

Aus der  
Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie  
der Universität Würzburg  
Direktor: Prof. Dr. Jürgen Deckert

**Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (NOS-III) reguliert  
die Proliferation neuronaler Stammzellen im adulten Gyrus dentatus**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Matthias Wycislo  
aus Ansbach

Würzburg, im Oktober 2007

Referent: Prof. Dr. med. Klaus-Peter Lesch

Koreferentin: Prof. Dr. med. Claudia Sommer

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 17.09.2008

Der Promovend ist Arzt.

# Inhaltsverzeichnis

1. Theoretischer Hintergrund	1
1.1 Adulte Neurogenese.....	1
1.1.1 Überblick.....	1
1.1.2 Lokalisation.....	2
1.1.3 Nachweismethoden .....	3
1.1.4 Mechanismus.....	5
1.1.5 Entdeckungsgeschichte.....	7
1.1.6 Regulationsfaktoren.....	7
1.2 Stickstoffmonoxid – ein biologisch aktives Gas .....	10
1.2.1 Überblick.....	10
1.2.2 Biosynthese von Stickstoffmonoxid .....	11
1.2.3 Beteiligung von NO an physiologischen und pathophysiologischen Prozessen.....	15
1.3 Neurobiologische Grundlagen von Lernen und Gedächtnis .....	20
1.3.1 LTP als ein wesentlicher Mechanismus neuronaler Plastizität .....	20
1.3.2 Lernen und Gedächtnisbildung im Hippokampus – funktionelle Aspekte der adulten Neurogenese .....	22
1.4 Zusammenhänge zwischen dem NO-Signalweg und der adulten Neurogenese.....	27
2. Fragestellung	29
3. Material und Methoden	30
3.1 Material .....	30
3.1.1 Chemikalien.....	30
3.1.2 Antikörper .....	31
3.1.3 Puffer und Lösungen .....	31
3.1.4 Geräte und Software.....	32
3.1.5 Sonstiges.....	33
3.1.6 Biologisches Material.....	34
3.2 Methoden .....	35
3.2.1 In-vivo-Markierung neu entstehender Hippokampusneurone mit Bromodeoxyuridin (BrdU) .....	35

3.2.2	Anfertigung von histologischen Schnitten des Gyrus dentatus des Hippokampus.....	36
3.2.3	Immunhistochemischer Nachweis von BrdU .....	38
3.2.4	Bestimmung der Zelldichte BrdU-positiver Zellen im Gyrus dentatus des Hippokampus.....	40
3.2.5	Darstellung der mikroskopischen Anatomie des Hippokampus mit der Nissl-Färbung .....	43
4.	Ergebnisse	45
4.1	Darstellung der mikroskopischen Anatomie .....	45
4.2	NOS-III-Knockout-Mäuse zeigen eine signifikant reduzierte Neurogenese .....	45
4.3	Altersabhängigkeit.....	49
4.4	Geschlechtsabhängigkeit .....	50
4.5	Abhängigkeit der adulten Neurogenese vom Körpergewicht.....	50
4.6	Abhängigkeit der adulten Neurogenese von der Anzahl der Versuchstiere pro Käfig.....	52
4.7	Unterschiede im Hippokampusvolumen .....	53
4.8	Adulte Neurogenese in verschiedenen Teilstrukturen des Gyrus dentatus .....	55
5.	Diskussion	57
5.1	NOS-III ist ein regulatorisches Protein der adulten hippocampalen Neurogenese.....	57
5.2	Der Einfluss biometrischer Parameter auf die adulte hippocampale Neurogenese.....	59
5.3	Unterschiede im Hippokampusvolumen .....	60
5.4	Mögliche Mechanismen der Regulation der adulten hippocampalen Neurogenese durch NOS-III.....	61
5.4.1	Verschiedene Zelltypen des murinen Hippokampus als mögliche Quellen von NOS-III bzw. NO .....	61
5.4.2	Mögliche Feedback-Mechanismen bei der Regulation der adulten Neurogenese .....	63
5.5	Regulation der adulten Neurogenese durch NO.....	65
5.6	Methodische Aspekte .....	69
6.	Zusammenfassung	72
7.	Literatur	73

## Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
5-HT <sub>1A</sub>	Subtyp 1A des Serotoninrezeptors
A	Fläche
AB-Komplex	Avidin-Biotin-Komplex
AMPA-Rezeptor	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure-Rezeptor als Subtyp des Glutamaterezeptors
BDNF	Brain-derived Neurotrophic Factor
BrdU	5-Bromo-2-deoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
c	Zelldichte
CA1-CA4	Mikroskopisch-anatomische Abschnitte des Hippokampus (CA, lat. Cornu ammonis)
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CREB	cAMP-Response-Element-Binding-Protein
d	Schichtdicke
DAB	Diaminobenzidin
DETA/NONOat	(Z)-1-[N-(2-Aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazene-1,1,2-diolat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPI	Diphenyleneiodoniumchlorid
EGF	Epidermal Growth Factor
eNOS	“endotheliale” Isoform der Stickstoffmonoxid-synthase (= NOS-III)
f	weiblich
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinadeninmononukleotid
FGF-2	Fibroblast Growth Factor 2
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein (glialer Marker für Astrozyten)

H <sub>4</sub> Bip	(6R)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-Biopterin
HI	Hilus des Gyrus dentatus (Region CA4 des Hippokampus)
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
IgG	Immunglobulin G
iNOS	„induzierbare“ Isoform der Stickstoffmonoxid-synthase (= NOS-II)
i. p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
KZS	Körnerzellschicht des Gyrus dentatus (Hippokampus)
L-NAME	N <sup>ω</sup> -Nitro-methyl-L[D]-argininmethylester
LTD	Long-term Depression (Langzeitdepression)
LTP	Long-term Potentiation (Langzeitpotenzierung)
m	männlich
MAP-Kinasen (MAPK)	Mitogen-activated Protein Kinases
MMA	Methylazoxymethanol
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NMDA-Rezeptor	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor als Subtyp des Glutamatrezeptors
NeuN	Neuron-specific Nuclear Protein
NHS	Normal Horse Serum
nNOS	„neuronale“ Isoform der Stickstoffmonoxid-synthase (= NOS-I)
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
NOS-I	Isoform I der Stickstoffmonoxidsynthase (= nNOS)
NOS-II	Isoform II der Stickstoffmonoxidsynthase (= iNOS)
NOS-III	Isoform III der Stickstoffmonoxidsynthase (= eNOS)
NSE	Neuronen-spezifische Enolase
PARP	Poly-(ADP-Ribose)Polymerase

PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PNS	Peripheres Nervensystem
RT	Raumtemperatur
S-100 $\beta$	Marker für reife Astrozyten
SD	Standardabweichung
sGC	lösliche Guanylylcyclase
SGZ	Subgranulärzone des Gyrus dentatus (Hippokampus)
SSC	Standard-Citratlösung
SSRI	Selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitoren
TBS	TRIS-Buffered Saline
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ZNS	Zentrales Nervensystem



# 1. Theoretischer Hintergrund

## 1.1 Adulte Neurogenese

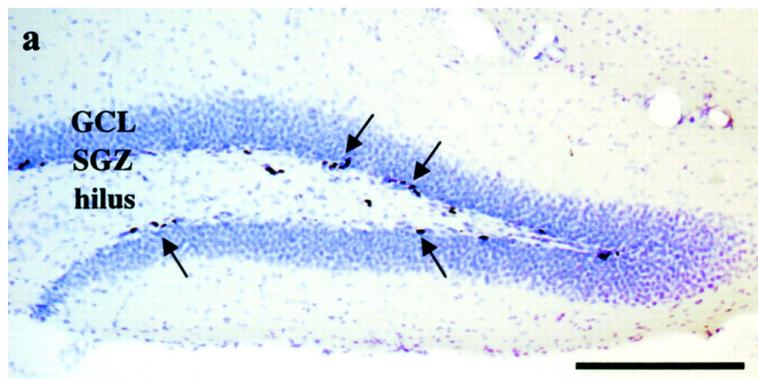
### 1.1.1 Überblick

In den vergangenen Jahren konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass sowohl im Gehirn von erwachsenen Säugetieren [47, 58] als auch im Gehirn des erwachsenen Menschen [51] neue Nervenzellen gebildet werden. Dies geschieht vor allem in zwei umschriebenen Hirnregionen, dem Hippokampus, einer für Lernen und Gedächtnis entscheidenden Hirnregion, und der Subventrikulärzone der Seitenventrikel, die mit dem Riechhirn (Bulbus olfactorius) über Projektionsbahnen in Verbindung steht. Dieses Phänomen der Neuentstehung von Nervenzellen im erwachsenen Gehirn wurde mit dem Begriff „adulte Neurogenese“ bezeichnet und führte zu einem Paradigmenwechsel in den Neurowissenschaften. Während noch bis in die 1990er Jahre die Lehrmeinung gegolten hatte, dass die Neurone des ZNS – nach ihrer Entstehung während der Embryonalentwicklung oder kurz postnatal – terminal differenziert und im erwachsenen Organismus nicht mehr teilungsfähig sind, wird heute davon ausgegangen, dass auch das erwachsene Gehirn dazu in der Lage ist, an umschriebenen Stellen Neurone und Gliazellen aus Vorläuferzellen zu bilden.

Diese Befunde fügten sich nur schwer in die vorhandenen Konzepte von Aufbau und Funktion des Gehirns ein. Neugebildete Nervenzellen sollten eigentlich die komplex verschalteten neuronalen Netzwerke stören [88]. Außerdem war es schwer vorstellbar, wie sich terminal differenzierte Neurone wieder mitotisch teilen sollten [88]. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass sich nicht die ausdifferenzierten Neurone teilen, sondern vielmehr undifferenzierte neurale Stammzellen [120]. Auch konnte gezeigt werden, dass sich die neu gebildeten Nervenzellen strukturell und funktionell in bestehende Neuronennetzwerke integrieren [153, 163]. Die zugrunde liegenden Mechanismen, die offensichtlich komplex sind, sind jedoch größtenteils noch unbekannt. Um diese gegenwärtig noch brach liegende Fähigkeit des Gehirns zur Regeneration eines Tages therapeutisch nutzen zu können, gilt das besondere Forschungsinteresse der Aufklärung von Regulationsfaktoren und Mechanismen der adulten Neurogenese.

### 1.1.2 Lokalisation

Es existieren zwei Regionen des Säugergehirns, in denen kontinuierlich in nicht unbedeutendem Umfang aus Stammzellen neue Nervenzellen gebildet werden, der Gyrus dentatus des Hippokampus und die Subventrikulärzone (in der Lateralwand der Seitenventrikel) [47, 87, 99]. Die in der Subventrikulärzone neu gebildeten Zellen wandern entlang des rostralen Migrationstraktes in den Bulbus olfactorius ein und differenzieren dort weiter zu funktionstüchtigen Neuronen des Riechhirns [5, 87, 101, 102]. Im Gyrus dentatus residieren proliferierende Stammzellen in der Subgranulärzone zwischen Körnerzellschicht und Hilus (Abb. 1.1). Die von ihnen neu gebildeten Zellen wandern zum Teil in die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus ein und reifen zu morphologisch und funktionell kompetenten Körnerzellen. Man schätzt, dass im Gyrus dentatus von erwachsenen Ratten ca. 9000 neue Zellen pro Tag [27] gebildet werden (entsprechend einem Turnover von ca. 6% aller vorhandenen Körnerzellen [47]).



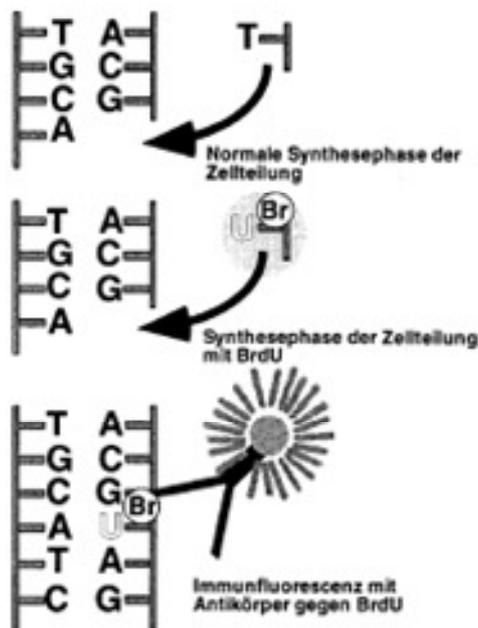
**Abb. 1.1.** Adulte Neurogenese im Gyrus dentatus des Hippokampus (modifiziert nach [47]). In der Subgranulärzone (SGZ) des Gyrus dentatus (v-förmige Struktur) entstehen neue Nervenzellen aus proliferierenden Stammzellen (Pfeile; immunhistochemischer Nachweis mit BrdU). Maßstabsbalken 200  $\mu$ m, GCL = Körnerzellschicht, hilus = Hilus des Gyrus dentatus (Region CA4).

Bei Primaten konnte adulte Neurogenese auch im Neokortex nachgewiesen werden [66], allerdings in geringerem Umfang, wobei dieser Befund von anderen Gruppen jedoch nicht repliziert werden konnte [93]. Kürzlich wurde außerdem demonstriert, dass auch in der Substantia nigra adulte Neurogenese stattfindet [170], jedoch in wesentlich geringerer Menge als im Gyrus dentatus. Im Hinblick auf potenzielle therapeutische Optionen beim M. Parkinson hat dieser Befund jedoch erhebliche Bedeutung, da dieser sehr häufigen Erkrankung des mittleren und höheren Lebensalters eine Degeneration von Nervenzellen in der Substantia nigra zugrunde liegt.

Warum Neurogenese nur in bestimmten, umschriebenen Regionen (Nischen) des ZNS vorkommt, konnte bisher nicht geklärt werden. Stammzellen konnten jedoch auch aus anderen, bezüglich der adulten Neurogenese „stummen“ Arealen des ZNS extrahiert werden (z. B. aus dem Septum, dem Striatum und dem Rückenmark [88, 119]). Neben der Option, pluripotente embryonale Stammzellen therapeutisch zu nutzen, ist eine weitere Zukunftsperspektive, autologe Stammzellen aus dem Gehirn des Patienten selbst zu gewinnen, in Kultur zu züchten und in geschädigte Hirnregionen zu implantieren, wo sie nach Ausdifferenzierung die Funktion von zugrunde gegangenen Neuronen übernehmen könnten [59, 87, 136], obgleich dies zum gegenwärtigen Zeitpunkt natürlich noch Zukunftsmusik darstellt.

### **1.1.3 Nachweismethoden**

Die adulte Neurogenese wird in der Regel durch In-vivo-Markierung mit Bromodeoxyuridin (BrdU) sichtbar gemacht (Abb. 1.2). Neben dieser Standardmethode existiert die autoradiographische Darstellung der Zellproliferation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin, die jedoch u. a. wegen ihrer Ungenauigkeit weitgehend verlassen wurde [47, 130].



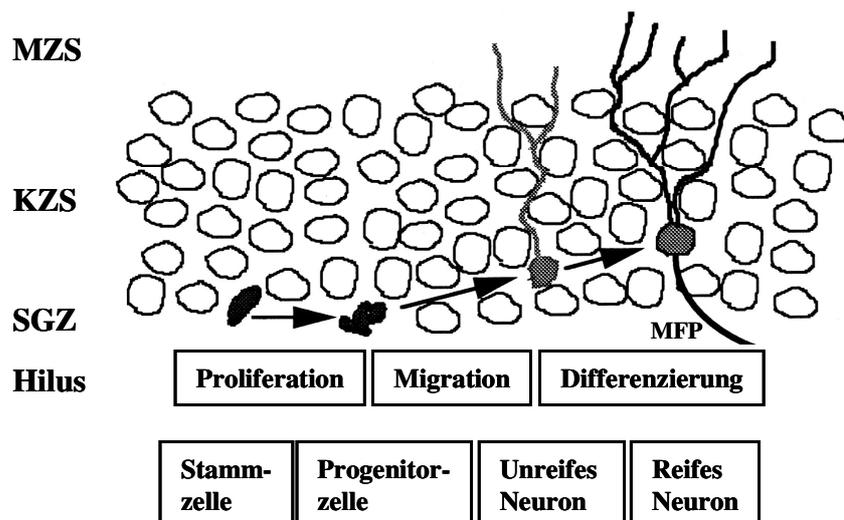
**Abb. 1.2.** In-vivo-Nachweis der adulten Neurogenese mit Bromodeoxyuridin (BrdU) (aus [87], Erläuterungen siehe Text)

Den zu untersuchenden Tieren wird systemisch (i. p.) BrdU injiziert, das während der mitotischen Zellteilung anstelle der Base Thymidin während der Synthesephase in die DNA eingebaut wird [87]. Nach Anfertigung von Gewebsschnitten kann BrdU immunhistochemisch mit Antikörpern gegen BrdU sichtbar gemacht werden. Da verabreichtes BrdU schnell wieder ausgeschieden wird [157], werden mit dieser Methode nur Zellen markiert, die sich zum Zeitpunkt der Injektion geteilt haben. Das Zeitintervall zwischen BrdU-Injektion und Tötung des Versuchstieres zur histologischen Aufarbeitung entscheidet darüber, welcher Schritt der adulten Neurogenese dargestellt wird: Im Beispiel der adulten Neurogenese im Gyrus dentatus ist die Proliferation der Vorläuferzellen in der Subgranulärzone 1 Tag nach Markierung mit BrdU, die Migration in die Körnerzellschicht nach einer Woche und die Differenzierung zu Neuronen nach 4 Wochen sichtbar [87] (BrdU bleibt in der DNA der Tochterzellen während der gesamten Lebensdauer der Zelle inkorporiert [154]). Um die Differenzierung zu Neuronen oder Gliazellen darzustellen, kann eine gleichzeitige

immunhistochemische Darstellung mit Antikörpern gegen Marker reifer Neurone (z. B. NeuN oder NSE) oder Gliazellen (z. B. GFAP, S-100 $\beta$ ) erfolgen (konfokalmikroskopische Analyse).

### 1.1.4 Mechanismus

Der folgende Abschnitt beschreibt die adulte Neurogenese im Gyrus dentatus des Hippokampus in ihren Einzelschritten. Man unterscheidet bei dem Prozess der adulten Neurogenese generell die Proliferation neuraler Zellen von deren Survival, da 4 Wochen nach ihrer Entstehung nur ca. 50% der neu gebildeten Zellen überleben, die Übrigen jedoch durch Degeneration zugrunde gehen. Wie in Abb. 1.3 gezeigt, proliferieren in der Subgranulärzone ansässige Stammzellen zu einer weiteren Stamm- und einer Progenitorzelle. Die Tochterzellen wandern innerhalb von ca. 4 Wochen in die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus ein (Migration) und differenzieren dabei über Stadien unreifer Neurone zu reifen ortsständigen Körnerzellen, die wie die bestehenden Körnerzellen Dendriten in die Molekularzellschicht (MZS) und Axone entlang des Moosfaser-Pathways (MFP) in die Region CA3 entsenden sowie zu Langzeitpotenzierung (LTP) fähig sind [153, 162].



**Abb. 1.3.** Proliferation, Migration und Differenzierung von neu gebildeten Neuronen in Subgranulärzone (SGZ) und Körnerzellschicht (KZS) des Gyrus

dentatus (modifiziert nach [47]). MZS = Molekularzellschicht, MFP = Moosfaser-Pathway. Erläuterungen siehe Text.

Die in der SGZ gelegenen Stamm- oder Vorläuferzellen der adulten hippocampalen Neurogenese sind überraschenderweise Astrozyten sehr ähnlich [145, 154]. Sie besitzen die Morphologie ortsständiger Astrozyten der Subgranulärzone und exprimieren den astrozytären Marker GFAP. Sie sind jedoch im Gegensatz zu den parallel zum Gyrus dentatus orientierten ortsständigen Astrozyten S100 $\beta$ -negativ und mit ihren Ausläufern vertikal in Richtung der Körnerzellschicht orientiert. Man geht davon aus, dass sie als pluripotente Vorläuferzellen sowohl klassische Astrozyten als auch Neurone hervorbringen können [154]. Dem entspricht die Tatsache, dass während der embryonalen Neurogenese (aus Neuroepithelzellen) Astrozyten und Ependymzellen gewissermaßen als wenig differenzierte Zellen übrig bleiben (Default Differentiation), während neuronale und oligodendrogliale Differenzierungslinien abzweigen. Somit ist es zumindest denkbar, dass aus Astrozyten im adulten Organismus Neurone hervorgehen können, wenn geeignete Gene aktiviert werden [90]. Es existieren jedoch auch gegenteilige Befunde [121], nämlich dass neurale Stammzellen gliale Marker wie GFAP nur ausgesprochen transient exprimieren, während sie in den Zellzyklus eintreten.

Im Gyrus dentatus sind die aufeinander folgenden Schritte Proliferation, Migration und Differenzierung somit räumlich eng benachbart, während sie in der Subventrikulärzone, der zweiten bedeutsamen Region adulter Neurogenese, räumlich disseminiert ablaufen: Proliferation in der Subventrikulärzone, Migration entlang des rostralen Migrationstraktes und schließlich Differenzierung im Bulbus olfactorius [87].

Durch Doppelmarkierung mit BrdU und Markern reifer Neurone bzw. Gliazellen (vgl. Abschnitt 1.1.3) konnte gezeigt werden, dass von den überlebenden Zellen etwa 75-80% zu Neuronen, 10-15% zu Gliazellen und die Übrigen zu Zellen eines undeterminierten Phänotyps differenzieren [47]. Die entstehenden Gliazellen sind ganz überwiegend Astrozyten und vereinzelt Mikrogliazellen. Oligodendrozyten entstehen jedoch nicht [154].

### **1.1.5 Entdeckungsgeschichte**

Bereits im Jahr 1965 konnten Altman und Das [4, 87] mit autoradiographischen Methoden zeigen, dass im Hippokampus von erwachsenen Ratten neue Nervenzellen gebildet werden. Diese Arbeit wurde nicht zuletzt aufgrund methodischer Unzulänglichkeiten als Kuriosität eingestuft [87, 88]. In den 80er und 90er Jahren des 20. Jahrhunderts konnten Fernando Nottebohm und Mitarbeiter zeigen, dass im Striatum von adulten Kanarienvögeln Neurogenese vorkommt und diese funktionell mit dem Lernen eines neuen Gesangsrepertoires korreliert [62, 87]. Außerdem demonstrierten sie, dass adulte Neurogenese im Hippokampus von Singvögeln saisonalen Schwankungen unterliegt und dann am stärksten ausgeprägt ist, wenn sich die Tiere Futterverstecke innerhalb eines größeren Territoriums einprägen müssen [11, 12]. Im Folgenden konnte adulte Neurogenese im Hippokampus von Ratten, Mäusen [85], Primaten [65] und schließlich im Hippokampus des Menschen [51] nachgewiesen werden, letzteres durch einen überaus eleganten Ansatz: Die für den immunhistochemischen Nachweis der adulten Neurogenese eingesetzte zytotoxische In-vivo-Markersubstanz BrdU kann üblicherweise nicht für die Sichtbarmachung der adulten Neurogenese im menschlichen Hippokampus verabreicht werden. Der Schwede Eriksson [51] erfuhr durch einen Zufall [88], dass Patienten, die unheilbar an Zungen- und Kehlkopfkrebs erkrankt waren, im Rahmen einer Studie zur Überwachung der Größenzunahme des Tumors die Substanz BrdU verabreicht bekommen hatten. Nach dem Tod der Patienten durften einige Gehirne immunhistochemisch untersucht werden, und es ließ sich das Vorkommen adulter Neurogenese völlig analog auch im Hippokampus des Menschen zeigen.

