Professor Dr. med. Klaus-Peter Lesch
Korreferent: Professor Dr. med. Peter Kugler
Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

30. April 2008

Der Promovend ist Arzt

Meiner Familie in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Anatomie des Hippocampus	1
1.2	Funktion des Hippocampus	2
1.3	Definition adulter Neurogenese	3
1.4	Adulte hippocampale Neurogenese im geschichtlichen Überblick.....	6
1.5	Immunhistochemische Detektion adulter Neurogenese im	10
	Hippocampus mittels BrdU und Ki67	10
1.6	Epidemiologie, ätiopathogenetische Daten und Diagnostik der Depression.....	13
1.7	Epidemiologie, ätiopathogenetische Daten und Diagnostik der bipolar affektiven Erkrankung	16
1.8	Epidemiologie, ätiopathogenetische Daten und Diagnostik der Schizophrenie	18
1.9	Ziele dieser Arbeit.....	20
2	Material.....	21
2.1	Geräte.....	21
2.2	Software.....	22
2.3	Verbrauchsmaterialien.....	22
2.4	Chemikalien	23
2.5	Standardpuffer	25
2.6	Lösungen für immunhistochemische Färbungen	25
2.7	Antikörper	26
2.7.1	Primärantikörper	26
2.7.2	Sekundärantikörper	27
2.8	Detektionskits	28
2.9	Versuchstiere	29
2.10	Humangewebe.....	29
3	Methoden.....	32
3.1	BrdU-Injektion und Gewebeaufarbeitung	32
3.2	Immersionsfixierung und Gewebeaufarbeitung.....	32

3.3	Immunhistochemische Färbungen.....	33
3.4	Immunhistochemische Einzelmarkierungen an.....	35
	Mausgewebe	35
3.4.1	PCNA-Färbung mittels Immunfluoreszenz.....	35
3.4.2	PCNA-Färbung mittels DAB.....	35
3.4.3	DCX-Färbung mittels DAB.....	36
3.5	Immunhistochemische Doppelmarkierungen an Mausgewebe.....	37
3.5.1	BrdU/Ki67 Doppelmarkierung mittels Immunfluoreszenz.....	37
3.5.2	β -III-Tubulin/Ki67 Doppelmarkierung mittels Immunfluoreszenz.....	38
3.5.3	GFAP/Ki67 Doppelmarkierung mittels Immunfluoreszenz	38
3.6	Immunhistochemische Färbungen an humanem postmortem Gewebe	39
3.6.1	Ki67/Nissl-Färbung an humanem postmortem Gewebe mittels DAB-Methode	39
3.6.2	NeuN/Nissl Färbung mittels DAB-Methode.....	40
3.6.3	DCX/Nissl Färbung mittels DAB-Methode	40
3.6.4	PCNA/Nissl Färbung mittels DAB-Methode	40
3.7	Morphometrische Analyse und Quantifizierung der Ki67 positiven Zellen in Humangewebe	41
3.8	Statistische Hilfsmittel.....	41
4	Ergebnisse.....	43
4.1	Ergebnisse der immunhistochemischen Einzelmarkierungen an Mausgewebe	43
4.1.1	PCNA-Färbung mittels Immunfluoreszenz.....	43
4.1.2	PCNA-Färbung mittels DAB.....	43
4.1.3	DCX-Färbung mittels DAB.....	44
4.2	Ergebnisse der immunhistochemischen Doppelmarkierungen an Mausgewebe	45
4.2.1	β -III-Tubulin/Ki67 Doppelmarkierung mittels Immunfluoreszenz.....	45
4.2.2	GFAP/Ki67 Doppelmarkierung mittels Immunfluoreszenz	45
4.2.3	BrdU/Ki67 Doppelmarkierung mittels Immunfluoreszenz.....	46
4.3	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen an humanem postmortem Gewebe.....	48
4.3.1	NeuN/Nissl Färbung mittels DAB-Methode.....	48

4.3.2	DCX/Nissl Färbung mittels DAB-Methode	48
4.3.3	PCNA/Nissl-Färbung mittels DAB-Methode.....	48
4.3.4	Ki67/Nissl Färbung mittels DAB-Methode.....	49
4.4	Neurale Stammzellproliferation in Humangewebe und beeinflussende Faktoren.....	50
4.5	Effekte von Alkohol- und Substanzmissbrauch.....	52
4.6	Einfluss einer Therapie mit Antidepressiva	52
4.7	Adulte Neurogenese und psychische Erkrankungen	53
5	Diskussion	55
5.1	Effekte einer medikamentösen Therapie	58
5.2	Affektive Störungen und adulte Neurogenese	60
5.3	Adulte Neurogenese und Schizophrenie.....	61
6	Zusammenfassung	65
7	Abkürzungsverzeichnis	66
8	Literaturverzeichnis.....	69

1 Einleitung

1.1 Anatomie des Hippocampus

Die Hippocampusformation besteht nach Definition von Blackstad (1956) aus fünf unterschiedlichen Regionen: Dem Gyrus dentatus (DG), dem Subiculum, der Area retrosplenialis, dem entorhinalen Cortex und dem Ammonshorn (Cornu amonis, CA), welches sich aufgrund morphologischer Aspekte und der Vernetzung mit anderen Hirnarealen in die Regionen CA1-4 (Abbildung 1) unterteilt. Die Formation aus DG und CA wird allgemein als Hippocampus bezeichnet. Zwischen diesen einzelnen Regionen einerseits und zu anderen Hirnarealen andererseits besteht eine Vielzahl afferenter und efferenter Verbindungen.

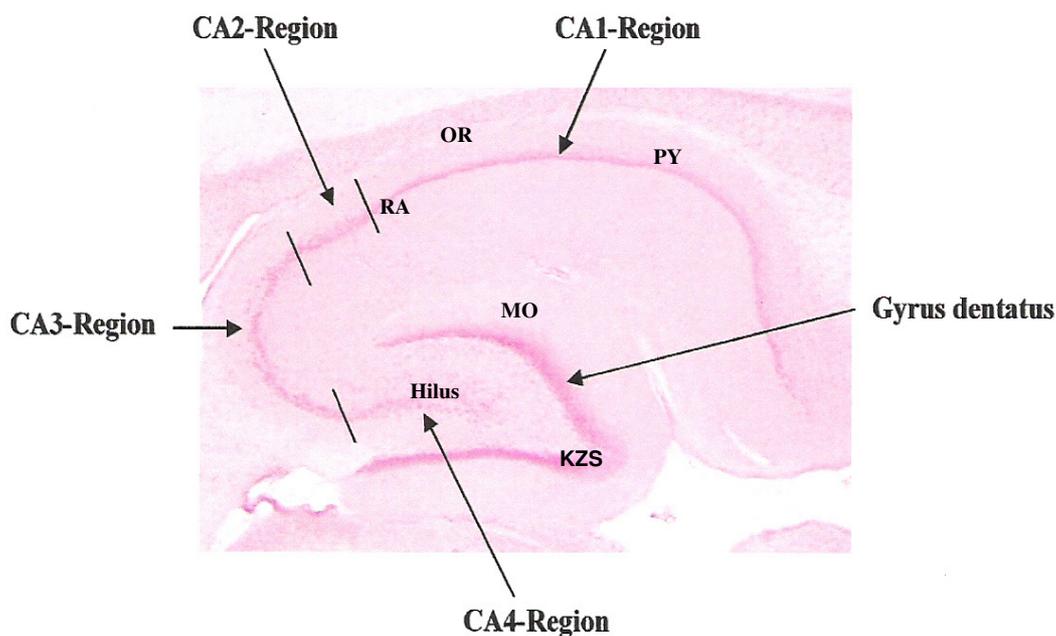


Abbildung 1: Hämatoxylin-Eosin-Färbung des Hippocampus einer Ratte mit Einteilung der verschiedenen CA-Regionen (CA1-4). (MO) Stratum moleculare, (KZS) Stratum granulare / Körnerzellschicht, (RA) Stratum radiatum, (PY) Stratum pyramidale, (OR) Stratum oriens (modifiziert nach Paxinos und Watson 1998).

Ein wesentliches Kennzeichen des Hippocampus ist seine Schichtung. Das Ammonshorn setzt sich aus dem Stratum pyramidale, das die Somata der Pyramidenzellen beherbergt, dem Stratum oriens, welches die Basaldendriten und Axone der Pyramidenzellen enthält, und dem Stratum radiatum zusammen,

in dem die Dendriten der Pyramidenzellen zu finden sind. Der Gyrus dentatus zeigt eine ähnliche Dreischichtung, bestehend aus dem Stratum granulare, welches das Stratum moleculare vom Bereich des Hilus abtrennt. Die zwischen dem Hilus und dem Stratum granulare gelegene Subgranularzellschicht markiert hierbei den Ort, an dem sich neurale Stammzellen befinden.

1.2 Funktion des Hippocampus

Der Hippocampus ist ein Teil des limbischen Systems, welches an vielen neuronalen Vorgängen beteiligt ist, die das Verhalten bestimmen und bei emotionalen Reaktionen ablaufen. Ferner erfüllt es integrative Aufgaben in der Kontrolle des vegetativen Nervensystems und der Koordinierung viszeraler sowie kognitiver Funktionen. Der Hippocampus als solcher ist die entscheidende Struktur für Lern- und Gedächtnisfunktionen, was eindrucksvoll durch den Fall eines Patienten veranschaulicht werden konnte, der nach einer beidseitigen Hippocampektomie zwar einen vollständigen Verlust des Langzeitgedächtnisses im Sinne einer anterograden Amnesie, jedoch keine weiteren Einschränkungen insbesondere seiner kognitiver Leistungen erleiden musste (1). Auch scheint der Hippocampus mehr am Lernvorgang („Engrammierung“) als an der Speicherung von Gedächtnisinhalten maßgeblich beteiligt zu sein, da Patienten mit einem geschädigten Hippocampus zwar Schwierigkeiten haben, neues Wissen aufzunehmen, vor der Verletzung gespeicherte Informationen jedoch problemlos abrufen können (2-6). Die Bedeutung des Hippocampus für die Speicherung expliziter und räumlicher Gedächtnisinhalte konnte dennoch durch tierexperimentelle Studien nahegelegt werden (7-9). Weiterhin wird der Hippocampus durch seine Beteiligung an emotionalen Prozessen als Angriffspunkt antidepressiv wirksamer Medikamente diskutiert (10-22). Positive Befunde konnten dabei nicht nur für Medikamente, wie beispielsweise selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer, sondern ebenfalls für eine elektrokonvulsive Therapie (EKT) im Tiermodell nachgewiesen werden (10;23-27).

1.3 Definition adulter Neurogenese

Unter adulter Neurogenese versteht man die auf mehreren Ebenen in mannigfaltiger Art und Weise beeinflussbare Neuentstehung von Nervenzellen im adulten Individuum, welche sich als komplexer Vorgang aus Proliferation, Migration, Differenzierung und Überleben der neuen Zellen im zentralen Nervensystem zusammensetzt. Ausgehend von neuralen Stammzellen (NSC, multipotente Zellen (28), die sich durch ihre Fähigkeit zur Proliferation, Selbsterneuerung und Differenzierung in neuronale und gliale Zelltypen auszeichnen), bilden sich Neurone, Astrozyten oder Oligodendrozyten (Abbildung 2a).

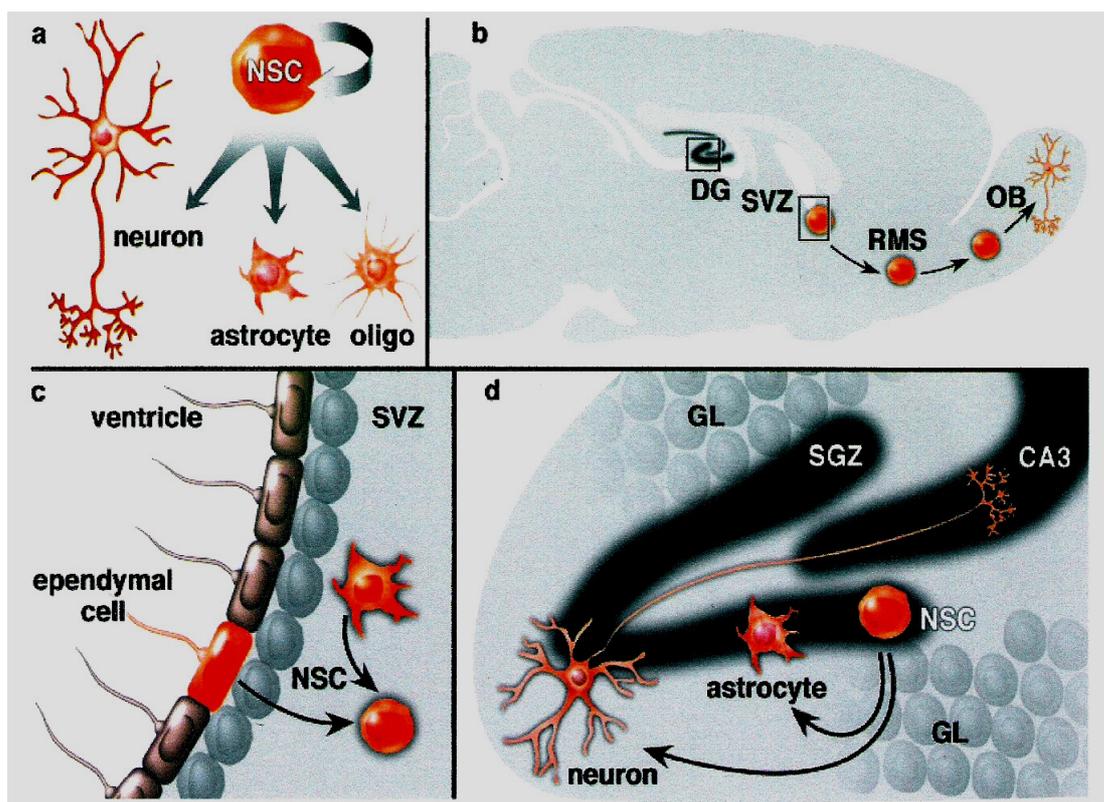


Abbildung 2: Neurogenese und neurale Stammzellen im Gehirn eines erwachsenen Säugetiers (29).

Zur Zeit bestehen zwei Theorien bezüglich der Herkunft der NSCs (Teilabbildung 2c): Erstere besagt, dass die Zellen ihren Ursprung in ependymalen Zellen der lateralen Ventrikel finden, während die andere Theorie vermutet, dass es sich um Astrozyten-ähnliche Zellen handelt, die den

Astrozytenmarker GFAP (glial fibrillary acid protein) exprimieren (30;31). Teilabbildung 2b zeigt schematisch die beiden Entstehungsorte neuraler Stammzellen im sagittalen Schnitt durch das Gehirn einer Maus, nämlich die Subventrikulärzone (SVZ) und den Gyrus dentatus (DG) (29;32-36). Ausgehend von der subventrikulären Zone (SVZ), welche sich an der Wand des lateralen Ventrikels befindet, wandern die NSCs entlang des rostralen migratorischen Systems (RMS) zum Bulbus olfactorius (OB), wo sie sich schließlich zu Interneuronen differenzieren (37). Im DG hingegen bilden sich neue Zellen ausgehend von NCSs, welche in der Subgranularzellschicht (SGZ) des DG lokalisiert sind (Teilabbildung 2d), in die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus einwandern und sich dort zu Neuronen oder Gliazellen differenzieren.

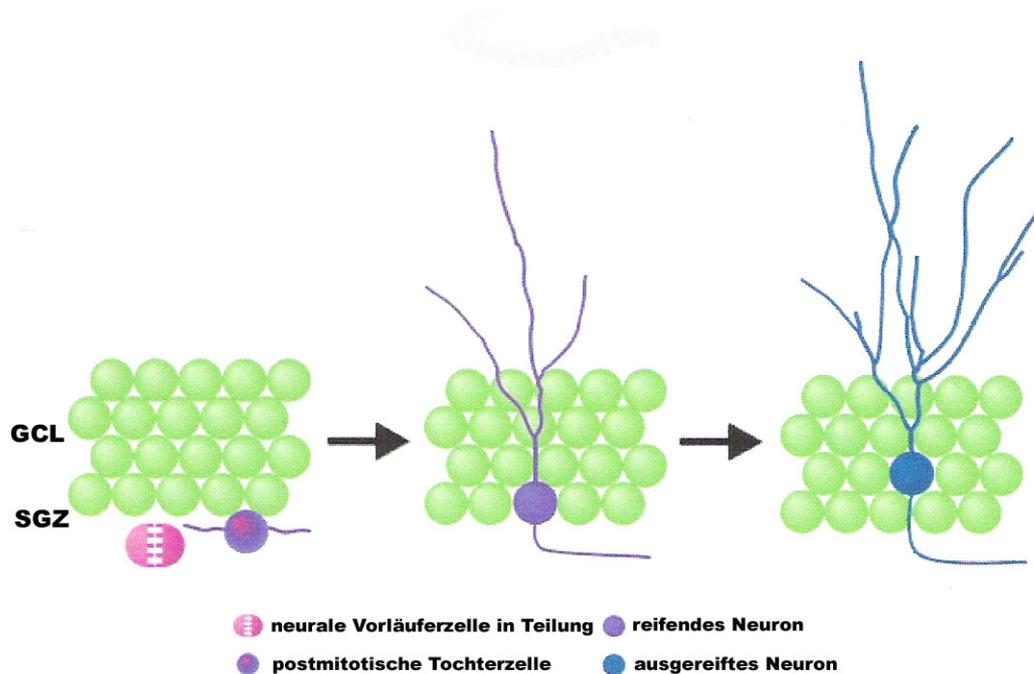


Abbildung 3: Ausreifung neuer Körnerzellen aus Vorläuferzellen aus der Subgranularzellschicht (SGZ) und Einwanderung in die Körnerzellschicht (GCL); modifiziert (38)

Die in der Körnerzellschicht ansässigen neuen Neurone bilden im Folgenden durch die Molekularzellschicht reichende Dendriten sowie ein mit der CA3-Region verknüpftes Axon und werden somit morphologisch und elektrophysiologisch als Körnerzellen integriert (37;39-44) (Abbildung 3 und 4). Dieser Vorgang nimmt von der ersten Zellteilung bis zur funktionellen Integration zwischen vier bis sieben Wochen in Anspruch und korreliert somit mit dem klinisch fassbaren Wirkungseintritt antidepressiv wirksamer Medikamente (45;46). Wie aus Abbildung 4 ersichtlich wird, kommunizieren die neuen

Dendriten mit den Axonen der Neurone des Bulbus olfactorius über den Tractus temporo-ammonicus perforans und bilden so die hippocampale Afferenz. Die Axone der Körnerzellen projizieren zu den CA3-Pyramidenzellen und bilden so den Moosfaserweg. Diese wiederum sind mit der CA1-Region verbunden, wo die terminalen Endigungen der CA3-Pyramidenzellen mit den Dendriten der CA1-Zellen glutamaterge Synapsen ausbilden.

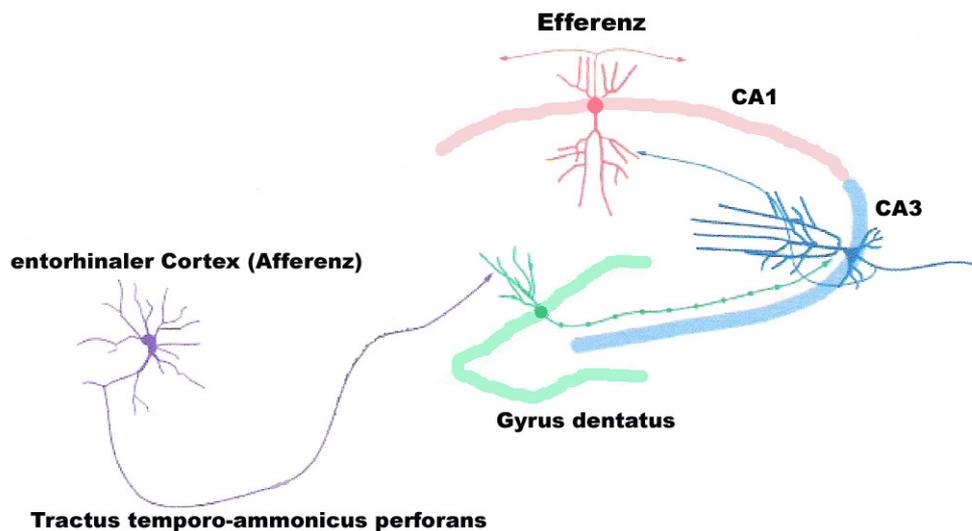


Abbildung 4: Trisynaptische Verschaltung des Hippocampus; modifiziert nach (38).

Besonders wichtig ist es, zwischen den Begriffen der adulten Neurogenese (aN) und der neuralen Stammzellproliferation (NSP) zu unterscheiden. Die neuronale Stammzellproliferation beschreibt den ersten Schritt der adulten Neurogenese, nämlich die Proliferation von neuronalen Stammzellen, welche zur Erzeugung einer weiteren Stammzelle sowie einer neuronalen Progenitorzelle führt. Wie bereits erwähnt, migriert diese im Gyrus dentatus gebildete Tochterzelle in die Körnerzellschicht und differenziert sich dabei vom undifferenzierten Neuroblasten überwiegend zu einer ausgereiften Körnerzelle. Einige wenige Neuroblasten differenzieren jedoch zu Gliazellen. Dieser zweite Schritt der adulten Neurogenese wird meist unter dem Begriff „survival“ zusammengefasst, wobei aber nur 10% der neu gebildeten Zellen den kompletten Weg der Differenzierung durchlaufen.

Es soll somit an dieser Stelle verdeutlicht sein, dass die adulte Neurogenese letztlich als Überbegriff verstanden werden muss, welcher sich aus Proliferation und „survival“ (= Migration und Differenzierung) zusammensetzt und in der

Bildung von einer weiteren Stammzelle sowie einer neuralen Progenitorzelle und schließlich eines funktionell integrierten Neurons beziehungsweise einer Gliazelle resultiert. Der in dieser Arbeit untersuchte erste Schritt der adulten Neurogenese, nämlich die neurale Stammzellproliferation, kann somit lediglich als Surrogat-Parameter verwendet werden, da die Anzahl neu entstandener und tatsächlich funktionell integrierter Neurone unbekannt bleibt, worunter man jedoch adulte Neurogenese im engeren Sinne versteht.

1.4 Adulte hippocampale Neurogenese im geschichtlichen Überblick

Das Phänomen der adulten hippocampalen Neurogenese hat in den letzten Jahren deutlich an Interesse gewonnen und steht insbesondere seit dem Nachweis der adulten Neurogenese im humanen Hippocampus (47;48) im Mittelpunkt neurowissenschaftlicher Forschung. Hierdurch konnte das lange aufrechterhaltene Dogma, dass Nervenzellen sich infolge ihrer Spezifizierung im erwachsenen humanen Gehirn nicht mehr teilen können (49), widerlegt werden, wobei hauptsächlich die oben bereits angeführten Regionen des Gyrus dentatus bzw. der Subventrikulärzone als Orte adulter Neurogenese lokalisiert und identifiziert werden konnten (41;50-54). Neuere Studien zeigen jedoch, dass auch in weiteren Regionen, wie zum Beispiel im Striatum und im Neokortex, neue Neurone entstehen (55-66). Trotz dieser aufsehenerregenden Befunde hätte der Nachweis adulter Neurogenese im humanen Gehirn jedoch nicht allzu sehr überraschen sollen, zumal über diese im Gehirn von Ratten bereits Anfang bzw. Mitte der 1960er Jahre berichtet wurde (50;67) und schon um die Wende vom 19. zum 20. Jahrhundert Zweifel an der Theorie aufkamen, dass Nervenzellen aufgrund ihrer Spezifizierung ihre Teilungsfähigkeit verloren hätten (68-70). Der definitive Nachweis von adulter Neurogenese wurde schließlich im Jahre 1977 erbracht, als autoradiographisch markierten Zellen unter dem Elektronenmikroskop erstmals eine neuronale Ultrastruktur zugewiesen werden konnte (35). Mitte der 1980er Jahre konnte zudem im ZNS von Kanarienvögeln gezeigt werden, dass sich insbesondere in der Paarungszeit, in der diese immer wieder neue Melodien lernen müssen,

Zellen im dorsomedialen Striatum teilen und so neue Nervenzellen entstehen (71). Die Vermutung, dass adulte hippocampale Neurogenese maßgeblich an Lernvorgängen beteiligt sei, konnte von Barnea und Nottebohm bei Singvögeln in den 1990er Jahren bestätigt werden (72;73) und schließlich konnte auch bei Weißbüscheläffchen, Primaten also, gezeigt werden, dass adulte Neurogenese im Hippocampus nicht nur stattfindet, sondern auch durch Stress negativ im Sinne einer Abnahme der Zellproliferation im Gyrus dentatus beeinflusst werden kann (53). Durch weitere Studien an Primaten konnte die Existenz adulter Neurogenese sicher bestätigt werden (33;58).