### **1.1.6 Regulationsfaktoren**

Wie die Neurogenese im erwachsenen Organismus reguliert wird, ist erst teilweise aufgeklärt. In einer Reihe von Arbeiten konnten einzelne Einflussfaktoren ermittelt werden: Tab. 1.1 gibt einen Überblick über die derzeit bekannten Regulationsfaktoren der adulten Neurogenese [47, 48, 83]:

**Tab. 1.1.** Bekannte Regulationsfaktoren der adulten Neurogenese (Erläuterungen im Text)

	<b>Stimulation der adulten Neurogenese durch</b>	<b>Inhibition der adulten Neurogenese durch</b>
<b>Makroskopische Phänomene</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Abwechslungsreiche Umgebung</li> <li>• Lernen (hippokampus-abhängig)</li> <li>• Bewegung</li> <li>• Epileptische Anfälle (Temporallappen-anfälle) [13, 123]</li> <li>• Globale [100] und fokale [173] zerebrale Ischämie</li> <li>• Elektrokrampftherapie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alter</li> <li>• Stress</li> <li>• Röntgenstrahlung [122, 156]</li> </ul>
<b>Regulatorische Moleküle (mikroskopische Ebene)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neurotrophe Faktoren: BDNF</li> <li>• Wachstumsfaktoren: EGF, IGF-1, FGF-2, VEGF</li> <li>• Serotonin: d-Fenfluramin, 5-HT<sub>1A</sub>-Agonisten</li> <li>• Antidepressiva (Fluoxetin / SSRI, Reboxetin, TCA, Tranylcypromin, Li)</li> <li>• Östrogene</li> <li>• cAMP-Kaskade, Rolipram</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glukokortikoide</li> <li>• Exzitatorische Neurotransmitter (Glutamat via NMDA-Rezeptor)</li> <li>• Opiate [50]</li> </ul>

Gage und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Mäuse eine um 60% höhere Rate adulter hippocampaler Neurogenese aufweisen, wenn sie in abwechslungsreicher Umgebung untergebracht sind (z. B. in großen Käfigen mit Spielzeug und vielen Artgenossen, sog. Enriched Environment) [86]. Hippokampusabhängiges Lernen (z. B. Lernen im Morris Water Maze) hatte in Studien einen positiven Einfluss auf die adulte Neurogenese im Hippokampus von Nagern [63, 67]. Allein freiwilliges Laufen in einem Laufrad führt bei Mäusen zu einer erhöhten Rate adulter Neurogenese im Gyrus dentatus im Vergleich zu Kontrollen [162], möglicherweise über eine peripher gesteigerte Sekretion von IGF-1 [1, 25, 28, 86]. Überraschenderweise konnte kürzlich außerdem gezeigt werden, dass auch peripher ausgeschüttetes VEGF zumindest teilweise für die Zunahme der adulten Neurogenese von Mäusen, die in einem Laufrad laufen, verantwortlich ist, nicht jedoch für die basale Neurogeneserate bei Kontrolltieren [52].

Generell nimmt die adulte Neurogenese mit zunehmendem Alter der Tiere ab [97, 144]. Auch Stress hat einen negativen Einfluss auf die adulte Neurogenese [68, 105].

Neben den genannten makroskopischen Phänomenen wurde der Einfluss regulatorischer Moleküle und psychotroper Substanzen auf die adulte Neurogenese untersucht. Neurotrophe Faktoren wie BDNF [175] und Wachstumsfaktoren wie z. B. EGF, IGF-1, FGF-2 und VEGF [1, 80, 98, 174] regulieren nach intraventrikulärer Applikation die adulte Neurogenese positiv. Bemerkenswerterweise beeinflusste EGF dabei die Differenzierung der neu gebildeten Zellen bevorzugt in Richtung eines glialen Zelltyps, FGF-2 mehr hin zu Neuronen [98]. Serotonin (5-HT) hat via 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren einen positiven Effekt auf die adulte Neurogenese [23, 47], da sowohl 5-HT-Freisetzung durch d-Fenfluramin als auch der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoragonist 8-Hydroxy-2-dipropylaminotetralin die Anzahl BrdU-positiver Zellen im Hippokampus erhöhen, der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorantagonist WAY 100,635 sie hingegen erniedrigt [47, 78]. Chronische Applikation von Antidepressiva verschiedener Substanzklassen führte im Tierversuch zu einer Steigerung der adulten Neurogenese [48, 104, 106]. Darunter waren neben klassischen tricyclischen Antidepressiva selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitoren (SSRI) wie Fluoxetin, die zu einer Erhöhung der Serotonin-Konzentration im synaptischen Spalt führen (in

Übereinstimmung mit dem positiven Einfluss von Serotonin auf die adulte Neurogenese), selektive Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer wie Reboxetin und Monoaminoxidase-Inhibitoren wie Tranylcypromin. Auch Antidepressiva im weiteren Sinn, wie das bei bipolaren affektiven Psychosen eingesetzte Phasenprophylaktikum Lithium [29], und die Elektrokrampftherapie [103, 104] steigern nachweislich die adulte Neurogenese. Ferner konnte eine positive Regulation der adulten Neurogenese durch Östrogene gezeigt werden [158].

Bisher wenig verstanden sind die Second-Messenger-Mechanismen, durch die regulative Signale der adulten Neurogenese intrazellulär umgesetzt werden. Die cAMP-CREB-Kaskade konnte als eine solche Signalkaskade identifiziert werden, u. a. durch den Nachweis, dass Rolipram, ein Inhibitor der cAMP-Phosphodiesterase 4, adulte hippocampale Neurogenese fördert [47, 89].

Hormonell herunterreguliert wird die adulte Neurogenese durch Glukokortikoide [64]. Da es sich dabei um Stresshormone handelt, wurde postuliert, die stressbedingte Abnahme der adulten Neurogenese sei durch sie vermittelt [47]. Dieser Zusammenhang und die positive Regulation der adulten Neurogenese durch Antidepressiva sind Belege für eine mögliche Rolle der adulten hippocampalen Neurogenese bei der Pathogenese endogener Depressionen [14, 47, 48, 83]. Schließlich regulieren auch NMDA-Rezeptor-vermittelte glutamaterge Afferenzen zum Hippokampus die dort ablaufende adulte Neurogenese negativ [26].

## **1.2 Stickstoffmonoxid – ein biologisch aktives Gas**

### **1.2.1 Überblick**

Stickstoffmonoxid (NO), ein gasförmiges Radikal, hat vielfältige biologische Funktionen im menschlichen Körper [114, 133, 141, 168]. Es ist einerseits ein frei durch Zellmembranen diffundierendes Signalmolekül, das parakrin in der unmittelbaren zellulären Umgebung seines Entstehungsortes wirkt. Außerdem kommt NO auch eine Rolle als antiinfektiöses Agens bei der unspezifischen Immunabwehr von Viren, Bakterien und intrazellulären Parasiten zu.

In den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde NO im kardiovaskulären System als erster gasförmiger Botenstoff entdeckt [56, 76]. Durch verschiedene Stimuli

wie Acetylcholin oder Scherspannung wird NO vom Gefäßendothel freigesetzt und diffundiert durch die Zellmembran hindurch in die glatten Gefäßmuskelzellen. Dort aktiviert es als seinen Rezeptor die lösliche Guanylylcyclase (sGC). Über nachgeschaltete Signalkaskaden kommt es zur Relaxation der Gefäßmuskulatur und somit zur Vasodilatation [160].

## **1.2.2 Biosynthese von Stickstoffmonoxid**

### **1.2.2.1 NO-Synthasen**

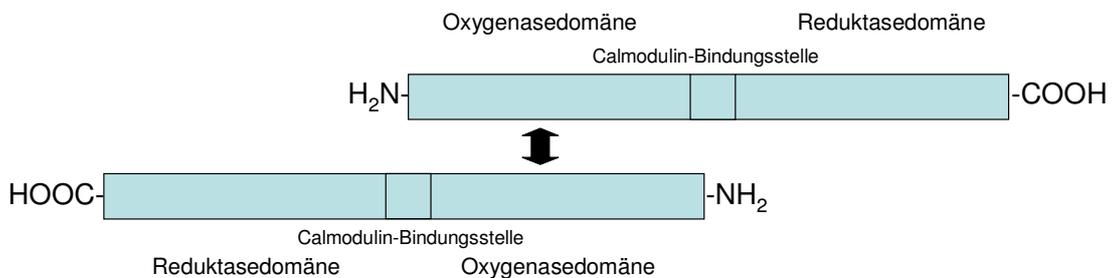
NO wird im Organismus von Säugetieren durch das Enzym NO-Synthase aus L-Arginin und molekularem Sauerstoff synthetisiert. Bislang sind drei Isoenzyme der NO-Synthase bekannt [114]: neuronale NO-Synthase (NOS-I), benannt nach ihrer Erstbeschreibung in Neuronen [138], induzierbare NO-Synthase (NOS-II) und endotheliale NO-Synthase (NOS-III). Es handelt sich dabei um relativ große (molekulare Masse 260-320 kDa), dimere Enzyme [141]. Die NO-Synthasen [54] werden von drei Single-Copy-Genen kodiert (NOS1 auf Chromosom 12, NOS2 auf Chromosom 17 und NOS3 auf Chromosom 7). Tab. 1.2 gibt einen Überblick über die drei NOS-Isoenzyme und ihre biochemischen Eigenschaften [141, 168]. Im Folgenden wird hier immer die offizielle Nomenklatur verwendet (NOS-I - NOS-III).

**Tab. 1.2. Biochemische und molekularbiologische Charakteristika der NOS-Isoformen**

<b>NOS-Isoform</b>	<b>NOS-I (nNOS)</b>	<b>NOS-II (iNOS)</b>	<b>NOS-III (eNOS)</b>
<b>Expression</b>	konstitutiv	induzierbar	konstitutiv
<b>Aktivitätsregulation durch intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration</b>	ja (Aktivität abhängig von erhöhtem intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Spiegel)	nein, da feste Calmodulin-Bindung	ja (Aktivität abhängig von erhöhtem intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Spiegel)
<b>Zuerst identifiziert in</b>	Neuronen (nNOS)	aktivierten Makrophagen (iNOS)	Endothelzellen (eNOS)
<b>Weitere wichtige Expressionsorte</b>	Magenepithelzellen, Bronchialepithelzellen, Pankreatische $\beta$ -Zellen u. v. m.	Glatte Muskelzellen, Hepatozyten, Pankreatische $\beta$ -Zellen, Astrozyten u. v. m.	
<b>Molekulare Masse (kDa/Monomer)</b>	160	130	133
<b>Intrazelluläre Lokalisation</b>	in Lösung oder membrangebunden	in Lösung oder membrangebunden	weitgehend membrangebunden
<b>Genort</b>	12q24.2-24.31	17cen-17q11.2	7q35-36
<b>v<sub>max</sub> (nmol L-Citrullin/mg * min)</b>	> 300	< 1600	15

Alle drei NOS-Isoenzyme bestehen im Monomer aus einer C-terminalen Reduktase-Domäne und einer N-terminalen Oxygenasedomäne (Abb. 1.4), die den größten Teil des Dimerisierungsbereiches darstellt. Aktives Enzym liegt immer als Homodimer vor. Der molekulare Schalter Calmodulin (vgl. Abschnitt 1.2.2.2), der der Regulation der Enzymaktivität dient, liegt zwischen der Reduktase- und

der Oxygenasedomäne. Als Kofaktoren für die Biosynthese von NO werden FMN, FAD und NADPH in der Reduktase- und H<sub>4</sub>Bip in der Oxygenasedomäne gebunden. Letztere ist hämhaltig und bindet außerdem das Substrat L-Arginin. Abb. 1.4 zeigt schematisch die molekulare Architektur der dimerisierten aktiven Stickstoffmonoxidsynthase.

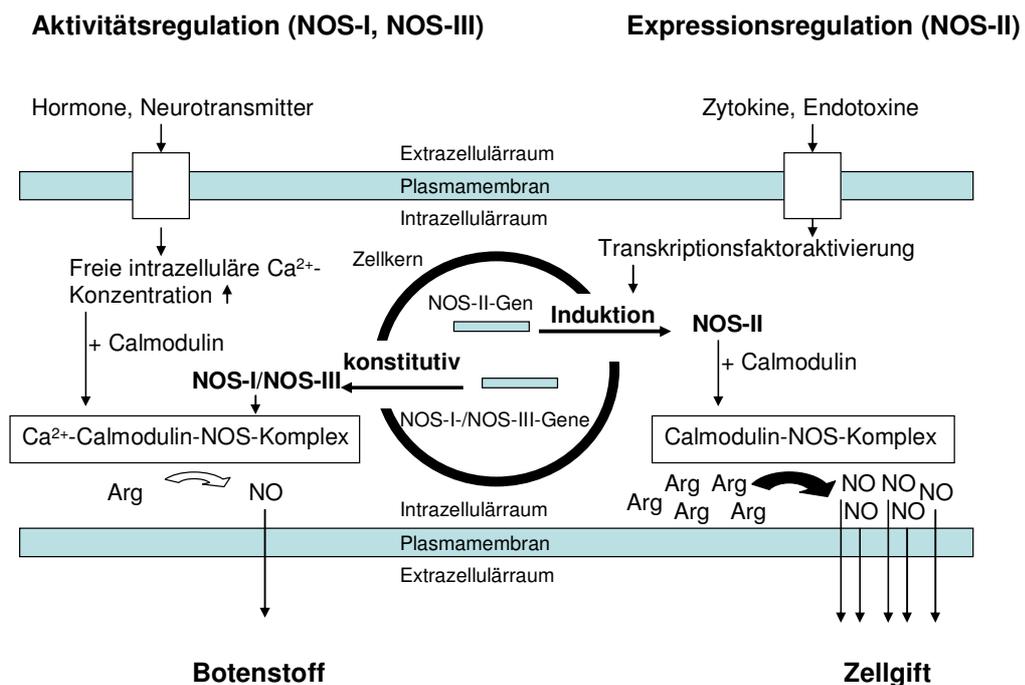


**Abb. 1.4.** Schema des aktiven NOS-Homodimers

### 1.2.2.2 Regulation der Enzymaktivität der NO-Synthasen

Während NOS-I und NOS-III zwar konstitutiv exprimiert werden, ihre Aktivität aber entscheidend von einer erhöhten intrazellulären Calcium-Konzentration abhängt (Aktivitätsregulation), ist das Isoenzym NOS-II nicht konstitutiv vorhanden, sondern wird durch bestimmte Stimuli wie inflammatorische Zytokine oder Endotoxine (bakterielle Lipopolysaccharide) über Transkriptionsfaktoraktivierung induziert (Expressionsregulation). Nach Induktion ist das Enzym NOS-II jedoch calciumunabhängig aktiv und produziert pro Zeiteinheit 10- bis 100mal mehr NO als NOS-I bzw. NOS-III (Abb. 1.5); NOS-II wird daher auch als High-Output-NO-Synthase bezeichnet. Bei NOS-II handelt es sich um das Isoenzym, das NO für Immunreaktionen und Entzündungsvorgänge bereitstellt.

Die Regulation der Enzyme NOS-I und -III erfolgt über einen Anstieg des freien intrazellulären Calciums, wodurch Calciumionen vermehrt an Calmodulin binden. Calmodulin bindet dann nach einer Konformationsänderung an die inaktive NO-Synthase, hebt über eine Änderung der Quartärstruktur eine Hemmung des Elektronenflusses innerhalb des Enzyms auf (Disinhibition) und aktiviert somit das Enzym. Abb. 1.5 (modifiziert nach [141]) fasst diese Regulationsvorgänge zusammen. Allerdings unterliegt auch die Expression von NOS-I und -III komplexen Regulationsprozessen, so dass hier sowohl ein langsamer als auch ein schneller Mechanismus zur Steuerung der NO-Produktion vorliegen.

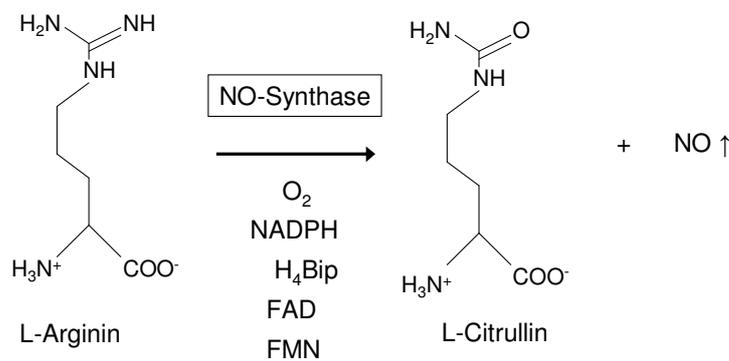


**Abb. 1.5.** Regulation der Aktivität der NO-Synthasen

### 1.2.2.3 Mechanismus der enzymatischen NO-Synthese

Abb. 1.6 zeigt die Biosynthese von NO durch NO-Synthasen. In einer Oxidoreduktion wird NO unter katalytischer Wirkung der NO-Synthase aus der Aminosäure L-Arginin und molekularem Sauerstoff gebildet. Als Nebenprodukt

entsteht L-Citrullin, das neben L-Arginin im Harnstoff-Zyklus des Säugerzellstoffwechsels vorkommt. Der Reaktionsmechanismus der Umsetzung, der nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand für alle drei NOS-Isoformen identisch ist, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Insbesondere die genaue Stöchiometrie des Kofaktors NADPH ist noch Gegenstand der Forschung. Weitere notwendige Kofaktoren sind FAD, FMN, H<sub>4</sub>Bip, die Hämgruppe der Oxygenasedomäne sowie Calmodulin und Calciumionen.



**Abb. 1.6.** Die NO-Synthase-Reaktion (modifiziert nach [141])

### 1.2.3 Beteiligung von NO an physiologischen und pathophysiologischen Prozessen

In vielen Organsystemen hat Stickstoffmonoxid sowohl nützliche als auch schädliche Wirkungen (Tab. 1.3). Bei vielen Krankheiten ist die Gewebekonzentration von NO pathologisch erhöht, aber auch zu wenig NO kann zu Erkrankungen führen. Man spricht insgesamt von NO als einem „zweischneidigen Schwert“ [140]. Den drei NOS-Isoformen lassen sich grob orientierend drei Organsysteme zuordnen, in denen jedes Isoenzym jeweils eine herausragende Funktion hat und die im folgenden exemplarisch näher beleuchtet werden sollen: NOS-I im zentralen und peripheren Nervensystem, NOS-II im Immunsystem sowie NOS-III im Herz-Kreislauf-System [141]. Im ZNS, das in der vorliegenden Arbeit im Vordergrund steht, haben sowohl NOS-I als auch NOS-III

eine entscheidende physiologische Rolle. Außerdem ist wohl nahezu jede Zelle dazu in der Lage, NOS-II zu exprimieren [133].

**Tab. 1.3.** Physiologische und pathophysiologische Funktionen von NO (modifiziert nach [139])

<b>Organsystem</b>	<b>Wichtige Funktionen von NO</b>	<b>Pathophysiologie von NO</b>
Herz-Kreislaufsystem – Endothel	Vasodilatation	Hypotension, Capillary Leakage, Reperfusionsschaden, septischer Schock
Thrombozyten	Adhäsionshemmung, Aggregationshemmung, Hemmung der Freisetzungsreaktion	
Immunsystem	Antibakterielle Aktivität, insbesondere in Makrophagen	Inflammatorische Gewebsschädigung, Transplantatabstoßung
Herz	Steigerung der Koronardurchblutung	Herzversagen im septischen Schock
Lunge	Regulation des Ventilations-/Perfusionsverhältnisses	Asthma?
Pankreas	Modulation der Insulinfreisetzung	Diabetes mellitus?
Niere	Regulation der Perfusion und der Reninsekretion	Nierenversagen
Gastrointestinaltrakt, PNS	Modulatorischer Transmitter, penile Erektion	Infantile hypertrophe Pylorusstenose
ZNS	Vielfältige Funktionen in den Bereichen	Neurotoxizität, Epilepsie, Migräne, ischämischer

	Gedächtnis, Lernen und Verhalten	Insult, M. Alzheimer, HIV-Demenz
--	----------------------------------	----------------------------------

### 1.2.3.1 NO im Herz-Kreislauf-System

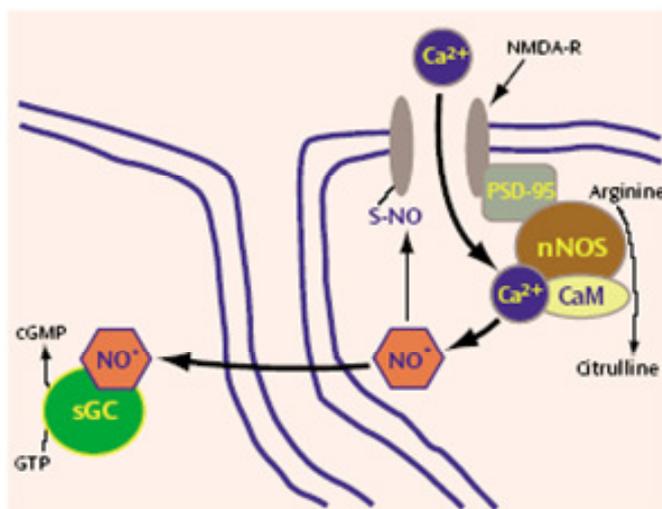
Im kardiovaskulären System wurde die humanbiologische Funktion von NO zuerst entdeckt (s. Kapitel 1.2.1). Durch Stimuli (Rezeptoraktivierung durch Acetylcholin, ATP, Serotonin oder Histamin; Scherspannung des strömenden Blutes [82]) freigesetztes NO diffundiert in die glatten Gefäßmuskelzellen und relaxiert diese nach Aktivierung des NO-Rezeptors sGC (Vasodilatation). Der Blutfluss und die Sauerstoffzufuhr in den abhängigen Regionen werden erhöht [160]. Diese Wirkung von NO macht man sich seit über hundert Jahren durch den Einsatz des Medikaments Glycerintrinitrat („Nitroglycerin“, heutzutage durch NO-Donoren wie Molsidomin) in der Behandlung der Angina pectoris zunutze.

Eine insgesamt antiatherosklerotische Wirkung von NO ergibt sich daraus, dass NO antiproliferativ auf die glatten Gefäßmuskelzellen, aggregations- und adhäsionshemmend auf die Thrombozyten wirkt.

### 1.2.3.2 NO im zentralen und peripheren Nervensystem

Im ZNS kommt NOS-I in Neuronen des Kleinhirns (dort wurde NOS-I primär beschrieben), des Hippokampus, der Hypophyse und des olfaktorischen Kortex vor [21, 22, 49, 138, 149, 161]. NOS-III kommt möglicherweise ebenfalls in Neuronen, besonders des Hippokampus, vor, z. B. in CA1-Pyramidenzellen [40, 44], allerdings ist dieser Befund sehr umstritten. Obwohl nur ca. 1% aller Neuronen NOS-positiv sind, ist nahezu jede Zelle des Gehirns mit Terminalen der weit verzweigten NOS-haltigen Neurone in Kontakt [19, 20]. NO erfüllt die Dale'schen Kriterien eines Neurotransmitters nicht vollständig: Es wird zwar auf einen Reiz hin aus einem präsynaptischen Neuron freigesetzt und reguliert Funktionen eines postsynaptischen Neurons, jedoch wird es weder vesikulär gespeichert, noch ist seine Funktion streng auf eine Synapse begrenzt [141], sodass die Bezeichnung Neuromodulator geeigneter erscheint. NO wirkt parakrin auf Zielzellen, die in enger Nachbarschaft zu NOS-haltigen Zellen liegen. Man

spricht hierbei von nitriener Neurotransmission [141]. Neben der Wirkung auf postsynaptische Neurone wirkt NO auch präsynaptisch bzw. rückwärts [7] (z. B. bei der Langzeitpotenzierung, vgl. Kap. 1.3.1). Abb. 1.7 zeigt den Wirkmechanismus von NO in Neuronen. Die NO-Freisetzung wird durch erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel ausgelöst, die z. B. durch Aktivierung des glutamatergen NMDA-Rezeptors entstehen [167].



**Abb. 1.7** aus [150]. Synthese und Aktivität von NO in Neuronen

Nach glutamaterger Aktivierung des Neurons über den NMDA-Rezeptor (NMDA-R) strömt  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle ein.  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert zusammen mit Calmodulin (CaM) nNOS (NOS-I), die über das Protein PSD-95 am NMDA-Rezeptor verankert ist. Das synthetisierte NO diffundiert als Neuromodulator in benachbarte Zellen und aktiviert die lösliche Guanylylcyclase (sGC). cGMP setzt weitere intrazelluläre Signalkaskaden in Gang.

NO als Neuromodulator beeinflusst vor allem Gedächtnis, Lernen und Verhalten. Langzeitpotenzierung (LTP) als ein maßgeblicher Mechanismus von Lernen und Gedächtnis (Kap. 1.3.1) wird durch NO-Freisetzung fasilitiert [150]. Es besteht weit reichender Konsens darüber, dass NO bei LTP einen retrograden Messenger vom postsynaptischen zum präsynaptischen Neuron darstellt [18, 70, 116, 143]. NOS-

Blockade im Tiermodell führt dementsprechend auch zu vermindertem räumlichen Lernvermögen [71, 113].

Männliche NOS-I-Knockout-Mäuse zeigen äußerst aggressives und hypersexuelles Verhalten [96, 115], während weibliche NOS-I-Knockout-Mäuse ein vermindert mütterliches Verhalten im Vergleich zu Wildtypen aufweisen [61]. Insgesamt ist der Verhaltensphänotyp von NOS-I-Knockout-Mäusen von verminderter Ängstlichkeit und schlechterem Lernverhalten geprägt, was auf die Modulation von Verhalten durch NO hinweist.

NO hat außerdem über die zeitlich begrenzte Expression von NOS während der Embryonalentwicklung eine wesentliche Rolle bei der Synapto- und Morphogenese des ZNS [21, 35].

Pathophysiologisch ist NO wesentlich an der Zellschädigung beim ischämischen Hirninfarkt beteiligt. Die fokale Ischämie führt zu exzessiver Glutamatfreisetzung [31] (Exzitotoxizität). Über an den NMDA-Rezeptor gekoppelte NOS-I (und über induzierte NOS-II [173]) kommt es zur massiven NO-Freisetzung [37, 109]. Neurotoxisch wirken vor allem die NO-Metaboliten Peroxynitrit sowie das Hydroxylradikal, u. a. über Energiedepression der Zelle durch überschießende Aktivierung des sehr energieintensiven PARP-DNA-Reparatursystems [15, 128].

Außerdem ist NO unter anderem an der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen wie M. Alzheimer, Chorea Huntington [32] und HIV-Demenz [2, 36] beteiligt.

Im peripheren Nervensystem stellt NO den lange Zeit unbekanntem Transmitter der NANC-Neurone (nicht-adrenerg-nicht-cholinerg) [131] dar und vermittelt die Motilität und Peristaltik des Gastrointestinaltrakts sowie die penile Erektion [24]. NOS-I-Knockout-Mäuse sind auch ein Tiermodell für die pädiatrisch bedeutsame infantile hypertrophe Pylorusstenose [33, 164].

### **1.2.3.3 NO im Immunsystem**

Im Immunsystem hat NO eine zentrale Funktion als direkt chemisch wirkendes Agens bei der unspezifisch-zellulären Immunabwehr von intrazellulären Bakterien und Parasiten, wie z. B. *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania major* und *Toxoplasma gondii*, durch Makrophagen und andere Leukozyten [139, 141]. Die dafür notwendigen hohen NO-Konzentrationen können

nur durch die High-Output-NOS-II bereitgestellt werden [133]. Die Expression dieser immunologischen Isoform NOS-II wird durch Entzündungsmediatoren (Interleukine, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) oder Endotoxine (bakterielle Lipopolysaccharide) induziert. Einer ebenfalls tumoriziden Wirkung von aktivierten Makrophagen via NO steht eine kanzerogene bzw. mutagene Rolle von NO gegenüber [141, 155, 166]. Pathogenetisch ist NO bei einer Reihe von Autoimmunerkrankungen beteiligt, z. B. beim Diabetes mellitus Typ I, bei der Immunkomplex-Nephritis sowie bei Arthritiden [141]. Auch bei der Transplantatabstoßung spielt NO eine Rolle [141].

## **1.3 Neurobiologische Grundlagen von Lernen und Gedächtnis**

### **1.3.1 LTP als ein wesentlicher Mechanismus neuronaler Plastizität**

In den vergangenen 20 Jahren setzte sich innerhalb der Neurowissenschaften die Erkenntnis durch, dass das adulte zentrale Nervensystem, und hier besonders die Großhirnrinde, zur strukturellen und funktionellen Flexibilität bzw. Neuorganisation [34] fähig ist. Für diese Eigenschaft wurde der Begriff „Neuronale Plastizität“ geprägt.

Auf zellulärer Ebene wurden drei Hauptmechanismen neuronaler Plastizität identifiziert [34, 42]:

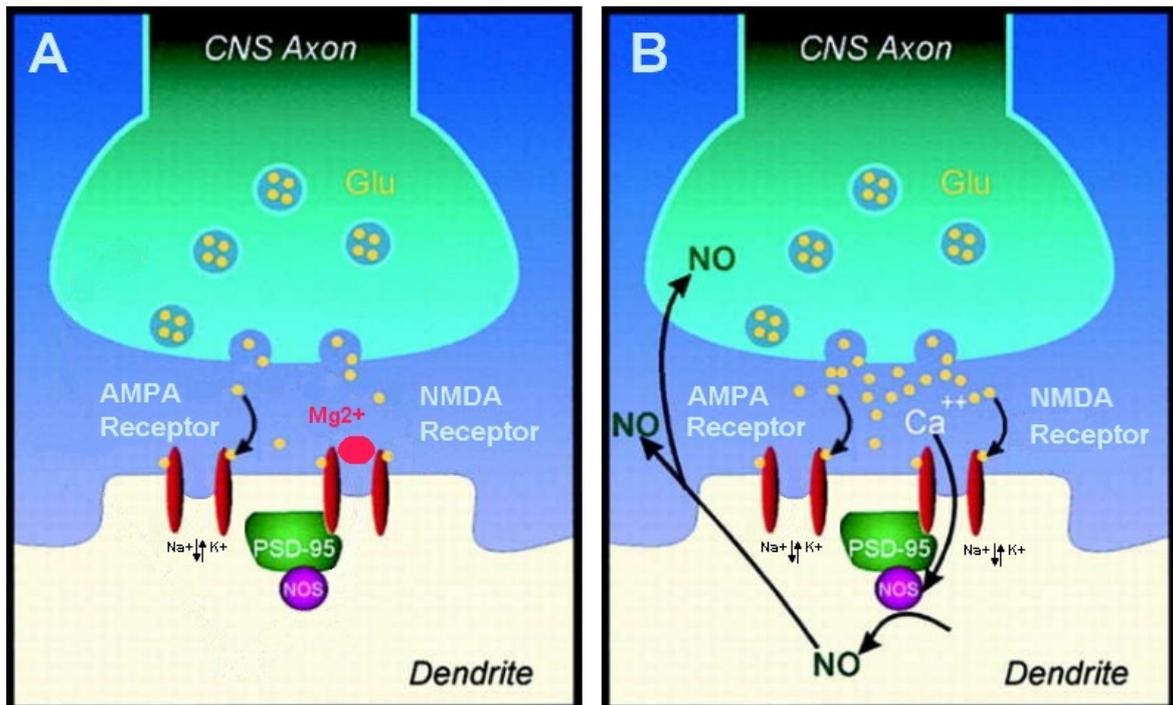
- a) Veränderung der Balance zwischen Inhibition und Exzitation
- b) Veränderung der Effizienz synaptischer Übertragung, u. a. Long-term Potentiation (LTP) bzw. Long-term Depression (LTD)
- c) Strukturell-morphologisch fassbare Veränderungen (z. B. adulte Neurogenese).

Diese Mechanismen entsprechen den bisher bekannten zellulären Vorgängen von Lernen und Gedächtnis. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Mittelpunkt stehende adulte Neurogenese ist eine strukturell-morphologische Form (c) neuronaler Plastizität. Kategorie (c) können ferner das Wachstum von Axonen [81] und Axonverzweigungen [69] und die Synaptogenese bzw. Neuentstehung von Synapsen [92] zugeordnet werden. All diese strukturellen Veränderungen treten erst mit längerer zeitlicher Latenz ein, gewöhnlich über Wochen bis Monate.

Ein sehr bedeutender Mechanismus neuronaler Plastizität ist die Veränderung der Effizienz der Übertragung an synaptischen Kontaktstellen zwischen Neuronen (b). Der kanadische Psychologe D. Hebb [73] hatte bereits 1949 aufgrund theoretischer Überlegungen postuliert, dass die andauernde Veränderung synaptischer Übertragungseffizienz ein Lernen und Gedächtnis zugrunde liegender Mechanismus sein könnte. Die lange (über Stunden, Tage und Wochen [16, 45]) anhaltende Verstärkung synaptischer Übertragung (Long-term Potentiation, Langzeitpotenzierung, LTP) wurde 1973 von Bliss und Lomo im Hippokampus tatsächlich experimentell beschrieben [17] und kommt dort im Gyrus dentatus und den Regionen CA1 und CA3 vor [94] (siehe auch Abb. 1.10). LTP wurde in der Folgezeit in verschiedenen weiteren Hirnregionen nachgewiesen, z. B. im auditorischen, im somatosensorischen und visuellen Kortex, im Motorkortex, im Striatum und Kleinhirn [9, 10, 77, 94]. Assoziative LTP (als eine von mehreren LTP-Formen) entsteht [34], wenn ein afferenter Impuls auf ein postsynaptisches Neuron trifft, aber nur dann, wenn entweder gleichzeitig ein weiterer afferenter Impuls auf dieselbe Zelle trifft oder wenn die postsynaptische Zelle zumindest unterschwellig depolarisiert wird.

Auch eine lang anhaltende Abschwächung der synaptischen Übertragungsstärke (Long-term Depression, LTD) existiert, z. B. an Purkinje-Zellen des Kleinhirns [45]. LTP und LTD gelten gegenwärtig als wesentliche zellphysiologische Mechanismen von Lernen und Gedächtnis.

Auf molekularer Ebene [45] ist LTP im Hippokampus, hierbei am intensivsten in der CA1-Region studiert [43], an den NMDA-Rezeptor gebunden. Im Rahmen dieser Darstellung kann nicht näher auf die ausgefeilten molekularen Mechanismen von LTP eingegangen werden (vgl. [45, 74, 91, 117, 132, 151]). Für die vorliegende Arbeit ist jedoch höchst interessant, dass NO bei LTP als retrograder Messenger eine Rückkoppelung vom postsynaptischen zum präsynaptischen Neuron und damit eine dauerhafte Verstärkung des neu ausgebildeten synaptischen Pfades herstellt: NO wird postsynaptisch NMDA-Rezeptor-vermittelt und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig über NOS-I (analog zu Abb. 1.7) und möglicherweise NOS-III synthetisiert und diffundiert in die präsynaptische Nervenendigung, wo es via cGMP-Bildung die Transmitterausschüttung verbessert (Abb. 1.8).



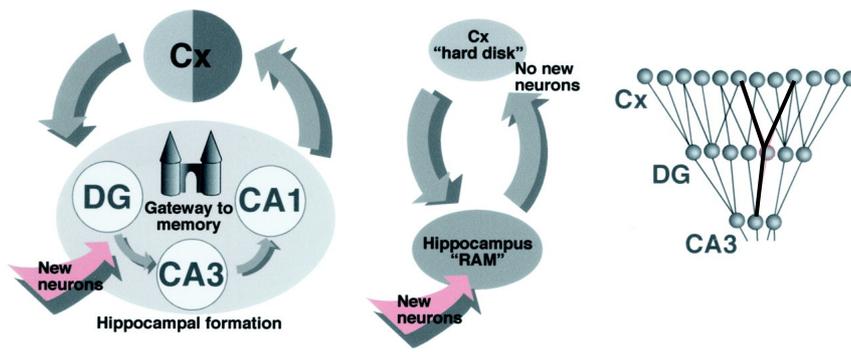
**Abb. 1.8.** NO als retrograder Messenger bei Langzeitpotenzierung (LTP) an glutamatergen Synapsen im Hippokampus (modifiziert nach [45, 91, 132], Erläuterungen siehe Text). AMPA- und NMDA-Rezeptoren als Subtypen des Glutamat-Rezeptors und NOS-I (bzw. möglicherweise NOS-III) spielen eine entscheidende Rolle. Weitere molekulare Details können der Literatur [45, 74, 91, 117, 132, 151] entnommen werden.

### 1.3.2 Lernen und Gedächtnisbildung im Hippokampus – funktionelle Aspekte der adulten Neurogenese

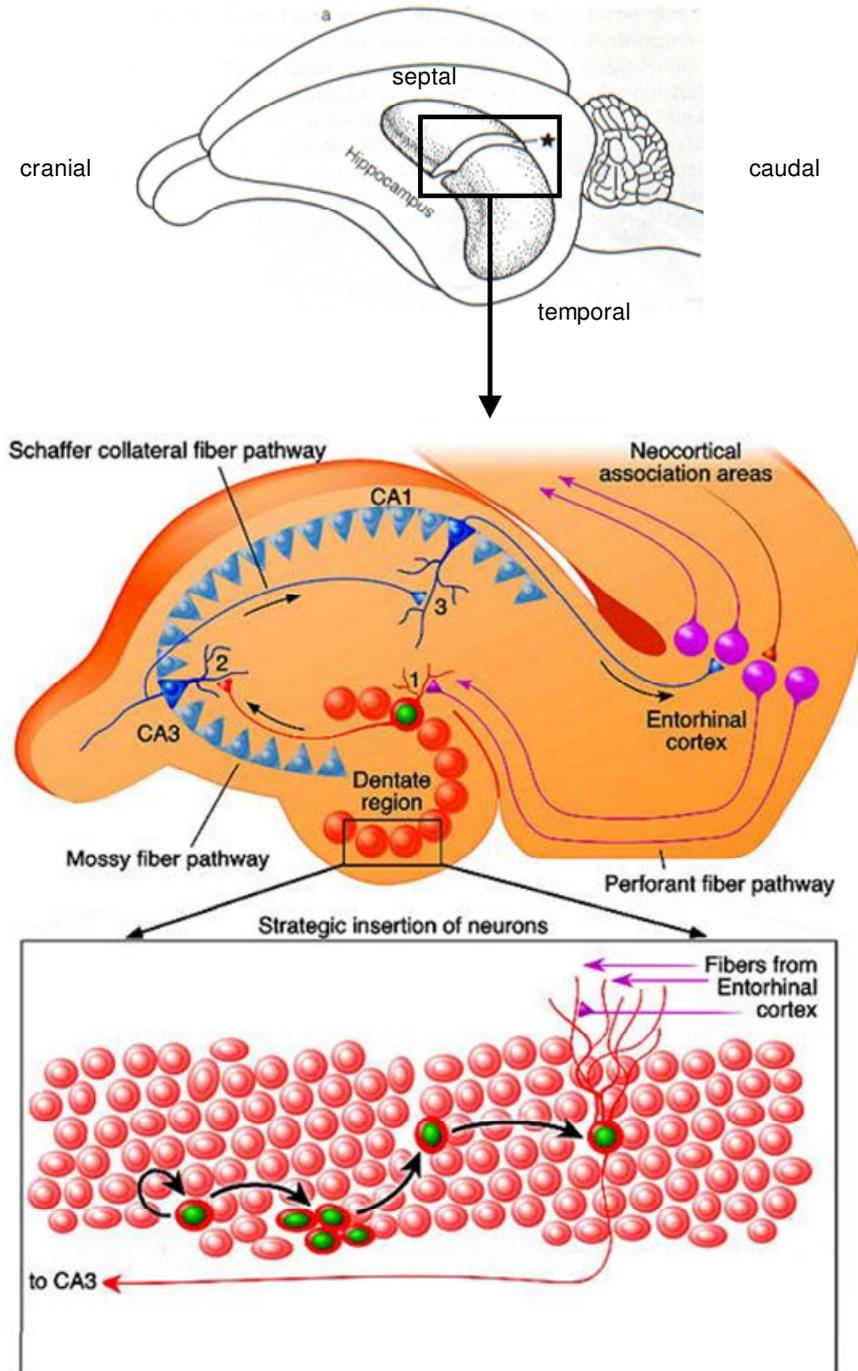
Der Hippokampus, eine zum größten Teil im medialen Temporallappen gelegene [159], entwicklungsgeschichtlich alte Hirnstruktur, hat eine bedeutende Funktion bei der Einspeicherung von Informationen ins deklarative Gedächtnis [16]. Das menschliche Langzeitgedächtnis besteht nach aktuellen Konzepten [79, 107] aus vier Entitäten: Das episodische (autobiographische Ereignisse) und das semantische Gedächtnis (Wissensgedächtnis) können unter dem Oberbegriff deklaratives bzw. explizites Gedächtnis eingeordnet werden, da eine bewusste Wiedergabe von Fakten und Episoden realisiert wird ("wissen, dass"). Drittens

gehören das prozedurale Gedächtnis (motorische Fertigkeiten, Handlungsabläufe und Handlungsstrategien) und viertens das Priming (erleichtertes Erinnern bzw. Wiedererkennen von früher wahrgenommenen Reizmustern) zum nicht-deklarativen bzw. impliziten Gedächtnis, bei dem nicht genau beschrieben werden kann, wie die zum Teil subkortikal abgelegten Handlungsabläufe oder -strategien im Einzelnen ablaufen ("wissen, wie") [79]. Sowohl für die Einspeicherung in die Gedächtnissysteme als auch für den Abruf aus ihnen sind unterschiedliche, jeweils eng umgrenzte Hirnregionen zuständig, z. B. das limbische System mit dem Hippokampus zur Einspeicherung in das semantische und vor allem in das episodische Gedächtnis. Bei diesen Hirnregionen handelt es sich um Flaschenhalsstrukturen, die von allen Informationen passiert werden müssen und die besonders vulnerabel für Hirnschädigungen sind [107] (z. B. anterograde Amnesie durch bilaterale Hippokampusläsion [16]). Die eigentliche Speicherung von Gedächtnisinhalten über längere Zeiträume stellt man sich modellhaft dergestalt vor, dass Informationen vergleichsweise robust über das Aktivitätsmuster und die Stärke synaptischer Verbindungen (LTP) in ausgedehnten Neuronenverbänden abgelegt sind, die den gesamten Neokortex umspannen [84, 107].

Der Hippokampus bereitet als Zwischenspeicher (vgl. RAM in der Informationstechnologie) deklarative Gedächtnisinhalte für die Langzeitspeicherung im Kortex („Festplatte“) vor und bündelt sie [84]. Dazu ist er über den entorhinalen Kortex reziprok mit dem Neokortex (Assoziationsareale) verbunden [16] (Abb. 1.9 und 1.10). Auf molekularer Ebene spielt bei dieser Gedächtniskonsolidierung NMDA-Rezeptor-vermittelte assoziative LTP, u. a. in der CA1-Region des Hippokampus, eine entscheidende Rolle [16, 142].



**Abb. 1.9.** Gateway-to-memory-Theorie nach Kempermann zur Funktion der adulten Neurogenese im Hippokampus ([84], Erläuterungen siehe Text)



**Abb. 1.10.** Funktionelle Anatomie des Hippokampus (modifiziert nach [3, 6, 152]) – im Gyrus dentatus an strategischer Stelle platzierte neue Nervenzellen (Bild unten). Der Hilus des Gyrus dentatus entspricht der Region CA4.

Nach dem deutschen Neurogenese-Forscher Kempermann könnte interessanterweise eine Funktion der adulten Neurogenese im Hippokampus darin

bestehen, dass die neuen Neurone zu einer Leistungssteigerung der Prozesseinheit Hippokampus beitragen, indem sie an strategisch günstigen Positionen dieser Flaschenhalsstruktur eingefügt werden (Gateway-to-memory-Theorie [84]). Die Abb. 1.9 und 1.10 zeigen, dass der kortikale Input via entorhinalen Kortex und Perforant Path auf nur ca. 250 000 Körnerzellen des Gyrus dentatus (in der Maus [84]) konvergiert und von dort über den Moosfaser-Pathway zur Region CA3 und weiter über die Schaffer-Kollateralen zur Region CA1 geleitet wird. Von CA1 fließt die Information zurück zum entorhinalen Kortex und schließlich zum Neokortex. Die adulte Neurogenese im Gyrus dentatus findet bemerkenswerterweise an einer der beiden engsten Stellen (Gyrus dentatus und CA3) dieses Flaschenhalses statt. Hier können relativ wenige neu gebildete Nervenzellen signifikant die Komplexität erhöhen, zu deren Verarbeitung das Netzwerk in der Lage ist [84].

Insgesamt wird damit der adulten Neurogenese eine Funktion beim hippocampusabhängigen, deklarativen Lernen zugeschrieben. Hierzu passt die Beobachtung sehr gut, dass bei Vögeln das Ausmaß der adulten Neurogenese mit dem Vorhandensein von Lernaufgaben (Lernen von Liedern, Einprägen von Futterverstecken) korreliert (vgl. 1.1.5). Shors et al. [148] konnten außerdem zeigen, dass die Hemmung der hippocampalen Neurogenese durch einen chemischen Inhibitor des Zellzyklus (MMA) zu Defiziten beim hippocampusabhängigen Lernen (Einprägen von Orten) führte. Schließlich zeigen auch die Versuche von van Praag et. al. [162] eine Korrelation von Lernen und adulter hippocampaler Neurogenese: Laufen führte bei Mäusen zu einer parallelen Zunahme von adulter Neurogenese, LTP und Lernleistung. Dass eine Rolle der adulten Neurogenese bei Lernvorgängen vorhanden, jedoch weitaus komplexer ist, als bisher angenommen, zeigt die sehr differenzierte Arbeit von Döbrössy et al. [41]: Bei einem hippocampusabhängigen Lernparadigma (Water Maze), bei dem sich Ratten eine Plattform in einem Wasserbecken einprägen mussten, ließ sich eine Anfangsphase des Lernens mit raschen Fortschritten von einer Endphase unterscheiden, in der die Lernperformance nur noch marginal gesteigert werden konnte. BrdU-Markierung in der Endphase zeigte eine gesteigerte Proliferations- und Survivalrate im Gyrus dentatus an. Die End- oder Konsolidierungsphase des Lernens führte jedoch überraschenderweise zu einer Abnahme des Survivals

derjenigen Zellen, die in der Anfangsphase gebildet worden waren. Global über beide Phasen hinweg konnte netto keine Zunahme der adulten Neurogenese durch das Lernen gezeigt werden. Das erneute Untergehen von initial gebildeten neuen Zellen wird als Suppression von Neuronen aufgefasst, die während des Lernprozesses keine brauchbaren synaptischen Verbindungen ausbilden konnten. Die Lernperformance war sogar umso besser, je mehr initial entstandene Neurone in der Konsolidierungsphase rückgebildet wurden.

Eine Zunahme des Survivals von neu gebildeten Zellen des Gyrus dentatus durch Training im Water Maze konnte von Gould et al. [63] festgestellt werden. Dabei handelt es sich jedoch wohl um vor der Lernaufgabe entstandene Zellen [41]. Insgesamt wird die Beteiligung der adulten hippocampalen Neurogenese an hippocampusabhängigen Lernvorgängen deutlich. Wie die mosaikartigen, zum Teil konträren Einzelbefunde in einen stimmigen Gesamtmechanismus eingeordnet werden können, müssen kommende Studien zeigen.

#### **1.4 Zusammenhänge zwischen dem NO-Signalweg und der adulten Neurogenese**

Aus den bisher dargestellten Grundlagen ergeben sich mögliche Verbindungen zwischen Stickstoffmonoxid und der adulten hippocampalen Neurogenese.

Adulte Neurogenese spielt eine komplexe, erst in Ansätzen verstandene Rolle bei Lernvorgängen (im engeren Sinn bei hippocampusabhängigen Lernparadigmen, vgl. Kap. 1.3) [41, 63, 84, 148]. Auch NO hat eine wichtige Funktion bei Lernvorgängen, da es der retrograde Messenger von LTP ist, dem bisher am besten verstandenen zellulären Mechanismus von Lernen. Rickard et al. [137] konnten außerdem zeigen, dass die Inhibition von NOS durch DPI die Gedächtniskonsolidierung bei jungen Hühnern hemmt.

Neben dem gemeinsamen Bezug zu Lernvorgängen besteht zwischen adulter Neurogenese und dem NO-Signalweg auch ein enger örtlicher Kontext: NOS-III kann in Gefäßendothelzellen des Gyrus dentatus nachgewiesen werden [135]. Durch NOS-III synthetisiertes NO kann als gasförmiger, parakriner Botenstoff in die benachbarten Stammzellen der adulten Neurogenese diffundieren (sog. vaskuläre Nische der adulten Neurogenese [121]).

NO ist außerdem an der Synapto- und Morphogenese des ZNS entscheidend beteiligt [21, 35], eine Rolle von NO auch bei strukturellen neuroplastischen Veränderungen im adulten Organismus ist somit durchaus vorstellbar.

Aus diesen Gemeinsamkeiten der Physiologie von NO und der adulten Neurogenese ergibt sich die Hypothese, dass NO, und speziell durch NOS-III synthetisiertes NO, die adulte Neurogenese im Gyrus dentatus des Hippokampus regulieren könnte. Einige Studien mit überwiegend pharmakologischem Ansatz wiesen bereits in diese Richtung: Zhang et al. [169] konnten z. B. zeigen, dass ein NO-Donor (DETA/NONOat) dosisabhängig zu einer Zunahme der adulten Neurogenese, u. a. im Gyrus dentatus, führt. Dies gilt sowohl für native Ratten als auch nach artifiziell ausgelösten Schlaganfällen (ipsilateraler Verschluss der A. cerebri media). Zhu et al. [173] berichten, dass die adulte Neurogenese im Gyrus dentatus nach fokaler zerebraler Ischämie zunimmt und mit NOS-II-Expression assoziiert ist.

## 2. Fragestellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des durch NOS-III synthetisierten Signalmoleküls NO auf die adulte Neurogenese im Gyrus dentatus (Hippokampus) der Maus untersucht. In der vorliegenden Studie wurde dazu ein genetischer Ansatz gewählt. Homozygote NOS-III-Knockout-Mäuse wurden mit Wildtypen bezüglich der Rate neu gebildeter Zellen im Gyrus dentatus des Hippokampus verglichen (Proliferationsrate). Das Zeitfenster zwischen In-vivo-Markierung mit BrdU und Tötung der Tiere wurde dabei so weit gewählt (6 Tage), dass neben der reinen Proliferationsrate (24h) auch gewisse Aussagen über die Differenzierung bzw. den Verbleib der neu gebildeten Zellen (Zeitraum bis 4 Wochen) möglich waren.