Dennoch wurde erst im Jahre 1998 die Brücke zum Menschen geschlagen, nämlich als es Eriksson und Mitarbeitern bei fünf Patienten, die mit dem Thymidinanalogon Bromodesoxyuridin (BrdU) wegen eines Kehlkopf- bzw. Mundhöhlenkrebses behandelt wurden, gelang, postmortal Zellen in deren Hippocampus mit Hilfe immunhistochemischer Methoden nachzuweisen. Da sich BrdU, welches bei den Patienten detektiert werden konnte, während der S-Phase (Abbildung 5) in die Desoxyribonukleinsäure (DNS) integriert (Abbildung 6), konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass sich diese Zellen neu geteilt haben müssen, und somit, dass adulte Neurogenese auch im humanen Hippocampus existiert. Da es sich hierbei um Patienten mit einem Durchschnittsalter von 64 Jahren handelte, zeigt diese Studie nicht nur, dass Neurogenese beim Menschen existiert, sondern auch bis ins Alter persistiert (47).

Weitere Studien, vor allem an Gehirnen von Mäusen und Ratten, aber auch beim Menschen, konnten zeigen, in wie vielfältiger Art und Weise die adulte Neurogenese beeinflusst werden kann. So konnte vielfach belegt werden, dass sowohl akuter als auch chronischer Stress, der ein relevanter Auslösefaktor psychischer Erkrankungen ist, zu einer signifikanten Reduktion der Neurogenese führt (53;74;75). Stress resultiert in erhöhten Plasmakonzentrationen von Glukokortikoiden (Kortikotropin, Kortikosteron) und reduziert darüber hinaus auch die Proliferation und das Überleben von hippocampalen Körnerzellen (76-78). Da bei vielen psychischen Erkrankungen, insbesondere bei der Schizophrenie, neuronale Entwicklungsstörungen als

wesentlicher pathophysiologischer Faktor postuliert werden, war diese Fragestellung Gegenstand weiterer Studien, die den Einfluss von insbesondere pränatalem Stress auf die postnatale Neurogenese untersuchten. Hierbei konnte dann in der Tat gezeigt werden, dass pränataler Stress beim Nagetier zu einer verminderten Neurogenese führt (79). Besonders eindrucksvoll sind hierbei Studienergebnisse, die aufzeigen, dass pränataler Stress (akustische Schreckreizexposition der Muttertiere) noch nach einem Zeitraum von 2-3 Jahren zu einer signifikant verminderten Neurogenese im Gyrus dentatus junger Rhesus-Affen führt (80), welche als Ausdruck einer Stressreaktion wiederum mit einem erhöhten Plasmakortisolspiegel verbunden war. Durch Blockade von Kortikotropin-releasing-factor- und Vasopressin-Rezeptoren konnte diese stressinduzierte Reduktion der Neurogenese sogar wieder rückgängig gemacht werden (81). Neben dem inhibitorischen Effekt von Glukokortikoiden ist bislang nur der proliferationsstimulierende Effekt von Östrogenen nachgewiesen (77;82;83), wobei aller Wahrscheinlichkeit nach eine große Anzahl von Hormonen, Neurotransmittern und Wachstumsfaktoren an der Regulation der Neurogenese beteiligt ist, wozu insbesondere Hormone aus der Schilddrüse, der Nebenniere und den Gonaden zählen (77;82;84-87). Auch konnte gezeigt werden, dass diesem hemmenden Effekt von Glukokortikoiden durch Serotonin entgegengesteuert werden kann, das eine Steigerung der Produktion neuer Nervenzellen durch die Aktivierung des 5HT_{1A}-Rezeptors bewirken kann (88). Ebenfalls auf Rezeptorebene wurde der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDA-R) als die Neurogenese beeinflussend erkannt, da dessen Aktivierung zu einem Rückgang und dessen Hemmung zu einer Zunahme der Proliferation führt (89).

Aufgrund dieser Befunde wurden Hypothesen entwickelt, die davon ausgehen, dass eine veränderte Neurogenese einen wichtigen neurobiologischen Faktor in der Ätiopathogenese von psychischen Erkrankungen darstellt, bei denen eine erhebliche Stressvulnerabilität bekannt ist, wozu vor allem die depressiven Störungen zählen (78;90). So konnte im Tiermodell der so genannten „gelernten Hilflosigkeit“ ein depressionsartiges Bild erzeugt werden, das auch mit einer signifikant verminderten Neurogenese einherging (15). Diese Befunde bezüglich des Zusammenhangs zwischen Verhaltensänderung und Neuro-

genese sind jedoch noch umstritten, da es Daten gibt, die einen solchen Zusammenhang nicht finden (91). Der Nachweis einer kausalen Verknüpfung steht also noch immer aus. Demgegenüber liegen jedoch Befunde aus dem Bereich der pharmakobehavioralen Erforschung der Effekte von Antidepressiva vor, die nahe legen, dass das Ausmaß hippocampaler Neurogenese bestimmte Verhaltensmerkmale direkt beeinflussen kann (15;92). Eine verstärkte hippocampale Neurogenese konnte dagegen in einer Postmortem-Studie bei Alzheimer-Patienten und bei Patienten nach Hirnischämie gesehen werden, wobei diese Resultate am ehesten im Sinne einer neuronalen Gegenregulation zu interpretieren sind. Als weiterer wichtiger Einflussfaktor auf die Neurogenese konnte neben Nikotin vor allem Alkohol identifiziert werden. Im Tierversuch wurde nachgewiesen, dass eine übermäßige chronische Alkoholfuhr, wie sie auch bei der Alkoholabhängigkeit vorkommt, vor allem im Hippocampus des adulten Gehirns die Proliferation neuraler Vorläuferzellen inhibiert und das Überleben neu entstandener Nervenzellen vermindert (93-99). Durch freiwillige körperliche Betätigung kann dies jedoch wiederum positiv beeinflusst werden (100). In tierexperimentellen Studien wurde weiterhin beschrieben, dass Nagetiere, die in einer reizreichen Umgebung gehalten wurden oder die Möglichkeit physischer Aktivität erhielten, eine verstärkte Bildung neuer Nervenzellen aufwiesen (101-106), woraus gefolgert wurde, dass physische Aktivität eine antidepressive Wirkung habe (107). Dies konnte durch nachfolgende Studien bestätigt werden (108-119). Ebenso nehmen jedoch das Alter sowie die Ernährung und die genetische Prädisposition ebenfalls maßgeblichen Einfluss auf die Neurogenese (41;120), wobei durchschnittlich im Hippocampus adulter Mäuse täglich etwa 70 neue Körnerzellen geboren werden (120). Hiervon überlebt jedoch nur ein Bruchteil, da der überwiegende Anteil durch apoptotische Mechanismen zerstört wird (121).

Besonders eindrucksvoll ist ein Anfang der 1990er Jahre durchgeführtes Experiment, in dem der Einfluss von Wachstumsfaktoren (epidermal growth factor = EGF) auf die Proliferation von neuralen Stammzellen und deren anschließende Ausreifung in Neurone oder Astrozyten gezeigt werden konnte (122). Weitere Ergebnisse bestätigten diesen Einfluss (63;122;123), wobei neueste Studien nun auch einen Einfluss von β -Endorphinen (124;125), dem

vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) (126-129), von BDNF (brain-derived neurotrophic factor) (130-149) und Serotonin (23;139;150-163) aufzeigen. Weiterhin finden sich bei Hirnischämie, Traumata und Krampfanfällen Veränderungen bezüglich der Neurogenese (164-167). Durch diese Vielzahl beeinflussender Faktoren und die nahezu unüberschaubare Flut von wissenschaftlichen Veröffentlichungen, die verschiedensten Stimuli sowohl negative als auch positive Effekte auf die Neurogenese zuschreiben, fordern Kritiker nun auch den Nachweis eines Stimulus, der keine Wirkung auf die adulte Neurogenese hat, zumal so unspezifische Stimuli wie die Änderung der Konzentration von Hormonen oder vermehrte körperliche Aktivität annähernd gleiche Effekte auf die adulte Neurogenese zu haben scheinen (168). Weiterhin entsteht mehr und mehr der Verdacht, dass es sich bei den neuronalen Vorläuferzellen im Gyrus dentatus und in der subventrikulären Zone um eine heterogene Gruppe von Zellen handelt, die in ihrer Entstehung und Reifung zu verschiedenen Zeitpunkten und in unterschiedlichster Art und Weise beeinflusst werden können (168), was verlangt, dass die genaue Identifikation und Typisierung dieser Zellen Gegenstand weiterer Forschung sein muss.

1.5 Immunhistochemische Detektion adulter Neurogenese im Hippocampus mittels BrdU und Ki67

Um den Nachweis sich teilender Zellen im Nervengewebe anzutreten, bedient man sich der Tatsache, dass sich Nukleotidanaloga während der Mitose in die DNS integrieren und anschließend mit autoradiographischen oder, wie auch in der hier vorliegenden Arbeit, immunhistochemischen Methoden nachgewiesen werden können. Der Vorgang des Zellzyklus gliedert sich in mehrere Phasen (Abbildung 5), wobei während der S-Phase (Synthesephase) die Replikation der Kern-DNS mit der Synthese identischer Tochterstränge aus dem parentalen Strang und in der M-Phase (Mitose) die Zellkernteilung erfolgt. Die G-Phasen (G₁, G₂) repräsentieren Zwischenphasen, die G₀-Phase entspricht dem Zustand einer Zelle, in dem sie sich nicht mehr repliziert und damit ruht.

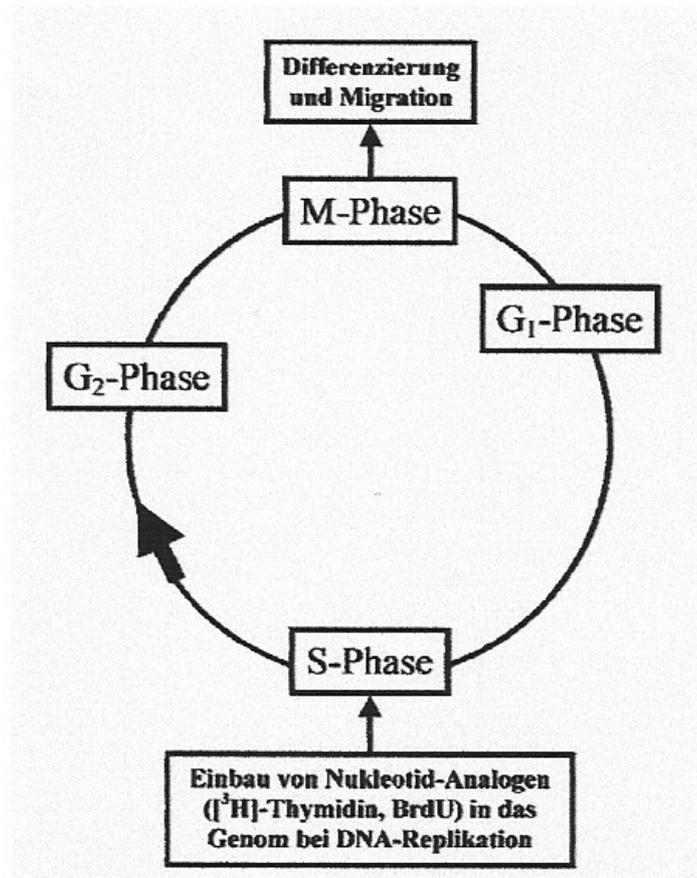


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Zellzyklus (nicht dargestellt ist die G₀-Phase). (78)

Das von uns verwendete Thymidinanalogon Bromodesoxyuridin (BrdU) wird von Zellen, die sich in der S-Phase (Abbildung 5) des Zellzyklus befinden, in das genetische Material und somit in die DNS-Tochterstränge integriert (Abbildung 6) (169-171). Dabei kompetitiert das im Überschuss angebotene BrdU mit Thymidin um die Basenpaarung mit Adenin und damit um den Einbau in die DNS. Da BrdU vom Körper schnell eliminiert und somit nur kurz verfügbar ist (172), markiert man mit dieser Methode nur Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Injektion geteilt haben.

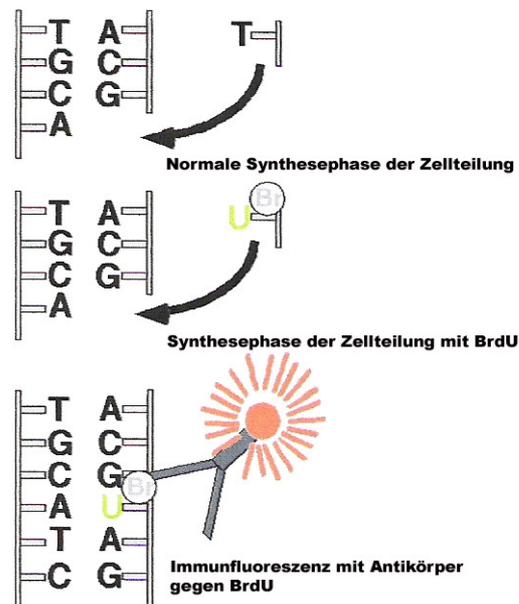


Abbildung 6: Markierung von mitotischen Zellen mit Bromodesoxyuridin. (173)

Um den Differenzierungs- und Migrationszustand neu entstandener Zellen zu bestimmen, räumt man eine Wartezeit von etwa vier Wochen ein, bevor eine immunhistochemische Doppelmarkierung dann zeigen kann, dass BrdU markierte Zellen ebenfalls neuronale Marker exprimieren, wie zum Beispiel NeuN, sich also in dieser Zeit nach der Teilung zum Neuron ausdifferenziert haben. Insbesondere die hohe Spezifität von BrdU in Verbindung mit der hochsensiblen Fluoreszenzmikroskopie hat dieser Methode enorme Popularität verliehen. Alternativ findet Diaminobenzidin (DAB) in Verbindung mit der Lichtmikroskopie Verwendung (174;175). Dem Einsatz von BrdU sind jedoch Grenzen gesteckt, da es mutagene Eigenschaften hat und deshalb womöglich zu schwerwiegenden Veränderungen an Körper, Gehirn und somit auch am Verhalten führen kann (176). Es wurde zum Beispiel aufgezeigt, dass die Verabreichung von BrdU die Ausschüttung von Glukokortikoiden aus der Nebenniere beeinflusst (177;178). Abgesehen davon stellt die intraperitoneale Injektion von BrdU eine Form von Stress dar, der bekanntlich zu einer Verminderung der adulten Neurogenese führt (179), weshalb nach alternativen Möglichkeiten zur Detektion von sich teilenden bzw. neu geteilten Zellen gesucht wurde (180). Fündig wurde man schließlich mit Ki67, einem nukleären Protein, welches während der gesamten Dauer des Zellzyklus, abgesehen von

der G₀-Phase, exprimiert wird und somit einen endogenen Marker repräsentiert (181), wodurch sich die Applikation eines möglicherweise toxischen Stoffes wie BrdU erübrigt. Dabei kann Ki67 ebenfalls mittels immunhistochemischer Methoden dargestellt werden. Damit fand man einen Marker, der zum einen keines komplizierten und technisch schwierigen Applikationsverfahrens bedarf und dessen Einsatz zum anderen nicht auf Labortiere beschränkt bleibt. Auch wird Ki67 bei allen Säugern, von Nagetieren bis zum Menschen, exprimiert (181) und ist nicht abhängig von der Permeabilität der Bluthirnschranke (182;183). Durch immunhistochemische Doppelmarkierungen konnte gezeigt werden, dass mit BrdU markierte Zellen ebenfalls als Ki67 positiv detektiert werden können. Es wurden jedoch etwa 50% mehr Ki67 positive Zellen gefunden, was man darauf zurückführt, dass Ki67 während des gesamten Zellzyklus exprimiert wird, wohingegen BrdU lediglich während der S-Phase in die DNS integriert werden kann (181). Damit konnte gezeigt werden, dass Ki67 ein verlässlicher Marker für die Neurogenese und eine sehr gute Alternative zur Darstellung proliferierender Zellen mittels BrdU ist (180).

1.6 Epidemiologie, ätiopathogenetische Daten und Diagnostik der Depression

Vor allem bedingt durch ihre hohe Prävalenz stehen psychiatrische Erkrankungen immer mehr im Mittelpunkt wissenschaftlichen Interesses. Durch neuere Forschungsergebnisse kann der Verdacht mehr und mehr bestätigt werden, dass ein Großteil dieser Erkrankungen durch neurobiologische Ursachen erklärbar ist. Für die vorliegende Arbeit standen hierbei die Depression, die bipolar affektive Erkrankung und die Schizophrenie im Vordergrund, welche daher im Folgenden kurz erläutert werden sollen.

Mit einer steigenden Inzidenz (184;185) und einer Lebenszeitprävalenz von 10 bis 20% kommt der Depression die größte Bedeutung innerhalb der Gruppe der affektiven Störungen zu. Die Diagnostik psychischer Erkrankungen anhand des triadischen Systems, das eine Einteilung in organische, endogene und neurotische Störungen vornimmt, wurde zu Gunsten neuer, operationalisierter

Diagnose- und Klassifikationssysteme (Internationale Klassifikation der Krankheiten in der zehnten Version = ICD-10 und Diagnostisches und Statistisches Manual psychischer Störungen in der vierten Version = DSM-IV), verlassen. Deren diagnostische Kriterien stützen sich auf die Leitsymptome: Depressive Verstimmung, Antriebshemmung, Denkhemmung und Schlafstörungen sowie Interesse- und Initiativeverlust, Entscheidungsunfähigkeit, Angst- und Hoffnungslosigkeit, innere Unruhe und Grübeln. Die sogenannten Vitalstörungen werden als akzessorische Symptome angesehen (Tabelle 1). Erschreckend ist, dass sich 10% der Patienten mit der Diagnose einer Depression suizidieren (186;187). Das DSM-IV unterscheidet zwischen der Major Depression und der dysthymen Störung, während die ICD-10 die depressive Episode (F32) von den rezidivierenden depressiven Störungen (F33) und den anhaltenden affektiven Störungen (F34) abgrenzt; daneben findet sich ebenfalls die Diagnose der Dysthymie. Bezüglich der Einschlusskriterien einer entsprechenden Diagnose unterscheiden sich beide Klassifikationssysteme nur geringfügig voneinander, wobei die in diese Studie eingeschlossenen Patienten alle nach dem DSM-IV diagnostiziert wurden (Tabelle 1).

Da die Einteilung heute primär nach klinischen und psychosozialen Kriterien wie Schweregrad, Auslöser, Verlauf etc. erfolgt, wird der Vorstellung einer heute angenommenen multifaktoriellen Genese vor allem auch durch den Wechsel vom triadischen System hin zur ICD-10 bzw. zum DSM-IV Rechnung getragen. Ätiopathogenetisch ist die Entstehung affektiver Erkrankungen am ehesten im Sinne des Vulnerabilitätskonzepts als multifaktoriell zu verstehen, welches von einer anlagebedingten Verletzlichkeit ausgeht und diese in Zusammenhang mit einem Lebensereignis (akute Verluste, lebenszyklische Krisen etc.) als ursächlich ansieht. Neben der genetischen Disposition und einem Lebensereignis vervollständigen endogene Faktoren (konstitutionelle Prädisposition, neuroendokrinologische Dysregulation etc.), somatische Faktoren (aktuelle oder chronische körperliche Erkrankungen etc.), Entwicklungsfaktoren (ängstlich-fürsorglicher Erziehungsstil, gelernte Hilflosigkeit etc.) und Persönlichkeitsfaktoren die Modellvorstellung zur Ätiopathogenese von Depressionen. Da durch viele Studien gezeigt werden konnte, dass bei depressiven Patienten im

Vergleich zu Gesunden eine Verminderung der Neurotransmitter Noradrenalin und Serotonin im synaptischen Spalt vorliegt, liegt eine Monoamindefizit-Hypothese nahe. Erhärtet wird diese durch den Wirkmechanismus der Antidepressiva, welche eine Steigerung der Konzentration eben dieser Botenstoffe zwischen den Synapsen bewirken. Durch ihre typische Wirklatenz von durchschnittlich drei Wochen wird jedoch zunehmend deutlich, dass nicht nur die Konzentration dieser Botenstoffe im synaptischen Spalt sowie die Dichte und Empfindlichkeit entsprechender Rezeptoren (z. B. Beta-Rezeptoren), sondern auch adaptive Veränderungen auf Ebene der Rezeptor-gekoppelten Signaltransduktionsmechanismen (*second messenger*) mit Effekten auf die Gen-Expression (Aktivierung von Transkriptionsfaktoren) eine wesentliche Rolle spielen.

Neuroendokrinologische Befunde weisen weiterhin auf eine Störung der Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren- bzw. Schilddrüsen-Achse hin, da in entsprechenden Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass bei einem hohen Prozentsatz der an einer Depression erkrankten Patienten sowohl ein Hyperkortisolismus als auch ein pathologischer Dexamethason-Suppressionstest vorliegt. Auch in hirnmorphologischen postmortem Untersuchungen und bildgebenden Verfahren (Magnetresonanztomographie, Positronen-Emissions-Tomographie) konnten Auffälligkeiten vor allem im präfrontalen Kortex und im Hippocampus, insbesondere bezüglich des Volumens, gezeigt werden (188-197). Dies wirft die Frage auf, ob eine Störung der Neurogenese im Hippocampus mit der Verminderung dessen Volumens in direktem Zusammenhang steht (198). Eine Hypothese besagt, dass eine verminderte adulte Neurogenese zur Entstehung der depressiven Symptomatik bei Patienten mit einer Depression beiträgt (11;92;199). Weiterhin konnte bei depressiven Patienten sowohl ein verminderter zerebraler Blutfluss als auch ein verminderter Glukosemetabolismus in den Amygdalae (200;201) und im präfrontalen Kortex (202;203) gezeigt werden. Dennoch wurde bislang kein direkter kausaler Zusammenhang zwischen der Depression und dem Phänomen der adulten Neurogenese nachgewiesen (204;205).

Tabelle 1: Diagnosekriterien einer depressiven Episode nach ICD-10. (206)

- Deprimierter Affekt, in einem für die Betroffenen ungewöhnlichen Ausmaß, die meiste Zeit des Tages, fast jeden Tag, im Wesentlichen unbeeinflusst von den Umständen,
- Interessenverlust und/oder Freudlosigkeit an Aktivitäten, die normalerweise angenehm waren,
- Antriebsminderung mit erhöhter Ermüdbarkeit,
- Klagen über verminderte Konzentration, Aufmerksamkeit, Denkvermögen, Unschlüssigkeit,
- Vermindertem Selbstwertgefühl und Selbstvertrauen,
- Schuldgefühle und Gefühle von Wertlosigkeit,
- Suizidgedanken und Suizidversuche, Selbstverletzungen,
- Schlafstörungen (Hyper- und Hyposomnie),
- Verminderter oder gesteigerter Appetit,
- Psychomotorische Agitiertheit oder Hemmung.

Die der Major Depression des DSM-IV entsprechende „Schwere depressive Episode“ der ICD-10 fordert alle Symptome der Punkte 1 bis 3 sowie mindestens fünf Symptome der Punkte 4 bis 10, wobei diese über einen Zeitraum von zwei Wochen bestehen oder zumindest außergewöhnlich schwer oder schnell auftretend sein sollten.

1.7 Epidemiologie, ätiopathogenetische Daten und Diagnostik der bipolar affektiven Erkrankung

Die bipolar affektive Erkrankung gehört ebenfalls zur Gruppe der affektiven Störungen und zeichnet sich durch eine Lebenszeitprävalenz von ca. 1% aus. Da affektive Erkrankungen in 70% der Fälle unipolar verlaufen, macht die bipolar affektive Krankheit an diesen den kleineren Anteil in Höhe von 30% aus. Bedingt durch ihren phasenhaften Verlauf reicht das Spektrum der Symptome von inadäquat gehobener Stimmung, Antriebssteigerung, beschleunigtem Denken und Selbstüberschätzung (Leitsymptome der Manie, Tabelle 2) über

manisch-depressive Mischzustände bis hin zu den bereits erwähnten Leitsymptomen der Depression (Tabelle 1). Wieder unterscheiden sich ICD-10 und DSM-IV nur geringfügig voneinander. Nach der ICD-10 wird die bipolare affektive Störung (F31) nach Schweregrad und Verlauf unterteilt, wohingegen das DSM-IV die bipolare Störung 1 von der bipolaren Störung 2 und der zylothymen Störung unterscheidet. Im Gegensatz zur bipolaren Störung 1, die mindestens eine manische Phase fordert, genügt bei der bipolaren Störung 2 das Vorhandensein einer hypomanen Phase. Besonders für bipolare Erkrankungen konnte anhand von Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien eine genetische Disposition belegt werden. Demnach beträgt das Morbiditätsrisiko eines Nachkommens von Eltern, die beide an einer bipolar affektiven Erkrankung leiden, 50% bis 60% und die Konkordanzrate für eineiige bzw. zweieiige Zwillinge 80% bzw. 20%.

Tabelle 2: Diagnostische Leitlinien der Manie / Hypomanie , modifiziert nach ICD-10 (207) (Bei schwerer oder vollständiger Ausprägung mit schwerer Einschränkung der persönlichen Lebensführung Diagnose einer Manie, ansonsten Hypomanie).

- Gehobene (oder euphorische) Stimmung oder dysphorische Stimmung (Reizbarkeit),
- Antriebssteigerung (v.a. sozial, beruflich, sexuell), vermehrte Gesprächigkeit, Rededrang (Logorrhoe),
- Ideenflucht oder subjektives Gefühl von Gedankenrasen,
- Ablenkbarkeit oder dauernder Wechsel von Aktivitäten oder Plänen,
- Vermindertes Schlafbedürfnis,
- Gesteigerte Libido,
- Überhöhte Selbsteinschätzung oder Größenwahn,
- Verlust normaler sozialer Hemmungen,
- Tollkühnes oder leichtsinniges Verhalten, dessen Risiken die Betroffenen nicht erkennen (übertriebene Einkäufe, rücksichtsloses Fahren),
- Gesteigerte Geselligkeit oder übermäßige Vertraulichkeit.

1.8 Epidemiologie, ätiopathogenetische Daten und Diagnostik der Schizophrenie

Da es sich bei der Schizophrenie um eine Gruppe von Erkrankungen mit unterschiedlichsten Symptomen handelt, soll zum besseren Verständnis folgende Definition dienen:

Die schizophrenen Psychosen gehören zur Hauptgruppe der endogenen Psychosen. Bei diesen Erkrankungen kommt es zum Auftreten charakteristischer, symptomatisch oft sehr vielgestaltiger psychopathologischer Querschnittsbilder mit Wahn, Halluzinationen, formalen Denkstörungen, Ich-Störungen, Affektstörungen und psychomotorischen Störungen. Nachweisbare organische Ursachen fehlen. Die neueren Klassifikationssysteme verlangen eine bestimmte Mindesterkrankungsdauer. Schizophrenieartige Bilder, die dieses Kriterium nicht erfüllen, werden als schizophreniforme Erkrankung klassifiziert (208).

Mit einer Lebenszeitprävalenz von 1% handelt es sich bei den schizophrenen Psychosen um häufige und nicht zuletzt durch eine Suizidrate von 10% prognostisch schwerwiegende Erkrankungen. Interessant ist die Tatsache, dass die Prävalenzzahlen in verschiedenen Ländern mit unterschiedlichem soziokulturellem Hintergrund gleich sind. Im Gegensatz zur Depression, von der Frauen etwa dreimal häufiger betroffen sind als Männer, erkranken Männer und Frauen in ausgeglichenem Verhältnis zueinander. Männer sind jedoch meist fünf Jahre früher als Frauen betroffen, durchschnittlich im Alter von 21 Jahren. Der Hinweis, dass schizophrene Psychosen insbesondere in sozial niedrigen Schichten auftraten, konnte nicht belegt werden. Man führt dieses Phänomen vielmehr auf die so genannte Drift-Hypothese zurück, nach der schizophrene Patienten im Laufe ihrer Erkrankung einen sozialen Abstieg erleiden. Wie bei den affektiven Erkrankungen ist auch bei der Schizophrenie von einer multifaktoriellen Genese auszugehen, wobei eine genetisch bedingte Vulnerabilität im Vordergrund zu stehen scheint. Grundsätzlich ist zu sagen, dass das Morbiditätsrisiko mit steigendem Verwandtschaftsgrad zunimmt, was

zahlreiche Familien- und Adoptionsstudien verdeutlichen. Zwillingsstudien zeigen weiterhin, dass eineiige Zwillinge eine Konkordanzrate von über 50% aufweisen, wohingegen dieser Wert bei zweieiigen Zwillingen bei 15% liegt. Die nicht komplette Konkordanz eineiiger Zwillinge weist darauf hin, dass nicht nur die genetische Prädisposition für den Ausbruch der Erkrankung ausschlaggebend sein kann, sondern dass vielmehr auch zerebrale Schäden, psychosoziale sowie auslösende Faktoren wie Lebensereignisse im Sinne eines Vulnerabilitäts-Stress-Modells ineinander wirken. So wurden bereits sowohl perinatale Schädigungen und virale Infektionen in der pränatalen oder auch Neugeborenen-Periode als Risiko erhöhend beschrieben. Anhand neuropathologischer und bildgebender Untersuchungen konnten strukturelle Auffälligkeiten des zentralen Nervensystems gezeigt werden, wobei insbesondere eine Atrophie des Hippocampus bei schizophrenen Patienten nachzuweisen war. Auch hier interessierte im Rahmen der vorliegenden Studie natürlich vorrangig, ob eine Verminderung der hippocampalen Neurogenese an diesem Phänomen beteiligt ist.

Vor allem im Bereich des Frontalhirns wurde mit Hilfe der funktionellen Bildgebung (Positronenemissionstomographie und Single-Photonen-Emissions-Computertomographie) eine verminderte Durchblutung bzw. ein Hypometabolismus gefunden und als sogenannte Hypofrontalität diskutiert, welche als Korrelat kognitiver Störungen Schizophrener interpretiert wird. Auf biochemischer Ebene steht die sog. „Dopamin-Hypothese“ an erster Stelle, welche eine Überreaktivität zentralnervöser dopaminergener Neurone und somit einen Überschuss von Dopamin im synaptischen Spalt beschreibt. Möglicherweise führt dabei die bereits erwähnte Hypofrontalität zu einer reaktiv gesteigerten Dopaminsynthese vor allem im mesolimbischen System. Gestützt wurde diese Hypothese durch den Wirkmechanismus von Antipsychotika, der in einer Blockade postsynaptischer Dopamin-D₂-Rezeptoren besteht. Allerdings scheinen sowohl das glutamaterge (relativer Glutamatmangel) als auch das serotonerge System ebenfalls beteiligt zu sein.

Tabelle 3: Diagnosekriterien der Schizophrenie nach ICD-10. (209)

- Kontrollwahn, Beeinflussungswahn, Wahnwahrnehmung,
- Halluzinationen, besonders kommentierende oder dialogisierende Stimmen,
- Gedankenlautwerden, Gedankeneingebung, Gedankenentzug, Beeinflussungserlebnisse, Zerfahrenheit, Gedankenabreißen u.a.,
- Katatone Symptome,
- Negative Symptome wie Apathie, Sprachverarmung, verflachter Affekt,
- Charakteristische Symptomatik über mindestens einen Monat,
- Keine nachweisbare organische Ursache.

1.9 Ziele dieser Arbeit

Ziel der hier vorgestellten Studie ist es, eine Methode zur Bestimmung der adulten Neurogenese an humanem postmortem Gewebe zu etablieren und dann zu untersuchen, ob diese bei psychischen Erkrankungen quantitativ oder qualitativ verändert ist. Weiterhin soll das Ausmaß potentiell beeinflussender Faktoren, wie zum Beispiel von Alkohol- und Drogenkonsum, einer medikamentösen Therapie oder dem Alter der Patienten auf die adulte hippocampale Neurogenese bestimmt werden. Hierbei stellt diese Studie die erste Arbeit an humanem postmortem Gewebe dar, die sich mit der adulten Neurogenese bei psychischen Erkrankungen beschäftigt.

2 Material

2.1 Geräte

Kryostat	Typ HM 500 O Microm Laborgeräte GmbH Walldorf, Deutschland
Lichtmikroskop	Typ DMRBE Leica Mikroskopie und Systeme GmbH Wetzlar, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Typ BX 40 F Olympus Optical CO., LTD Japan
Konfokales Mikroskop	Typ DMRE Leica Microsystems Heidelberg GmbH Heidelberg, Deutschland
Digitalkamera	Typ Nikon Cool Pix 4500 Nikon Corporation Japan
AGFA Scanner	AGFA Duoscan f40 Scanner AGFA Köln, Deutschland
Wasserbad	GFL 1083 Burgwedel, Deutschland
Mikrowelle	Siemens, Deutschland

2.2 Software

Word 2003	Microsoft Corporation USA
Excel 2003	Microsoft Corporation USA
DigiTrace	Imatec Neufahrn, Deutschland
Leica Confocal Systems	Leica Microsystems GmbH Heidelberg, Deutschland
Adobe Photoshop 5,5	Adobe USA
ImageJ1.33.u Software Paket	Wayne Rasband National Institutes of Health, USA http://rsb.info.nih.gov/ij/
SPSS für Windows 9.0	SPSS Inc. USA
Endnote 1988-1999	ISI ResearchSoft

2.3 Verbrauchsmaterialien

Einbettmedium	Tissue-Tek, O.C.T. 4583 Compound Satura Finetek USA, INC. USA
---------------	---

Material

Objektträger	Super Frost Plus (Menzel-Gläser) Menzel GmbH & Co KG Braunschweig, Deutschland
Deckgläser	Menzel-Gläser Menzel GmbH & Co KG Braunschweig, Deutschland
Einschlussmittel	Vitro-Clud Herstellung u. Vertrieb R. Langenbrinck Emmendingen, Deutschland Aquatex Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Parafilm	Parafilm „H“ American National Can USA
Liquid Blocker	Super PAP Pen Plano GmbH Wetzlar, Deutschland

2.4 Chemikalien

Phosphate Buffered Saline (PBS) 10x	Cambrex Bio Science Bio Whittaker Belgien
Tris-HCl	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland

Material

Normal Goat Serum (NGS)	Vector Laboratories, Inc. USA
Normal Horse Serum (NHS)	Vector Laboratories, Inc. USA
Bovine Serum Albumine (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Saccharose	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Citrat-Monohydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
H ₂ O ₂ (30 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
HCl (5M)	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Essigsäure (96%)	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Ethanol (100%)	Mallinckrodt Baker B.V. Holland

Material

Xylol	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
5-Bromo-2-desoxyuridin (BrdU)	Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Deutschland
Kresylviolett	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland

2.5 Standardpuffer

Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x	100ml 10x PBS ad 1000ml Aqua dest.
Tris Buffered Saline, pH 7,5 (TBS) 1x	0,1M Tris-HCl + 0,15M NaCl ad Aqua dest.
Citratpuffer	0,01M Citrat-Monohydrat ad Aqua dest.

2.6 Lösungen für immunhistochemische Färbungen

Blocklösung I	5% Normal Horse Serum 2% Bovine Serum Albumine 0,25% Triton X-100 ad 100ml TBS
Blocklösung II	3% Normal Horse Serum 2% Bovine Serum Albumine 0,25% Triton X-100 ad 100ml TBS

Material

0,6% H ₂ O ₂ in TBS	1ml H ₂ O ₂ (30%)
ad	50ml TBS
1M HCl	200ml 5M HCl
ad	1000ml Aqua dest.
Ethanollösung (70%)	70ml 100% Ethanol
ad	100ml Aqua bidest.
Ethanollösung (95%)	95ml 100% Ethanol
ad	100ml Aqua bidest.
96% Ethanol + 96% Essigsäure	240ml 100% Ethanol
	50µl 96% Essigsäure
ad	300ml Aqua bidest.
4% Paraformaldehyd, pH 7,4 - 7,6	4g Paraformaldehyd
ad	100ml PBS
8% Paraformaldehyd, pH 7,4 - 7,6	8g Paraformaldehyd
ad	100ml PBS
5-Bromo-2`-desoxyuridin- Lösung	10mg BrdU
	1ml 0,9% NaCl
Kresylviolett-Lösung	0,4% Kresylviolett ad Aqua dest.

2.7 Antikörper

2.7.1 Primärantikörper

Anti-BrdU rat IgG	Diagnostic International GmbH Schriessheim, Deutschland Verdünnung 1:5000
-------------------	---

Material

NCL-Ki67-MM1	Novocastra Laboratories Ltd. United Kingdom Verdünnung 1:100, 1:200
PCNA	Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA Verdünnung 1:250
NeuN	Chemicon International, Inc. USA Verdünnung 1: 400
Doublecortin (DCX)	Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA Verdünnung 1:250
β -III-Tubulin	Promega USA Verdünnung 1: 200
GFAP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland Verdünnung 1: 100

2.7.2 Sekundärantikörper

Biotinylierter goat anti-ms IgG (H+L)	Vector Laboratories, Inc. USA Verdünnung 1:400
Biotinylierter horse anti-goat IgG (H+L)	Vector Laboratories, Inc. USA Verdünnung 1: 200

Material

Cy2-markierter goat anti-ms IgG (H+L)	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. USA Verdünnung 1:200
Cy3-markierter donkey anti-rat IgG (H+L)	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. USA Verdünnung 1:200
Cy3-markierter goat anti- rabbit IgG (H+L)	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. USA Verdünnung 1:200
Fab konjugierter Maus Cy3	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. USA Verdünnung 1:200

2.8 Detektionskits

Vectastain ABC-Kit	Vector Laboratories, Inc. USA
Roche DAB-Kit	Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Deutschland

2.9 Versuchstiere

Alle Versuchstiere (*Mus musculus*) wurden vor einem C57Bl/6 Hintergrund von Jackson Laboratories (Bar Harbor, Ma, USA) gezüchtet. Die Mäuse wurden unter den gleichen Bedingungen mit Wasser und Futter ad libitum in einem zwölfstündigen Hell/Dunkel-Zyklus gehalten. Die Tierhaltungsbedingungen entsprachen den internationalen Richtlinien für Tierversuche.

2.10 Humangewebe

Die vom Stanley Foundation Neuropathology Consortium (USA) zur Verfügung gestellten humanen Gehirnschnitte wurden auf Objektträger aufgezogen, in tiefgefrorenem Zustand geliefert und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C im Gefrierschrank aufbewahrt. Insgesamt handelte es sich hierbei um Schnitte von 60 Gehirnen, die von 15 Patienten mit einer Schizophrenie, 15 Patienten mit einer bipolar affektiven Erkrankung, 15 Patienten mit einer Depression ohne psychotische Symptome und 15 Kontrollen stammten. Von jedem Gehirn standen uns sieben Schnitte aus dem anterioren Hippocampus zur Verfügung. Hierbei wurden die Gruppen hinsichtlich des Alters, des Geschlechts, der Herkunft, des postmortem Intervalls und der verwendeten Hemisphäre aufeinander abgestimmt. Weiterhin wurden von der Stanley Foundation demographische und medizinische Daten bezüglich des Substanzmissbrauchs, der Einnahme von Medikamenten mit psychotroper Wirkung und die zuletzt verschriebene Medikation zur Verfügung gestellt (Tabelle 4). Hieraus war ersichtlich, dass zwölf der 15 Patienten mit Schizophrenie zum Zeitpunkt des Todes neuroleptisch und zwölf der 15 Patienten mit einer Depression antidepressiv behandelt wurden. Abgesehen von zwei Patienten, die ohne jegliche Medikation waren, nahmen die verbleibenden dreizehn Patienten aus der Gruppe der bipolar affektiv Erkrankten eine große Zahl verschiedenster psychotroper Medikamente ein. Die psychischen Erkrankungen aller Patienten wurden von zwei Psychiatern anhand der DSM-IV Kriterien diagnostiziert, wobei alle hier

Material

dargestellten Experimente ohne vorherige Kenntnis der Diagnose durchgeführt wurden.

Material

Tabelle 4: Demographische und medizinische Daten der untersuchten Patienten.

Diagnose (n=je 15)	Alter	pH	Postmor- tem Intervall (Std.)	Aufbewahr- ungszeit (d)	Erkrank- ungsalter (a)	Dauer der Erkrankung (a)	Fluphenazin- Kumulativedosis (bzw. Äquivalenz- dosis) (mg)	Ohne jegliche neuroleptische Behandlung (n)	Psychotische Symptome (n)	Suizid (n)
Kontroll- gruppe	48±10	6,2±0,2	23±9	338±234	-	-	-	15	-	-
Schizo- phrenie	44±13	6,1±0,2	33±14	621±233	23±8	21±11	52 266±62 061	1	15	4
Bipolar affektive Erkrankung	42±12	6,1±0,2	32±16	620±172	21±8	20±10	20 826±24 015	3	11	9
Depression	46±9	6,1±0,2	24±11	434±290	34±13	13±11	-	15	0	7

3 Methoden

3.1 BrdU-Injektion und Gewebeaufarbeitung

Für den immunhistochemischen Nachweis von BrdU positiven Zellen wurde den Mäusen vier Mal im Abstand von jeweils zwei Stunden eine BrdU-Lösung mit einer Konzentration von 10mg BrdU/ml in 0,9% NaCl-Lösung intraperitoneal injiziert, welche zuvor auf Körpertemperatur erwärmt wurde. Um die für die einzelne Maus nötige Menge von BrdU-Lösung zu ermitteln, wurden die Versuchstiere vor der ersten Injektion gewogen, wobei jede Maus pro Injektion 100mg BrdU pro kg Körpergewicht erhalten sollte. Diese entsprach circa 0,3ml BrdU-Lösung je Injektion bei einem durchschnittlichen Gewicht von 20-30g. 48h nach der letzten BrdU-Injektion wurden die Mäuse mit 4% Paraformaldehyd transkardial perfundiert und daraufhin die Gehirne entnommen, welche über Nacht bei 4°C in 4% PFA fixiert und anschließend in Saccharose-Lösung gefriereschützt wurden. Nach dem Schneiden der 40 µm dicken Schnitte durch den gesamten Hippocampus wurden diese bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Die Gehirne BrdU injizierter Mäuse wurden zur Darstellung einer Doppelfärbung sowohl mit Ki67 als auch mit PCNA verwendet.

3.2 Immersionsfixierung und Gewebeaufarbeitung

Die Versuchstiere wurden mittels zervikaler Dislokation unter CO₂-Anästhesie getötet. Anschließend wurden die Gehirne entnommen und für 48-72h in einer frisch hergestellten 4%igen Paraformaldehyd-Lösung in PBS immersionsfixiert. Des Gefrierschutzes wegen erfolgte nach viermaligem Waschen der Gehirne in PBS für jeweils 15 Minuten eine sukzessive Überführung in 10%- und 20%iger in PBS gelöster Saccharose. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Gehirne auf Korkplättchen gebettet, in mit Trockeneis gekühltem Isopentan eingefroren und bei -20°C bis -70°C im Gefrierschrank gelagert. Schließlich erfolgte mit Hilfe des Kryostaten die Herstellung 40µm dünner, serieller, koronarer Schnitte der gesamten Hippocampusregion, die im direkten Anschluss an den Schneidevorgang auf Objektträger aufgezogen wurden. Um den Schneide-

vorgang zu optimieren wurde die Temperatur der Gehirne mittels kurzzeitiger Lagerung im Kryostaten (Kammertemperatur -20°C, Objekttemperatur -16°C) auf circa -20°C angehoben und die in Tissue-Tek[®] eingebetteten Schnitte in die entsprechende Schneidevorrichtung eingespannt. Anschließend wurden die Schnitte entweder direkt einer Färbung unterzogen oder weiterhin bei -20 bis -70°C im Gefrierschrank gelagert. Verwendung fand das immersionsfixierte Gewebe bei den Färbeversuchen mittels des PCNA-Antikörpers.

3.3 Immunhistochemische Färbungen

Der Nachweis der Marker im Gehirngewebe oben aufgelisteter Patienten bzw. Versuchstiere erfolgte durch den Einsatz antigenspezifischer Primärantikörper, welche nach verschiedenen Vorbehandlungen der Gewebe, die unter den entsprechenden Unterpunkten näher erläutert werden, an das nachzuweisende Antigen binden. Diese Bindung wird entweder durch den Einsatz eines biotinylierten Zweitantikörpers in Kombination mit einem Avidin-Biotin-Komplex sowie DAB im Schnitt sichtbar gemacht oder der Nachweis erfolgt alternativ durch Fluoreszenz gekoppelte Zweitantikörper. Basierend auf der hohen Affinität von Avidin zu Biotin fand beim Einsatz der erstgenannten Methode das aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isolierte und somit gentechnisch hergestellte Streptavidin Verwendung. Dieses besitzt vier Bindungsstellen für das wasserlösliche Vitamin Biotin, von welchen drei mit dem Biotin-Peroxidase-Komplex besetzt sind und die verbleibende vierte Stelle an das Biotin des biotinylierten Sekundärantikörpers bindet. Mit Hilfe des Brückenantikörpers und des Streptavidins auf der einen und des Streptavidins mit der an das Biotin gebundenen Peroxidase auf der anderen Seite, gelingt die Detektion des Primärantikörpers (siehe Abbildung 7). Dabei überträgt das Enzym Peroxidase unter Zusatz des Chromogens DAB (3,3 Diaminobenzidin) Wasserstoffionen von H₂O₂ auf DAB, wodurch neben Wasser ein Phenazinpolymer entsteht, welches sich durch seine Braunfärbung mikroskopisch nachweisen lässt. Zur Bildung des Streptavidin-Biotin-Komplexes wurden die Komponenten A (Avidin) und B (Biotin) des Detektionskits eine halbe Stunde vor Gebrauch gemischt und bei Raumtemperatur belassen. Nach Inkubation der Schnitte in diesem Avidin-

Biotin-Komplex (siehe Färbeprotokoll 3.4.2) wurde das DAB (Verdünnung 1:10 DAB/Puffer) aufgetragen und solange auf den Schnitten belassen, bis sich eine Braunfärbung zeigte. Dabei betrug die Einwirkzeit durchschnittlich circa drei Minuten.