Weiterhin sollten der Einfluss morphometrischer Daten auf die adulte Neurogenese bei NOS-III-Knockout-Tieren und Wildtypen untersucht werden. Dazu gehörten u. a. die Parameter Alter und Geschlecht der Tiere. Das Volumen von Substrukturen des Gyrus dentatus konnte zudem zwischen den beiden NOS-III-Genotypen verglichen werden.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Material

Während der Laborarbeiten im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Chemikalien, Geräte, biologisches Material etc. verwendet.

#### 3.1.1 Chemikalien

Borsäure (Pufferqualität)	AppliChem, Darmstadt
BrdU (5-Bromo-2-deoxy- uridin)	Roche Diagnostics, Mannheim
DAB Substrate DAB/Metal Concentrate (10x conc.) sowie Peroxide Buffer	Boehringer Mannheim
Ethanol, absolut	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Natriumazid	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Natriumchlorid, reinst	Merck, Darmstadt
NHS (Normal Horse Serum)	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
Peroxidase VECTASTAIN ABC (Avidin-Biotin- Complex)-Kit, Standard PK-4000	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Salzsäure (HCl) 5 N	Combi-Titrisol, Merck, Darmstadt
TRIS (Pufferan, p. a.)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100 (t-Octylphenoxy-poly- ethoxyethanol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Wasserstoffperoxid 30% (medizinisch reinst, stabilisiert)	Merck, Darmstadt

Wasserstoffperoxid 30% (stabilized)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Vitro-Clud (Einschlussmittel für mikroskopische Technik)	R. Langenbrinck, Emmendingen
Xylol, reinst (Isomeregemisch)	Merck, Darmstadt

### 3.1.2 Antikörper

#### Primärantikörper:

Anti-Bromodeoxyuridin(BrdU)- Antikörper (Maus IgG1, monoklonal)	Roche Diagnostics, Mannheim
---	-----------------------------

#### Sekundärantikörper:

Biotinylierter Anti-Maus-IgG- (H+L)-Antikörper (in Ziege hergestellt)	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
---	---

### 3.1.3 Puffer und Lösungen

Blocklösung 1	5% NHS 0,25% Triton X-100 2% BSA
---------------	--

Blocklösung 2	2% NHS 0,25% Triton X-100 2% BSA
---------------	--

Borsäure 0,1 M, auf pH 8,5 eingestellt

Cresylviolett	83 ml einer 10%igen Essigsäure auf 1000 ml aqua dest. + 0,1 % Cresylviolett
---------------	--

Ethanol 70%

Ethanol 95%  
 Ethanol 96%  
 Natriumazid 10%  
 Natriumazidlösung 0,05 % in PBS  
 Natriumazidlösung 0,05 % in TBS pH 7,5  
 Natriumchloridlösung (0,9%ig, steril, zur Injektion)  
 Paraformaldehydlösung (4% PFA in PBS)

PBS 10x	0,137 M NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> BioWhittaker Europe, Verviers, Belgien
---------	---

Pufferlösung pH 7,00	Merck, Darmstadt
Pufferlösung pH 9,00	Merck, Darmstadt

SSC 20x	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat
---------	---------------------------------

TBS pH 7,5	0,15 M NaCl 0,1 M Tris-HCl
------------	-------------------------------

### 3.1.4 Geräte und Software

#### Geräte:

Digitalkamera (für Mikroskop) CCD KP-C551 Color Camera	Hitachi Denshi Ltd., Japan
Inkubationsbox (4 x 6 Wells) NUNC Multidish	NUNC GmbH, Wiesbaden
Inkubator GFL 1083 (heizbar, Schüttelvorrichtung)	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg

Magnetrührer GLW M32	Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg
Magnetrührer IKAMAG RCT	Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen
Mikroskop Leica Leitz	Leica Mikroskopie & Systeme, Wetzlar
DMRBE	
Objektive:	
2,5 x	
5 x 0,12	
10 x 0,30	
20 x 0,50	
40 x 0,70	
Milli-Q Water System	Millipore S.A., Molsheim, Frankreich
pH-Meter WTW pH 530	Wissenschaftlich-technische Werkstätten, Weilheim
Schüttler IKA-Vibrax-VXR	Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen
Vibratom 752 M Vibroslice	Campden Instruments Ltd., Sileby, UK
Waage BP 1200	Sartorius AG, Göttingen

Software:

DigiTrace Applikationssystem, V 2.22	IMATEC Elektronische Bildanalyzesysteme GmbH, Miesbach
Microsoft Excel 2002 SP-2	Microsoft GmbH, Unterschleißheim
Microsoft Word 2002 SP-2	Microsoft GmbH, Unterschleißheim

**3.1.5 Sonstiges**

Deckgläser 24 x 50 mm	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg
Film (Kodak Ektachrome 64 T)	Kodak Limited, UK
Klingen (Valet Blades)	World Precision Instruments Inc., Sarasota, USA
Objektträger (Super Frost Plus, 25 x 75 x 1,00 mm)	Menzel-Gläser, Braunschweig
Sterilfilter FP 30/0,2 CA-S, gebrauchsfertige Filtereinheit	Schleicher & Schüll GmbH, Dassel

### 3.1.6 Biologisches Material

Für die Anfertigung von Gehirnschnitten der Hippokampusregion wurden 19 BL6-Mäuse verwendet, davon 9 NOS-III-Knockout-Mäuse (homozygot, NOS-III -/-; rückgekreuzte Tiere des Originalstamms von Shesely und Mitarbeitern [147]) und 10 Wildtypiere (NOS-III +/+). Der Genotyp jedes einzelnen Tieres wurde mittels PCR bestätigt. Die allesamt gesunden,  $31,0 \pm 3,0$  Wochen alten, adulten Tiere zeigten sich in ihrem Verhalten unauffällig. Sie waren einem natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus ausgesetzt und hatten freien Zugang zu Nahrung und Wasser. Die Knockout-Tiere waren identischen Umgebungsbedingungen (Standard-Unterbringungsbedingungen) ausgesetzt wie die Wildtypiere. Die NOS-III-Knockout-Mäuse wurden in Standardkäfigen zu je 1 bis 4 gleichgeschlechtlichen Tieren, die Wildtypmäuse in ebensolchen Käfigen zu je 1 bis 5 gleichgeschlechtlichen Tieren zusammengehalten. Für das Projekt der vorliegenden Arbeit war durch die zuständigen Stellen (Universität Würzburg, Regierung von Unterfranken) ein Tierschutzantrag genehmigt worden. Die Versuchstiere wurden von der Aufzucht bis zur Tötung nach den Regeln des Tierschutzes behandelt.

Tab 3.1 zeigt die Daten der Tiere in der Übersicht:

**Tab. 3.1.** Biometrische Daten und Genotyp der Versuchstiere

Laufende Nummer	Code-nummer	Genotyp	Geschlecht	Gewicht bei BrdU-Injektion (g)	Geburtsdatum	Datum der Tötung	Alter bei Tötung (Wochen)
L1	C18	NOS-III -/-	f	31,6	11.04.01	24.12.01	36,7
L2	C1	NOS-III -/-	m	28,2	02.05.01	24.12.01	33,7
L3	C3	NOS-III -/-	m	28,2	02.05.01	24.12.01	33,7
L4	C7	NOS-III -/-	m	30,6	02.05.01	24.12.01	33,7
L5	C6	NOS-III -/-	m	29,6	21.06.01	24.12.01	26,6
L6	C19	NOS-III +/+	m	36,1	14.05.01	24.12.01	32,0
L7	C2	NOS-III +/+	m	36,4	14.05.01	24.12.01	32,0
L8	C4	NOS-III +/+	m	35,4	14.05.01	24.12.01	32,0
L9	C5	NOS-III +/+	m	35,2	14.05.01	24.12.01	32,0
L10	C9	NOS-III +/+	m	33,8	24.05.01	24.12.01	30,6
L11	C10	NOS-III -/-	f	24,9	21.06.01	24.12.01	26,6
L12	C8	NOS-III -/-	f	28,8	21.06.01	24.12.01	26,6
L13	C12	NOS-III -/-	f	26,1	21.06.01	24.12.01	26,6
L14	C16	NOS-III -/-	f	24,5	21.06.01	24.12.01	26,6

L15	C11	NOS-III +/-	f	25,0	14.05.01	24.12.01	32,0
L16	C17	NOS-III +/-	f	25,3	14.05.01	24.12.01	32,0
L17	C13	NOS-III +/-	f	24,7	14.05.01	24.12.01	32,0
L18	C15	NOS-III +/-	f	26,0	14.05.01	24.12.01	32,0
L19	C14	NOS-III +/-	f	23,7	14.05.01	24.12.01	32,0

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 In-vivo-Markierung neu entstehender Hippokampusneurone mit Bromodeoxyuridin (BrdU)

Den Versuchstieren wurde 4 x 75 mg/kg KG BrdU in 4 Einzelinjektionen im Abstand von 2 Stunden intraperitoneal injiziert. Nach 6 Tagen wurden die Tiere getötet und die Gehirne zur immunhistochemischen Aufarbeitung entnommen.

Zur Injektion wurde eine BrdU-Lösung (10 mg/ml) in 0,9% NaCl steril filtriert (Sterilfilter FP 30/0,2 CA-S) und auf 37 °C erwärmt. Bei einer zu applizierenden BrdU-Dosis von 75 mg/kg Körpergewicht wurden den  $29,2 \pm 4,4$  g schweren Mäusen im Mittel  $218,9 \pm 33,0$  µl einer 10 mg/ml-BrdU-Lösung pro Einzelinjektion i. p. injiziert. Das zu injizierende Volumen an 10 mg/ml-BrdU-Lösung wurde für jedes einzelne Versuchstier anhand des Gewichts des Tieres berechnet (vgl. Tab. 3.2). Die Injektionen wurden ohne Äthernarkose durchgeführt, was für die Tiere schonender ist.

**Tab. 3.2.** BrdU-Injektionen der Versuchstiere

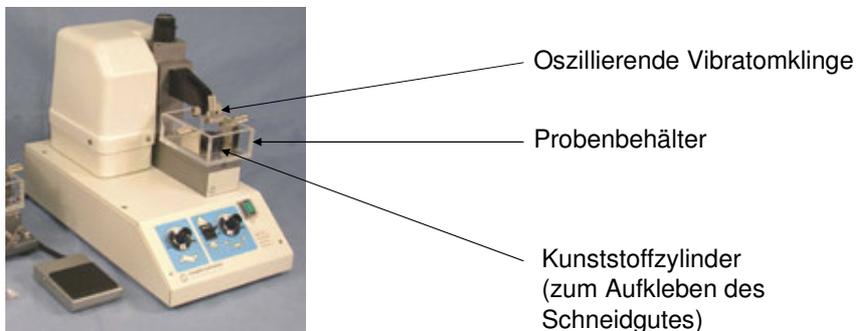
Laufende Nummer	Code-nummer	Genotyp	Geschlecht	Geburtsdatum	Alter bei BrdU-Injektion In Tagen	Gewicht in g	Volumen an injizierter BrdU-Lösung in µl
L1	C18	NOS-III -/-	f	11.04.01	251	31,6	4 x 237
L2	C1	NOS-III -/-	m	02.05.01	230	28,2	4 x 212
L3	C3	NOS-III -/-	m	02.05.01	230	28,2	4 x 212
L4	C7	NOS-III -/-	m	02.05.01	230	30,6	4 x 230
L5	C6	NOS-III -/-	m	21.06.01	180	29,6	4 x 222
L6	C19	NOS-III +/-	m	14.05.01	218	36,1	4 x 271
L7	C2	NOS-III +/-	m	14.05.01	218	36,4	4 x 273
L8	C4	NOS-III +/-	m	14.05.01	218	35,4	4 x 266
L9	C5	NOS-III +/-	m	14.05.01	218	35,2	4 x 264

L10	C9	NOS-III +/+	m	24.05.01	208	33,8	4 x 254
L11	C10	NOS-III -/-	f	21.06.01	180	24,9	4 x 187
L12	C8	NOS-III -/-	f	21.06.01	180	28,8	4 x 216
L13	C12	NOS-III -/-	f	21.06.01	180	26,1	4 x 196
L14	C16	NOS-III -/-	f	21.06.01	180	24,5	4 x 184
L15	C11	NOS-III +/+	f	14.05.01	218	25,0	4 x 188
L16	C17	NOS-III +/+	f	14.05.01	218	25,3	4 x 190
L17	C13	NOS-III +/+	f	14.05.01	218	24,7	4 x 185
L18	C15	NOS-III +/+	f	14.05.01	218	26,0	4 x 195
L19	C14	NOS-III +/+	f	14.05.01	218	23,7	4 x 178

Die Mäuse wurden 6 Tage nach den BrdU-Injektionen durch Einleitung von Kohlendioxid in ein Glasgefäß getötet und die Gehirne entnommen. Diese wurden 4 Tage bei 4 °C in frisch hergestellter 4%iger Paraformaldehydlösung in PBS (pH 7,4) fixiert, nach Ablauf dieser Zeit 5 x 15 Min. in PBS gewaschen und in 0,05 %iger Natriumazidlösung in PBS bei 4 °C aufbewahrt. Der Azidanteil wirkt als Schutz vor mikrobiologischem Abbau des fixierten Gewebes.

### 3.2.2 Anfertigung von histologischen Schnitten des Gyrus dentatus des Hippokampus

Zur Herstellung von 40 µm dicken Gewebsschnitten der Hippokampusregion wurde ein Vibratom 752 M Vibroslice (Campden Instruments) verwendet. Abb. 3.1 zeigt ein vergleichbares Modell.



**Abb. 3.1.** Vibratom

Das zu schneidende Gewebe wurde mit Sekundenkleber auf den Kunststoffzylinder des Einsatzes (Abb. 3.1) geklebt, der in den mit TBS-Pufferlösung gefüllten Probenbehälter geschraubt wird. Die Geschwindigkeit der horizontalen Oszillation des Messers sowie die Geschwindigkeit des Vorschubs des Probenbehälters können am Gerät eingestellt werden.

Für jedes zu schneidende Gehirn wurde eine neue Klinge eingesetzt. Zum Sammeln der Hirnschnitte wurden Kunststoffgefäße mit 24 Wells vorbereitet. Als ideal geeignet erwiesen sich Gefäße mit 4 x 6 Wells, da bei diesen jeder sechste Schnitt als eine komplette Viererreihe zum Färben entnommen werden kann. Die Sammelgefäße wurden mit ca. 1 ml 0,05%iger Natriumazidlösung in TBS pro Well befüllt.

Der Probenbehälter wurde dann mit TBS pH 7,5 bis ca. 0,5 cm unter die Oberkante aufgefüllt.

Mit einem Skalpell wurde das Kleinhirn vom Großhirn abgetrennt. Mit einem zweiten, genau frontal verlaufenden Schnitt wurde eine 1-2 mm dicke Scheibe vom frontalen Ende des Gehirns entfernt. Das Gehirn wurde dann mit der Frontalseite im 45°-Winkel zur Schnittrichtung auf die mit einigen Tropfen Sekundenkleber versehene Mitte des Kunststoffzylinders aufgesetzt. Nach Aushärten des Klebstoffs (3 Minuten) wurde der Einsatz mit dem aufgeklebten Gehirn waagrecht in den puffergefüllten Probenbehälter montiert.

Am Vibratom wurden die Parameter Speed Control Blade und Speed Control Bath Advance mit den Werten 6 bzw. 2 eingestellt.

Von einer Ausgangsposition einige Millimeter oberhalb des Gehirns erfolgte mittels Probeschnitten im 100µm-Abstand eine Annäherung an das Präparat. Nach dem ersten Anschnitt wurde die Klinge jeweils um die endgültige Schnittdicke von 40 µm gesenkt. Sobald ein vollständiger Frontalschnitt erhältlich war, wurden die Schnitte gesammelt. Dazu wurden sie mit einem dünnen Malpinsel in die Sammelgefäße überführt. Im Verlauf des Schneidens von okzipital nach frontal kommt der Hippokampus durch seine dunklere Pigmentierung bilateral im Bereich der Temporallappen zur Darstellung (zunächst sichelförmig fast in der ganzen Ausdehnung der Temporallappen, später nur noch medio-kraniel). Das Schneiden wurde beendet, sobald der Hippokampus beidseits nur noch punktförmig medial der Seitenventrikel erkennbar war.

### **3.2.3 Immunhistochemischer Nachweis von BrdU**

Um eine Serie von 15 Hippokampusschnitten in fronto-okzipitaler Richtung auszuwählen (jeder 6. Schnitt der seriellen Schnittserie) wurde als Startpunkt ein Schnitt ausgewählt, bei dem der Hippokampus gerade brillenförmig beidseits der Mittellinie erkennbar ist. Die verwendeten 15-Schnitt-Serien stellten den Gyrus dentatus des Hippokampus in der ganzen Ausdehnung dar. Aufgrund der dreidimensionalen Lage des Hippokampus im Gehirn ist die fronto-okzipitale Serie gleichzeitig eine septo-temporale Serie (siehe Abb. 1.10). Für die parallele immunhistochemische Aufarbeitung von drei Versuchstieren wurden drei Färbeboxen mit je mindestens 15 Wells mit ca. 1-2 ml TBS pro Well gefüllt. Jeder sechste Schnitt wurde für eine Färbeserie ausgewählt, in die drei Färbeboxen überführt und auf einer Schüttelvorrichtung 10 Min. in TBS gewaschen.

#### **Versuchsprotokoll für den immunhistochemischen Nachweis von BrdU**

##### **1. 2 x 10 Min. Spülen der 40 µm dicken Vibratomschnitte in TBS (pH 7.5)**

Die Inkubationsschritte 1-15 sowie 17 wurden unter leichtem Schütteln auf einer Schüttelvorrichtung durchgeführt.

**2. Inkubation der Schnitte in 0,6 % Wasserstoffperoxid in TBS bei RT für 30 Min.:** Nach Dekantieren des Waschpuffers wurden 1000 µl einer 0,6%igen Wasserstoffperoxidlösung in TBS in jedes Well pipettiert und die Schnitte darin inkubiert. Dieser Versuchsschritt dient der Blockierung der endogenen Peroxidase, damit der Peroxidase-Nachweis mit DAB am Ende der Färbung nicht gestört wird.

##### **3. 3 x 5 Min. Waschen mit TBS**

**4. Inkubation der Schnitte in 50% Formamid / 2 x SSC bei 65°C für 2 h:** In 1000 µl/Well dieser Lösung wurden die Schnitte im vorgeheizten Wasserbad bei 65°C zwei Stunden inkubiert.

##### **5. 2 x 5 Min. Waschen mit TBS**

**6. Inkubation der Schnitte in 1000 µl/Well 2N-Salzsäure bei 37°C für 30 Min. bei RT:** Die Schritte 4 und 6 dienen der Denaturierung der DNA im

Nervengewebe, so dass das in die DNA eingebaute BrdU vom Anti-BrdU-Antikörper erkannt werden kann.

**7. Spülen in 0,1 M Borsäure (pH 8,5) für 10 Min.:** Ohne einen dazwischen liegenden Waschschriff wurden die Schnitte in je 1 ml der Borsäurelösung gespült.

**8. 3 x 10 Min. Waschen mit TBS**

**9. Inkubation der Schnitte in 750 µl/Well Blocklösung 1 (5% NHS, 0,25% Triton-X-100, 2% BSA in TBS) bei RT für 1 h**

**10. Inkubation mit 1. Antikörper-Lösung (Anti-BrdU; 1:400 verdünnt in Blocklösung 1; 750 µl/Well) bei 4°C über Nacht:** Ein 100µl-Aliquot des Anti-BrdU-Antikörpers wurde dazu mit 40 ml Blocklösung im Verhältnis 1:400 verdünnt.

**11. 3 x 10 Min. Waschen mit TBS**

**12. Inkubation mit 2. Antikörper-Lösung (biotinylierter Anti-Maus-Antikörper, 1:400 verdünnt in Blocklösung 2 (Blocklösung 1 mit nur 2% NHS)) bei RT für 2 h; 750 µl/Well:** Zur Detektion des gebundenen Erstantikörpers wurde ein biotinylierter Anti-Maus-Antikörper als Zweitantikörper verwendet.

**13. 3 x 10 Min. Waschen mit TBS**

**14. Inkubation mit dem AB-Komplex (Avidin-Biotin-Komplex) für 1,5 Stunden bei RT:** Die Schnitte wurden in 750 µl pro Well der frisch angesetzten Lösung des AB-Komplexes inkubiert. Der AB-Komplex muss 30 Min. vorher angesetzt werden.

**15. 3 x 10 Min. Waschen mit TBS**

**16. Peroxidase-Nachweis mit DAB für ca. 5-10 Min.:** Zur Herstellung der DAB-Lösung wurde die DAB-Substratlösung 1:10 in DAB-Substratpuffer verdünnt. Die Hippokampuschnitte wurden in 1 ml DAB-Lösung für 5-10 Min. unter manuellem Schütteln inkubiert. Nach dieser Zeit sollten sich alle Schnitte kräftig braun gefärbt haben.

**17. 3 x 5 Min. Waschen mit TBS:** Nach der Entwicklung mit DAB wurde noch in 3 direkt aufeinander folgenden Waschschriffen für je 5 Min. mit TBS gewaschen, um die Färbung zu stoppen. Die Schnitte wurden dann bis zum Aufziehen auf Objektträger in der 3. Waschlösung bei ca. 5 °C gelagert.

**18. Schnitte auf Objektträger aufziehen und über Nacht trocknen lassen:** Jeweils 3 Schnitte einer Serie wurden in eine mit TBS (pH 7,5) gefüllte Petrischale überführt und mit einem Pinsel auf einen mit Bleistift beschrifteten Objektträger aufgezogen. Danach wurde die überschüssige Flüssigkeit entfernt und der

Objektträger zum Antrocknen des Schnittes kurz abgelegt. Die Objektträger wurden zum Trocknen über Nacht auf eine Münchener Mappe unter den Abzug gelegt.

**19. Objektträger eindecken mit Vitro-Clud:** Die Objektträger wurden zunächst durch eine aufsteigende Alkoholreihe hindurchgeschleust, um die Schnitte von Wasserresten zu befreien (siehe Tab. 3.3). Dann wurden sie unter Verwendung von Vitro-Clud als Eindeckmittel luftblasenfrei mit Deckgläsern abgedeckt.

**Tab. 3.3.** Aufsteigende Alkoholreihe

Reihenfolge	Lösung	Inkubationsdauer
1.	70 % Ethanol	3 Min.
2.	95 % Ethanol	3 Min.
3.	Ethanol abs. 1	3 Min.
4.	Ethanol abs. 2	3 Min.
5.	Xylol 1	3 Min.
6.	Xylol 2	3 Min.
7.	Xylol 3	3 Min.

Auf einer Münchener Mappe wurden die eingedeckten Objektträger einige Tage unter dem Abzug gelagert, so dass keine Xyloldämpfe mehr entweichen konnten.

### **3.2.4 Bestimmung der Zelldichte BrdU-positiver Zellen im Gyrus dentatus des Hippokampus**

Nach dem gegenwärtigen Wissen über die adulte Neurogenese im Hippokampus entstehen die neu gebildeten Nervenzellen in der Subgranulärzone (SGZ) des Gyrus dentatus aus Vorläuferzellen und wandern innerhalb von etwa 4 Wochen in die Körnerzellschicht (KZS) des Gyrus dentatus ein [47, 87]. Die Versuchstiere des vorliegenden Projektes wurden 6 Tage nach der Markierung mit BrdU getötet. Die für diesen Zeitrahmen interessanten Kompartimente sind damit sowohl Subgranulärzone als auch Körnerzellschicht. Die Auswertung erfolgte über die

Bestimmung der Zelldichte BrdU-positiver Zellen in der Subgranulärzone und der Körnerzellschicht zusammen.

Die Zelldichte  $c$  errechnet sich über

$$(1) \quad c = N / V$$

( $N$  = Zellzahl,  $V$  = Volumen),

bzw. über

$$(2) \quad c = N / (A * d)$$

( $A$  = Fläche ,  $d$  = Schichtdicke).

Letztlich erhält man als Zelldichte (Einheit:  $\text{mm}^{-3}$ ):

(3)

$$c = \frac{\Sigma N(\text{BrdU-positiver Zellen in SGZ}) + \Sigma N(\text{BrdU-positiver Zellen in KZS})}{\Sigma A(\text{KZS}) * d}$$

Dabei ist  $d$  die konstante Schichtdicke der histologischen Schnitte ( $40 \mu\text{m}$ ). Die in die Berechnungsformel (3) noch eingehende Flächensumme  $\Sigma A(\text{SGZ})$  wurde näherungsweise mit Null gleichgesetzt, da es sich bei der Subgranulärzone um ein lichtmikroskopisch nicht zu vermessendes, sehr schmales Zellband handelt.

Die Dichteformel (3) gilt nur unter gewissen Voraussetzungen: Die Schichtdicke  $d$  muss konstant sein, was mit dem verwendeten Vibratom gut erreicht werden konnte. Außerdem müssen die verwendeten Reagenzien, insbesondere Primär- und Sekundärantikörper, bis in das Zentrum der  $40 \mu\text{m}$  dicken Schnitte eindringen können. Dazu wurde den Block- und Antikörperlösungen das Detergenz Triton-X zugesetzt, das die Penetration der Reagenzien in die histologischen Schnitte erleichtert.