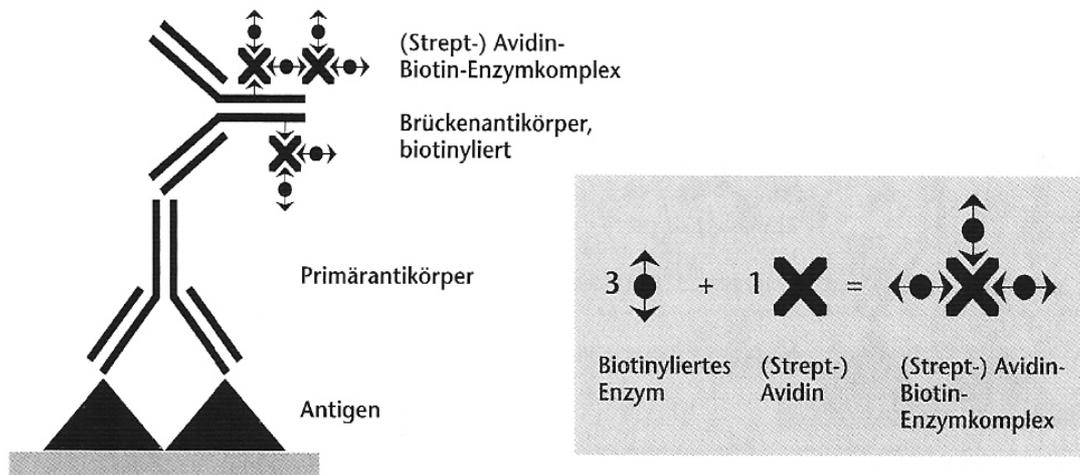


Abbildung 7: Schema der ABC-Methode mit Darstellung von Primärkörper, biotinyliertem Brückenantikörper und ABC-Komplex. (210)

Die zweitgenannte Methode, nämlich die Detektion mittels Immunfluoreszenz, erfolgte durch die Inkubation des Gewebes mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörper. Dieses Prinzip, bei dem der Farbstoff im Fluoreszenzmikroskop angeregt und so ein Farbsignal sichtbar wird, bezeichnet man als sekundäre Fluoreszenz. Verwendung fand zum einen Carbocyanin (Cy2) und zum anderen Indocarbocyanin (Cy3, siehe Färbeprotokoll 3.5.1). Diese Fluorochrome haben die Eigenschaft, Licht einer bestimmten Wellenlänge aufzunehmen (Absorption) und daraufhin Photonen in einem anderen Wellenlängenbereich wieder abzugeben (Emission). Durch dieses Absorptions- bzw. Emissionsspektrum konnten Cy2 (grün) und Cy3 (rot) im Fluoreszenzmikroskop erkannt und so die darzustellenden Antigene durch deren spezifische Bindung kenntlich gemacht werden.

3.4 Immunhistochemische Einzelmarkierungen an Mausgewebe

3.4.1 PCNA-Färbung mittels Immunfluoreszenz

Nach dreimaligem Waschen der in 4% PFA-fixierten und auf Objektträgern aufgezogenen Schnitte in TBS für je fünf Minuten wurden die Gehirnschnitte in 0,01M Citratpuffer für fünf Minuten gekocht, um das Gewebe somit durchlässiger und dem Antikörper zugänglich zu machen. Nach einer Abkühlzeit von circa zehn Minuten erfolgte ein erneuter dreimaliger Waschgang zu je fünf Minuten. Anschließend wurde das Gewebe für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer mit 100µl Blocklösung I je Schnitt geblockt, bevor es dann über Nacht bei 4°C im Kühlschrank mit einem anti-Maus PCNA-Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:250 in Blocklösung I inkubiert werden konnte. Nach dreimaligem Waschen in TBS für je fünf Minuten wurde das Gewebe mit einem anti-Maus CY2 Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:200 in Blocklösung II mit 100µl je Schnitt für zwei Stunden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Wegen der Lichtempfindlichkeit des Antikörpers war es dabei wichtig das Gewebe stets im Dunkeln zu lagern. Nachdem das Gewebe erneut dreimal für je fünf Minuten in TBS gewaschen wurde, wurde es mittels Aquatex® eingedeckelt und bis zum Mikroskopieren im Dunkeln aufbewahrt.

3.4.2 PCNA-Färbung mittels DAB

Analog zur PCNA-Färbung mittels Immunfluoreszenz wurde bei dieser Färbung zu Beginn ein Waschgang in TBS dreimal zu je fünf Minuten durchgeführt. Da bei allen noch zu beschreibenden Färbungen gleichartige Waschgänge enthalten sind, bezieht sich ein Waschgang immer auf dreimaliges Waschen für je fünf Minuten in TBS. Da nicht nur das Enzym des Detektionssystems, sondern auch die endogene Peroxidase das Chromogen DAB umsetzt, wurde das Gewebe für 30 Minuten in 0,6% H₂O₂ in TBS inkubiert, um die endogene Peroxidase zu blockieren und so falsch-positive Ergebnisse infolge einer Mitreaktion des gewebeeigenen Enzyms zu verhindern. Nach einem weiteren

Waschgang wurde das Gewebe in 0,01M Citratpuffer gekocht und nach einer Abkühlzeit von circa zehn Minuten erneut gewaschen. Bevor die Schnitte im Kühlschrank bei 4 °C über Nacht mit dem anti-Maus PCNA-Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:250 in Blocklösung I inkubiert wurden, wurden diese zur Absättigung elektrostatischer Ladungen und damit zur Verhinderung unspezifischer Anfärbungen für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer in Blocklösung I überführt. Sowohl für das Blocken als auch für die Inkubation mit dem Primärantikörper wurde eine Menge von 100µl pro Schnitt verwendet. Darauf folgend wurde das Gewebe wiederum einem Waschgang unterzogen, bevor es mit dem biotinylierten anti-Maus Antikörper mit einer Verdünnung von 1:400 in Blocklösung II (100µl je Schnitt) für zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert wurde. Eine weitere Inkubation erfolgte, nachdem das Gewebe erneut gewaschen wurde, mit dem Avidin-Biotin-Komplex (100µl je Schnitt) für eineinhalb Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer, bevor nach einem weiteren Waschgang 100µl DAB auf die Schnitte pipettiert wurden. Nach erfolgtem Umsatz des DAB durch die Peroxidase des Avidin-Biotin-Komplexes wurde die Lösung abgeschüttet und die Schnitte kurz mit TBS abgespült und anschließend einem letzten Waschgang unterzogen. Mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe wurde dem Gewebe Wasser entzogen, wobei die Schnitte für je zwei Minuten zuerst in Aqua dest, dann in Ethanol 70%, Ethanol 90%, dann zweimal in Ethanol 100% und schließlich dreimal in Xylol gestellt wurden. Das Eindeckeln erfolgte mit VitroClud®.

3.4.3 DCX-Färbung mittels DAB

Die Färbung wurde analog zu der unter Punkt 3.2.2 geschilderten PCNA-Färbung durchgeführt, wobei die entsprechenden Antikörper (DCX C-18 Primärantikörper in der Verdünnung 1:250 in Blocklösung I und biotinylierter anti-goat-Sekundärantikörper in der Verdünnung 1:200 in Blocklösung II) verwendet wurden.

3.5 Immunhistochemische Doppelmarkierungen an Mausgewebe

3.5.1 BrdU/Ki67 Doppelmarkierung mittels Immunfluoreszenz

Die, wie unter Punkt 3.1 beschrieben, vorbehandelten, auf Objektträgern aufgetragenen Gehirnschnitte wurden zunächst entsprechend den bereits erwähnten Färbungen einem Waschgang in TBS unterzogen. Um das Gewebe für den Primärantikörper durchlässiger zu machen und somit dessen Penetranz zu erhöhen, wurde dieses in 0,01M Citratpuffer in der Mikrowelle für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt. Nach einer Abkühlzeit von circa 20 Minuten wurden die Schnitte erneut gewaschen und in einer feuchten Kammer für eine Stunde mit Blocklösung I geblockt. Nach einem weiteren Waschgang erfolgte nun über Nacht bei 4 °C die Inkubation der Schnitte mit dem Maus anti-Ki67 Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:200 in Blocklösung I. Zur Detektion des Primärantikörpers wurde das Gewebe nach erneutem Waschen mit dem Cy2 markierten goat anti-maus IgG Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:200 in TBS für zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Unter Lichtausschluss wurde das Gewebe erst gewaschen und dann in 8% PFA für 15 Minuten postfixiert, um die Ki67 positiven Signale vor der folgenden Behandlung mit HCl zu schützen und eine Beschädigung der bereits durchgeführten Färbung zu vermeiden. Um die DNS zu denaturieren und so die Zielantigene freizulegen, wurden die Schnitte für 45 Minuten in eine auf 45 °C erwärmte 1M HCl-Lösung überführt und anschließend gewaschen. Wiederum über Nacht bei 4 °C erfolgte die Inkubation mit dem Anti-BrdU rat IgG Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:5000 in 5% NHS, 0,25% Triton X-100 und 2% BSA in TBS (Blocklösung I). Zur Detektion des Primärantikörpers wurden die Schnitte nach einem weiteren Waschgang mit dem Cy3 markierten donkey anti-rat IgG Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:200 in Blocklösung II für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wieder gewaschen. Zum Abschluss der Färbung wurden die Schnitte mit Aquatex[®] eingedeckelt und im Dunkeln gelagert. Die mikroskopische Auswertung erfolgte an einem mit einem Bio-Rad MRC 1024 *laser-*

scanning confocal imaging-System ausgestatteten DMRBE Leica Lichtmikroskop.

3.5.2 β -III-Tubulin/Ki67 Doppelmarkierung mittels Immunfluoreszenz

Zu Beginn der Doppelmarkierung wurden die Schnitte in frischem, kalten 4% PFA fixiert, gewaschen und anschließend für fünf Minuten in der Mikrowelle in 0,01M Citratpuffer gekocht. Nach einem weiteren Waschgang erfolgte das Blockieren unspezifischer Antigene mittels 3% NGS in TBS für eine Stunde bei Raumtemperatur. Mit dem Ki67 Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:200 in 3% NGS wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C inkubiert und wieder gewaschen. Die weitere Behandlung der Schnitte erfolgte aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Sekundärantikörpers unter Lichtausschluss. Zur Detektion des Ki67 Antikörpers wurde das Gewebe mit dem Fab-konjugierten Maus Cy3 Sekundärantikörper, in einer Verdünnung von 1:200 in 3% NGS, für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin wieder gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Maus anti- β -III-Tubulin Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:200 in 3% NGS über Nacht bei 4°C. Nach einem weiteren Waschgang wurde der Maus anti- β -III-Tubulin Primärantikörper detektiert, indem eine Inkubation mit dem Maus Cy2 Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:200 für zwei Stunden bei Raumtemperatur erfolgte. Nach einem anschließenden Waschgang ließ man die Schnitte trocknen, bevor diese in VitroClud[®] eingedeckelt wurden.

3.5.3 GFAP/Ki67 Doppelmarkierung mittels Immunfluoreszenz

Die Färbung erfolgte analog zum unter Punkt 3.5.2 beschriebenen Procedere. Allerdings wurde, anstelle von 3% NGS, ein Normalserum aus dem Pferd verwendet und die Primär- und Sekundärantikörper wurden jeweils in einem gemeinsamen Arbeitsschritt parallel aufgetragen. So wurden die Schnitte gleichzeitig mit dem Ki67 Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:200 und dem GFAP Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:100 über Nacht bei 4°C

inkubiert. Analog dazu erfolgte die Inkubation des Gewebes gleichzeitig mit dem Maus Cy2 (gegen Ki67) und dem Rabbit Cy3 Sekundärantikörper (gegen GFAP) je in einer Verdünnung von 1:200 für zwei Stunden bei Raumtemperatur.

3.6 Immunhistochemische Färbungen an humanem postmortem Gewebe

3.6.1 Ki67/Nissl-Färbung an humanem postmortem Gewebe mittels DAB-Methode

Pro Humangehirn standen sieben Schnitte des anterioren Hippocampus zur Verfügung, welche zunächst für zehn Minuten in frischem kaltem 4% PFA fixiert und daraufhin gewaschen wurden. Zum Blockieren der endogenen Peroxidase wurde das Gewebe für 30 Minuten in 0,6% H_2O_2 inkubiert und wiederum gewaschen, bevor, wie oben stehend beschrieben, die Penetranz des Gewebes mittels des Kochens im Citratpuffer erhöht wurde. Nach einem weiteren Waschgang erfolgte aus bereits erklärten Gründen das Überführen der Schnitte in 3% NHS in TBS. Anschließend wurde das Gewebe über Nacht bei 4 °C mit dem NCL-Ki67-MM1 Primärantikörper (in einer Verdünnung von 1:100 in 3% NHS) in TBS inkubiert, erneut gewaschen und für zwei weitere Stunden bei Raumtemperatur mit dem biotinylierten goat anti-maus IgG Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:200 in 3% NHS in TBS inkubiert. Wiederum wurden die Schnitte gewaschen und daraufhin für eineinhalb Stunden mit dem 30 Minuten vorher angesetzten Avidin-Biotin-Komplex inkubiert. Bevor das DAB aufpipettiert werden konnte, wurde ein erneuter Waschgang durchgeführt. Nach einer Wartezeit von durchschnittlich drei Minuten bis zum Farbumschlag wurde das DAB abgeschüttet und die Schnitte nochmals gewaschen, bevor zur Erleichterung der Orientierung im Schnitt eine Nissl-Kernfärbung durchgeführt wurde. Hierzu wurden die Schnitte für zehn Minuten in einer Kresylviolettlösung inkubiert und anschließend mit destilliertem Wasser ab gespült. Zur Entfärbung wurden die Schnitte in mit Essigsäure versetzten 96% Ethanol für zwei Minuten überführt, wobei es wichtig war, darauf zu achten, dass sich das Gewebe nicht zu stark entfärbte. Um dem Gewebe Wasser zu entziehen, wurde

es zunächst für zwei Minuten in 100% Ethanol und daraufhin zweimal für je fünf Minuten in Xylol verbracht. Das anschließende Eindeckeln erfolgte mit VitroClud®.

3.6.2 NeuN/Nissl Färbung mittels DAB-Methode

Die Färbung wurde, abgesehen von der Verwendung des NeuN-Primärantikörpers in einer Verdünnung von 1:400 in Blocklösung I, analog zu dem unter Punkt 3.6.1 beschriebenen Procedere an einigen Probeschnitten durchgeführt.

3.6.3 DCX/Nissl Färbung mittels DAB-Methode

Auch diese Färbung wurde, abgesehen von der Verwendung des DCX-Primärantikörpers in einer Verdünnung von 1:100 in Blocklösung I, analog zu dem unter Punkt 3.6.1 beschriebenen Procedere an einigen Probeschnitten durchgeführt.

3.6.4 PCNA/Nissl Färbung mittels DAB-Methode

Wiederum erfolgte diese Färbung, abgesehen von der Verwendung des PCNA-Primärantikörpers in einer Verdünnung von 1:250 in Blocklösung I, analog zu dem unter Punkt 3.6.1 beschriebenen Procedere an einigen Probeschnitten.

3.7 Morphometrische Analyse und Quantifizierung der Ki67 positiven Zellen in Humangewebe

Zur Quantifizierung Ki67 positiver Zellen wurde ein Leica Mikroskop mit 400-facher Vergrößerung verwendet. Dabei wurde das Gesichtsfeld so eingestellt, dass sich horizontal in dessen Mitte die Körnerzellschicht befand. Anschließend wurde entlang der kompletten Körnerzellschicht mikroskopiert und jede markierte Zelle, die sich in diesem Bereich befand, als Ki67 positiv gewertet, wenn diese dreidimensional durch den Gewebeschnitt scharf abgegrenzt werden konnte. Um eine entsprechende Einheit zu schaffen und die Anzahl der positiven Signale im Gyrus dentatus miteinander vergleichbar zu machen, wurden die einzelnen Schnitte mit Hilfe eines Scanners erfasst und gleichermaßen vergrößert. Anschließend wurde die Länge der Körnerzellschicht mit dem ImageJ 1.33u Software-Paket vermessen. So konnte jeweils eine durchschnittliche Anzahl Ki67 positiver Zellen pro Millimeter Körnerzellschicht ermittelt werden. Dabei wurden ausschließlich in der Subgranularzellschicht des Gyrus dentatus Ki67 positive Zellen erfasst, wobei diese als einer Distanz von zwei Zelldurchmessern in beide Richtungen ausgehend von dem Übergang des Gyrus dentatus zum Hilus entsprechend definiert wurde (47). Die Mikroskopie und Auszählung Ki67 positiver Zellen erfolgte dabei ohne Kenntnis der entsprechenden Diagnosen.

3.8 Statistische Hilfsmittel

Die durchschnittliche Anzahl Ki67 positiver Zellen ist angegeben als Mittelwert \pm Standardfehler. Unterschiede zwischen den Gruppen mit entsprechender Diagnose wurden sowohl mittels ANOVA als auch mittels des Student`s t-test mit nachfolgender Bonferroni Korrektur mit einem als signifikant betrachteten $p < 0,05$ festgelegt. Potentielle kofundierende Variablen wie Alter, pH-Wert und Gewicht des Gehirns, Dauer der Lagerung, Postmortemintervall (PMI), Beginn und Dauer der Erkrankung sowie die Kumulativdosis von Fluphenazin bezüglich der Ki67-Zellzahl wurden mit Hilfe von Varianzanalysen mit Kovarianten bewertet. Um die Auswirkung von Alkohol- oder Drogenabusus bezüglich der

Methoden

Ki67-Zellzahl zu untersuchen, wurde der Student's t-test mit einer nachfolgenden Bonferroni Korrektur durchgeführt. Der Einfluss einer antidepressiven Therapie auf die neuronale Stammzellproliferation wurde berechnet, indem vier Gruppen (ohne medikamentöse Behandlung, Behandlung mit selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmern, Behandlung mit trizyklischen Antidepressiva, Behandlung mit beiden Substanzgruppen gleichzeitig) ohne Berücksichtigung der Diagnosen gebildet und mittels ANOVA und Student's t-test analysiert wurden. Sämtliche Berechnungen wurden mit Hilfe des Programms SPSS für Windows 9.0 durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der immunhistochemischen Einzelmarkierungen an Mausgewebe

4.1.1 PCNA-Färbung mittels Immunfluoreszenz

Die PCNA-Färbung mittels Immunfluoreszenz erbrachte weder am Mausgewebe noch an dem uns zur Verfügung gestellten Humangewebe verwertbare Ergebnisse. Bei PCNA (proliferating cell nuclear antigen) handelt es sich um ein Hilfsprotein der DNS-Polymerase delta, welches in der G₁-Phase auf einen Maximalwert bezüglich dessen Expression ansteigt, um in der G₂-Phase wieder auf einen niedrigen Basalwert abzufallen. Als ein die DNS-Synthese unterstützendes Hilfsprotein ist es dabei in DNS-Reparaturmechanismen involviert und wird somit nicht nur in proliferierenden Stammzellen, sondern auch beispielsweise in postischämischen oder apoptotischen Zellen exprimiert. Da die Färbung mittels der DAB-Methode an Mausgewebe gut funktioniert hat, ist das Scheitern der Färbung mittels Immunfluoreszenz am ehesten auf ein Problem mit den verwendeten Antikörper zurückzuführen. Weshalb die guten Ergebnisse der PCNA-Färbung mittels DAB am Mausgewebe nicht auf das uns zur Verfügung gestellte Humangewebe übertragen werden konnten, bleibt unklar, wobei nur einige wenige Schnitte aufgrund der sehr begrenzten Menge von Humangewebe mit dem PCNA-Antikörper bearbeitet wurden.

4.1.2 PCNA-Färbung mittels DAB

Die PCNA-Färbung mittels DAB erbrachte an Mausgewebe gute Ergebnisse (Abbildung 8). In humanen Hirnschnitten konnte jedoch im Gegensatz hierzu keine reliable Anfärbung proliferierender Zellen erreicht werden (siehe 4.1.1).

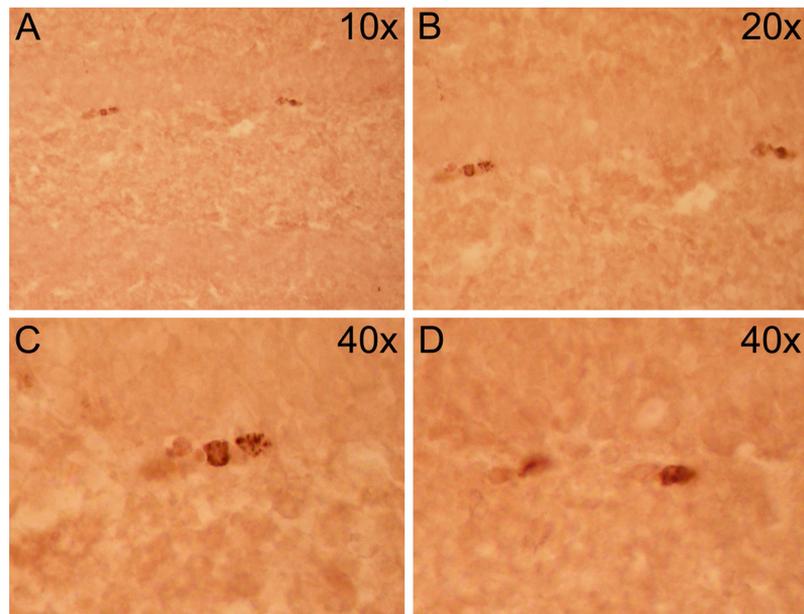


Abbildung 8: PCNA positive Zellen im Gyrus dentatus der Maus in unterschiedlichen Vergrößerungen (Teilabbildung A: 10-fache Vergrößerung, Teilabbildung B: 20-fache Vergrößerung, Teilabbildungen C und D: 40-fache Vergrößerung).

4.1.3 DCX-Färbung mittels DAB

Weder an Mausgewebe noch an Humangewebe konnten mit den DCX-Färbungen mittels DAB positive Signale im Gyrus dentatus detektiert werden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die Tatsache, dass das Mikrotubulin-assoziierte Doublecortin-Antigen nur vorübergehend in neuronalen Vorläuferzellen und weder in Stammzellen noch in adulten Nervenzellen nachweisbar ist. Dieses Expressionsmuster macht DCX zu einem einzigartigen Marker für die Neurogenese, da es für einen Zeitraum von circa zwei bis drei Wochen, nachdem die Zellen postmitotisch wurden, exprimiert wird (211;212). Auch hier bleibt unklar, weshalb die Färbungen sowohl an Mausgewebe als auch an Humangewebe nicht gelangen. Möglicherweise steht hier jedoch ein Problem mit dem Primärantikörper im Vordergrund, da die DCX-Färbungen unabhängig von der Färbeprozedur und dem verwendeten Material nicht funktionierten.

4.2 Ergebnisse der immunhistochemischen Doppelmarkierungen an Mausgewebe

4.2.1 β -III-Tubulin/Ki67 Doppelmarkierung mittels Immunfluoreszenz

In der β -III-Tubulin/Ki67 Doppelmarkierung zeigten sich zwar positive Signale für Ki67, nicht jedoch für β -III-Tubulin, so dass diese Doppelmarkierung als solche nicht gelang. Dass Doppelmarkierungen mit β -III-Tubulin und Ki67 möglich sind, konnte bereits in Studien an Mäusen gezeigt werden, in welchen die Rate adulter Neurogenese nach einem stattgehabtem apoplektischen Insult untersucht wurde (213). Allerdings existiert bislang nur eine Publikation, die eine Kolo-kalisation von β -III-Tubulin und Ki67 an humanem Gewebe beschreibt (214). Hierbei handelte es sich um Gewebe von Patienten mit einem Glioblastoma multiforme.

4.2.2 GFAP/Ki67 Doppelmarkierung mittels Immunfluoreszenz

In dieser Färbung zeigten sich zwar positive Signale für GFAP (glial fibrillary acid protein), nicht jedoch für Ki67, so dass die Doppelmarkierung nicht gelang. Bei GFAP handelt es sich um einen Marker für Gliazellen, nämlich Astrozyten und Ependymzellen, welcher jedoch auch als Marker neuraler Stammzellproliferation herangezogen wird, da GFAP ebenfalls von neuralen Stammzellen exprimiert wird. Möglicherweise handelt es sich bei den in unserer Färbung positiven Signalen um bereits differenzierte Gliazellen, weshalb das Ki67-Antigen nicht mehr exprimiert wurde. Warum allerdings überhaupt keine Ki67 positiven Signale zu finden waren, lässt ein Problem bei der Durchführung der Färbeprozedur vermuten.

4.2.3 BrdU/Ki67 Doppelmarkierung mittels Immunfluoreszenz

Um zeigen zu können, dass Ki67 nicht nur verwendet werden kann, um proliferierende Zellen in Ratten, wie bereits belegt wurde (180), sondern auch in anderen Säugetieren darzustellen, wurden Gehirnschnitte BrdU-injizierter Mäuse mit Antikörpern gegen BrdU und Ki67 doppelmarkiert. Im konfokalen Mikroskop konnten beide Marker in der Subgranularzellschicht, nämlich an der Grenze zwischen Hilus und Körnerzellschicht, in den Kernen markierter Zellen gesehen werden (Abb. 9A-C). Der subventrikuläre Bereich an der lateralen Begrenzung der Seitenventrikel ist eine weitere Region des Gehirns, in der Neurogenese stattfindet. Dort konnten wir ebenfalls zeigen, dass Zellen mittels Doppelmarkierung mit BrdU und Ki67 erkannt werden können (Abb. 9 D-F). Dabei wurden nur solche Zellen als positiv gewertet, die entlang der z-Achse durch den 40µm dicken Schnitt dreidimensional dargestellt werden konnten.

Da BrdU als gebräuchlicher Mitose-Marker in der Erforschung der adulten Neurogenese Verwendung findet, schlossen wir aus der stabilen Kolo-kalisation, dass die Verwendung von Ki67 ebenfalls eine verlässliche Methode ist, um die Zellproliferation zu messen und zu quantifizieren.

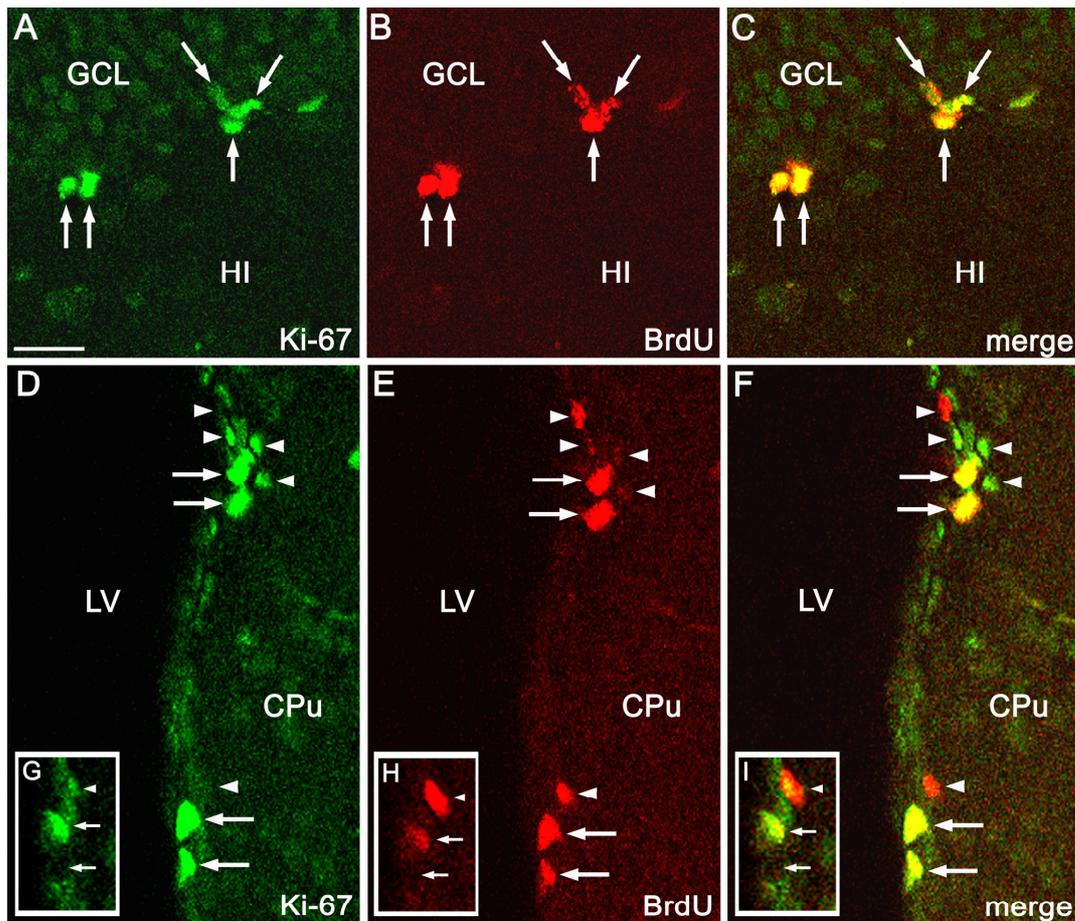


Abbildung 9: Doppelmarkierung neu entstandener Zellen im Mausgehirn mit Ki67 und BrdU. HI = Hilus, GCL = Granularzellschicht, LV = Seitenventrikel, CPu = Corpus Putamen.

Mit Hilfe des Konfokalmikroskops dargestellte und Laser gescannte Bilder zeigen in Abbildung 9 repräsentative Ausschnitte aus dem mit Ki67 (A, grün) und BrdU (B, rot) markierten Gyrus dentatus der Maus. Bild C zeigt die Übereinanderlagerung (sog. „merged image“) von A und B und verdeutlicht, dass die mit Ki67 markierten Zellen in der Subgranularzellschicht des Gyrus dentatus den mit BrdU markierten Zellen entsprechen (Pfeile). Die Bilder D-I zeigen eine immunhistochemische Doppelfärbung mit Ki67 und BrdU in der Subventrikulärzone der Maus. Die Pfeile in Abbildung D-F weisen auf Zellen hin, die eindeutig von beiden Antikörpern markiert wurden (siehe Abbildung F), während die kleineren Pfeile Zellen kennzeichnen, die auf den ersten Blick nicht von beiden Antikörpern markiert zu sein scheinen. Durch die Betrachtung tiefer liegender Schichten des 40µm dünnen Gewebeschnitts konnten wir jedoch erkennen, dass selbst diese Zellen sowohl von Ki67 als auch von BrdU markiert wurden, wie die Abbildungen G-I zeigen (Pfeile), während in dieser Schicht

keine weiteren Zellen erkannt werden konnten (unterster Pfeil in den Abbildungen G-I). Der Balken in Abbildung A entspricht einer Länge von 25µm und kann auf alle Abbildungen A-I bezogen werden.

4.3 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen an humanem postmortem Gewebe

4.3.1 NeuN/Nissl Färbung mittels DAB-Methode

Färbungen mit NeuN (neuron specific nuclear protein) erbrachten keine positiven Ergebnisse im humanen Gyrus dentatus. Da uns nur eine sehr begrenzte Anzahl von Humangewebe zur Verfügung stand, wurden weitere Versuche zur Optimierung der Färbeprozedur nicht unternommen, so dass letztlich unklar bleibt, weshalb die Färbung mit NeuN an humanem Gewebe nicht funktioniert hat. Bisher existieren nur wenige Studien mit NeuN an humanem Gewebe (215), jedoch mehrere an Gewebe von Maus und Ratte (180;216). So wurde bereits gezeigt, dass NeuN und Ki67 nicht koexprimiert werden, was darauf zurückgeführt wird, dass Ki67 exprimiert wird, bevor die weitere Differenzierung zu einer Gliazelle oder einem Neuron erfolgt. NeuN zeigt dabei die Differenzierung zu einem Neuron an.

4.3.2 DCX/Nissl Färbung mittels DAB-Methode

Weder an Mausgewebe noch an Humangewebe konnten mit den DCX-Färbungen mittels DAB positive Signale im Gyrus dentatus gewonnen werden (siehe 4.1.3).

4.3.3 PCNA/Nissl-Färbung mittels DAB-Methode

Die PCNA-Färbung mittels DAB erbrachte am Mausgewebe gute Ergebnisse, nicht jedoch am Humangewebe, so dass sie nicht weiter verfolgt wurde (siehe 4.1.1).

4.3.4 Ki67/Nissl Färbung mittels DAB-Methode

Eine Ki67/Nissl-Doppelfärbung konnte reliabel an humanem Gewebe etabliert werden. Die Teilabbildungen A und C der Abbildung 10 zeigen repräsentative photomikrographisch festgehaltene Bilder koronarer Schnitte durch den mit Antikörpern gegen Ki67 gefärbten Gyrus dentatus eines Mausgehirns. Die markierten Zellen befinden sich meistens in Zellgruppen liegend in der Subgranularzellschicht des Gyrus dentatus (Pfeile). Die Teilabbildungen B und D zeigen repräsentative photomikrographisch festgehaltene und mit Ki67 gefärbte Schnitte des anterioren humanen Hippocampus. Diese wurden zudem einer Nissl-Färbung unterzogen, um das Auffinden des Gyrus dentatus zu erleichtern. Der Pfeil deutet auf einen mit Ki67 markierten Zellkern in der Subgranularzellschicht hin. Da die Markierung mit Ki67 durch die Verwendung von DAB durchgeführt wird, kann die markierte Zelle von den Nissl markierten Zellen durch ihre dunkelbraune Farbe unterschieden werden.

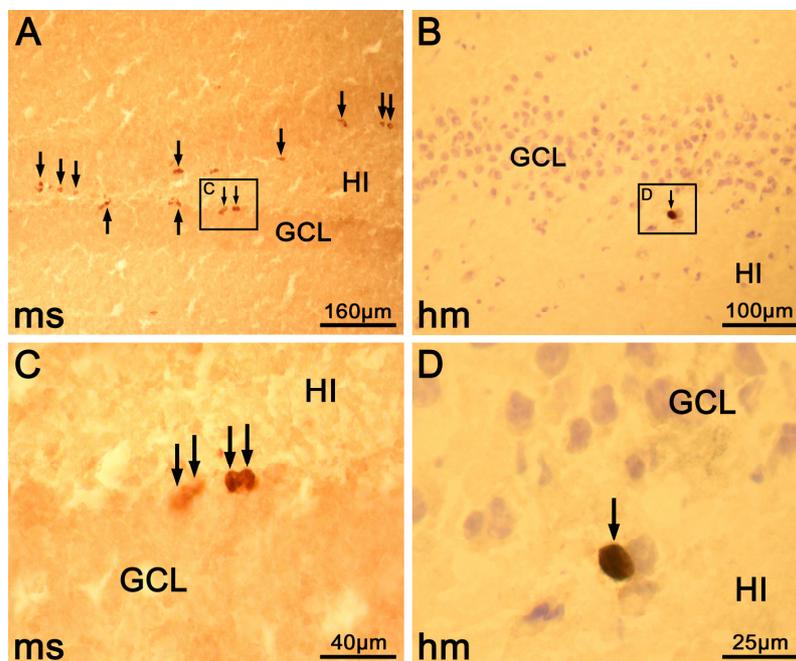


Abbildung 10: Markierung von Zellen des Gyrus dentatus mittels Ki67 in Mausgewebe und humanem Gewebe. HI = Hilus, GCL = Granularzellschicht, ms = Mausgewebe, hm = Humangewebe.

4.4 Neurale Stammzellproliferation in Humangewebe und beeinflussende Faktoren

Um die neurale Stammzellproliferation beim Menschen zu untersuchen, wurden die von der Stanley Foundation zur Verfügung gestellten Schnitte durch den anterioren Hippocampus nach Etablierung der entsprechenden Methode (s. 3.6.1. und 4.3.4.) mit Ki67 gefärbt und quantifiziert. Dabei wurden Ki67 positive Zellen ausschließlich in der zwischen der Körnerzellschicht und der polymorphen Zellschicht des humanen Gyrus dentatus gelegenen Subgranularzellschicht detektiert. Das morphologische Erscheinungsbild der Ki67 positiven Zellen im Humangewebe entsprach dem der Ki67 positiven Zellen im Mausgewebe. Ki67 scheint demnach nicht nur bei Nagetieren, sondern auch beim Menschen ein geeigneter Proliferationsmarker zu sein (siehe Abbildung 10).

Während der Auszählung der Ki67 positiven Zellen fielen fünf Gehirne auf, die sich durch eine extrem gesteigerte Proliferation auszeichneten, und zwar sowohl aus der gesunden Kontrollgruppe, aus der Gruppe der Schizophrenen als auch aus der Gruppe der Depressiven. Diese wurden von der nachfolgenden statistischen Auswertung ausgeschlossen, da sie mehr als zwei Standardabweichungen über dem Mittelwert lagen. Im Durchschnitt zeigte sich bei diesen eine Anzahl von 6,9 Ki67 positiven Zellen/mm Körnerzellschicht, wohingegen die durchschnittliche Anzahl Ki67 positiver Zellen unter Ausschluss der fünf erwähnten Gehirne bei $0,13 \pm 0,12$ /mm Körnerzellschicht lag. Unter Einschluss dieser fünf Gehirne ergab sich ein Wert von $0,76 \pm 2,81$ /mm Körnerzellschicht. Bezüglich des Alters, des pH-Werts und des Gewichts dieser Gehirne, der Lagerungsdauer, des Postmortemintervalls sowie des Erkrankungsbeginns, der Erkrankungsdauer und der Kumulativdosis von Fluphenazin zeigten sich keine Unterschiede (siehe Tabelle 5).

Durch die Verwendung von Varianzanalysen mit Kovarianten untersuchten wir, ob Alter, pH-Wert und Gewicht der Gehirne, Lagerungsdauer, Postmortemintervall (alle Gehirne), Erkrankungsbeginn, Erkrankungsdauer und

die Kumulativdosis von Fluphenazin einen Einfluss auf die Anzahl Ki67 positiver Zellen hat. Bei dieser Analyse, in die alle Untersuchungsobjekte eingingen, erbrachte nur die Variable des Postmortemintervalls in der Gruppe der Depressiven einen signifikanten Effekt ($p=0,039$). Tendenziell signifikante Effekte bezüglich des Postmortemintervalls traten auch bei den beiden anderen Patientengruppen auf, während die anderen Variablen keinen Effekt auf die Anzahl Ki67 positiver Zellen hatten. In einer Analyse, in die nur Patienten, also nicht die gesunde Kontrollgruppe, eingeschlossen wurden, konnte weder bezüglich des Erkrankungsbeginns, der Erkrankungsdauer noch der Kumulativdosis von Fluphenazin ein signifikanter Effekt gezeigt werden ($p \geq 0,39$). Auch beim Vergleich zwischen rechtem und linkem Hippocampus zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($p=0,93$; Student's t-test). Im Vergleich aller Gruppen zeigte sich darüber hinaus kein Effekt einer Behandlung mit Neuroleptika im Bezug auf die Anzahl Ki67 positiver Zellen ($p=0,11$; Student's t-Test). Folglich scheinen die genannten beeinflussenden Faktoren, abgesehen vom Postmortemintervall, keinen Einfluss auf die Neurogenese in den von uns untersuchten Gehirnen zu haben.

Tabelle 5: Aus der statistischen Auswertung wegen des Vorkommens einer extrem gesteigerten Proliferation ausgeschlossene Gehirne.

Patient	Ki67 positive Zellen/mm Körnerzellschicht	Diagnose	Substanzmissbrauch	Medikamentöse Therapie zum Zeitpunkt des Todes
1	0,8	Depression	Schwerer aktueller Alkohol- und Substanzmissbrauch	Fluoxetin, Trimipramin
2	1,4	Gesund	Kein Missbrauch	Keine Medikation
3	5,3	Depression	Geringfügiger Alkoholmissbrauch	Trazodon
4	8,3	Schizophrenie	Geringfügiger Alkoholmissbrauch	Clozapin
5	18,5	Schizophrenie	Kein Missbrauch	Thioridazin, Clozapin, Amitriptylin

4.5 Effekte von Alkohol- und Substanzmissbrauch

Da verstärkter Alkoholkonsum im Verdacht steht, die Neurogenese zu beeinträchtigen, untersuchten wir, ob Alkoholabusus oder sonstiger Substanzmissbrauch einen Einfluss auf die Färbung mit Ki67 hat. Hierbei wurden sowohl Alkohol- als auch Substanzmissbrauch vom Stanley Medical Research Institute (SMRI) auf einer Skala von 0 bis 5 eingeteilt, wobei dem Wert 0 der niedrigste und dem Wert 5 der höchste Grad des Missbrauchs entspricht. Jedoch wurden in der Analyse die beiden Gruppen mit einem Missbrauchsgrad von 0-2 und 3-5 aufgrund der kleinen Anzahl zusammen gruppiert betrachtet. Weiterhin wurde unterteilt in eine Gruppe mit aktuellem Missbrauch, eine Gruppe mit zurückliegendem Missbrauch und in eine Gruppe, bei der nie ein Missbrauch vorgelegen hatte. Zwischen keiner dieser Gruppen konnten wir signifikante Unterschiede bezüglich der Färbung mit Ki67 finden (Student`s t-test).

4.6 Einfluss einer Therapie mit Antidepressiva

Da in den letzten Jahren auf Grund von tierexperimentellen Untersuchungen häufig die Hypothese geäußert wurde, dass die Steigerung der Neurogenese ein wesentlicher Wirkungsmechanismus aller Antidepressiva sei, ist es von großem Interesse, ob sich dies auch beim Menschen zeigt. Ohne Berücksichtigung der Diagnose wurden die Gehirne hierfür entsprechend der zuletzt verordneten Medikation in vier Gruppen eingeteilt. Diese bestanden aus einer Gruppe ohne antidepressive Medikation, einer Gruppe mit einer antidepressiven Medikation mit trizyklischen Antidepressiva, einer Gruppe, welche mit selektiven Serotonin- Wiederaufnahmehemmern behandelt wurde, und einer Gruppe, der sowohl trizyklische Antidepressiva als auch selektive Serotonin- Wiederaufnahmehemmer verabreicht wurde. Zwischen all diesen Gruppen konnten im ANOVA ($p=0.21$) keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden. Auch der Vergleich der Gruppe ohne antidepressive Therapie mit allen Gruppen jeglicher antidepressiven Therapie kombiniert brachte keinen

signifikanten Unterschied hervor ($p=0,22$; Student's t-test). Eine Subgruppenanalyse innerhalb der Gruppe mit Major Depression konnte nicht durchgeführt werden, da nur drei der Patienten mit der Diagnose einer Major Depression zum Zeitpunkt des Todes keine antidepressive Therapie erhielten.

Tabelle 6: Einfluss einer Therapie mit Antidepressiva auf die Anzahl Ki67 positiver Zellen.

Medikamentöse Therapie	Keine Medikation	Trizyklische Antidepressiva (TCAs)	Selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (SSRIs)	TCAs+SSRIs
	n = 33	n = 10	n = 7	n = 5
Ki67 positive Zellen/mm Subgranularzellschicht (MW \pm Std.-Fehler)	0,14 \pm 0,12	0,12 \pm 0,12	0,12 \pm 0,16	0,08 \pm 0,03

4.7 Adulte Neurogenese und psychische Erkrankungen

Nach Analyse konfundierender Faktoren und der möglichen Effekte einer medikamentösen Therapie untersuchten wir nun, ob die durch die Färbung des Gewebes mit Ki67 nachgewiesene neurale Stammzellproliferation im Gyrus dentatus bei psychischen Erkrankungen verändert ist. Alle drei Diagnosegruppen (Bipolar affektive Erkrankung, Major Depression und Schizophrenie) wurden mit der Kontrollgruppe anhand von Mittelwerten der Varianzanalysen miteinander verglichen. Hierbei zeigte sich, dass die neurale Stammzellproliferation nur bei der Schizophrenie, selbst wenn potentielle Beeinflussungseffekte von Störvariablen berücksichtigt wurden, (Abb. 11; $0,07 \pm 0,02$ vs $0,19 \pm 0,04$ Zellen/mm in der Kontrollgruppe; $p=0,027$), signifikant vermindert ist. Obwohl sich ein Trend in Richtung einer verminderten adulten Neurogenese bei bipolar affektiven Erkrankungen sehen lässt, zeigte sich kein Unterschied in der Anzahl Ki67 positiver Zellen zwischen der Gruppe der Depressionen und der gesunden Kontrollgruppe.

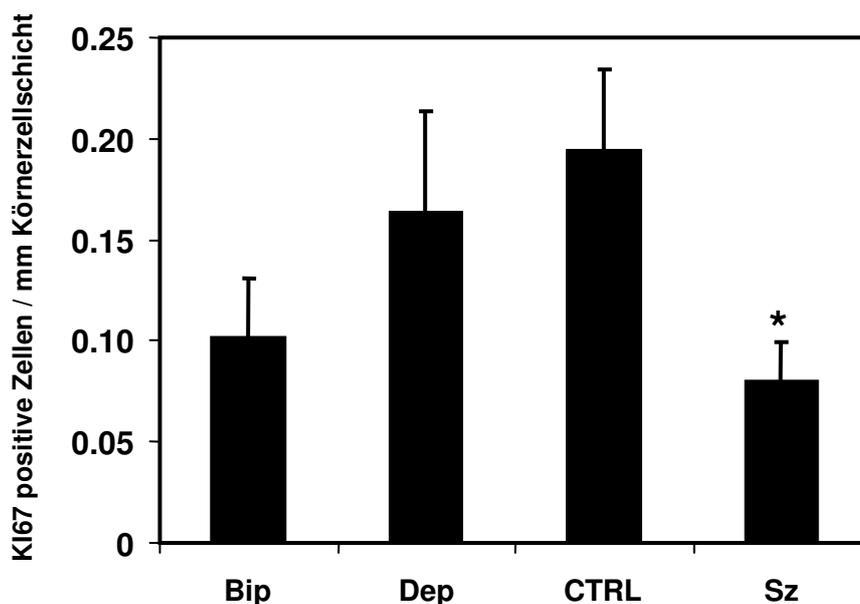


Abbildung 11: Anzahl Ki67 positiver Zellen pro mm Körnerzellschicht in Abhängigkeit der Diagnose (Bip = bipolar affektive Erkrankung, Dep = Major Depression, Sz = Schizophrenie, CTRL = gesunde Kontrollgruppe). Jeder der vier Balken entspricht einer Gruppe von 13 bis 15 Patienten bzw. Gesunden. Pro Gehirn wurden sieben Schnitte des anterioren Hippocampus gefärbt und ausgezählt.

Bei dieser Analyse bleibt jedoch unbekannt, ob sowohl die Patienten aus der Gruppe der Major Depression als auch die Patienten aus der Gruppe der bipolar affektiven Erkrankungen akut unter ihrer Erkrankung litten, da sich beide Krankheiten bekanntlich durch einen phasischen Verlauf auszeichnen. Obwohl der Suizid als Indikator einer aktuell präsenten Erkrankung in Betracht gezogen werden kann, zeigten Patienten mit einer affektiven Erkrankung, die durch Suizid starben, keine signifikante Differenz bezüglich der neuronalen Stammzellproliferation im Vergleich zu solchen Patienten, die aus anderen Gründen verstarben (Gruppe der durch Suizid Verstorbenen: 0,12 Ki67 positive Zellen/mm Körnerzellschicht, n=16; Gruppe der nicht durch Suizid Verstorbenen: 0,13 Ki67 positive Zellen/mm Körnerzellschicht, n=12; p=0,77; Students t-test).

5 Diskussion

Die wichtigsten Ergebnisse der hier vorliegenden Studie sind zusammengefasst:

1. Die neurale Stammzellproliferation ist bei Patienten mit einer unipolaren Depression nicht vermindert;
2. Die Proliferation hippocampaler neuraler Stammzellen ist bei an einer Schizophrenie erkrankten Patienten signifikant vermindert;
3. Die Behandlung mit antidepressiven und/oder antipsychotischen Medikamenten hat keinen Einfluss auf die neurale Stammzellproliferation.