Ziel der Flächenauswertungen war es, die Summe aller Flächen der Körnerzellschicht ( $\Sigma A(KZS)$  in Gleichung (3)) zu bestimmen. Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden unter einem Lichtmikroskop bei 5-facher Vergrößerung betrachtet und die Region des Gyrus dentatus für jeden Schnitt einer Serie über eine an das Mikroskop angeschlossene Digitalkamera unter dem Programm Digitrace als Grafik eingelesen. Zunächst wurde ein Nativbild des Gyrus dentatus als Digitalbild gespeichert (Abb. 3.2).

Mit Hilfe der Polygonfunktion des Programmes Digitrace können Bildstrukturen durch ein Vieleck manuell umrandet und dann die Polygonfläche berechnet werden. Die Fläche der Körnerzellschicht wurde durch die Flächendifferenz – Fläche von Körnerzellschicht und Hilus (Fläche innerhalb der äußeren Begrenzungslinie in Abb. 3.2) abzüglich der Fläche des Hilus (Fläche innerhalb der inneren Begrenzungslinie in Abb. 3.2) – bestimmt. Alle Einzelflächen wurden in das Programm Microsoft Excel übertragen, die Flächendifferenzen gebildet und die Summe aller Flächen der Körnerzellschicht  $\Sigma A(KZS)$  pro Tier berechnet (Summation über alle 30 gefärbten Gyri dentati beider Hippocampi).



**Abb. 3.2.** Flächenauswertung (Gyrus dentatus, Hippokampus). Die Körnerzellschicht (KZS) des Gyrus dentatus kommt hell in der Form des Buchstaben Lambda zur Darstellung. Die beiden Schenkel des Gyrus dentatus umschließen den Hilus (HI) (CA4). Die Fläche der Körnerzellschicht A(KZS) ergibt sich als Differenz der Flächen innerhalb der äußeren (A(KZS+HI)) und der inneren Begrenzungslinie (A(HI)). Beide Polygonzüge haben eine gemeinsame Basis. Die beiden Flächenangaben sind Beispiele für A(KZS+HI) (oben) und A(HI) (unten) des gezeigten Schnittes.

Bei den am weitesten frontal gelegenen Schnitten ist kein Hilus abgrenzbar. Hier wurde die Körnerzellschicht direkt von einem Polygon umgrenzt.

Unter dem Lichtmikroskop wurden bei 40facher Vergrößerung die durch die immunhistochemische Färbung braun-violett angefärbten, BrdU-positiven Zellen im Gyrus dentatus aller Schnitte gezählt. Um subjektive Einflüsse bei der Zellzählung auszuschließen, wurde die Auswertung verblindet vorgenommen. Charakteristisch für BrdU-positive Zellen ist ihr ovalärer, homogener braun-violetter Zellkern. Gelegentlich können Kerngranula und Mitosestadien beobachtet werden. Axone und Dendriten kommen jedoch bei dieser immunhistochemischen Färbung nicht zur Darstellung. Artefakte können durch ihre homogene, schwarze Färbung abgegrenzt werden, Kristalle erscheinen schillernd, in bernsteinartigem Farbton. Anschnitte kleiner Gefäße erkennt man durch ihre astförmigen Verzweigungen und ihre braun-schwarze Färbung ohne violette Farbnuance.

Die Gesamtzellzahl BrdU-positiver Zellen in SGZ und KZS pro Tier ( $\Sigma N(\text{BrdU-positiver Zellen in SGZ}) + \Sigma N(\text{BrdU-positiver Zellen in KZS})$ ; Gleichung (3)) wurde im Programm Excel für alle 30 Schnitte eines jeden Tieres als Summe berechnet.

### **3.2.5 Darstellung der mikroskopischen Anatomie des Hippokampus mit der Nissl-Färbung**

Um ein Positivbild des Gyrus dentatus mit allen vorhandenen Neuronen und Gliazellen zu erhalten, wurde eine Serie von Vibratomschnitten mit der Nervengewebsfärbung nach Nissl gefärbt. Analog zum Vorgehen bei der

immunhistochemischen Färbung wurde vom Startpunkt ausgehend eine fronto-okzipitale Serie von 15 Hippokampusschnitten ausgewählt (jeder 6. Schnitt) und auf Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden über Nacht getrocknet, danach in eine Färbeküvette überführt und mit Cresylviolettlösung überschichtet. Nach einer Inkubationszeit von ca. 5 Min. wurden die Schnitte unter fließendem destilliertem Wasser gewaschen, danach ca. 0,5 bis 1 Minute mit einer 96%-Ethanol-Eisessiglösung entfärbt. Sodann wurde 2 x 5 Minuten in Xylolbädern inkubiert. Zuletzt wurden die Gehirnschnitte wie oben beschrieben mit Vitro-Clud eingedeckt.

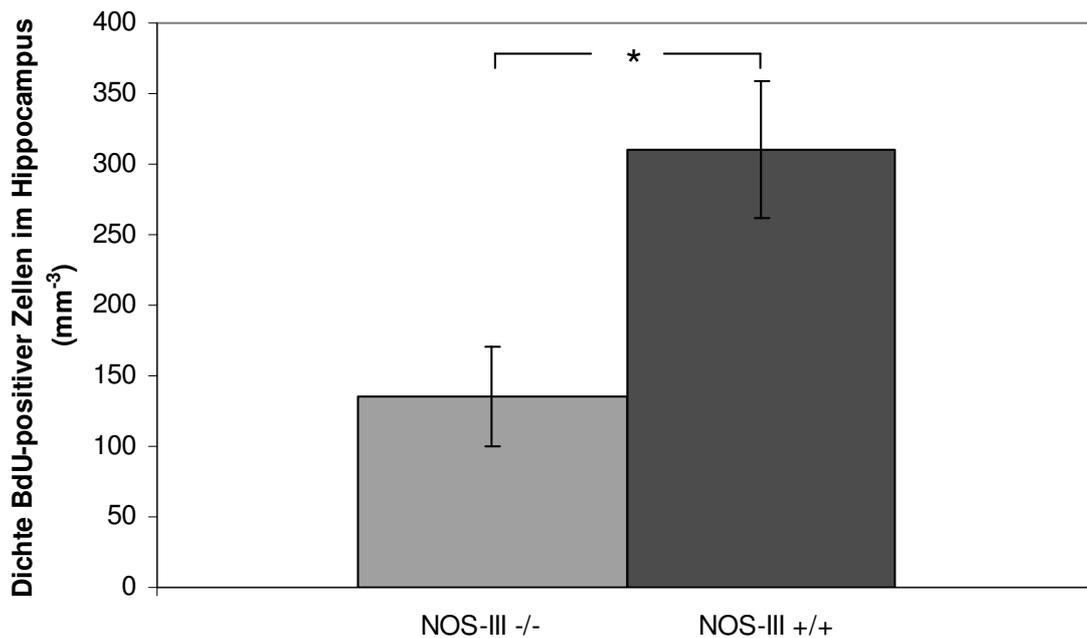
## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Darstellung der mikroskopischen Anatomie**

Zur Darstellung der mikroskopischen Anatomie der Hippokampusregion wurden ausgewählte Schnittserien mit der Nissl-Färbung gefärbt (vgl. Abschnitt 3.2.5). Sowohl bei den NOS-III-Knockout-Mäusen, als auch bei den Wildtyptieren zeigte sich eine regelrechte Anatomie des Gyrus dentatus ohne strukturelle Auffälligkeiten. Insbesondere waren keine Unterschiede in der Morphologie des Gyrus dentatus bei NOS-III-Knockout- im Vergleich zu Wildtyptieren zu erkennen.

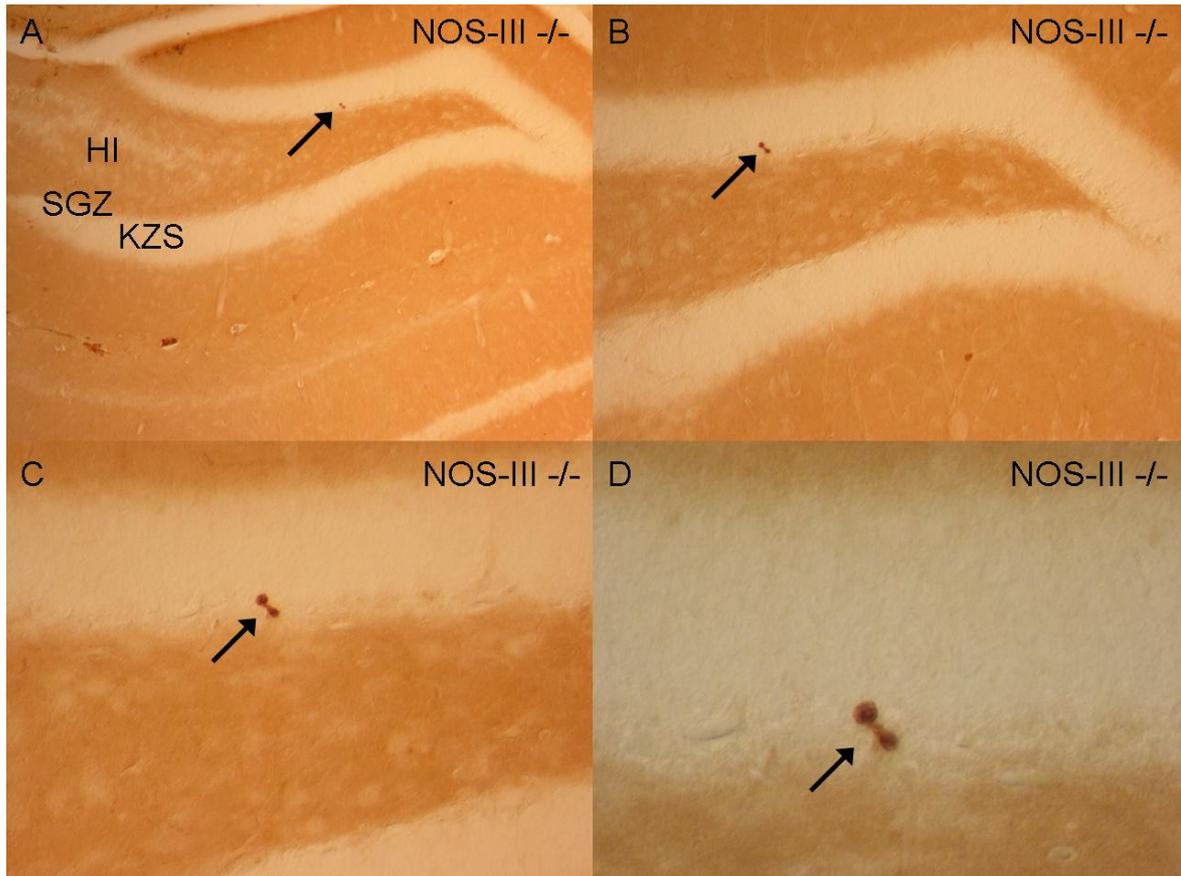
### **4.2 NOS-III-Knockout-Mäuse zeigen eine signifikant reduzierte Neurogenese**

NOS-III-Knockout-Mäuse zeigten eine signifikante Reduktion ( $p < 0,001$ ; zweiseitig gepaarter Student's t-Test) der Proliferationsrate von neuronalen Stammzellen der adulten Neurogenese im Gyrus dentatus des Hippokampus. Während Wildtyptiere ( $n=10$ ) als Kontrollen  $310,6 \pm 48,1$  (Mittelwert  $\pm$  SD) BrdU-positive Zellen pro  $\text{mm}^3$  Körnerzellschicht aufwiesen, konnten bei NOS-III-Knockout-Mäusen ( $n=9$ ) nur  $135,2 \pm 35,6$  BrdU-markierte Zellen pro  $\text{mm}^3$  nachgewiesen werden, entsprechend 43,5% der Proliferationsrate der Kontrollen (Abb. 4.1).

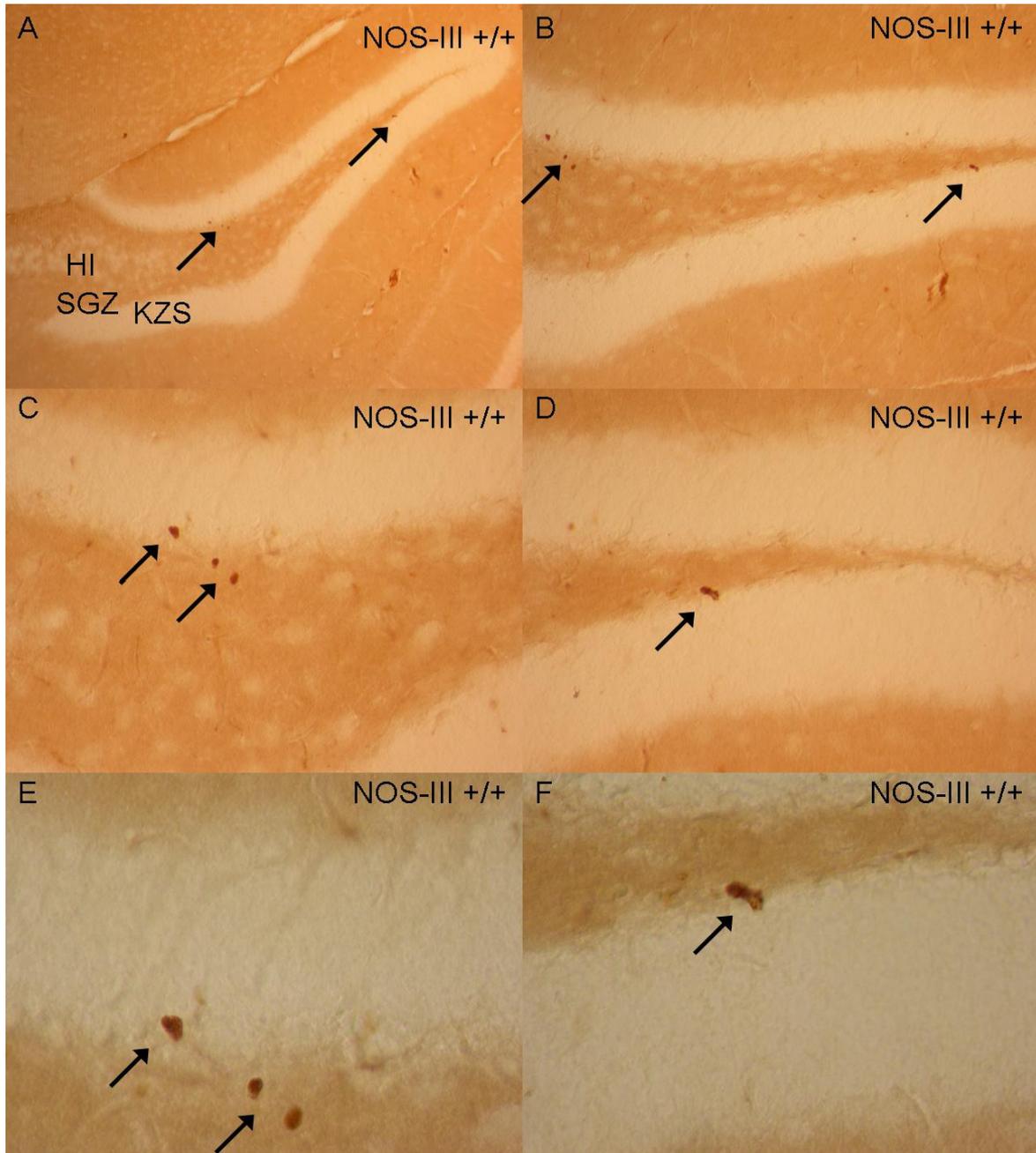


**Abb. 4.1.** Zelldichte BrdU-positiver Zellen in Subgranulärzone und Körnerzellschicht des Gyrus dentatus (Hippokampus) von NOS-III-Knockout-Tieren (NOS-III -/-) im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (NOS-III +/+). Bei NOS-III-Knockout-Mäusen zeigte sich eine statistisch signifikant (\*;  $p < 0,001$ ) geringere Dichte neu gebildeter Zellen im Hippocampus (SGZ und KZS des Gyrus dentatus beider Hippocampi).

In Abb. 4.2 ist ein typisches Beispiel des Gyrus dentatus eines NOS-III-Knockout-Tieres mit wenigen neu gebildeten Zellen im Bereich von Subgranulärzone und Körnerzellschicht des Gyrus dentatus gezeigt (die Pfeile deuten auf zwei BrdU-immunoreaktive Zellen). Im Vergleich dazu ist in Abb. 4.3 die basal höhere Neurogeneratesrate bei NOS-III-Wildtyp-Tieren zu erkennen (typisches Beispiel). Die Pfeile weisen wiederum auf neu gebildete Zellen im Gyrus dentatus.



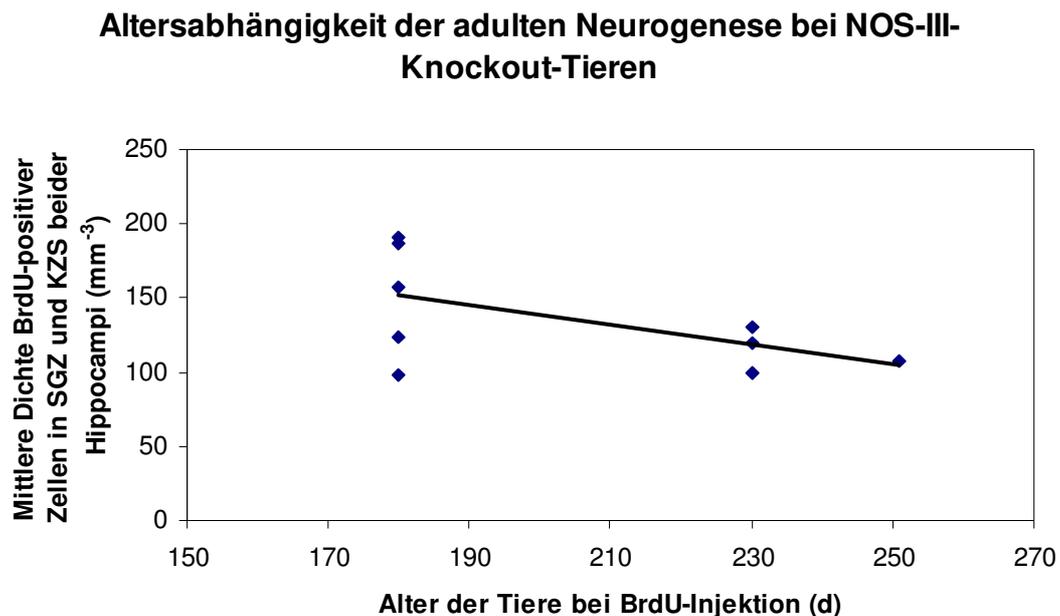
**Abb. 4.2.** Reduzierte Dichte BrdU-positiver, proliferierender Zellen im Gyrus dentatus bei NOS-III-Knockout-Mäusen. Es sind nur 2 BrdU-positive Zellen (Pfeile, wahrscheinlich Stamm- und Tochterzelle nach Mitose) in der KZS an der Grenze zur SGZ erkennbar (A: 5x Vergrößerung, B: 10x, C: 20x, D: 40x). Die Abschnitte des Gyrus dentatus (HI, SGZ und KZS) sind in A bezeichnet.



**Abb. 4.3.** Basale Dichte BrdU-positiver, proliferierender Zellen im Gyrus dentatus bei Wildtyptieren. Es sind insgesamt 5 BrdU-positive Zellen (Pfeile) erkennbar: in C und E 3 Zellen, jeweils in der Körnerzellschicht, der Subgranulärzone und im Hilus; in D und F 2 Zellen in der Subgranulärzone in einem Mitosestadium (A: 5x Vergrößerung, B: 10x, C und D: 20x, E und F: 40x). Die Abschnitte des Gyrus dentatus (HI, SGZ, und KZS) sind in A bezeichnet.

### 4.3 Altersabhängigkeit

Aus Abb. 4.4 ist die Altersverteilung der untersuchten NOS-III-Knockout-Mäuse ersichtlich. Für die NOS-III-Knockout-Tiere errechnet sich ein Korrelationskoeffizient zwischen Alter und Dichte BrdU-positiver Zellen von  $r = -0,558$ . Somit ergibt sich bei diesem Genotyp eine moderate negative Korrelation zwischen Alter und Ausmaß der adulten Neurogenese, d. h. je älter das untersuchte Tier zum Zeitpunkt der BrdU-Injektion war, umso weniger neu gebildete Zellen konnten im Hippokampus nachgewiesen werden. Anzumerken ist, dass die untersuchten Wildtyp-Tiere jedoch nahezu gleich alt waren, so dass hier keine Auswertung der Altersabhängigkeit vorgenommen werden konnte.



**Abb. 4.4.** Altersabhängigkeit der adulten Neurogenese bei NOS-III-Knockout-Tieren. Erläuterungen im Text.

#### 4.4 Geschlechtsabhängigkeit

In der NOS-III-Knockout-Gruppe wurden 5 weibliche und 4 männliche Tiere untersucht, in der Wildtypgruppe sowohl 5 weibliche als auch 5 männliche Mäuse. Tab. 4.1 zeigt in einer Vierfeldertafel die Mittelwerte der Dichte BrdU-positiver Zellen in Subgranulärzone und Körnerzellschicht beider Hippocampi für diese 4 Gruppen.

**Tab. 4.1.** Einfluss des Geschlechts der Versuchstiere auf die adulte Neurogenese (Mittelwerte der Dichte BrdU-positiver-Zellen in Subgranulärzone und Körnerzellschicht beider Hippocampi  $\pm$  SD [ $\text{mm}^{-3}$ ])

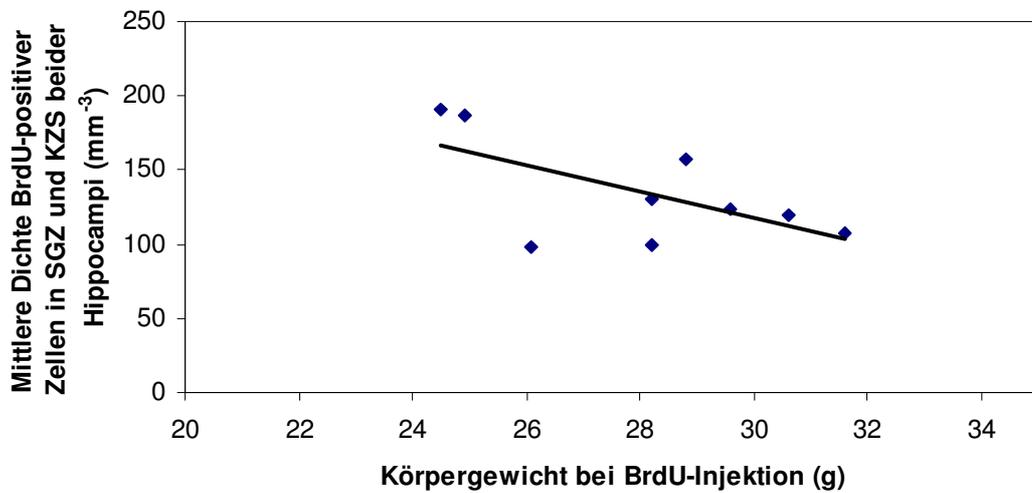
	<b>m</b>	<b>f</b>
<b>NOS-III -/-</b>	118,51 $\pm$ 13,33 (n = 4)	148,51 $\pm$ 43,58 (n = 5)
<b>NOS-III +/+</b>	312,64 $\pm$ 55,24 (n = 5)	308,50 $\pm$ 46,32 (n = 5)

Um Unterschiede zwischen den einzelnen Subgruppen der Vierfeldertafel in Tab. 4.2 auf Signifikanz zu überprüfen, wurde der Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Dabei ergaben sich keine statistisch signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede.

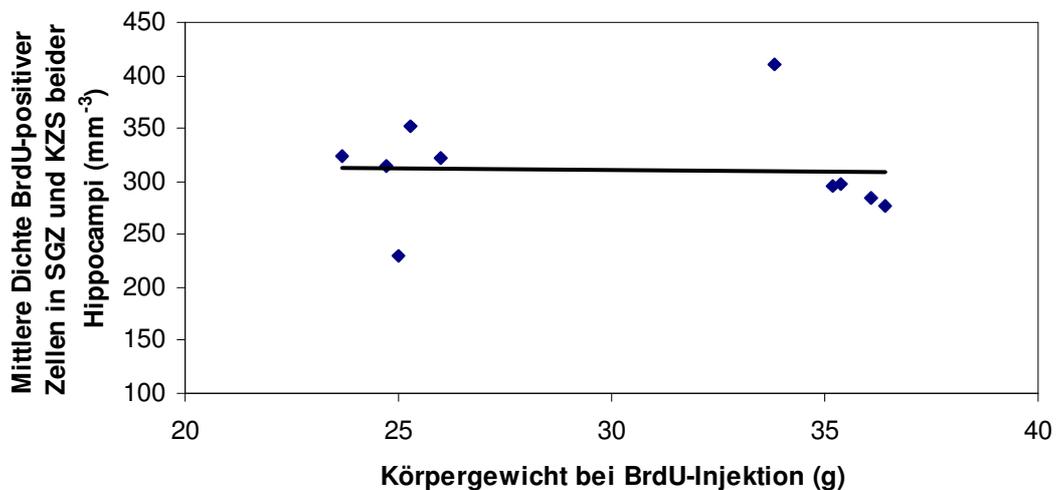
#### 4.5 Abhängigkeit der adulten Neurogenese vom Körpergewicht

Der Einfluss dieses Parameters auf die adulte hippokampale Neurogenese ist in Abb. 4.5 gezeigt:

### Abhängigkeit der adulten Neurogenese vom Körpergewicht (NOS-III-Knockout-Tiere)



### Abhängigkeit der adulten Neurogenese vom Körpergewicht (Wildtyp-Tiere)



**Abb. 4.5.** Abhängigkeit der adulten Neurogenese (Zelldichte BrdU-positiver Zellen im Hippokampus) vom Körpergewicht bei NOS-III-Knockout-Tieren (oben) und Wildtyp-Tieren (unten). Erläuterungen im Text.

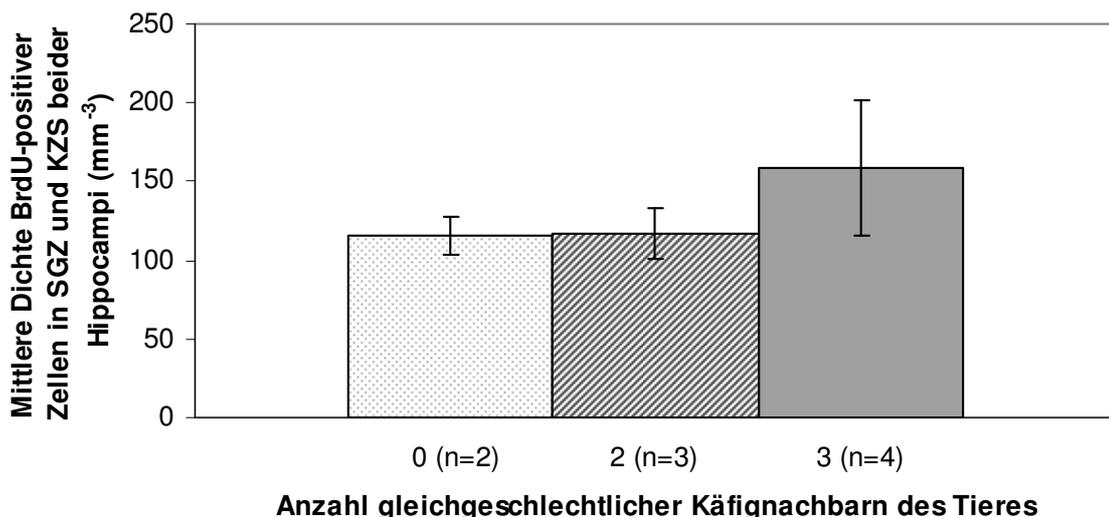
Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten zwischen Neurogeneserate und Körpergewicht ergibt bei NOS-III-Knockout-Tieren einen Wert von  $r = -0,623$ , also einer moderaten negativen Korrelation entsprechend. Je geringer das

Körpergewicht des NOS-III-Knockout-Tieres war, umso größer war die Rate der adulten hippocampalen Neurogenese. Im Gegensatz dazu errechnet sich der entsprechende Korrelationskoeffizient in der Wildtyp-Gruppe mit  $r = -0,040$ . Bei den Wildtyp-Mäusen ist somit keine Korrelation zwischen Proliferationsrate im Gyrus dentatus und Körpergewicht festzustellen.

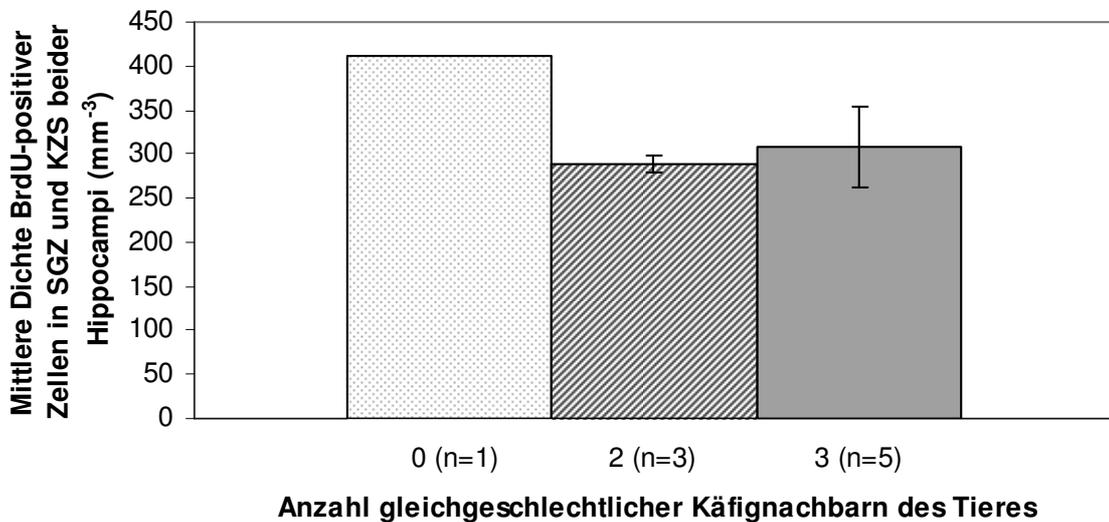
#### 4.6 Abhängigkeit der adulten Neurogenese von der Anzahl der Versuchstiere pro Käfig

Die NOS-III-Knockout- und Wildtypiere waren identischen Umgebungsbedingungen ausgesetzt (Standard-Unterbringungsbedingungen, s. Abschnitt 3.1.6). Es wurden jedoch innerhalb beider Genotypen unterschiedlich viele Tiere (1 bis 4 bzw. 1 bis 5) gleichen Geschlechts in einem Käfig zusammengehalten. Abb. 4.6 veranschaulicht dies:

**Abhängigkeit der adulten Neurogenese von der Anzahl Käfignachbarn (NOS-III-Knockout-Tiere)**



### Abhängigkeit der adulten Neurogenese von der Anzahl Käfignachbarn (Wildtyp-Tiere)



**Abb. 4.6.** Abhängigkeit der adulten Neurogenese von der Anzahl Käfignachbarn des Versuchstiers bei NOS-III-Knockout-Tieren (oben) und Wildtyptieren (unten). Erläuterungen siehe Text.

Die statistische Auswertung ergab jedoch weder bei NOS-III-Knockout-Tieren, noch bei Wildtyptieren signifikante Unterschiede der Dichte BrdU-positiver Zellen im Gyrus dentatus in Abhängigkeit von der Anzahl der Käfignachbarn der Versuchstiere.

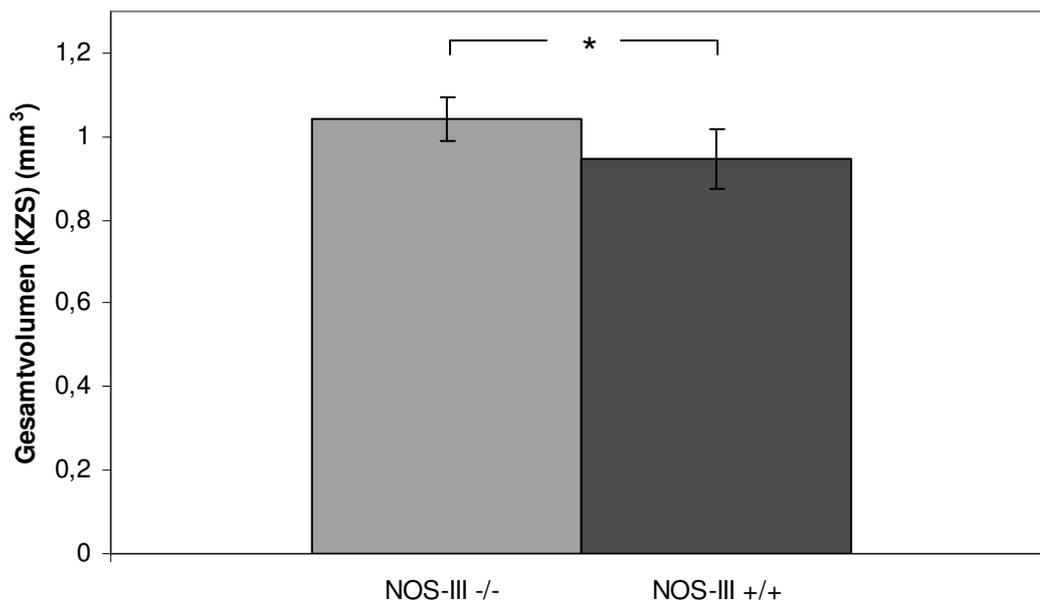
### 4.7 Unterschiede im Hippokampusvolumen

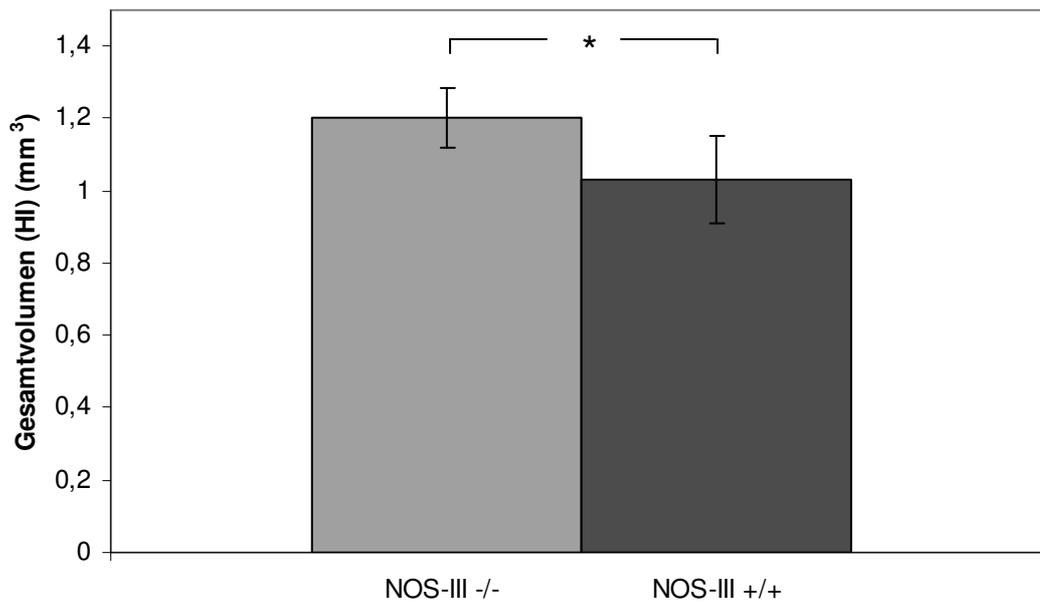
Zur Berechnung der Zelldichte neu gebildeter Hippokampusneurone wurden die Volumina der Körnerzellschicht sowie des Hilus des Gyrus dentatus bestimmt (vgl. Kapitel 3.2.4). Das Gesamtvolumen der Körnerzellschicht (analog des Hilus) jedes Tieres wurde über

$$(1) \quad V(\text{KZS}) = \Sigma A(\text{KZS}) * d * 6$$

berechnet (Schnittdicke  $d = 0,04 \text{ mm}$ ). Im Gegensatz zur Berechnung der Zelldichte (vgl. Abschnitt 3.2.4) geht hier der Faktor 6 ein, der sich daraus ergibt, dass nur jeder sechste Schnitt einer Serie gefärbt und vermessen wurde (Summation über alle Volumenelemente).

Es resultierte eine statistisch signifikante ( $p < 0,01$ ) Erhöhung des Volumens der Körnerzellschicht bei den NOS-III-Knockout-Tieren ( $1,04 \pm 0,05 \text{ mm}^3$ ) im Vergleich zu den Wildtyptieren ( $0,95 \pm 0,07 \text{ mm}^3$ ) um 10,0 %. Noch ausgeprägter war der Unterschied im Volumen der Hilusregion. Das Volumen des Hilus der NOS-III-Knockout-Mäuse ( $1,20 \pm 0,08 \text{ mm}^3$ ) war im Vergleich zu Wildtypgruppe ( $1,03 \pm 0,12 \text{ mm}^3$ ) ebenfalls statistisch signifikant um 16,5 % erhöht ( $p < 0,01$ ; Abb. 4.7).





**Abb. 4.7.** Signifikante Unterschiede im Hippokampusvolumen von NOS-III-Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen: Volumina der Körnerzellschicht (oben), des Hilus (unten).

#### **4.8 Adulte Neurogenese in verschiedenen Teilstrukturen des Gyrus dentatus**

Wie in Abschnitt 3.2.4 dargelegt, sind bei den hier untersuchten, 6 Tage nach Markierung mit BrdU getöteten Tieren sowohl die Subgranulärzone (Proliferation) als auch die Körnerzellschicht (Migration, beginnende Differenzierung) maßgebliche Kompartimente. Die Gesamtauswertung (Kap. 4.1) erfolgte deshalb über die Zellzählung in beiden Regionen zusammen, bezogen auf das Volumen der Körnerzellschicht. Es liegt jedoch nahe, die Zelldichte in beiden Kompartimenten auch getrennt voneinander auszuwerten (Tab. 4.2).

**Tab. 4.2.** Adulte Neurogenese in verschiedenen Substrukturen des Gyrus dentatus (\* = statistisch signifikante Unterschiede zu den Kontrollen; Student's t-Test)

NOS-III-Genotyp	Mittlere Zelldichte BrdU-positiver Zellen beider Hippocampi $\pm$ SD [ $\text{mm}^{-3}$ ]			Anteil der in die KZS eingewanderten Zellen (Zelldichte KZS/ Zelldichte (SGZ +KZS))
	in SGZ + KZS	in SGZ	in KZS	
<b>NOS-III -/-</b>	<b>135,17</b> $\pm$ 35,59* (= <b>43,52 %</b> der NOS-III +/+)	<b>94,20</b> $\pm$ 26,45* (= <b>35,90 %</b> der NOS-III +/+)	<b>40,98</b> $\pm$ 13,05 (= <b>85,07 %</b> der NOS-III +/+)	<b>30,32 %</b>
<b>NOS-III +/+</b>	<b>310,57</b> $\pm$ 48,11	<b>262,40</b> $\pm$ 53,50	<b>48,17</b> $\pm$ 27,29	<b>15,51 %</b>

Wie bei der Auswertung der Zelldichte neu gebildeter Neurone in SGZ und KZS zusammen (Kap. 4.1) besteht auch beim Vergleich der Proliferationsrate isoliert in der SGZ ein signifikanter Unterschied zwischen NOS-III-Knockout-Tieren und Wildtypen. Es fällt auf, dass die Abnahme der adulten Neurogenese bei NOS-III -/- Tieren fast vollständig auf die Reduktion der Stammzellproliferation in der SGZ zurückzuführen ist.

Von den bei NOS-III-Knockout-Mäusen in geringerem Umfang neu gebildeten Neuronen wandert jedoch ein höherer, nahezu doppelt so großer Anteil in die Körnerzellschicht ein (30,32% bei den NOS-III-Knockout-, 15,51% bei den Wildtypen; Tab. 4.2).

## 5. Diskussion

### 5.1 NOS-III ist ein regulatorisches Protein der adulten hippocampalen Neurogenese

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (NOS-III) eine Rolle bei der Regulation der adulten Neurogenese im Hippokampus (Maus) spielt. Verschiedene Teilschritte der adulten Neurogenese sind voneinander zu unterscheiden (vgl. Kap. 1.1.4), u. a. Proliferation der Stamm- bzw. Vorläuferzellen und Survival der neu gebildeten Zellen. Die Proliferation neuraler Stammzellen wird bei der adulten Neurogenese im Hippokampus durch NOS-III positiv reguliert: NOS-III-Knockout-Mäuse zeigten eine im Vergleich zu Wildtyp-Tieren auf 43,5% signifikant reduzierte Proliferationsrate von Stammzellen der adulten Neurogenese im Gyrus dentatus des Hippokampus (Abb. 4.1, 4.2 und 4.3). Es wurde ein genetischer Ansatz (NOS-III-Knockout-Tiere) gewählt, da derzeit kein spezifischer NOS-III-selektiver NOS-Inhibitor zur Verfügung steht.

Die Reduktion der Proliferationsrate bei NOS-III-Knockout-Mäusen gegenüber der von Wildtyp-Tieren auf 43,5 % ergibt sich durch die Auszählung der Strukturen Subgranulärzone und Körnerzellschicht zusammen (Kap. 4.8, Tab. 4.2). Diese Auswertung wurde gewählt, da innerhalb der Versuchszeit von sechs Tagen bereits ein Teil der neu gebildeten Zellen in die Körnerzellschicht eingewandert war, der überwiegende Anteil sich jedoch noch in der Subgranulärzone befand, zum Teil gruppiert (in Form von Clustern). Vergleicht man die Proliferationsrate in verschiedenen Abschnitten des Gyrus dentatus (Tab. 4.2), so zeigt sich, dass insgesamt die Reduktion der adulten Neurogenese bei NOS-III Knockout-Tieren fast vollständig in der SGZ stattfindet (bei NOS-III-Knockouts 35,9 % der Proliferationsrate der Kontrollen), in der KZS dagegen das Ausmaß der BrdU-positiven Zellen fast unverändert ist. Dies spricht dafür, dass NOS-III vor allem eine Rolle in der Proliferation neuraler Stammzellen innehat; Migration und Differenzierung werden dagegen nicht oder kaum beeinflusst. Übereinstimmend damit wurde in späteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass das Survival der neu gebildeten Zellen bei NOS-III-Knockouts nicht signifikant verändert ist (s. u.). Offensichtlich finden hier kompensatorische Vorgänge statt,

was auch erklären könnte, dass ein nahezu doppelt so großer Anteil neu gebildeter Zellen bei NOS-III-Knockouts in die Körnerzellschicht einwandert (vgl. Tab. 4.2).

Dadurch, dass in der vorliegenden Studie das Zeitintervall zwischen BrdU-Gabe und Entnahme der Gehirne (6 Tage) länger als 24 Stunden (reine Proliferation) und kürzer als 4 Wochen (Survival der Zellen, Migration und Ausdifferenzierung zu Neuronen) gewählt wurde, wurden neben der Zellproliferation die Zellmigration in die Körnerzellschicht, die Zelldifferenzierung zu Neuronen und das Survival der Zellen zum Teil (ca. 1/4) mit aufgezeichnet. Überwiegend ist die vorliegende Studie aber eine Proliferationsstudie: Die ca. 24 Stunden dauernde Proliferation und die beginnende Migration der Zellen wurden erfasst; die ca. vier Wochen benötigende Ausdifferenzierung der neu gebildeten Zellen zu reifen Neuronen (z. B. erkennbar durch Doppelmarkierung mit BrdU und Markern reifer Neurone) und das Survival der neu gebildeten Zellen (Anteil der überlebenden Zellen) können im Rahmen dieser Studie jedoch nicht nachgewiesen werden. Interessanterweise stellte sich in späteren Untersuchungen der Arbeitsgruppe [135] heraus, dass nach 28 Tagen kein signifikanter Unterschied in der Dichte neu gebildeter Neurone zwischen NOS-III-Knockouts und Wildtyptieren mehr vorlag. NOS-III kann insofern ein differenzieller Effekt bei der Regulation der adulten hippocampalen Neurogenese zugeschrieben werden: Es reguliert positiv die Proliferation neuraler Stammzellen im Gyrus dentatus, hat jedoch keine Netto-Auswirkung auf die adulte hippocampale Neurogenese. Weitere Regulationsfaktoren wie z. B. VEGF (s. Abschnitt 5.4.2) scheinen hierbei ebenfalls eine Rolle zu spielen. Es gab jedoch keine Hinweise darauf, dass bei Wildtyptieren im Vergleich zu NOS-III-Knockouts eine größere Anzahl von neu gebildeten Zellen pyknotisch wird oder degeneriert. Eine wichtige Konsequenz für zukünftige Studien zur adulten Neurogenese ist jedoch, sowohl Proliferations-, als auch Survivalstudien durchzuführen.

## 5.2 Der Einfluss biometrischer Parameter auf die adulte hippocampale Neurogenese

Eine Reihe von biometrischen Parametern, z. B. Alter und Geschlecht der Versuchstiere, wurden im Rahmen dieser Neurogenesestudie hinsichtlich ihres Einflusses auf die Proliferationsrate der hippocampalen Vorläuferzellen analysiert. Sowohl für die NOS-III-Knockout-Tiere, als auch für die Wildtypen zeigte sich eine moderate negative Korrelation der Merkmale Alter und Proliferationsrate im Gyrus dentatus (Kap. 4.3). Dieser Zusammenhang stimmt mit der Literatur überein [97, 144]. Aufgrund der geringen Varianz des Alters sollte unser Befund jedoch vorsichtig interpretiert werden.

Hinsichtlich der Geschlechtsabhängigkeit der adulten Neurogenese (Kap. 4.4) zeigten sich keine statistisch signifikanten Geschlechtsunterschiede. Auch bei diesem Befund besteht Übereinstimmung mit den Angaben der Literatur. Aus der Fülle von Einzel- und Übersichtsarbeiten zur Regulation der adulten Neurogenese (vgl. Kap. 1.1.6) gehen keine übereinstimmenden Hinweise auf eine generelle Geschlechtsabhängigkeit der adulten Neurogenese hervor. Eine Arbeit zeigte eine gesteigerte Proliferationsrate bei sich nicht fortpflanzenden weiblichen Feldmäusen gegenüber sich reproduzierenden Weibchen und gegenüber Männchen [60]. Von Tanapat et al. [158] wurde gezeigt, dass weibliche Ratten eine erhöhte Proliferationsrate im Hippokampus hatten, der jedoch bei Survival-Experimenten kein Netto-Gewinn an Neuronen gegenüberstand. Interessanterweise wirkten sich jedoch Östrogene und die Östrogenphase des weiblichen Zyklus im Tierversuch bezüglich der adulten Neurogenese förderlich aus [83, 158]. Bei genauerer Betrachtung der hier vorliegenden Daten (Tab. 4.1) besteht in der Wildtypgruppe per se keine Geschlechtsabhängigkeit der Proliferationsrate. Allerdings zeigten weibliche NOS-III-Knockout-Tiere gegenüber männlichen NOS-III-Knockout-Tieren eine Erhöhung der Proliferationsrate um 25,3% (nicht signifikant). Dieser Unterschied mag dem Vorliegen eines höheren Östrogenplasmaspiegels bei weiblichen Tieren zugeschrieben werden. Interessant ist in diesem Kontext, dass Östrogen die Expression der neuronalen NOS-Isoform stimuliert, so dass dies einen möglichen Kompensationsmechanismus und somit eine Erklärung für diesen Befund darstellen könnte.

Das Körpergewicht der Versuchstiere (Kap. 4.5) korrelierte bei NOS-III-Knockout-Mäusen moderat negativ mit der Proliferationsrate im Gyrus dentatus: Je geringer das Körpergewicht des Tieres war, umso größer war die Proliferationsrate. Bei Wildtyptieren ergab sich keine Korrelation zwischen den beiden Merkmalen Körpergewicht und Neurogeneserate. In der Summe belegen diese Daten keinen ausgeprägten Zusammenhang zwischen Körpergewicht und Neurogenese.

Darüber hinaus wurde die Proliferationsrate im Gyrus dentatus in Abhängigkeit von der Anzahl gleichgeschlechtlicher Käfignachbarn des Versuchstiers aufgeführt (Kap. 4.6). NOS-III-Knockout-Tiere hatten numerisch eine etwas höhere Proliferationsrate, je mehr Käfignachbarn sie hatten. Umgekehrt zeigten Wildtyptiere eine Tendenz zu umso niedrigeren Proliferationsraten, je mehr Käfignachbarn sie hatten. Eine statistische Signifikanz fand sich jedoch nicht, so dass die Anzahl der Käfignachbarn zumindest in unseren Untersuchungen keinen Einfluss auf die adulte Neurogenese hatte.