Bevor diese Ergebnisse diskutiert werden können, muss allerdings noch beachtet werden, dass fünf Gehirne aus dem Gesamtkollektiv von weiteren statistischen Untersuchungen ausgeschlossen wurden, da diese ein extrem hohes Niveau neuraler Stammzellproliferation aufzeigten. Insbesondere die Gehirne 3, 4 und 5 zeigten eine außerordentlich hohe Aktivität neuraler Stammzellproliferation, die weder durch jegliche Form von Behandlung noch aus irgendeinem anderen offensichtlichen Grund erklärt werden konnte. Da wir leider keine Informationen darüber erhielten, ob sich diese Patienten einer elektrokonvulsiven Therapie (EKT) unterzogen hatten, wäre dies eine mögliche, wenn auch nur spekulative Erklärung, da bereits gezeigt werden konnte, dass eine elektrokonvulsive Therapie die adulte Neurogenese im Tiermodell stimulieren kann (27;174). Da Depressionen und Schizophrenien jeweils heterogene Gruppen von Psychosen sind, bestünde die Möglichkeit, dass einige dieser Subgruppen mit einer stark erhöhten neuralen Stammzellproliferation einhergehen. Letztlich könnte es sich bei den fünf Patienten auch um Artefakte handeln, was wir jedoch in Anbetracht der Tatsache, dass sich diese Schnitte weder in der Zellverteilung noch morphologisch von den übrigen Schnitten unterscheiden, als eher unwahrscheinlich einschätzen. Außerdem zeigten sich keine weiteren offensichtlichen Unterschiede bezüglich konfundierender Faktoren und Variablen im Vergleich zu den übrigen Patienten.

Generell muss kritisch hinterfragt werden, ob mit dem Ki67-Antikörper tatsächlich ein verlässlicher Marker für die adulte Neurogenese im humanen Gehirn zur Verfügung steht. In vorhergehenden Studien, die sich mit der Erforschung der adulten Neurogenese in Humangewebe beschäftigten, wurden Antikörper gegen PCNA (217;218) und DCX (219) verwendet. Hierbei sei erwähnt, dass sowohl bei der Verwendung von Ki67 als auch PCNA und BrdU völlig unklar bleibt, welche Art von Zelle letztlich detektiert wird, da mit Hilfe dieser Antigene nur gezeigt werden kann, dass sich Zellen geteilt haben, ohne jedoch zu wissen, wie sich eben diese Zellen weiter differenzieren. Der Nachweis einer Differenzierung von neuralen Stammzellen zu Neuronen konnte durch Doppelmarkierungen von NeuN mit BrdU erbracht werden, da es sich bei NeuN um einen spezifischen Marker für eine bereits fortgeschrittene Reifung zu einem Neuron handelt (216). Ein weiterer Nachteil von Ki67 ebenso wie von PCNA ist, dass diese Antigene nur eine Momentaufnahme der adulten Neurogenese zum Zeitpunkt der Materialgewinnung liefern, wohingegen die Färbung mittels BrdU einen größeren Beobachtungszeitraum der adulten Neurogenese gestattet. Obwohl zu Beginn der hier vorliegenden Studie mit PCNA durchgeführte Färbungen an Mausgewebe vielversprechend waren, konnten in nachfolgenden Untersuchungen im Gegensatz zu Ki67 an menschlichem Gewebe keine zuverlässigen Ergebnisse erreicht werden. Außerdem wird das in Reparaturmechanismen der DNS involvierte PCNA auch in ruhenden Zellen exprimiert (220) und es besteht eine wesentlich bessere Korrelation zwischen Ki67 und BrdU als zwischen PCNA und BrdU (221). Auf Grundlage dieser Daten wurde für unsere Färbungen der Ki67-Antikörper verwendet.

Im Gegensatz zu BrdU, welches während der S-Phase sich teilender Zellen in die DNS integriert wird, wird Ki67 während der gesamten Mitose der Zelle, abgesehen von der G₀-Phase, exprimiert (181). Infolgedessen werden etwa doppelt so viele Zellen, die Ki67 exprimieren, detektiert als Zellen, die mit BrdU markiert wurden. Demgegenüber scheint sich die Anzahl Ki67 positiver Zellen während des Zellzyklus zu ändern, so dass in der frühen G₁-Phase eine nicht unerhebliche Anzahl Ki67 positiver Zellen nicht detektiert wird, was wiederum

eine vermeintlich niedrigere Rate neuraler Stammzellproliferation zur Folge hat (222). Es kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass es sich bei manchen der markierten Zellen um zugrunde gehende Neurone handelt, da sowohl Ki67 als auch BrdU in Zellen, in welchen eine Ischämie- bzw. Hypoxie induzierte DNS-Synthese während der Apoptose stattfindet, exprimiert werden (223). Ein großer Nachteil ist, dass mittels Ki67 nicht zwischen neuralen und glialen Zellen unterschieden werden kann, da Ki67 exprimiert wird, bevor sich die Vorläuferzellen ihrer terminalen Differenzierung unterziehen, weshalb die Detektion von Ki67 nur den Mittelwert der neuralen Stammzellproliferation und nicht die tatsächliche Menge und Entstehung funktionstüchtiger Neurone liefern kann, wobei jedoch Letzteres unter adulter Neurogenese im engeren Sinne verstanden wird. Leider ist es aus den o.g. Gründen deshalb auch nicht möglich, Doppelmarkierungen mit neuralen Markern wie NeuN oder glialen Markern wie GFAP anzufertigen, wobei bereits gezeigt werden konnte, dass Ki67 und NeuN nicht koexprimiert werden (180). Sieht man von diesen Einschränkungen ab, liefern immunhistochemische Färbungen mit dem Ki67-Antikörper bislang die besten Näherungswerte für adulte Neurogenese im humanen Gyrus dentatus, insbesondere wenn man sich vor Augen hält, dass Ki67 positive Zellen mit BrdU markierten Zellen in ihrer Lokalisation übereinstimmen und dass 75 bis 90% der BrdU positiven Zellen den neuronalen Marker NeuN exprimieren (14;224-226). Fasst man also zusammen, dass Ki67 den ersten Schritt der Neurogenese, nämlich die Stammzellproliferation aufzeigt, stellt sich also die Frage, was die Ergebnisse unserer Studie letztlich bedeuten.

5.1 Effekte einer medikamentösen Therapie

Wie durch eine beträchtliche Anzahl von Studien gezeigt werden konnte (25;204;227), führen verschiedenste medikamentöse Therapienansätze mit Antidepressiva zu einer Erhöhung BrdU markierter Zellen. Diese Studien wurden primär an Ratten durchgeführt, konnten jedoch mit gleichen Ergebnissen an Mäusen wiederholt werden. Durch die Beobachtung, dass eine durch eine Bestrahlung induzierte Hemmung der Neurogenese die Effekte einer antidepressiven Medikation blockiert, wurde vermutet, dass die Wirksamkeit einer medikamentösen Therapie mit Antidepressiva von der Stimulation der adulten Neurogenese abhängt (92). Der hier vorgelegte Befund, dass keine Form einer antidepressiven Therapie die Rate neuraler Stammzellproliferation beeinflusst, widerspricht allerdings der Hypothese, dass die Stimulation adulter Neurogenese für die Wirksamkeit einer medikamentösen antidepressiven Therapie nötig ist. Nach diesen Ergebnissen ist es sogar so, dass Patienten, die eine antidepressive Medikation erhalten hatten, niedrigere Raten neuraler Stammzellproliferation aufzeigten, auch wenn dies nicht statistisch signifikant war. Demgegenüber stehen Studien, die zeigen, dass nahezu jede pharmakologische (trizyklische Antidepressiva und selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (14)) als auch nicht-pharmakologische (Sport und elektrokonvulsive Therapie (27)) antidepressive Therapie mit Ausnahme der transkraniellen Magnetstimulation die adulte hippocampale Neurogenese erhöht (12;228), so dass sogar vorgeschlagen wurde, dass eine Steigerung der adulten Neurogenese ein antidepressives Wirkprinzip darstelle. So schützt beispielsweise der selektive Serotoninwiederaufnahmehemmer Fluoxetin vor einer Stress-induzierten Reduktion der adulten Neurogenese (15), wobei dies hauptsächlich für frühe, sich amplifizierende Vorläuferzellen gilt (229). Eine weitere, bemerkenswerte Studie an Ratten zeigte (230), dass eine bilaterale olfaktorische Bulbektomie, welche ein etabliertes Tiermodell für Depressionen darstellt, zu einer Reduktion der adulten Neurogenese im Hippocampus führt, was durch trizyklische Antidepressiva umkehrbar ist. Somit kann die „Neurogenese-Hypothese der Depression“ weiter aufrechterhalten werden, wobei unsere Studie, welche die bisher einzige am Menschen durchgeführte

Arbeit darstellt, weder für eine Involvierung der adulten Neurogenese in die Pathogenese der Depression noch für ihre Steigerung durch Antidepressiva spricht (231).

Auch eine Behandlung mit Neuroleptika (Kumulativedosis) zeigte keinen Effekt auf die neurale Stammzellproliferation, wobei bislang Antipsychotika und deren Wirkung auf die adulte Neurogenese nicht im Fokus des Forschungsinteresses standen, da die adulte Neurogenese in den letzten Jahren fast ausschließlich im Zusammenhang mit affektiven Erkrankungen thematisiert wurde. Es ist bemerkenswert, dass bislang nur eine Studie eine Steigerung der adulten Neurogenese unter einer medikamentösen Therapie mit Haloperidol beschreibt (232), wohingegen sechs weitere Studien unter Verwendung sowohl kurz- als auch längerfristiger Behandlungsschemata keine Änderung der neuralen Stammzellproliferation nachweisen konnten (26;233-237).

Eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse unserer Studie wäre, dass die Medikamente nicht, wie verordnet, eingenommen wurden, wobei dies jedoch nur für einige und sicher nicht alle Patienten zutreffen mag. Weitere Ursachen, die in Betracht gezogen werden müssen, sind polypharmakologische Therapieansätze und die Heterogenität der verordneten Substanzen. Letztlich muss bedacht werden, dass es sich in unserer Studie um ein relativ kleines und damit eingeschränkt aussagekräftiges Patientenkollektiv handelt, was jedoch ein Problem jeder Studie, die humanes postmortem Gewebe untersucht, ist. Dennoch stehen die Ergebnisse unserer postmortem Studie (231) in Übereinstimmung mit den tierexperimentellen Befunden, welche zeigen konnten, dass die Behandlung mit Neuroleptika keinen Einfluss auf die neurale Stammzellproliferation im Gyrus dentatus hat. So scheint zumindest die hippocampale adulte Neurogenese kein Ansatzpunkt für die Wirkweise von Neuroleptika zu sein, wobei natürlich andere Gehirnregionen von einer verstärkten adulten Neurogenese profitieren könnten. So könnten atypische Neuroleptika zumindest einige ihrer Effekte durch eine Stimulation der Stammzellproliferation zum Beispiel im präfrontalen Kortex vermitteln und dadurch den bei schizophrenen Patienten beobachteten entwicklungsbedingten Fehlbildungen entgegenwirken.

5.2 Affektive Störungen und adulte Neurogenese

Auf Studien am Tiermodell basierend wurde vermutet, dass Depressionen zumindest teilweise durch eine verminderte adulte Neurogenese verursacht werden. Infolgedessen wurde die Erforschung der adulten Neurogenese bei Patienten mit einer affektiven Erkrankung ungeduldig erwartet. Obwohl die untersuchten Patienten aus der Gruppe der bipolar affektiven Erkrankungen einen Trend zu einer niedrigeren Rate adulter Neurogenese aufzeigten, war unsere Feststellung, nämlich dass die neurale Stammzellproliferation bei Patienten aus der Gruppe der unipolaren Depression unverändert ist, überraschend und widerspricht der Annahme, dass die adulte Neurogenese eine zentrale Stellung in der Ätiopathogenese affektiver Erkrankungen einnimmt. Weiterhin scheint die adulte Neurogenese somit nicht das Korrelat für magnetresonanztchnisch gewonnenen Daten, die eine Hippocampusatrophie bei Patienten mit einer schweren Depression beschreiben (238-240), zu sein, jedoch wurde von einer erhöhten Dichte der Neurone mit entsprechender Volumenminderung des Neuropils berichtet, was die Annahme einer hippocampalen Atrophie unterstützt (197). Dieser Volumenverlust wurde allerdings eher einer Reduktion des Neuropils als einer Neurodegeneration zugeschrieben, nicht zuletzt da ein Zellverlust in postmortem Gewebe depressiver Patienten nicht nachgewiesen werden konnte (241;242). Es muss beachtet werden, dass die hier vorliegende Studie mit ihrem geringen Patientenkollektiv bezüglich milder bis moderater Effekte eine beschränkte Aussagekraft besitzt und dass die Differenzierung und die strukturelle Integration von neuen Zellen in vorbestehende neuronale Netzwerke dennoch von Relevanz für die Pathophysiologie affektiver Erkrankungen sein können. Dies muss daher in weiteren Studien, die sich mit der neuronalen Feinstruktur beschäftigen, weiter untersucht werden. Weiterhin besteht dennoch, abgesehen von den bereits genannten Überlegungen, die Möglichkeit, dass die Anzahl Ki67 positiver Zellen, die als Maß für die neurale Stammzellproliferation herangezogen wird, bei Depressionen unverändert ist. Jedoch ist deren Überlebensrate vermindert, was zu einer niedrigeren Nettoneurogenese führt. Nicht zuletzt könnte ja auch noch in dem untersuchten Kollektiv eine

krankheitsbedingt erniedrigte Neurogeneserate durch antidepressive Therapie wieder auf normale Werte gesteigert worden sein. Letztlich bleiben die Mechanismen, die dem hippocampalen Volumenverlust zugrunde liegen, weiter unklar, wobei die Theorie einer Reduktion der Rate neu gebildeter Zellen als Ursache der hippocampalen Atrophie erst widerlegt werden muss, zumal Stress und die damit einhergehenden erhöhten Glukokortikoidspiegel die adulte Neurogenese reduzieren. Bevor also definitive Rückschlüsse bezüglich des Stellenwerts adulter Neurogenese bei affektiven Erkrankungen gezogen werden können, sollten weitere Versuche unternommen werden, unsere Ergebnisse mit alternativen Proliferationsmarkern zu replizieren.

5.3 Adulte Neurogenese und Schizophrenie

Überraschenderweise war die einzige Variable, die signifikant mit einer verminderten neuralen Stammzellproliferation einherging, die Diagnose einer Schizophrenie. Bis jetzt wurde diese Erkrankung nicht mit einer verminderten Rate adulter Neurogenese in Verbindung gebracht. In einem Tiermodell der Schizophrenie wurde die Neurogenese durch zweifache Injektionen mit Ketamin, einem nicht kompetitiven N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor-Antagonisten, stimuliert (243). Andererseits erhöhen atypische Neuroleptika, wie beispielsweise Olanzapin (14), im Gegensatz zum prototypischen Antipsychotikum Haloperidol die Rate adulter Neurogenese in der Subventrikulär-zone, was darauf schließen lässt, dass diese Pharmaka die Zellproliferation im rostralen Migrationsstrang stimulieren, um so den Zell-bestand zwar im Bulbus olfactorius, nicht jedoch im Hippocampus aufzufüllen (236). In Übereinstimmung damit konnten in einer an humanem postmortem Gewebe durchgeführten Studie neuronale Abnormalitäten im Bulbus olfactorius schizophrener Patienten als Hinweis auf Störungen der Zellproliferation gefunden werden (244). Während diese Ergebnisse nicht als Indikator für Veränderungen im Gyrus dentatus als solchem verstanden werden können, bleibt der Einfluss von atypischen Neuroleptika auf die hippocampale Neurogenese weiter strittig (14;236). Ziel einer sorgfältig durchgeführten Studie war es deshalb, den Zusammenhang von Neuroleptika und Neurogenese weiter aufzuklären (233),

wobei sich zeigte, dass im Gegensatz zu hochdosiertem Clozapin oder Haloperidol niedrigdosiertes Clozapin die Stammzellproliferation im Gyrus dentatus von Ratten stimuliert. Olanzapin, nicht jedoch Haloperidol, stimuliert die adulte Neurogenese im präfrontalen Kortex (237), in einer weiteren Region also, die mit der Pathophysiologie der Schizophrenie in Verbindung gebracht wird. Es überrascht daher nicht, dass der Hippocampus, neben dem dorsolateralen präfrontalen Kortex, der Hauptverdächtige in der Pathogenese schizophrener Erkrankungen ist (245;246). Einige der Effekte atypischer Neuroleptika könnten deshalb darauf zurückzuführen sein, dass diese die Proliferation neuraler Stammzellen stimulieren und auf diese Weise die verminderte adulte Neurogenese bei schizophrenen Patienten kompensieren.

Es stellt sich nun die Frage, ob unser Ergebnis einer verminderten adulten Neurogenese bei schizophrenen Patienten Sinn ergibt. Bekanntermaßen gehen schizophrene Erkrankungen mit verschiedenen kognitiven und über die Zeit stabilen Defiziten einher (247), welche ein Grundsymptom der Erkrankung darstellen, das nicht nur in akuten Krankheitsepisoden auftritt, teilweise auf eine hippocampale Dysfunktion zurückzuführen ist und mit Änderungen des Hippocampus-Volumens korreliert (248). In tierexperimentellen Versuchen wurde gezeigt, dass die Hippocampus-Formation an der Onlineverarbeitung von Informationen und deren multimodaler Integration beteiligt ist und somit eine kohärente Abbildung der Umwelt ermöglicht (249). Weiterhin nimmt der Hippocampus eine maßgebliche Rolle in der Gedächtnisfunktion und weniger in der Affektregulation ein. Die Verminderung der adulten Neurogenese, die als ursächlich für Einbußen in der Gedächtnisfunktion diskutiert wurde (250), könnte also sehr wohl die kognitiven Einbußen schizophrener Patienten mit verursachen. Obwohl dies nicht in letzter Konsequenz bewiesen ist, könnte diese Funktion des Hippocampus zu der dysfunktionalen Informationsverarbeitung bei schizophrenen Psychosen beitragen, da eine Störung der adulten Neurogenese eine zeitliche Fehlkodierung neuer Informationen verursachen könnte, die nicht nur zu einer Störung des episodischen Gedächtnisses führt, sondern eventuell auch zu einer Störung der emotionalen Bewertung tatsächlicher Erlebnisinhalte und somit zu einer konsekutiven Wahnbildung. Ebenso könnte die Verbesserung kognitiver Funktionen bei

Schizophrenie durch eine medikamentöse Therapie, z. B. mit Clozapin, durch die Stimulation adulter Neurogenese bedingt sein, was in tierexperimentellen Studien bereits gezeigt werden konnte. Da sowohl Lernen (251) als auch körperliche Betätigung (105) und eine abwechslungsreiche Umgebung (252) die adulte Neurogenese stimulieren, muss hierbei auch an den potentiellen Nutzen dieser nicht pharmakologischen Behandlungen gedacht werden, da diese kostengünstig und nebenwirkungsfrei die adulte Neurogenese steigern.

In zahlreichen Studien konnte eine Reduktion des Hippocampus-Volumens um durchschnittlich 4% bei Patienten mit einer Schizophrenie belegt werden (239). Eine Meta-Analyse von MRT-Studien an Patienten mit einer ersten psychotischen Episode mit insgesamt 300 Patienten und 287 Kontrollen berichtet sogar von einer bilateralen Atrophie des Hippocampus von bis zu 8% (253), was die Vermutung nahelegt, dass die Volumenreduktion Ursache und nicht Konsequenz der Erkrankung ist. Eine weitere MRT-Studie, die sich Voxel-basierter Morphometrie bediente, fand bei mehr als 50% der eingeschlossenen Studien ein reduziertes Volumen des medialen Temporallappens, welcher den Hippocampus mit einschließt (254). Inzwischen existieren zahlreiche postmortem Studien, die erste Hinweise auf die zugrunde liegenden neurobiologischen Mechanismen liefern. So deuteten erste Untersuchungen auf einen Neuronenverlust (255), eine fehlerhafte Organisation hippocampaler Neurone (256) und auf eine Verkleinerung der Neuronenzellkörper hin (257). Spätere Studien konnten diese initialen Befunde jedoch nicht replizieren. Insbesondere neuere, stereologische Untersuchungen sprechen gegen eine umfassende Reduktion hippocampaler Neurone (258;259), wobei aber die Anzahl bestimmter, nicht-pyramidaler CA2-Neurone reduziert zu sein scheint (260). Eine Erklärung für diese sich widersprechenden Ergebnisse ist – neben der grundsätzlichen Heterogenität der Erkrankung – sicherlich auch die geringe Anzahl der pro Studie untersuchten Patienten. Das aktuell dominierende Modell geht davon aus, dass Störungen des Neuropils und dabei speziell des synaptischen Apparates für die in bildgebenden Verfahren detektierte Atrophie verantwortlich sind (261). Letztlich bleiben die Mechanismen auf zellulärer und molekularer Ebene bezüglich der Rolle des Hippocampus für die Ätiologie und Pathogenese der Schizophrenie weiterhin unklar, wobei eine Beeinträchtigung

der adulten Neurogenese mit einer daraus resultierenden gestörten neuronalen Verschaltung im Hippocampus zum einen gut das in MRT-Studien gefundene verkleinerte Hippocampus-Volumen erklären könnte und zum anderen hervorragend in die aktuellen Konzepte der Ätiopathogenese der Schizophrenie passen würde.

Der sich in unserer Studie abzeichnende Trend in Richtung einer verminderten adulten Neurogenese bei bipolar-affektiven Erkrankungen deutet möglicherweise auf gemeinsame pathophysiologische Vorgänge beider Erkrankungen hin. Diese These wird durch bereits erhobene genetische (262) und morphologische (263) Daten gestützt.

Duman forderte in seiner kritischen Bewertung des Zusammenhangs zwischen Neurogenese und Depression (25), die „Neurogenese-Hypothese der Depression“ mittels immunhistochemischer Färbungen mit Antikörpern gegen bestimmte Marker des Zellzyklus bei an einer Depression leidenden Patienten weiter zu untersuchen. Obwohl die Ergebnisse unserer Studie, die erstmalig adulte Neurogenese an Patienten mit psychischen Erkrankungen untersuchte, diese Hypothese nicht stützen, könnte die adulte Neurogenese jedoch eine wichtige Rolle bei schizophrenen Erkrankungen spielen, wodurch die als fester Bestandteil an der Erkrankung Schizophrenie angesehenen kognitiven Defizite erklärt werden könnten. Letztlich muss jedoch bedacht werden, dass die Erforschung der adulten Neurogenese am Menschen soeben erst begonnen hat.

6 Zusammenfassung

Es existiert bereits eine Vielzahl von tierexperimentellen Studien bezüglich Einflussfaktoren auf die adulte Neurogenese. Nachdem die Teilungsfähigkeit von neuronalen Stammzellen Ende der 1990er Jahre auch im adulten humanen Gehirn nachgewiesen wurde, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, adulte Neurogenese bei psychischen Erkrankungen zu quantifizieren bzw. den Einfluss medikamentöser Therapien auf die adulte Neurogenese zu untersuchen. Diese Studie stellt dabei die bislang einzige Arbeit dar, die sich mit der humanen adulten Neurogenese bei psychischen Erkrankungen beschäftigt. Mittels Doppelfärbungen von Ki67 und BrdU an Mausgewebe wurde zunächst nachgewiesen, dass das Ki67-Antigen ein zuverlässiger Marker für sich teilende Zellen ist, woraufhin die Färbeprozedur problemlos auf Humangewebe übertragen werden konnte. Die Quantifizierung von Ki67 positiven Zellen erfolgte entlang der Körnerzellschicht in einem definierten Abstand in der Einheit Zellen pro Millimeter. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie widersprechen in mehrfacher Hinsicht den Hypothesen, die sich aus tierexperimentellen Studien ergeben. Während die neurale Stammzellproliferation bei schizophrenen Psychosen signifikant vermindert ist, findet sich kein Unterschied bei affektiven Erkrankungen im Vergleich zu Kontrollen. Weder wird die „Neurogenese-Hypothese“ der Depression bestätigt, noch zeigte sich ein Effekt antidepressiv oder antipsychotisch wirksamer Pharmaka auf die Rate adulter Neurogenese, da eine pharmakologische Therapie jedweder Art keinen Einfluss auf die Zahl Ki67 positiver Zellen hatte. Deshalb scheint eine Steigerung der adulten Neurogenese kein Wirkmechanismus dieser Medikamente zu sein. Ein überraschendes Ergebnis jedoch ist die signifikant reduzierte Rate adulter Neurogenese bei an Schizophrenie erkrankten Patienten. Aufgrund der sehr begrenzten Anzahl untersuchter Patienten ist die vorliegende Studie in ihrer Aussagekraft jedoch eingeschränkt und muss daher an einem größeren Patientenkollektiv wiederholt werden. Eine Vielzahl von Fragen bzgl. des Stellenwerts der adulten Neurogenese bei psychischen Erkrankungen bleibt darüber hinaus weiter ungeklärt, was die Durchführung weiterer Studien am adulten humanen Gehirn verlangt.

7 Abkürzungsverzeichnis

a	= Jahr
ABC	= Avidin-Biotin-Komplex
aN	= Adulte Neurogenese
Aqua dest	= destilliertes Wasser
BDNF	= Brain-derived neurotrophic factor
Bip	= Bipolar-affektive Erkrankung
BrdU	= Bromodesoxyuridin
BSA	= Bovine Serum Albumine
bzw	= beziehungsweise
°C	= Grad Celsius
CA	= Cornu amonis
ca	= circa
CO ₂	= Kohlendioxid
CPu	= Corpus Putamen
CTRL	= Gesunde Kontrollgruppe
Cy2	= Carbocyanin
Cy3	= Indocarbocyanin
DAB	= 3,3 Diaminobenzidin
DCX	= Doublecortin X
Dep	= Major Depression
DG	= Gyrus dentatus
DNS	= Desoxyribonukleinsäure
DSM-IV	= Diagnostisches und statistisches Manual psychischer Störungen in der vierten Version
EGF	= Epidermal growth factor
EKT	= Elektrokonvulsive Therapie
etc	= et cetera
g	= Gramm
h	= Stunde
HCl	= Salzsäure
HI	= Hilus

Abkürzungsverzeichnis

hm	= Humangewebe
H ₂ O ₂	= Wasserstoffperoxid
G ₁ -Phase	= Zwischenphase des Zellzyklus
G ₂ -Phase	= Zwischenphase des Zellzyklus
G ₀ -Phase	= Ruhephase des Zellzyklus
GCL	= Körnerzellschicht (Granularzellschicht)
GFAP	= Glial fibrillary acid protein
ICD-10	= Internationale Klassifikation der Krankheiten in der zehnten Version
IgG	= Immunglobulin vom Subtyp gamma
Ki67	= Proliferationsmarker (Ki bezieht sich auf das Institut für Pathologie der Universität Kiel)
kg	= Kilogramm
KZS	= Körnerzellschicht (Granularzellschicht)
LV	= Seitenventrikel
M	= Molar
µm	= Mikrometer
mg	= Milligramm
ml	= Milliliter
mm	= Millimeter
MO	= Stratum moleculare
M-Phase	= Mitose
MRT	= Magnetresonanztomographie
ms	= Maus (-gewebe)
MW	= Mittelwert
NaCl	= Natriumchlorid
NCS	= Neurale Stammzelle
NeuN	= Neuron specific nuclear antigen
NGS	= Normal Goat Serum
NHS	= Normal Horse Serum
NMDA-R	= N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NSP	= Neurale Stammzellproliferation
OB	= Bulbus olfactorius
o.g.	= oben genannt

Abkürzungsverzeichnis

OR	= Stratum oriens
PBS	= Phosphate Buffered Saline
PCNA	= Proliferating cell nuclear antigen
PFA	= Paraformaldehyd
PMI	= Postmortemintervall
PY	= Stratum pyramidale
RA	= Stratum radiatum
RMS	= Rostrales migratorisches System
s.	= siehe
SGZ	= Subgranularzellschicht
SMRI	= Stanley Medical Research Institute
sog	= sogenannt
S-Phase	= Synthese-Phase
SSRI	= Selektive Serotonin Reuptake-Inhibitoren
Std	= Stunde
Std.-Fehler	= Standardfehler
SVZ	= Subventrikulärzone
Sz	= Schizophrenie
TBS	= Tris Buffered Saline
TCA	= Trizyklische Antidepressiva
Tris	= Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	= Tris-Puffer, pH mit Salzsäure eingestellt
USA	= United States of America
VEGF	= Vascular endothelial growth factor
ZNS	= Zentrales Nervensystem

8 Literaturverzeichnis

1. Milner B. Amnesia following operation on the temporal lobes. 1966.109-133. London, CWM Whitty and Ol Zangwill.
2. Lisman, J. E. (1999) *Neuron* 22, 233-242.
3. Milner, B. and Penfield, W. (1955) *Trans.Am.Neurol.Assoc.* 42-48.
4. Milner, B. (1959) *Psychiatr.Res.Rep.Am.Psychiatr.Assoc.* No 11, 43-58.
5. Penfield, W. and Milner, B. (1958) *AMA.Arch.Neurol.Psychiatry* 79, 475-497.
6. Scoville, W. B. and Milner, B. (1957) *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 20, 11-21.
7. Kandel E. *Principals of neural science*, 4. Auflage. Schwartz J and Jessel Th. (Cellular mechanisms of learning and the biological basis of individuality), 1247-1279. 2000. McGraw-Hill Companies, New York.
8. Kandel E., Kupfermann I., and Iversen S. *Principals of neural science*, 4. Auflage. 2000. Schwart J and Jessel Th. (Learning and memory), 1227-1246. McGraw-Hill-Companies, New York.
9. O`Keefe J. and Dostrovsky J. (1971) *Brain Res* 34: 171-17.
10. Brezun, J. M. and Daszuta, A. (1999) *Neuroscience* 89, 999-1002.
11. Duman, R. S., Heninger, G. R., and Nestler, E. J. (1997) *Arch.Gen.Psychiatry* 54, 597-606.
12. Duman, R. S., Malberg, J., and Nakagawa, S. (2001) *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 299, 401-407.
13. Duman, R. S., Nakagawa, S., and Malberg, J. (2001) *Neuropsychopharmacology* 25, 836-844.
14. Kodamo, M., Fujioko, T., and Duman, R. S. (2004) *Biological Psychiatry* 56, 570-580.
15. Malberg, J. E. and Duman, R. S. (2003) *Neuropsychopharmacology* 28, 1562-1571.
16. Popoli, M., Gennarelli, M., and Racagni, G. (2002) *Bipolar.Disord.* 4, 166-182.
17. Reid, I. C. and Stewart, C. A. (2001) *Br.J.Psychiatry* 178, 299-303.
18. Rocher, C., Spedding, M., Munoz, C., and Jay, T. M. (2004) *Cereb.Cortex* 14, 224-229.
19. Shakesby, A. C., Anwyl, R., and Rowan, M. J. (2002) *J.Neurosci.* 22, 3638-3644.
20. Spedding, M., Neau, I., and Harsing, L. (2003) *Curr.Opin.Pharmacol.* 3, 33-40.
21. Spedding, M., Jay, T., Costa e Silva, and Perret, L. (2005) *Nat.Rev.Drug Discov.* 4, 467-476.
22. Stewart, C. A. and Reid, I. C. (2002) *Mol.Psychiatry* 7 Suppl 1, S15-S22.
23. Brezun, J. M. and Daszuta, A. (2000) *Eur.J.Neurosci.* 12, 391-396.

Literaturverzeichnis

24. Duman, R. S. and Vaidya, V. A. (1998) *J.ECT.* 14, 181-193.
25. Duman, R. S. (2004) *Biological Psychiatry* 56, 140-145.
26. Malberg, J. E., Eisch, A. J., Nestler, E. J., and Duman, R. S. (2000) *J.Neurosci.* 20, 9104-9110.
27. Madsen, T. M., Treschow, A., Bengzon, J., Bolwig, T. G., Lindvall, O., and Tingstrom, A. (2000) *Biological Psychiatry* 47, 1043-1049.
28. Palmer, T. D., Takahashi, J., and Gage, F. H. (1997) *Mol.Cell Neurosci.* 8, 389-404.
29. Taupin, P. and Gage, F. H. (2002) *J.Neurosci.Res.* 69, 745-749.
30. Garcia, A. D., Doan, N. B., Imura, T., Bush, T. G., and Sofroniew, M. V. (2004) *Nat.Neurosci.* 7, 1233-1241.
31. Seri, B., Garcia-Verdugo, J. M., Mcewen, B. S., and Alvarez-Buylla, A. (2001) *J.Neurosci.* 21, 7153-7160.
32. Altman, J. (1962) *Science* 135, 1127-1128.
33. Gould, E., Reeves, A. J., Fallah, M., Tanapat, P., Gross, C. G., and Fuchs, E. (1999) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 5263-5267.
34. Gould, E. and Gross, C. G. (2002) *J.Neurosci.* 22, 619-623.
35. Kaplan, M. S. and Hinds, J. W. (1977) *Science* 197, 1092-1094.
36. Steindler, D. A. and Pincus, D. W. (2002) *Lancet* 359, 1047-1054.
37. Lois, C. and Alvarez-Buylla, A. (1994) *Science* 264, 1145-1148.
38. Christie, B. R. and Cameron, H. A. (2006) *Hippocampus* 16, 199-207.
39. Alvarez-Buylla, A. and Lois, C. (1995) *Stem Cells* 13, 263-272.
40. Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M., and Gage, F. H. (2003) *Development* 130, 391-399.
41. Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H., and Gage, F. H. (1996) *J.Neurosci.* 16, 2027-2033.
42. Lois, C. and Alvarez-Buylla, A. (1993) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90, 2074-2077.
43. Lois, C., Garcia-Verdugo, J. M., and Alvarez-Buylla, A. (1996) *Science* 271, 978-981.
44. Stanfield, B. B. and Trice, J. E. (1988) *Exp.Brain Res.* 72, 399-406.
45. Jessberger, S. and Kempermann, G. (2003) *Eur.J.Neurosci.* 18, 2707-2712.
46. Van Praag, H., Schinder, A. F., Christie, B. R., Toni, N., Palmer, T. D., and Gage, F. H. (2002) *Nature* 415, 1030-1034.
47. Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., and Gage, F. H. (1998) *Nature Medicine* 4, 1313-1317.
48. Murrell, W., Bushell, G. R., Livesey, J., McGrath, J., MacDonald, K. P., Bates, P. R., and Mackay-Sim, A. (1996) *Neuroreport* 7, 1189-1194.
49. Ramon, Y. C. (1952) *Bull.Los.Angel.Neuro.Soc.* 17, 5-46.

Literaturverzeichnis

50. Altman, J. and Das, G. D. (1965) *J.Comp Neurol.* 124, 319-335.
51. Altman, J. and Das, G. D. (1967) *Nature* 214, 1098-1101.
52. Caviness, V. S., Jr. (1973) *J.Comp Neurol.* 151, 113-120.
53. Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B. S., Flugge, G., and Fuchs, E. (1998) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 3168-3171.
54. Gueneau, G., Privat, A., Drouet, J., and Court, L. (1982) *Dev.Neurosci.* 5, 345-358.
55. Bedard, A., Cossette, M., Levesque, M., and Parent, A. (2002) *Neurosci.Lett.* 328, 213-216.
56. Bernier, P. J., Bedard, A., Vinet, J., Levesque, M., and Parent, A. (2002) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 11464-11469.
57. Dayer, A. G., Cleaver, K. M., Abouantoun, T., and Cameron, H. A. (2005) *J.Cell Biol.* 168, 415-427.
58. Gould, E., Reeves, A. J., Graziano, M. S., and Gross, C. G. (1999) *Science* 286, 548-552.
59. Gould, E., Vail, N., Wagers, M., and Gross, C. G. (2001) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 10910-10917.
60. Gritti, A., Bonfanti, L., Doetsch, F., Caille, I., Alvarez-Buylla, A., Lim, D. A., Galli, R., Verdugo, J. M., Herrera, D. G., and Vescovi, A. L. (2002) *J.Neurosci.* 22, 437-445.
61. Kokoeva, M. V., Yin, H., and Flier, J. S. (2005) *Science* 310, 679-683.
62. Magavi, S. S., Leavitt, B. R., and Macklis, J. D. (2000) *Nature* 405, 951-955.
63. Palmer, T. D., Ray, J., and Gage, F. H. (1995) *Mol.Cell Neurosci.* 6, 474-486.
64. Tropepe, V., Coles, B. L., Chiasson, B. J., Horsford, D. J., Elia, A. J., McInnes, R. R., and van der, K. D. (2000) *Science* 287, 2032-2036.
65. Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., Wohl, C., Wheatley, M., Peterson, A. C., and Reynolds, B. A. (1996) *J.Neurosci.* 16, 7599-7609.
66. Zhao, M., Momma, S., Delfani, K., Carlen, M., Cassidy, R. M., Johansson, C. B., Brismar, H., Shupliakov, O., Frisen, J., and Janson, A. M. (2003) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100, 7925-7930.
67. Messier, B., Leblond, C. P., and Smart, I. (1958) *Exp.Cell Res.* 14, 224-226.
68. Allen E. (1912) *J Comp Neurol* 19, 547-568.
69. Schaper A. (1897) *Arch f Entw-Mech Organ* 5, 81-132.
70. Sugita N. (1918) *J Comp Neurol* 29, 61-117.
71. Goldman, S. A. and Nottebohm, F. (1983) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 80, 2390-2394.
72. Barnea, A. and Nottebohm, F. (1994) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 11217-11221.
73. Barnea, A. and Nottebohm, F. (1996) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 714-718.
74. Gould, E., McEwen, B. S., Tanapat, P., Galea, L. A., and Fuchs, E. (1997) *J.Neurosci.* 17, 2492-2498.

Literaturverzeichnis

75. Pham, K., Nacher, J., Hof, P. R., and McEwen, B. S. (2003) *European Journal of Neuroscience* 17, 879-886.
76. Czeh, B., Welt, T., Fischer, A. K., Erhardt, A., Schmitt, W., Müller, M. B., Toschi, N., Fuchs, E., and Keck, M. E. (2002) *Biol.Psychiatry* 52, 1057-1065.
77. Gould, E. (1994) *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 743, 73-92.
78. Thome, J. and Eisch, A. J. (2005) *Nervenarzt* 76, 11-19.
79. Lemaire, V., Koehl, M., Le Moal, M., and Abrous, D. N. (2000) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 11032-11037.
80. Coe, C. L., Kramer, M., Czeh, B., Gould, E., Reeves, A. J., Kirschbaum, C., and Fuchs, E. (2003) *Biological Psychiatry* 54, 1025-1034.
81. Alonso, R., Griebel, G., Pavone, G., Stemmelin, J., Le Fur, G., and Soubrie, P. (2004) *Molecular Psychiatry* 9, 278-286.
82. Gould, E., Cameron, H. A., Daniels, D. C., Woolley, C. S., and McEwen, B. S. (1992) *J.Neurosci.* 12, 3642-3650.
83. Tanapat, P., Hastings, N. B., Reeves, A. J., and Gould, E. (1999) *J.Neurosci.* 19, 5792-5801.
84. Gould, E., Woolley, C. S., and McEwen, B. S. (1991) *Psychoneuroendocrinology* 16, 67-84.
85. Gould, E., Woolley, C. S., and McEwen, B. S. (1991) *J.Comp Neurol.* 313, 479-485.
86. Gould, E., Woolley, C. S., Cameron, H. A., Daniels, D. C., and McEwen, B. S. (1991) *J.Comp Neurol.* 313, 486-493.
87. Gould, E., Tanapat, P., and Cameron, H. A. (1997) *Brain Res.Dev.Brain Res.* 103, 91-93.
88. Gould, E. (1999) *Neuropsychopharmacology* 21, S46-S51.
89. Cameron, H. A., Tanapat, P., and Gould, E. (1998) *Neuroscience* 82, 349-354.
90. Jacobs, B. L. (2002) *Brain Behav.Immun.* 16, 602-609.
91. Vollmayr, B., Simonis, C., Weber, S., Gass, P., and Henn, F. (2003) *Biological Psychiatry* 54, 1035-1040.
92. Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C., and Hen, R. (2003) *Science* 301, 805-809.
93. Crews, F. T. and Nixon, K. (2003) *Alcohol Res.Health* 27, 197-204.
94. Crews, F. T., Miller, M. W., Ma, W., Nixon, K., Zawada, W. M., and Zakhari, S. (2003) *Alcohol Clin.Exp.Res.* 27, 324-335.
95. Crews, F. T., Nixon, K., and Wilkie, M. E. (2004) *Alcohol* 33, 63-71.
96. Crews, F. T., Mdzinarishvili, A., Kim, D., He, J., and Nixon, K. (2006) *Neuroscience* 137, 437-445.
97. Nixon, K. and Crews, F. T. (2002) *J.Neurochem.* 83, 1087-1093.

Literaturverzeichnis

98. Nixon, K. and Crews, F. T. (2004) *J.Neurosci.* 24, 9714-9722.
99. Nixon, K. (2006) *Hippocampus* 16, 287-295.
100. Redila, V. A., Olson, A. K., Swann, S. E., Mohades, G., Webber, A. J., Weinberg, J., and Christie, B. R. (2006) *Hippocampus* 16, 305-311.
101. Kempermann, G., Kuhn, H. G., and Gage, F. H. (1997) *Nature* 386, 493-495.
102. Kempermann, G., Brandon, E. P., and Gage, F. H. (1998) *Curr.Biol.* 8, 939-942.
103. Kempermann, G., van Praag, H., and Gage, F. H. (2000) *Prog.Brain Res.* 127, 35-48.
104. Rhodes, J. S., van Praag, H., Jeffrey, S., Girard, I., Mitchell, G. S., Garland, T., Jr., and Gage, F. H. (2003) *Behav.Neurosci.* 117, 1006-1016.
105. van Praag, H., Kempermann, G., and Gage, F. H. (1999) *Nature Neuroscience* 2, 266-270.
106. van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C., and Gage, F. H. (2005) *J.Neurosci.* 25, 8680-8685.
107. Lawlor, D. A. and Hopker, S. W. (2001) *BMJ* 322, 763-767.
108. Babyak, M., Blumenthal, J. A., Herman, S., Khatri, P., Doraiswamy, M., Moore, K., Craighead, W. E., Baldewicz, T. T., and Krishnan, K. R. (2000) *Psychosom.Med.* 62, 633-638.
109. Dimeo, F., Bauer, M., Varahram, I., Proest, G., and Halter, U. (2001) *Br.J.Sports Med.* 35, 114-117.
110. Dimeo, F. C., Thomas, F., Raabe-Menssen, C., Propper, F., and Mathias, M. (2004) *Support.Care Cancer* 12, 774-779.
111. Dunn, A. L., Trivedi, M. H., Kampert, J. B., Clark, C. G., and Chambliss, H. O. (2005) *Am.J.Prev.Med.* 28, 1-8.
112. Kritz-Silverstein, D., Barrett-Connor, E., and Corbeau, C. (2001) *Am.J.Epidemiol.* 153, 596-603.
113. Kubesch, S., Bretschneider, V., Freudenmann, R., Weidenhammer, N., Lehmann, M., Spitzer, M., and Gron, G. (2003) *J.Clin.Psychiatry* 64, 1005-1012.
114. Leppamaki, S., Haukka, J., Lonnqvist, J., and Partonen, T. (2004) *BMC.Psychiatry* 4, 22.
115. Mather, A. S., Rodriguez, C., Guthrie, M. F., McHarg, A. M., Reid, I. C., and McMurdo, M. E. (2002) *Br.J.Psychiatry* 180, 411-415.
116. Motl, R. W., McAuley, E., Birnbaum, A. S., and Lytle, L. A. (2006) *J.Adolesc.* 29, 19-32.
117. Penninx, B. W., Rejeski, W. J., Pandya, J., Miller, M. E., Di Bari, M., Applegate, W. B., and Pahor, M. (2002) *J.Gerontol.B Psychol.Sci.Soc.Sci.* 57, 124-132.
118. Singh, N. A., Clements, K. M., and Singh, M. A. (2001) *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* 56, M497-M504.
119. Strawbridge, W. J., Deleger, S., Roberts, R. E., and Kaplan, G. A. (2002) *Am.J.Epidemiol.* 156, 328-334.

Literaturverzeichnis

120. Kempermann, G., Kuhn, H. G., and Gage, F. H. (1997) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 10409-10414.
121. Biebl, M., Cooper, C. M., Winkler, J., and Kuhn, H. G. (2000) *Neurosci.Lett.* 291, 17-20.
122. Reynolds, B. A., Tetzlaff, W., and Weiss, S. (1992) *J.Neurosci.* 12, 4565-4574.
123. Kuhn, H. G., Winkler, J., Kempermann, G., Thal, L. J., and Gage, F. H. (1997) *Journal of Neuroscience* 17, 5820-5829.
124. Persson, A. I., Thorlin, T., Bull, C., Zarnegar, P., Ekman, R., Terenius, L., and Eriksson, P. S. (2003) *Eur.J.Neurosci.* 17, 1159-1172.
125. Persson, A. I., Thorlin, T., Bull, C., and Eriksson, P. S. (2003) *Mol.Cell Neurosci.* 23, 360-372.
126. Fabel, K., Fabel, K., Tam, B., Kaufer, D., Baiker, A., Simmons, N., Kuo, C. J., and Palmer, T. D. (2003) *Eur.J.Neurosci.* 18, 2803-2812.
127. Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X. O., Xie, L., and Greenberg, D. A. (2002) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 11946-11950.
128. Palmer, T. D., Willhoite, A. R., and Gage, F. H. (2000) *J.Comp Neurol.* 425, 479-494.
129. Schobersberger, W., Hobisch-Hagen, P., Fries, D., Wiedermann, F., Rieder-Scharinger, J., Villiger, B., Frey, W., Herold, M., Fuchs, D., and Jelkmann, W. (2000) *Immunobiology* 201, 611-620.
130. Barde, Y. A. (1989) *Neuron* 2, 1525-1534.
131. Berchtold, N. C., Kessler, J. P., Pike, C. J., Adlard, P. A., and Cotman, C. W. (2001) *Eur.J.Neurosci.* 14, 1992-2002.
132. Berchtold, N. C., Kessler, J. P., and Cotman, C. W. (2002) *J.Neurosci.Res.* 68, 511-521.
133. Bjornebekk, A., Mathe, A. A., and Brene, S. (2005) *Int.J.Neuropsychopharmacol.* 8, 357-368.
134. Cotman, C. W. and Berchtold, N. C. (2002) *Trends Neurosci.* 25, 295-301.
135. Farmer, J., Zhao, X., van Praag, H., Wodtke, K., Gage, F. H., and Christie, B. R. (2004) *Neuroscience* 124, 71-79.
136. Gomez-Pinilla, F., Ying, Z., Roy, R. R., Molteni, R., and Edgerton, V. R. (2002) *J.Neurophysiol.* 88, 2187-2195.
137. Horch, H. W. (2004) *Rev.Neurosci.* 15, 117-129.
138. Lowenstein, D. H. and Arsenault, L. (1996) *J.Neurosci.* 16, 1759-1769.
139. Mattson, M. P., Maudsley, S., and Martin, B. (2004) *Trends Neurosci.* 27, 589-594.
140. Neeper, S. A., Gomez-Pinilla, F., Choi, J., and Cotman, C. W. (1996) *Brain Res.* 726, 49-56.
141. Nilsson, M., Perfilieva, E., Johansson, U., Orwar, O., and Eriksson, P. S. (1999) *J.Neurobiol.* 39, 569-578.
142. Russo-Neustadt, A., Beard, R. C., and Cotman, C. W. (1999) *Neuropsychopharmacology* 21, 679-682.