### **5.3 Unterschiede im Hippokampusvolumen**

In Kap. 4.7 wurden die Volumina der Körnerzellschicht sowie des Hilus des Gyrus dentatus zwischen den beiden Genotypen NOS-III  $-/-$  und Wildtyp verglichen. Als überraschendes Nebenergebnis zeigte sich, dass bei NOS-III-Knockout-Mäusen gegenüber Wildtyptieren das Gesamtvolumen der Körnerzellschicht signifikant um 10,0% erhöht war. Das Volumen des Hilus des Gyrus dentatus war bei den NOS-III-Knockout-Tieren ebenfalls signifikant um 16,5 % erhöht. Eine Ursache für diese Volumenunterschiede lässt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht angeben. Zu beachten ist, dass durch die genannten Volumenunterschiede möglicherweise eine Interferenz mit der Auswertung der Zelldichte besteht: Bei offensichtlich vergrößertem Bezugsvolumen der Körnerzellschicht bei NOS-III-Knockout-Tieren im Vergleich zu Wildtypen ist die resultierende Zelldichte reduziert (Gleichung (1) in Kap. 3.2.4). Da es sich jedoch nur um einen Volumenunterschied von 10,0% handelt, erklärt dieser nicht die Reduktion der Proliferationsrate von NOS-III  $-/-$  um 56,5%.

## **5.4 Mögliche Mechanismen der Regulation der adulten hippocampalen Neurogenese durch NOS-III**

NO kann sowohl die Funktion eines intrazellulären, als auch eines interzellulären Messengers haben (Abb. 1.7 und 1.8). Bevor mögliche Signalkaskaden der Regulation adulter Neurogenese durch NO diskutiert werden, soll zunächst eine Antwort auf die Frage gefunden werden, in welchen Zellen im oder in der Nähe des Gyrus dentatus NO durch NOS-III synthetisiert werden kann.

### **5.4.1 Verschiedene Zelltypen des murinen Hippokampus als mögliche Quellen von NOS-III bzw. NO**

In den vergangenen Jahren sind Astrozyten als Kandidaten der Beherbergung von „Infrastruktur“ für Prozesse der Neuroplastizität in das Blickfeld gerückt. Z. B. konnten Gabott und Bacon [57] sowie Wiencken und Casagrande [165] zeigen, dass NOS-III in verschiedenen kortikalen und subkortikalen Hirnarealen von Nagern und anderen Säugetieren konstitutiv in Astrozyten vorkommt. Diese wurden sowohl anhand morphologischer Charakteristika als auch anhand astrozytenspezifischer Marker identifiziert (GFAP und S100 $\beta$ ). Die NOS-III-positiven Astrozyten umgeben mit den Fußfortsätzen ihrer sternförmigen Zellausläufer einerseits Synapsen zu Perikarya von Pyramidenzellen (axosomatische Synapsen), andererseits die Außenwände von Blutgefäßen und Kapillaren [57, 165]. Eine Reihe von Arbeiten zeigt außerdem, dass NOS-III-haltige Astrozyten in der Subgranulärzone des Gyrus dentatus vorkommen [134]. Möglicherweise sind die pluripotenten Stamm- oder Vorläuferzellen der adulten Neuro- und Gliogenese sogar selbst Astrozyten der Subgranulärzone oder diesen sehr ähnliche Zellen [145, 154], wobei auch gegenteilige Befunde erhoben wurden [121], so dass dieser Aspekt kontrovers diskutiert wird (vgl. Kap. 1.1.4). NO könnte also von astrozytärer NOS-III freigesetzt werden und in neurale Stammzellen diffundieren, wo es über Signalkaskaden die adulte Neurogenese positiv reguliert. Interessanterweise konnten wir jedoch auch bei Einsatz dreier verschiedener Antikörper gegen NOS-III kein Enzym in Astrozyten des Gyrus dentatus nachweisen. Dies macht eine Freisetzung von NO durch NOS-III in Astrozyten des Gyrus dentatus und den skizzierten Regulationsmechanismus zumindest für die

hier vorliegende Studie (oder für das Microenvironment des murinen Gyrus dentatus) unwahrscheinlich.

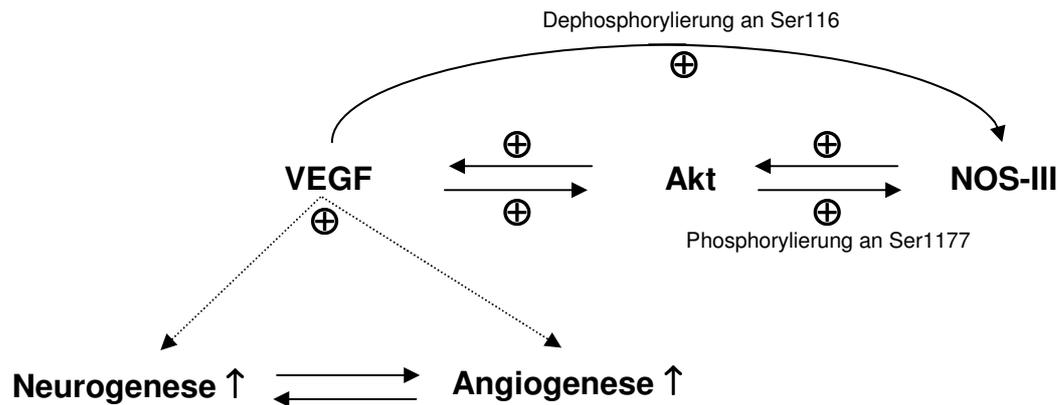
Alternativ dazu könnte NO durch NOS-III auch in Neuronen des Gyrus dentatus synthetisiert werden [40]. Auch beim Menschen wurde NOS-III in der Region CA1 des Hippokampus nachgewiesen, obwohl diese Befunde höchst kontrovers diskutiert werden. Denkbar ist nun, dass NO, das nach Aktivierung von NMDA-Rezeptoren postsynaptisch gebildet wird, parakrin in benachbarte Stamm- bzw. Vorläuferzellen der adulten Neurogenese diffundiert und dort ihre Proliferation in Gang setzt. Hier wäre die Verbindung zwischen hippokampaler LTP und adulter hippokampaler Neurogenese realisiert und der örtliche Kontext von NOS-III und adulter Neurogenese gegeben (Gyrus dentatus). Mittlerweile jedoch wird eher davon ausgegangen, dass es zumindest unter Ruhebedingungen keine NOS-III-Expression in Neuronen gibt. Auch wir konnten keine NOS-III in Neuronen des Gyrus dentatus nachweisen.

Insofern bleiben als wahrscheinlichste Quelle von von NOS-III generiertem NO Gefäße bzw. Gefäßendothelzellen [135], die reich an NOS-III (eNOS) sind. Dabei konnte bei Wildtyp-Tieren NOS-III-Expression im gesamten Gyrus dentatus gezeigt werden. NOS-III (+/-)-Tiere zeigten eine reduzierte NOS-III-Immunreaktivität, NOS-III (-/-)-Tiere überhaupt keine (Gen-Dosis-Effekt). Dies gibt den entscheidenden Hinweis darauf, dass für die Mikroumgebung der vorliegenden Studie als die maßgebliche NOS-III-Lokalisation vaskuläre Gefäßendothelzellen des Gyrus dentatus angenommen werden müssen. Unabhängig davon gibt es Arbeiten, die NOS-III in zerebralen Gefäßendothelzellen als Quelle von NO im Zusammenhang mit der adulten hippokampalen Neurogenese beschreiben. Es konnte gezeigt werden, dass adulte Neurogenese im Gyrus dentatus in der Nachbarschaft von Gefäßen (sog. Vascular Niche, Palmer et al. [121]) vorkommt und dass Endothelzellen (Shen et al. [146]) durch Freisetzung löslicher Faktoren die Expansion und Neuronenproduktion adulter neuraler Stammzellen in vitro fördern, was die essenzielle Rolle der vaskulären Endothelzellen in der vaskulären Nische der adulten Neurogenese deutlich macht. Durch NOS-III in Gefäßendothelzellen des Gyrus dentatus (Hippokampus) synthetisiertes Stickstoffmonoxid könnte somit in neuronale Vorläufer- bzw. Stammzellen diffundieren und dort deren Proliferation fördern.

#### **5.4.2 Mögliche Feedback-Mechanismen bei der Regulation der adulten Neurogenese**

Im Zusammenhang mit der Freisetzung von NO durch NOS-III in Gefäßendothelzellen des Gyrus dentatus sind neuere Erkenntnisse über die (Patho-)Biochemie von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) von Interesse. NOS-III-Knockout-Mäuse leiden häufiger an kongenitalen Herzfehlern und Herzversagen [53], wahrscheinlich aufgrund einer reduzierten myokardialen Kapillardichte und gestörter Angiogenese [171]. Als zugrunde liegender Mechanismus wird eine verringerte Expression von VEGF bei NOS-III-Knockout-Mäusen angesehen [171]. VEGF induziert einerseits Angiogenese (Endothelzellproliferation) [80], andererseits interessanterweise auch adulte Neurogenese [80, 174], u. a. über den E2F-Transkriptionsfaktor-Signalweg. Die Stimulation der adulten Neurogenese durch VEGF konnte sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* gezeigt werden [80].

NO beeinflusst positiv die Expression von VEGF, wahrscheinlich u. a. über Aktivierung der Proteinkinase Akt [46]. Das Ausschalten von NOS-III führt daher zu einem Mangel an VEGF. Neuere Experimente unserer Arbeitsgruppe [135] zeigen, dass reduzierte VEGF-Expression bei NOS-III-Knockout-Mäusen selektiv im Hippokampus vorkommt, nicht aber im Bulbus olfactorius oder im Kleinhirn. Umgekehrt stimuliert VEGF auch die NO-Synthese durch gesteigerte NOS-III-Expression [127] und Enzymaktivierung, letzteres durch Dephosphorylierung an Serin 116 [95] und Akt-vermittelte Phosphorylierung an Serin 1177 von NOS-III [39, 55, 110]. Insgesamt existiert eine positive Rückkopplung zwischen NOS-III und VEGF. Abb. 5.1 [135] veranschaulicht diese Zusammenhänge.



**Abb. 5.1.** Positive Rückkopplung zwischen NOS-III und VEGF bei der Regulation der adulten Neurogenese (Erläuterungen s. Text). Zwischen adulter Neurogenese und Angiogenese existiert ebenfalls ein bidirektionaler, verstärkender Zusammenhang.

Für die Diskussion der vorliegenden Arbeit bedeutet dies, dass NOS-III-Knockout-Mäuse eine reduzierte VEGF-Expression im Gyrus dentatus aufweisen und damit ein geringeres Ausmaß adulter Neurogenese bzw. Vorläuferzellproliferation. Neurale Stammzellen schütten interessanterweise einerseits VEGF aus, andererseits besitzen sie auch VEGF-Rezeptoren [108]. Somit kann postuliert werden, dass vaskuläre Endothelzellen über NOS-III NO synthetisieren, das parakrin in benachbarte neurale Stammzellen diffundiert und dort die Synthese von VEGF bewirkt. VEGF selbst kann über VEGF-Rezeptoren auf dieselbe oder weitere neurale Stammzellen einwirken und deren Proliferation bewirken. Es ist jedoch davon auszugehen, dass ein ganzes Netzwerk von Regulationsfaktoren der adulten Neurogenese in jedem Microenvironment der adulten Neurogenese vorliegt und dass Kompensationsmechanismen und alternative Signalwege existieren (s. Tab. 1.1). Dafür spricht auch, dass in der vorliegenden Studie die adulte Neurogenese bei NOS-III-Knockout-Mäusen gegenüber Wildtyptieren zwar deutlich und signifikant reduziert, jedoch noch nachweisbar war.

Sowohl adulte Neurogenese, als auch Angiogenese werden durch VEGF stimuliert (Abb. 5.1). Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung von Palmer et al. [121], dass in der Subgranulärzone des Gyrus dentatus in Clustern um Verzweigungen bzw. Terminalen feinsten Kapillaren herum (Vascular Niche)

sowohl neurale Stammzellen, als auch endotheliale Vorläuferzellen (Angioblasten) proliferieren. VEGF ist der Faktor, der adulte Neurogenese und Angiogenese eng verzahnt. Die Hirngefäße stellen eine Verbindung zu den übrigen Organen des Körpers da. Somit können einerseits Faktoren aus anderen Organen via Blutstrom, andererseits Faktoren aus dem benachbarten Hirngewebe adulte Neurogenese und Angiogenese simultan oder sequenziell hoch- oder herunterregulieren, bzw. können hirneigene Faktoren und peripher sezernierte Substanzen miteinander in Konkurrenz treten [121], z. B. VEGF, BDNF, EGF, FGF-2 (Tab. 1.1). Aus der Tumorbilogie ist bekannt, dass das Wachstum von Malignomen notwendigerweise mit dem Wachstum (Angiogenese) bzw. der Neuentstehung (Vaskulogenese) von Gefäßen verknüpft ist. Kenntnisse über die funktionelle Einheit von adulter Neurogenese und Angiogenese könnten nützlich sein, um neue Strategien bei der Therapie von (Hirn) Tumoren zu entwickeln (Antiangiogenese). Bevacizumab, ein gegen VEGF gerichteter Antikörper, ist derzeit zur Therapie u. a. des metastasierenden kolorektalen Karzinoms in Erprobung und wäre in diesem Kontext eine interessante Substanz.

Zwei Arbeiten von Cheng et al. [30] und Packer et al. [118] beschreiben einen weiteren Feedback Loop der adulten hippokampalen Neurogenese: NOS-I, das die Proliferation neuraler Stammzellen inhibiert, deren Differenzierung jedoch fördert, agiert in einem positiven Regelkreis mit Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF). Dieser Zusammenhang wird im folgenden Abschnitt 5.5 genauer beschrieben.

## **5.5 Regulation der adulten Neurogenese durch NO**

Eine Reihe weiterer Arbeitsgruppen hat sich bislang mit der Regulation der adulten Neurogenese durch NO beschäftigt, was teilweise zu konträren Ergebnissen führte. Zhang et al. [169] konnten in Übereinstimmung mit den hier vorgestellten Ergebnissen zeigen, dass der NO-Donor DETA/NOONOat, i. v. verabreicht, die adulte Neurogenese im Gyrus dentatus sowohl bei nativen Ratten, als auch bei Ratten nach artifiziell hervorgerufenen Schlaganfällen (Mediainfarkten) dosisabhängig steigert. Außerdem verbesserte der NO-Donor das funktionelle Outcome nach dem ischämischen Ereignis. Nach Verabreichung

von DETA/NONOat wurden erhöhte kortikale Spiegel von cGMP gemessen, was ein Indiz für die tatsächliche Wirkung der systemisch applizierten Substanz im ZNS ist. Insgesamt weisen diese Daten auf eine positive Regulation der adulten hippocampalen Neurogenese durch NO hin.

Dazu passen von Arvidsson und Kollegen [8] erhobene Daten, nach denen postischämische adulte Neurogenese über den NMDA-Rezeptor vermittelt wird. Daraus ist gleichzeitig eine Rolle von NO bei der adulten Neurogenese nach fokaler zerebraler Ischämie zu vermuten, da NO im Hippokampus der Second-Messenger des NMDA-Rezeptors ist. Eine Arbeit von Zhu et al. [173] weist außerdem eine essenzielle Rolle von NO, das durch die induzierbare NOS-II synthetisiert wird, bei der gesteigerten adulten hippocampalen Neurogenese nach fokaler zerebraler Ischämie nach, was aber einen möglichen Kompensationsmechanismus für pharmakologische oder genetische Inhibition einer der beiden konstitutiv vorhandenen NOS-Isoformen I und III nahe legt [129, 172, 173] (s. u.). Interessanterweise ist die ischämie-induzierte adulte Neurogenese NOS-II-abhängig reguliert, die Basalrate der Neurogenese jedoch vom NOS-II-Genotyp unabhängig [173]. NOS-II kann als einziges NOS-Isoenzym schnell hoch reguliert werden und ist außerdem unter Normalbedingungen nicht im Hirngewebe nachweisbar, so dass NOS-II als „Notfall-NOS“ offenbar Aufgaben bei akuten pathophysiologischen Zuständen wie zerebraler Ischämie innehat.

Park et al. [124] konnten zeigen, dass selektive Inhibition von NOS-I zu einer Zunahme des durch Adrenalektomie ausgelösten Zelltodes von Körnerzellen des Gyrus dentatus führt. Im Umkehrschluss ist NO durch NOS-I somit zytoprotektiv für diese Zellen. Im Widerspruch zu diesen Ergebnissen hatte dieselbe Gruppe ein Jahr zuvor gezeigt [125], dass pharmakologische Inhibition von NOS-I bei adrenaletomierten Ratten die Zellproliferation im Gyrus dentatus steigert. Dies wird jedoch als Kompensation für die erhöhte Apoptoserate im Gyrus dentatus von NOS-inhibierten, adrenaletomierten Ratten aufgefasst [124]. All diese pharmakologischen Studien sprechen für eine positive Rolle von NO bezüglich Genese und/oder Survival von Neuronen des Gyrus dentatus im adulten Organismus.

Packer et al. [118] zeigten allerdings kürzlich, dass NO die Proliferation von BrdU-positiven Zellen in der Subventrikulärzone und im Gyrus dentatus negativ

beeinflusst. Dies wurde sowohl anhand intraventrikulärer Injektion des nicht-selektiven NOS-Inhibitors L-NAME, als auch anhand von NOS-I-Knockout-Mäusen demonstriert. Nach NOS-Inhibition durch L-NAME konnte im Gyrus dentatus bemerkenswerterweise keine Zunahme der Zelldichte neu gebildeter Zellen gezeigt werden, sondern lediglich eine Zunahme der absoluten Zahl proliferierender Zellen. Aus dieser Studie ging außerdem hervor, dass nach NOS-Inhibition adulte Neurogenese u. a. im Striatum auftritt, woraus ein physiologisches „Stummschalten“ von nicht-neurogenen Stammzellregionen durch NO gefolgert wird.

Park et al. [125] zeigten, dass selektive NOS-I-Inhibition durch 7-Nitroindazol bei adrenaletomierten Ratten die Proliferationsrate im Gyrus dentatus steigert (s. o.), bei nicht operierten, nativen Kontrolltieren hatte 7-Nitroindazol bei einer viertägigen Gabe jedoch keinen Einfluss auf die Proliferationsrate. Dieser Punkt wurde in einer weiteren Studie vertieft [126], und es zeigte sich überraschenderweise, dass nur die chronische, mindestens 15-tägige NOS-Inhibition durch 7-Nitroindazol oder L-NAME (unspezifische NOS-Inhibition) die Zellproliferation im Gyrus dentatus von nativen Ratten steigert, nicht jedoch eine 5-tägige Hemmung durch 7-Nitroindazol. Diese Experimente stehen im Widerspruch zu den hier vorliegenden Daten und legen eine antiproliferative Wirkung von NO auf die Stammzellen im Gyrus dentatus nahe. Dies wird von Cheng et al. [30] bestätigt, die bei In-vitro-Untersuchung von murinen embryonalen neuralen Stammzellen und in vivo (allerdings wurde als neurogene Nische die Subventrikulärzone, nicht der Gyrus dentatus untersucht) eine antiproliferative, jedoch differenzierungsfördernde Wirkung von durch NOS-I synthetisiertem NO feststellten. Interessanterweise konnte dabei eine positive Rückkopplung von NOS-I und BDNF beobachtet werden. Aus den Arbeiten von Cheng [30] et al. und Packer et al. [118] geht ein antiproliferativer, aber differenzierungsfördernder Effekt von durch NOS-I produziertem NO hervor. Offenbar wird das Umschalten von der Proliferation zur Differenzierung als zwei aufeinander folgende Prozesse durch NO realisiert. Wie kann jedoch dasselbe Molekül NO einerseits antiproliferativ und differenzierungsfördernd (NOS-I-BDNF-Achse), andererseits proliferationsstimulierend (NOS-III-VEGF-Achse, s. o.) wirken? Die Erklärung ist darin zu sehen, dass NO als diffusibles, gasförmiges

Agens nur einen sehr geringen Aktionsradius hat. Die Lokalisation von NOS-I und NOS-III im Gyrus dentatus ist dabei sehr unterschiedlich. NOS-I ist überwiegend in Interneuronen vorhanden [118], NOS-III in den Endothelzellen von Blutgefäßen [135]. Somit ist nur NOS-III, jedoch nicht NOS-I räumlich dazu in der Lage, neurale Stammzellen im Gyrus dentatus direkt zu beeinflussen. Die Stimulation der Zellproliferation nur durch chronische, jedoch nicht akute NOS-Inhibition in der genannten Studie von Park [126] ist allerdings ein Indiz dafür, dass in den genannten 15 Tagen möglicherweise adaptive Prozesse wie Sekretion von Wachstumsfaktoren oder auch Induktion von NOS-II ablaufen. Das Studiendesign erlaubt nicht zu beurteilen, wie hoch die NO-Konzentration im Gyrus dentatus im Zeitverlauf tatsächlich ist, und durch welche Isoenzyme NO synthetisiert wird.

Bemerkenswert ist außerdem die kürzlich von Moreno-López et al. erschienene Studie [111]. Darin wurde gezeigt, dass durch chronische, pharmakologische NOS-Inhibition mit L-NAME (7 bzw. 15 Tage; isoenzymspezifisch) oder 7-Nitroindazol die Proliferationsrate in der Subventrikulärzone, im rostralen Migrationstrakt und im Bulbus olfactorius von adulten Mäusen gesteigert werden konnte, jedoch nicht im Gyrus dentatus des Hippokampus (dort fand sich eine nahezu unveränderte Proliferationsrate von 99% der Kontrollen). Somit ist NO ein physiologischer Inhibitor der adulten Neurogenese im System Subventrikulärzone - Bulbus olfactorius, jedoch nicht im Gyrus dentatus. Diese Arbeit zeigt anschaulich, dass die Wirkung von Stickstoffmonoxid auf die adulte Neurogenese eng an die jeweilige Mikroumgebung der Neuroneogenese gebunden ist. Es ist somit vorstellbar, dass NO in der Subventrikulärzone die Stammzellproliferation inhibiert, im Gyrus dentatus jedoch fördert.

Insgesamt bestätigt also die Vielzahl der genannten Arbeiten, dass Stickstoffmonoxid die adulte hippokampale Neurogenese reguliert. Überraschenderweise zeigt jedoch ein Teil der Literatur eine positive, der andere Teil eine negative Regulation. Diese sich widersprechende Studienlage zeigt, dass es bei der Regulation der adulten Neurogenese entscheidend auf die jeweilige Mikroumgebung der Nervenzellneuentstehung ankommt. Somit muss in kommenden Studien jeweils gezielt ein Microenvironment, z. B. der adulten Neurogenese des Gyrus dentatus, in allen Einzelheiten betrachtet werden. Systemische oder intraventrikuläre Applikation eines NO-Donors oder -Inhibitors

ist den genannten Studien zufolge zu unscharf, um stringente Daten zu erhalten. Auch durch Knockout-Modelle einzelner NOS-Isoformen gewonnene Daten sind nur zusammen mit Knockout-Experimenten der anderen beiden Isoenzyme auswertbar, da – wie oben dargelegt – zumindest die induzierbare NOS-II durch reduzierte Aktivität von NOS-I induziert werden kann. Das Gleiche könnte prinzipiell auch bei den betrachteten NOS-III-Knockout-Mäusen der vorliegenden Studie der Fall sein. Entsprechende Versuche mit Doppelknockout-Tieren werden momentan durchgeführt.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist aus den genannten Studien abzuleiten: Es ist offenbar nicht gleichgültig, durch welches der drei zerebral vorkommenden NOS-Isoenzyme NO bereitgestellt wird. Eine spezifische, pharmakologische NOS-III-Inhibition ist leider bei der In-vivo-Untersuchung der adulten hippokampalen Neurogenese (bzw. der Proliferationsrate im Gyrus dentatus) mangels selektiver Inhibitoren bisher (noch) nicht durchführbar.

Insgesamt reguliert NO also die adulte Neurogenese. Es hängt offenbar jedoch entscheidend von weiteren Parametern wie Ort der adulten Neurogenese (Gyrus dentatus oder Subventrikulärzone), betrachtetem Zeitraum (Proliferation versus Survival), Quelle von NO (konstitutive NOS-I versus -III), Mikroumgebung der adulten Neurogenese (z. B. Vorhandensein kompetitiver neurotropher Faktoren etc.) ab, ob letztlich eine positive oder negative Regulation der adulten Neurogenese durch NO resultiert.