Literaturverzeichnis

143. Sairanen, M., Lucas, G., Ernfors, P., Castren, M., and Castren, E. (2005) *J.Neurosci.* 25, 1089-1094.
144. Scharfman, H., Goodman, J., Macleod, A., Phani, S., Antonelli, C., and Croll, S. (2005) *Exp.Neurol.* 192, 348-356.
145. Thoenen, H. (1991) *Trends Neurosci.* 14, 165-170.
146. Vanhoutte, P. and Bading, H. (2003) *Curr.Opin.Neurobiol.* 13, 366-371.
147. Vaynman, S., Ying, Z., and Gomez-Pinilla, F. (2004) *Eur.J.Neurosci.* 20, 2580-2590.
148. Widenfalk, J., Olson, L., and Thoren, P. (1999) *Neurosci.Res.* 34, 125-132.
149. Wozniak, W. (1993) *Folia Morphol.(Warsz.)* 52, 173-181.
150. Banasr, M., Hery, M., Printemps, R., and Daszuta, A. (2004) *Neuropsychopharmacology* 29, 450-460.
151. Chaouloff, F., Laude, D., and Elghozi, J. L. (1989) *J.Neural Transm.* 78, 121-130.
152. Davis, J. M. and Bailey, S. P. (1997) *Med.Sci.Sports Exerc.* 29, 45-57.
153. Dey, S., Singh, R. H., and Dey, P. K. (1992) *Physiol Behav.* 52, 1095-1099.
154. Jacobs, B. L. and Azmitia, E. C. (1992) *Physiol Rev.* 72, 165-229.
155. Kohler, C., Chan-Palay, V., and Steinbusch, H. (1982) *J.Comp Neurol.* 209, 91-111.
156. Lim, B. V., Jang, M. H., Shin, M. C., Kim, H. B., Kim, Y. J., Kim, Y. P., Chung, J. H., Kim, H., Shin, M. S., Kim, S. S., Kim, E. H., and Kim, C. J. (2001) *Neurosci.Lett.* 308, 25-28.
157. Meeusen, R., Thorre, K., Chaouloff, F., Sarre, S., de Meirleir, K., Ebinger, G., and Michotte, Y. (1996) *Brain Res.* 740, 245-252.
158. Min, Y. K., Chung, S. H., Lee, J. S., Kim, S. S., Shin, H. D., Lim, B. V., Shin, M. C., Jang, M. H., Kim, E. H., and Kim, C. J. (2003) *J.Pharmacol.Sci.* 93, 218-221.
159. Nitz, D. A. and McNaughton, B. L. (1999) *Learn.Mem.* 6, 153-167.
160. Pasquier, D. A. and Reinoso-Suarez, F. (1978) *Brain Res.Bull.* 3, 373-389.
161. Vertes, R. P. and Crane, A. M. (1997) *J.Comp Neurol.* 378, 411-424.
162. Viana, D. P., Albo, Z., Vertes, R. P., and Kocsis, B. (2002) *Exp.Brain Res.* 145, 383-394.
163. Wilson, W. M. and Marsden, C. A. (1996) *Behav.Pharmacol.* 7, 101-104.
164. Bengzon, J., Kokaia, Z., Elmer, E., Nanobashvili, A., Kokaia, M., and Lindvall, O. (1997) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 10432-10437.
165. Gould, E. and Tanapat, P. (1997) *Neuroscience* 80, 427-436.
166. Liu, J., Solway, K., Messing, R. O., and Sharp, F. R. (1998) *J.Neurosci.* 18, 7768-7778.
167. Parent, J. M., Yu, T. W., Leibowitz, R. T., Geschwind, D. H., Sloviter, R. S., and Lowenstein, D. H. (1997) *J.Neurosci.* 17, 3727-3738.

Literaturverzeichnis

168. Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., and Kronenberg, G. (2004) *Trends Neurosci.* 27, 447-452.
169. Del Rio, J. A. and Soriano, E. (1989) *Brain Res.Dev.Brain Res.* 49, 311-317.
170. Gratzner, H. G. (1982) *Science* 218, 474-475.
171. Miller, M. W. and Nowakowski, R. S. (1988) *Brain Res.* 457, 44-52.
172. Takahashi, T., Nowakowski, R. S., and Caviness, V. S., Jr. (1992) *J.Neurocytol.* 21, 185-197.
173. Kempermann, G., Kuhn, H. G., Winkler, J., and Gage, F. H. (1998) *Nervenarzt* 851-857.
174. Scott, B. W., Wojtowicz, J. M., and Burnham, V. M. (2000) *Experimental Neurology* 165, 231-236.
175. Seki, T. and Arai, Y. (1995) *Neuroreport* 6, 2479-2482.
176. Kolb, B., Pedersen, B., Ballermann, M., Gibb, R., and Wishaw, I. Q. (1999) *J.Neurosci.* 19, 2337-2346.
177. Anisimov, V. N. (1994) *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 719, 494-501.
178. Malendowicz, L. K., Nussdorfer, G. G., and Trejer, M. (1997) *Life Sci.* 61, 641-643.
179. Cameron, H. A. and Gould, E. (1994) *Neuroscience* 61, 203-209.
180. Kee, N., Sivalingam, S., Boonstra, R., and Wojtowicz, J. M. (2002) *J.Neurosci.Methods* 115, 97-105.
181. Scholzen, T. and Gerdes, J. (2000) *Journal of Cellular Physiology* 182, 311-322.
182. Adelstein, S. J., Lyman, C. P., and O'Brien, R. C. (1964) *Comp Biochem.Physiol* 12, 223-231.
183. Cameron, H. A. and McKay, R. D. (2001) *J.Comp Neurol.* 435, 406-417.
184. Kessler, R. C., McGonagle, K. A., Zhao, S., Nelson, C. B., Hughes, M., Eshleman, S., Wittchen, H. U., and Kendler, K. S. (1994) *Arch.Gen.Psychiatry* 51, 8-19.
185. Klerman, G. L. and Weissman, M. M. (1989) *JAMA* 261, 2229-2235.
186. Beautrais, A. L., Joyce, P. R., Mulder, R. T., Fergusson, D. M., Deavoll, B. J., and Nightingale, S. K. (1996) *Am.J.Psychiatry* 153, 1009-1014.
187. Suominen, K., Henriksson, M., Suokas, J., Isometsa, E., Ostamo, A., and Lonnqvist, J. (1996) *Acta Psychiatr.Scand.* 94, 234-240.
188. Bremner, J. D., Narayan, M., Anderson, E. R., Staib, L. H., Miller, H. L., and Charney, D. S. (2000) *Am.J.Psychiatry* 157, 115-118.
189. Campbell, S. and Macqueen, G. (2004) *J.Psychiatry Neurosci.* 29, 417-426.
190. Campbell, S., Marriott, M., Nahmias, C., and MacQueen, G. M. (2004) *Am.J.Psychiatry* 161, 598-607.
191. Czeh, B., Michaelis, T., Watanabe, T., Frahm, J., de Biurrun, G., van Kampen, M., Bartolomucci, A., and Fuchs, E. (2001) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 12796-12801.

Literaturverzeichnis

192. Mervaala, E., Fohr, J., Kononen, M., Valkonen-Korhonen, M., Vainio, P., Partanen, K., Partanen, J., Tiihonen, J., Viinamaki, H., Karjalainen, A. K., and Lehtonen, J. (2000) *Psychol.Med.* 30, 117-125.
193. Sheline, Y. I. (1996) *Mol.Psychiatry* 1, 298-299.
194. Sheline, Y. I., Wang, P. W., Gado, M. H., Csernansky, J. G., and Vannier, M. W. (1996) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 3908-3913.
195. Sheline, Y. I., Sanghavi, M., Mintun, M. A., and Gado, M. H. (1999) *J.Neurosci.* 19, 5034-5043.
196. Steffens, D. C., Byrum, C. E., McQuoid, D. R., Greenberg, D. L., Payne, M. E., Blitchington, T. F., Macfall, J. R., and Krishnan, K. R. (2000) *Biol.Psychiatry* 48, 301-309.
197. Stockmeier, C. A., Mahajan, G. J., Konick, L. C., Overholser, J. C., Jurjus, G. J., Meltzer, H. Y., Uylings, H. B. M., Friedman, L., and Rajkowska, G. (2004) *Biological Psychiatry* 56, 640-650.
198. Cotter, D., Mackay, D., Chana, G., Beasley, C., Landau, S., and Everall, I. P. (2002) *Cereb.Cortex* 12, 386-394.
199. Coyle, J. T. and Duman, R. S. (2003) *Neuron* 38, 157-160.
200. Drevets, W. C. and Raichle, M. E. (1992) *Psychopharmacol.Bull.* 28, 261-274.
201. Drevets, W. C., Videen, T. O., Price, J. L., Preskorn, S. H., Carmichael, S. T., and Raichle, M. E. (1992) *J.Neurosci.* 12, 3628-3641.
202. Baxter, L. R., Jr., Schwartz, J. M., Phelps, M. E., Mazziotta, J. C., Guze, B. H., Selin, C. E., Gerner, R. H., and Sumida, R. M. (1989) *Arch.Gen.Psychiatry* 46, 243-250.
203. Biver, F., Goldman, S., Delvenne, V., Luxen, A., De, M., V, Hubain, P., Mendlewicz, J., and Lotstra, F. (1994) *Biol.Psychiatry* 36, 381-388.
204. Henn, F. A. and Vollmayr, B. (2004) *Biological Psychiatry* 56, 146-150.
205. Sapolsky, R. M. (2004) *Biol.Psychiatry* 56, 137-139.
206. Prof.Dr.Dieter Ebert and Prof.Dr.Thomas Loew. 2005. *Psychiatrie systematisch*, 6. Auflage. Seite 217.
207. Prof.Dr.Dieter Ebert and Prof.Dr.Thomas Loew. 2005. *Psychiatrie systematisch*, 6. Auflage. Seite 205.
208. Hans-Jürgen Möller, Gerd Laux, and Arno Deister. 2005. *Duale Reihe - Psychiatrie und Psychotherapie*, 3. Auflage. Seite 134.
209. Hans-Jürgen Möller, Gerd Laux, and Arno Deister. 2005. *Duale Reihe - Psychiatrie und Psychotherapie*, 3. Auflage. Seite 149.
210. Sabine Noll and Susanne Schaub-Kuhnen. 2000. *Praxis der Immunhistochemie*. Seite 17.
211. Brown, J. P., Couillard-Despres, S., Cooper-Kuhn, C. M., Winkler, J., Aigner, L., and Kuhn, H. G. (2003) *J.Comp Neurol.* 467, 1-10.
212. Rao, M. S. and Shetty, A. K. (2004) *Eur.J.Neurosci.* 19, 234-246.
213. Kunlin, J., Xiaomei Wang, and Lin Xie (2006) *PNAS* 103, 13198-13202.

Literaturverzeichnis

214. Mao Y, Zhou L, Zhu W, Wang X, Yang G, Xie L, Mao X, and Jin K (2007) *Frontiers in Bioscience* 12, 2252-2259.
215. Blumcke, I. and Wiestler, O. D. (2002) *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 61, 575-584.
216. Mullen, R. J., Buck, C. R., and Smith, A. M. (1992) *Development* 116, 201-211.
217. Curtis, M. A., Penney, E. B., Pearson, A. G., Roon-Mom, W. M. C., Butterworth, N. J., Dragunow, M., Connor, B., and Faull, R. L. M. (2003) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 9023-9027.
218. Hoglinger, G. U., Rizk, P., Muriel, M. P., Duyckaerts, C., Oertel, W. H., Caille, I., and Hirsch, E. C. (2004) *Nature Neuroscience* 7, 726-735.
219. Jin, K. L., Peel, A. L., Mao, X. O., Xie, L., Cottrell, B. A., Henshall, D. C., and Greenberg, D. A. (2004) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 343-347.
220. Ohta, Y. and Ichimura, K. (2000) *Annals of Otolaryngology and Laryngology* 109, 1046-1048.
221. Muskhelishvili, L., Latendresse, J. R., Kodell, R. L., and Henderson, E. B. (2003) *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 51, 1681-1688.
222. McCormick, D., Yu, C., Hobbs, C., and Hall, P. A. (1993) *Histopathology* 22, 543-547.
223. Kuan, C. Y., Schloemer, A. J., Lu, A. G., Burns, K. A., Weng, W. L., Williams, M. T., Strauss, K. I., Vorhees, C. V., Flavell, R. A., Davis, R. J., Sharp, F. R., and Rakic, P. (2004) *Journal of Neuroscience* 24, 10763-10772.
224. Hellsten, J., Wennstrom, M., Mohapel, P., Ekdahl, C. T., Bengzon, J., and Tingstrom, A. (2002) *European Journal of Neuroscience* 16, 283-290.
225. Hellsten, J., Wennstrom, M., Bengzon, J., Mohapel, P., and Tingstrom, A. (2004) *Biological Psychiatry* 55, 420-427.
226. Madsen, T. M., Treschow, A., Bengzon, J., Bolwig, T. G., Lindvall, O., and Tingstrom, A. (2000) *Biol.Psychiatry* 47, 1043-1049.
227. Warner-Schmidt, J. L. and Duman, R. S. (2006) *Hippocampus* 16, 239-249.
228. Ming, G. L. and Song, H. (2005) *Annu.Rev.Neurosci.* 28, 223-250.
229. Encinas, J. M., Vaahtokari, A., and Enikolopov, G. (2006) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103, 8233-8238.
230. Keilhoff, G., Becker, A., Grecksch, G., Bernstein, H. G., and Wolf, G. (2006) *Neuropsychopharmacology* 31, 1165-1176.
231. Reif, A., Fritzen, S., Finger, M., Strobel, A., Lauer, M., Schmitt, A., and Lesch, K. P. (2006) *Mol.Psychiatry* 11, 514-522.
232. Dawirs, R. R., Hildebrandt, K., and Teuchert-Noodt, G. (1998) *J.Neural Transm.* 105, 317-327.
233. Halim, N. D., Weickert, C. S., McClintock, B. W., Weinberger, D. R., and Lipska, B. K. (2004) *Neuropsychopharmacology* 29, 1063-1069.
234. Kippin, T. E., Kapur, S., and van der, K. D. (2005) *J Neurosci.* 25, 5815-5823.

Literaturverzeichnis

235. Schmitt, A., Weber, S., Jatzko, A., Braus, D. F., and Henn, F. A. (2004) *Journal of Neural Transmission* 111, 91-100.
236. Wakade, C. G., Mahadik, S. P., Waller, J. L., and Chiu, F. C. (2002) *Journal of Neuroscience Research* 69, 72-79.
237. Wang, H. D., Dunnavant, F. D., Jarman, T., and Deutch, A. Y. (2004) *Neuropsychopharmacology* 29, 1230-1238.
238. Neumeister, A., Wood, S., Bonne, O., Nugent, A. C., Luckenbaugh, D. A., Young, T., Bain, E. E., Charney, D. S., and Drevets, W. C. (2005) *Biol.Psychiatry* 57, 935-937.
239. Geuze, E., Vermetten, E., and Bremner, J. D. (2005) *Molecular Psychiatry* 10, 160-184.
240. Videbech, P. and Ravnkilde, B. (2004) *American Journal of Psychiatry* 161, 1957-1966.
241. Lucassen, P. J., Muller, M. B., Holsboer, F., Bauer, J., Holtrop, A., Wouda, J., Hoogendijk, W. J. G., De Kloet, E. R., and Swaab, D. F. (2001) *American Journal of Pathology* 158, 453-468.
242. Muller, M. B., Lucassen, P. J., Yassouridis, A., Hoogendijk, W. J. G., Holsboer, F., and Swaab, D. F. (2001) *European Journal of Neuroscience* 14, 1603-1612.
243. Keilhoff, G., Bernstein, H. G., Becker, A., Grecksch, G., and Wolf, G. (2004) *Biological Psychiatry* 56, 317-322.
244. Arnold, S. E., Han, L. Y., Moberg, P. J., Turetsky, B. I., Gur, R. E., Trojanowski, J. Q., and Hahn, C. G. (2001) *Archives of General Psychiatry* 58, 829-835.
245. Gothelf, D., Soreni, N., Nachman, R. P., Tyano, S., Hiss, Y., Reiner, O., and Weizman, A. (2000) *Eur.Neuropsychopharmacol.* 10, 389-395.
246. Weinberger, D. R. (1999) *Biol.Psychiatry* 45, 395-402.
247. Kurtz, M. M. (2005) *Schizophrenia Research* 74, 15-26.
248. Antonova, E., Sharma, T., Morris, R., and Kumari, V. (2004) *Schizophr.Res* 70, 117-145.
249. Sweatt, J. D. (2004) *Psychopharmacology (Berl)* 174, 99-110.
250. Kempermann, G. (2002) *J.Neurosci.* 22, 635-638.
251. Prickaerts, J., Koopmans, G., Blokland, A., and Scheepens, A. (2004) *Neurobiology of Learning and Memory* 81, 1-11.
252. Kempermann, G., Kuhn, H. G., and Gage, F. H. (1997) *Nature* 386, 493-495.
253. Steen, R. G., Mull, C., McClure, R., Hamer, R. M., and Lieberman, J. A. (2006) *Br.J Psychiatry* 188, 510-518.
254. Honea, R., Crow, T. J., Passingham, D., and Mackay, C. E. (2005) *Am.J Psychiatry* 162, 2233-2245.
255. Falkai, P. and Bogerts, B. (1986) *Eur.Arch Psychiatry Neurol Sci.* 236, 154-161.
256. Kovelman, J. A. and Scheibel, A. B. (1984) *Biol.Psychiatry* 19, 1601-1621.
257. Arnold, S. E., Franz, B. R., Gur, R. C., Gur, R. E., Shapiro, R. M., Moberg, P. J., and Trojanowski, J. Q. (1995) *Am.J Psychiatry* 152, 738-748.

Literaturverzeichnis

258. Heckers, S., Heinsen, H., Geiger, B., and Beckmann, H. (1991) Arch Gen.Psychiatry 48, 1002-1008.
259. Walker, M. A., Highley, J. R., Esiri, M. M., McDonald, B., Roberts, H. C., Evans, S. P., and Crow, T. J. (2002) Am.J Psychiatry 159, 821-828.
260. Benes, F. M. (1999) Biological Psychiatry 45, 1529-1530.
261. Harrison, P. J. (2004) Psychopharmacology (Berl) 174, 151-162.
262. Berrettini, W. (2003) American Journal of Medical Genetics Part C-Seminars in Medical Genetics 123C, 59-64.
263. Beckmann, H. and Jakob, H. (1991) Journal of Neural Transmission-General Section 84, 155-164.

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Andreas Reif sowie Herrn Professor Dr. med. Klaus-Peter Lesch für die Anregung des interessanten Themas, die ausgezeichnete Betreuung und die Möglichkeit des experimentellen Arbeitens im Labor. Besonders bedanken möchte ich mich weiterhin für die reibungslose Zusammenarbeit im Labor mit meinen Kolleginnen aus der Forschungsgruppe der „Klinischen Psychobiologie“. Hierbei möchte ich Frau Dr. rer. nat. Sabrina Klein sowie Frau Dr. rer. nat. Angelika Schmitt hervorheben, die mich zu jeder Zeit mit wertvollen Tipps und Vorschlägen unterstützten und immer ein offenes Ohr für meine Fragen und Probleme hatten.

Herrn Professor Dr. med. Klaus-Peter Lesch und Herrn Professor Dr. med. Peter Kugler danke ich für die Übernahme der Gutachten. Frau Dipl.-Päd. Martina Holm und Herrn Peter Lorenz danke ich für die technische Unterstützung und die Mithilfe bei der Gestaltung dieser Arbeit. Nicht zuletzt gilt mein tief empfundener Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich sowohl während meines Medizinstudiums als auch während meiner Promotion durchweg unterstützen und mir Mut zusprachen.

Lebenslauf

Lebenslauf

Geburtsdatum/-ort: 01. April 1978 in Würzburg

Schule und Studium

1984-1988	Grundschule in Güntersleben
1988-1997	Deutschhaus-Gymnasium Würzburg, Abitur
10/1999-05/2006	Medizinstudium an der Julius- Maximilians-Universität Würzburg
04/2002	Ärztliche Vorprüfung
03/2003	1. Staatsexamen
03/2005	2. Staatsexamen
05/2006	3. Staatsexamen

Praktisches Jahr

Innere Medizin:	* Klinik und Poliklinik für Innere Medizin der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (14 Wochen)
Chirurgie:	* Klinik und Poliklinik für Chirurgie im Zentrum für Operative Medizin der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (4 Wochen) Christian Medical College Vellore, Tamil Nadu, South India (10 Wochen)
Psychiatrie:	* Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Julius- Maximilians-Universität Würzburg (16 Wochen)

Lebenslauf

Famulaturen

- Chirurgie: * St. Hedwig-Krankenhaus, Berlin
(07/2003-08/2003)
- Psychiatrie: * Klinik und Poliklinik für Psychiatrie
und Psychotherapie Würzburg
(09/2003-10/2003)
- Psychiatrie: * Klinik und Poliklinik für Psychiatrie
und Psychotherapie Würzburg
(02/2004-03/2004)
- Allgemeinmedizin: * Dr. med. Ernst Wassermann,
Facharzt für Allgemeinmedizin und
Sportmedizin, Rimpf (09/2004)

Zivildienst

- 09/1997-10/1998 Johanniter-Unfall-Hilfe Würzburg als
Rettungshelfer

Praktische Erfahrungen

- 10/1998-04/1999 Ehrenamtliche Tätigkeit bei der
Johanniter-Unfall-Hilfe Würzburg mit
Ausbildung zum Rettungssanitäter
- 04/1999-10/1999 Hauptamtliche Tätigkeit bei der
Johanniter-Unfall-Hilfe Würzburg als
Rettungssanitäter
- 03/2000-05/2000 Einsatz als Rettungssanitäter mit der
Johanniter-Unfall-Hilfe in Bethlehem
und Gaza City, Palästina
- 03/2001-03/2003 Sitzwache im Universitätsklinikum
Würzburg auf der chirurgischen
Überwachungsstation

Lebenslauf

Promotion

12/2003 – 11/2007

Experimentelle Doktorarbeit bei
Doktorvater Prof. K.-P. Lesch, DFG-
Forschungsgruppe „Klinische
Psychobiologie“ der Klinik und
Poliklinik für Psychiatrie und
Psychotherapie Würzburg

Weiterbildung

07/2006

Beginn der klinischen Tätigkeit als
Assistenzarzt in der Inneren Medizin
im Caritas-Krankenhaus Bad
Mergentheim (Akademisches
Lehrkrankenhaus der
Universität Heidelberg)

Würzburg, 30.04.2008

Mathias Finger

Publikationsverzeichnis

A. Reif, S. Fritzen, M. Finger, A. Strobel, A. Schmitt, M. Lauer, K.-P. Lesch (2006), [Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia but not in depression](#); *Molecular Psychiatry* 11, Seite 514 – 522

A. Reif, S. Fritzen, M. Finger, A. Strobel, A. Schmitt, M. Lauer, K.-P. Lesch (2005), Adulte Neurogenese ist bei schizophrenen, aber nicht affektiven Psychosen vermindert; *Der Nervenarzt* 76 (Suppl 1), S54

S. Selch, S. Fritzen, M. Finger, A. Schmitt, K.-P. Lesch, A. Reif (2006), Neural stem cell proliferation is significantly reduced in schizophrenic, but not affective psychoses; *FENS Abstracts* 3

A. Reif, S. Fritzen, M. Finger, A. Strobel, A. Schmitt, K.-P. Lesch (2006), Neural stem cell proliferation is significantly reduced in schizophrenia, but not in affective psychoses; *European Neuropsychopharmacology* 16 (Suppl. 4), S221

A. Reif, S. Fritzen, M. Finger, K.-P. Lesch (2006) Neurogenesis and schizophrenia: is there a link?; *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 256 (Suppl 2), II/14