## **5.6 Methodische Aspekte**

In Kap. 5.1 wurde bereits die Aussagekraft der In-vivo-Markierung mit BrdU bezüglich der Proliferations- und Neurogeneserate im Gyrus dentatus diskutiert. Weitere Einschränkungen der BrdU-Methode sind, dass die Markersubstanz die DNA-Synthese und nicht die Zellteilung an sich darstellt [130] (siehe auch Abschnitt 1.1.3). Daher erscheinen neben sich mitotisch teilenden Zellen auch Zellen während DNA-Reparaturvorgängen oder während des physiologischen DNA-Turnovers [130] als BrdU-immunoreaktive Zellen. BrdU kann sogar selbst mutagen sein [112] und damit DNA-Reparaturprozesse initiieren. All diese Artefakte entstehen besonders bei hohen Dosen der In-vivo-Markierung mit BrdU

(mehrfache Applikation von 50-500 mg/kg KG [130]). In der vorliegenden Studie wurde den Tieren 4 x 75 mg/kg KG BrdU an einem Tag in 4 i.p.-Injektionen im Abstand von 2 Stunden verabreicht. Somit befindet sich die hier gewählte BrdU-Dosis eher an der unteren Grenze des artefaktproduzierenden Dosisbereichs. Das begleitende Vorliegen der genannten Artefakte neben realer Zellproliferation ist jedoch auch in dieser Studie möglich. Sogar beim Vorliegen solcher Artefakte würde es sich jedoch um einen systematischen Fehler bei NOS-III-Knockout-Tieren und Wildtypmäusen handeln, so dass das Endergebnis davon unbeeinflusst bliebe. Da bei beiden Genotypen häufig Mitosestadien beobachtet wurden (siehe Abb. 4.2 und 4.3), ist sicher gestellt, dass die BrdU-Methode auch in der vorliegenden Studie in erster Linie Zellproliferation aufzeichnete.

Im Gegensatz zur möglichen Überschätzung der Proliferationsrate durch Artefaktbeimengung kann auch eine Unterschätzung der Proliferationsrate diskutiert werden [72, 154]. Diese kommt dadurch zustande, dass das BrdU-Label im Verlauf von 3-4 aufeinander folgenden Zellteilungen so weit verdünnt wird, dass die immunhistochemische Nachweisgrenze von BrdU unterschritten wird. Dieser Vorgang dürfte hier eher von untergeordneter Bedeutung sein, da innerhalb von 6 Tagen nach BrdU-Markierung im Wesentlichen nur der initiale Proliferationsschritt der Stammzellen aufgezeichnet wurde (vgl. Kap. 5.1).

NOS-III-Knockout-Mäuse sind spontan hypertensiv [38, 147], da ihnen mit NO der Endothelium-derived Relaxing Factor (EDRF) der Blutgefäße fehlt. Die reduzierte Proliferationsrate im Gyrus dentatus von NOS-III-Knockout-Mäusen könnte also auch mit einer hypertensiven Enzephalopathie der NOS-III-Knockout-Tiere in einem Zusammenhang stehen. Die Darstellung der mikroskopischen Anatomie der Hippokampusregion bei NOS-III-Knockout-Tieren und -Wildtypen gibt jedoch keinerlei Hinweise auf bluthochdruckbedingte strukturelle Hirnläsionen (Kap. 4.1). Darüber hinaus geht aus der Literatur kein Hinweis auf einen Einfluss arterieller Hypertension auf die adulte Neurogenese hervor. Endotheliale Dysfunktion (NO als antiatherogener Faktor, vgl. Kap. 1.2.3.1) bei NOS-III-Knockout-Tieren und damit reduzierte adulte Neurogenese durch lokale zerebrale Minderperfusion ist eine weitere Möglichkeit. Jedoch zeigen weder die vorliegenden Nissl-Schnitte noch entsprechende Untersuchungen mehrerer anderer Arbeitsgruppen [38, 75,

147] neuronalen Zelluntergang in einer Vielzahl von Hirnregionen bei NOS-III-Knockout-Mäusen.

## 6. Zusammenfassung

Die Proliferation von in der Subgranulärzone des Gyrus dentatus ansässigen neuronalen Stammzellen ist der erste Schritt der Neuentstehung von Nervenzellen im adulten Organismus, der so genannten adulten Neurogenese, die in bestimmten neurogenen Nischen des ZNS von Säugetieren und des Menschen vorkommt. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass das Enzym endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (NOS-III bzw. eNOS) bzw. durch NOS-III gebildetes Stickstoffmonoxid (NO) die Proliferation neuraler Stamm- bzw. Vorläuferzellen im Gyrus dentatus des Hippokampus positiv reguliert, da Mäuse, bei denen das Gen für dieses Enzym deletiert ist, über eine signifikant erniedrigte Stammzellproliferation verfügen. NOS-III-Knockout-Mäuse zeigen außerdem erhöhte Volumina von Substrukturen des Gyrus dentatus. Biometrische Faktoren, wie z. B. Alter, Geschlecht, Körpergewicht, Umgebungsbedingungen, hatten dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die adulte Neurogenese. Die Abnahme der adulten Neurogenese bei NOS-III-Knockout-Tieren ist fast vollständig auf die Reduktion der Stammzellproliferation in der Subgranulärzone des Gyrus dentatus zurückzuführen. Ein Netto-Zuwachs an neu gebildeten Neuronen 4 Wochen nach Proliferation kann jedoch durch NOS-III nicht bewirkt werden, was auf eine komplexe Regulation der adulten Neurogenese hinweist. Die Stammzellproliferation im adulten murinen Gyrus dentatus wird jedoch vermutlich unter anderem über im Endothel gebildetes NO (als gasförmiges, parakrines Signalmolekül) vermittelt.

## 7. Literatur

1. Aberg, M.A., et al., *Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus*. J Neurosci, 2000. **20**(8): p. 2896-903.
2. Adamson, D.C., et al., *Immunologic NO synthase: elevation in severe AIDS dementia and induction by HIV-1 gp41*. Science, 1996. **274**(5294): p. 1917-21.
3. Akert, K., *Limbisches System*, in *Benninghoff Anatomie Band 2*, D. Drenckhahn, Zenker, W., Editor. 1994, Urban und Schwarzenberg: München, Wien, Baltimore. p. 603-627.
4. Altman, J. and G.D. Das, *Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats*. J Comp Neurol, 1965. **124**(3): p. 319-35.
5. Alvarez-Buylla, A. and C. Lois, *Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates*. Stem Cells, 1995. **13**(3): p. 263-72.
6. Andersen, P., Bliss, T.V.P., Skrede, K.K., *Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways*. Exp. Brain Res., 1971. **13**: p. 222-238.
7. Arancio, O., et al., *Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons*. Cell, 1996. **87**(6): p. 1025-35.
8. Arvidsson, A., Z. Kokaia, and O. Lindvall, *N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke*. Eur J Neurosci, 2001. **14**(1): p. 10-8.

9. Baranyi, A. and O. Feher, *Synaptic facilitation requires paired activation of convergent pathways in the neocortex*. Nature, 1981. **290**(5805): p. 413-5.
10. Baranyi, A. and M.B. Szenté, *Long-lasting potentiation of synaptic transmission requires postsynaptic modifications in the neocortex*. Brain Res, 1987. **423**(1-2): p. 378-84.
11. Barnea, A. and F. Nottebohm, *Recruitment and replacement of hippocampal neurons in young and adult chickadees: an addition to the theory of hippocampal learning*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(2): p. 714-8.
12. Barnea, A. and F. Nottebohm, *Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(23): p. 11217-21.
13. Bengzon, J., et al., *Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(19): p. 10432-7.
14. Benninghoff, J., et al., *When cells become depressed: focus on neural stem cells in novel treatment strategies against depression*. J Neural Transm, 2002. **109**(5-6): p. 947-62.
15. Berger, N.A., *Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage*. Radiat Res, 1985. **101**(1): p. 4-15.
16. Birbaumer, N., Schmidt, R.F., *Lernen und Gedächtnis*, in *Physiologie des Menschen*, R.F. Schmidt, Editor. 1995, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg New York. p. 154-166.

17. Bliss, T.V. and T. Lomo, *Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path*. J Physiol, 1973. **232**(2): p. 331-56.
18. Bohme, G.A., et al., *Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation*. Eur J Pharmacol, 1991. **199**(3): p. 379-81.
19. Bredt, D.S., et al., *Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase*. Neuron, 1991. **7**(4): p. 615-24.
20. Bredt, D.S., et al., *Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase*. Nature, 1991. **351**(6329): p. 714-8.
21. Bredt, D.S. and S.H. Snyder, *Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium*. Neuron, 1994. **13**(2): p. 301-13.
22. Breer, H., T. Klemm, and I. Boekhoff, *Nitric oxide mediated formation of cyclic GMP in the olfactory system*. Neuroreport, 1992. **3**(11): p. 1030-2.
23. Brezun, J.M. and A. Daszuta, *Serotonin may stimulate granule cell proliferation in the adult hippocampus, as observed in rats grafted with foetal raphe neurons*. Eur J Neurosci, 2000. **12**(1): p. 391-6.
24. Burnett, A.L., et al., *Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection*. Science, 1992. **257**(5068): p. 401-3.
25. Cameron, H.A., T.G. Hazel, and R.D. McKay, *Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters*. J Neurobiol, 1998. **36**(2): p. 287-306.

26. Cameron, H.A., B.S. McEwen, and E. Gould, *Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus*. J Neurosci, 1995. **15**(6): p. 4687-92.
27. Cameron, H.A. and R.D. McKay, *Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus*. J Comp Neurol, 2001. **435**(4): p. 406-17.
28. Carro, E., et al., *Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain*. J Neurosci, 2000. **20**(8): p. 2926-33.
29. Chen, G., et al., *Enhancement of hippocampal neurogenesis by lithium*. J Neurochem, 2000. **75**(4): p. 1729-34.
30. Cheng, A., et al., *Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain*. Dev Biol, 2003. **258**(2): p. 319-33.
31. Choi, D.W., *Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system*. Neuron, 1988. **1**(8): p. 623-34.
32. Christopherson, K.S. and D.S. Bredt, *Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease*. J Clin Invest, 1997. **100**(10): p. 2424-9.
33. Chung, E., et al., *Genetic evidence for the neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1) as a susceptibility locus for infantile pyloric stenosis*. Am J Hum Genet, 1996. **58**(2): p. 363-70.
34. Claßen, J., *Neurophysiologische Untersuchungen zu Prinzipien motorischer Plastizität beim Menschen*. Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät der Universität Rostock, 2000.

35. Contestabile, A., *Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development*. Brain Res Brain Res Rev, 2000. **32**(2-3): p. 476-509.
36. Dawson, V.L., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 coat protein neurotoxicity mediated by nitric oxide in primary cortical cultures*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(8): p. 3256-9.
37. Dawson, V.L., et al., *Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal nitric oxide synthase-deficient mice*. J Neurosci, 1996. **16**(8): p. 2479-87.
38. Demas, G.E., et al., *Elimination of aggressive behavior in male mice lacking endothelial nitric oxide synthase*. J Neurosci, 1999. **19**(19): p. RC30.
39. Dimmeler, S., et al., *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 601-5.
40. Dinerman, J.L., et al., *Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(10): p. 4214-8.
41. Dobrossy, M.D., et al., *Differential effects of learning on neurogenesis: learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date*. Mol Psychiatry, 2003. **8**(12): p. 974-82.
42. Donoghue, J.P., Hess, G., Sanes, J.N., *Substrates and mechanisms for learning in motor cortex*, in *Acquisition of motor behaviour in vertebrates*, B. J., Editor. 1996, MIT Press: Cambridge, MA. p. 363-386.
43. Doreulee, N., et al., *Defective hippocampal mossy fiber long-term potentiation in endothelial nitric oxide synthase knockout mice*. Synapse, 2001. **41**(3): p. 191-4.

44. Doyle, C.A. and P. Slater, *Localization of neuronal and endothelial nitric oxide synthase isoforms in human hippocampus*. Neuroscience, 1997. **76**(2): p. 387-95.
45. Dudel, J., *Erregungsübertragung von Zelle zu Zelle*, in *Physiologie des Menschen*, R.F. Schmidt, Editor. 1995, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg New York. p. 43-66.
46. Dulak, J. and A. Jozkowicz, *Regulation of vascular endothelial growth factor synthesis by nitric oxide: facts and controversies*. Antioxid Redox Signal, 2003. **5**(1): p. 123-32.
47. Duman, R.S., J. Malberg, and S. Nakagawa, *Regulation of adult neurogenesis by psychotropic drugs and stress*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **299**(2): p. 401-7.
48. Duman, R.S., S. Nakagawa, and J. Malberg, *Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment*. Neuropsychopharmacology, 2001. **25**(6): p. 836-44.
49. East, S.J. and J. Garthwaite, *NMDA receptor activation in rat hippocampus induces cyclic GMP formation through the L-arginine-nitric oxide pathway*. Neurosci Lett, 1991. **123**(1): p. 17-9.
50. Eisch, A.J., et al., *Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(13): p. 7579-84.
51. Eriksson, P.S., et al., *Neurogenesis in the adult human hippocampus*. Nat Med, 1998. **4**(11): p. 1313-7.
52. Fabel, K., et al., *VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis*. Eur J Neurosci, 2003. **18**(10): p. 2803-12.

53. Feng, Q., et al., *Development of heart failure and congenital septal defects in mice lacking endothelial nitric oxide synthase*. *Circulation*, 2002. **106**(7): p. 873-9.
54. Forstermann, U. and H. Kleinert, *Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1995. **352**(4): p. 351-64.
55. Fulton, D., et al., *Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt*. *Nature*, 1999. **399**(6736): p. 597-601.
56. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. *Nature*, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
57. Gabbott, P.L. and S.J. Bacon, *Localisation of NADPH diaphorase activity and NOS immunoreactivity in astroglia in normal adult rat brain*. *Brain Res*, 1996. **714**(1-2): p. 135-44.
58. Gage, F.H., *Neurogenesis in the adult brain*. *J Neurosci*, 2002. **22**(3): p. 612-3.
59. Gage, F.H., et al., *Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(25): p. 11879-83.
60. Galea, L.A. and B.S. McEwen, *Sex and seasonal differences in the rate of cell proliferation in the dentate gyrus of adult wild meadow voles*. *Neuroscience*, 1999. **89**(3): p. 955-64.
61. Gammie, S.C. and R.J. Nelson, *Maternal aggression is reduced in neuronal nitric oxide synthase-deficient mice*. *J Neurosci*, 1999. **19**(18): p. 8027-35.

62. Goldman, S.A. and F. Nottebohm, *Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(8): p. 2390-4.
63. Gould, E., et al., *Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation*. Nat Neurosci, 1999. **2**(3): p. 260-5.
64. Gould, E., et al., *Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus*. J Neurosci, 1992. **12**(9): p. 3642-50.
65. Gould, E., et al., *Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(9): p. 5263-7.
66. Gould, E., et al., *Neurogenesis in the neocortex of adult primates*. Science, 1999. **286**(5439): p. 548-52.
67. Gould, E., et al., *Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning*. Trends Cogn Sci, 1999. **3**(5): p. 186-192.
68. Gould, E., et al., *Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 3168-71.
69. Greenough, W.T., J.R. Larson, and G.S. Withers, *Effects of unilateral and bilateral training in a reaching task on dendritic branching of neurons in the rat motor-sensory forelimb cortex*. Behav Neural Biol, 1985. **44**(2): p. 301-14.
70. Haley, J.E., G.L. Wilcox, and P.F. Chapman, *The role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation*. Neuron, 1992. **8**(2): p. 211-6.
71. Hawkins, R.D., *NO honey, I don't remember*. Neuron, 1996. **16**(3): p. 465-7.

72. Hayes, N.L. and R.S. Nowakowski, *Dynamics of cell proliferation in the adult dentate gyrus of two inbred strains of mice*. Brain Res Dev Brain Res, 2002. **134**(1-2): p. 77-85.
73. Hebb, D.O., *The organization of behaviour. A neuropsychological theory*. 1949, New York: Wiley.
74. Huang, P.L., *Neuronal and endothelial nitric oxide synthase gene knockout mice*. Braz J Med Biol Res, 1999. **32**(11): p. 1353-9.
75. Huang, P.L., et al., *Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase*. Nature, 1995. **377**(6546): p. 239-42.
76. Ignarro, L.J., et al., *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 9265-9.
77. Iriki, A., et al., *Long-term potentiation in the motor cortex*. Science, 1989. **245**(4924): p. 1385-7.
78. Jacobs, B., Tanapat, P., Reeves, A., Gould, E., *Serotonin stimulates the production of new hippocampal granule neurons via the 5HT1A receptor in the adult rat*. Soc Neurosci Abstr, 1998. **24**: p. 1992.
79. Jaffard, R., *Das facettenreiche Gedächtnis*. Spektrum der Wissenschaft, 2002. **Spezial 1/2002 "Gedächtnis"**: p. 6-9.
80. Jin, K., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(18): p. 11946-50.
81. Jones, T.A. and T. Schallert, *Use-dependent growth of pyramidal neurons after neocortical damage*. J Neurosci, 1994. **14**(4): p. 2140-52.

82. Kelm, M., et al., *Release of endothelium derived nitric oxide in relation to pressure and flow*. Cardiovasc Res, 1991. **25**(10): p. 831-6.
83. Kempermann, G., *Regulation of adult hippocampal neurogenesis - implications for novel theories of major depression*. Bipolar Disord, 2002. **4**(1): p. 17-33.
84. Kempermann, G., *Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis*. J Neurosci, 2002. **22**(3): p. 635-8.
85. Kempermann, G., H.G. Kuhn, and F.H. Gage, *Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(19): p. 10409-14.
86. Kempermann, G., H.G. Kuhn, and F.H. Gage, *More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment*. Nature, 1997. **386**(6624): p. 493-5.
87. Kempermann, G., et al., *Neue Nervenzellen für das erwachsene Gehirn*. Nervenarzt, 1998. **69**: p. 851-857.
88. Kempermann, G.G., F.H., *Neue Nervenzellen im erwachsenen Gehirn*. Spektrum der Wissenschaft, 1999. **Juli 1999**: p. 32-38.
89. Kim, J.E., Nakagawa, S., Duman, R.S., *Chronic administration of rolipram, a cAMP phosphodiesterase-4 inhibitor, upregulates neurogenesis in the adult mouse hippocampus*. Soc Neurosci Abstr, 2000. **26**: p. 2316.
90. Kintner, C., *Neurogenesis in embryos and in adult neural stem cells*. J Neurosci, 2002. **22**(3): p. 639-43.
91. Klinke, R., *Erregungsübertragung in Zellverbänden*, in *Lehrbuch der Physiologie*, R. Klinke, Silbernagl, S., Editor. 2003, Georg Thieme Verlag: Stuttgart New York. p. 61-80.

92. Klintsova, A.Y. and W.T. Greenough, *Synaptic plasticity in cortical systems*. Curr Opin Neurobiol, 1999. **9**(2): p. 203-8.
93. Kornack, D.R. and P. Rakic, *Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex*. Science, 2001. **294**(5549): p. 2127-30.
94. Kötter, R., *Anatomie 3 - ZNS-Vorlesung: Hippokampus etc.* 1999: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
95. Kou, R., D. Greif, and T. Michel, *Dephosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase by vascular endothelial growth factor. Implications for the vascular responses to cyclosporin A*. J Biol Chem, 2002. **277**(33): p. 29669-73.
96. Kriegsfeld, L.J., et al., *Aggressive behavior in male mice lacking the gene for neuronal nitric oxide synthase requires testosterone*. Brain Res, 1997. **769**(1): p. 66-70.
97. Kuhn, H.G., H. Dickinson-Anson, and F.H. Gage, *Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation*. J Neurosci, 1996. **16**(6): p. 2027-33.
98. Kuhn, H.G., et al., *Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain*. J Neurosci, 1997. **17**(15): p. 5820-9.
99. Lenington, J.B., Z. Yang, and J.C. Conover, *Neural stem cells and the regulation of adult neurogenesis*. Reprod Biol Endocrinol, 2003. **1**(1): p. 99.
100. Liu, J., et al., *Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils*. J Neurosci, 1998. **18**(19): p. 7768-78.

101. Lois, C. and A. Alvarez-Buylla, *Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(5): p. 2074-7.
102. Lois, C., J.M. Garcia-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla, *Chain migration of neuronal precursors*. Science, 1996. **271**(5251): p. 978-81.
103. Madsen, T.M., et al., *Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy*. Biol Psychiatry, 2000. **47**(12): p. 1043-9.
104. Malberg, J.E., et al., *Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus*. J Neurosci, 2000. **20**(24): p. 9104-10.
105. Malberg, J.E., Eisch, A.J., Nestler, E.J., Duman, R.S., *Effects of antidepressant treatment and learned helplessness training on hippocampal neurogenesis in adult rat*. Soc Neurosci Abstr, 2000. **26**: p. 1044.
106. Manev, H., et al., *Antidepressants alter cell proliferation in the adult brain in vivo and in neural cultures in vitro*. Eur J Pharmacol, 2001. **411**(1-2): p. 67-70.
107. Markowitsch, H.J., *Neuropsychologie des menschlichen Gedächtnisses*. Spektrum der Wissenschaft, 2002. **Digest-ND 3/2002 "Rätsel Gehirn"**: p. 52-61.
108. Maurer, M.H., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rat neural stem cells*. Neurosci Lett, 2003. **344**(3): p. 165-8.
109. Meldrum, B. and J. Garthwaite, *Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease*. Trends Pharmacol Sci, 1990. **11**(9): p. 379-87.
110. Michell, B.J., et al., *The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase*. Curr Biol, 1999. **9**(15): p. 845-8.

111. Moreno-Lopez, B., et al., *Nitric oxide is a physiological inhibitor of neurogenesis in the adult mouse subventricular zone and olfactory bulb*. J Neurosci, 2004. **24**(1): p. 85-95.
112. Morris, S.M., *The genetic toxicology of 5-bromodeoxyuridine immunohistochemical determination in mammalian cells*. Mutant Res, 1991. **258**: p. 161-188.
113. Muller, U., *Inhibition of nitric oxide synthase impairs a distinct form of long-term memory in the honeybee, Apis mellifera*. Neuron, 1996. **16**(3): p. 541-9.
114. Nathan, C. and Q.W. Xie, *Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls*. Cell, 1994. **78**(6): p. 915-8.
115. Nelson, R.J., et al., *Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase*. Nature, 1995. **378**(6555): p. 383-6.
116. O'Dell, T.J., et al., *Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(24): p. 11285-9.
117. O'Dell, T.J., et al., *Endothelial NOS and the blockade of LTP by NOS inhibitors in mice lacking neuronal NOS*. Science, 1994. **265**(5171): p. 542-6.
118. Packer, M.A., et al., *Nitric oxide negatively regulates mammalian adult neurogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(16): p. 9566-71.
119. Palmer, T.D., J. Ray, and F.H. Gage, *FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain*. Mol Cell Neurosci, 1995. **6**(5): p. 474-86.

120. Palmer, T.D., J. Takahashi, and F.H. Gage, *The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells*. Mol Cell Neurosci, 1997. **8**(6): p. 389-404.
121. Palmer, T.D., A.R. Willhoite, and F.H. Gage, *Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis*. J Comp Neurol, 2000. **425**(4): p. 479-94.
122. Parent, J.M., et al., *Inhibition of dentate granule cell neurogenesis with brain irradiation does not prevent seizure-induced mossy fiber synaptic reorganization in the rat*. J Neurosci, 1999. **19**(11): p. 4508-19.
123. Parent, J.M., et al., *Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus*. J Neurosci, 1997. **17**(10): p. 3727-38.
124. Park, C., et al., *Inhibition of neuronal nitric oxide synthase increases adrenalectomy-induced granule cell death in the rat dentate gyrus*. Brain Res, 2002. **933**(1): p. 81-4.
125. Park, C., et al., *Inhibition of neuronal nitric oxide synthase enhances cell proliferation in the dentate gyrus of the adrenalectomized rat*. Neurosci Lett, 2001. **309**(1): p. 9-12.
126. Park, C., et al., *The chronic inhibition of nitric oxide synthase enhances cell proliferation in the adult rat hippocampus*. Neurosci Lett, 2003. **339**(1): p. 9-12.
127. Park, J.S., et al., *Expression and regulation of endothelial nitric oxide synthase by vascular endothelial growth factor in ECV 304 cells*. J Korean Med Sci, 2002. **17**(2): p. 161-7.
128. Pieper, A.A., et al., *Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death*. Trends Pharmacol Sci, 1999. **20**(4): p. 171-81.

129. Qu, X.W., et al., *Neuronal nitric oxide synthase (NOS) regulates the expression of inducible NOS in rat small intestine via modulation of nuclear factor kappa B*. *Faseb J*, 2001. **15**(2): p. 439-46.
130. Rakic, P., *Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis*. *J Neurosci*, 2002. **22**(3): p. 614-8.
131. Rand, M.J. and C.G. Li, *Nitric oxide as a neurotransmitter in peripheral nerves: nature of transmitter and mechanism of transmission*. *Annu Rev Physiol*, 1995. **57**: p. 659-82.
132. Reif, A., *Der NO-Signalweg und adulte Neurogenese: gibt es einen Zusammenhang?*, in *Klausurtagung des SFB 581 "Molekulare Modelle für Erkrankungen des Nervensystems"*. 2002: Würzburg.
133. Reif, A., *Über die Funktion des Cofaktors Tetrahydrobiopterin für die neuronale NO-Synthase*. Doktorarbeit aus der medizinischen Fakultät, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2000.
134. Reif, A., et al., *Endothelial nitric oxide synthase (NOS-III) has a double edged role in regulating adult neurogenesis*. in preparation, 2003.
135. Reif, A., et al., *Differential effect of endothelial nitric oxide synthase (NOS-III) on the regulation of adult neurogenesis and behaviour*. *Eur J Neurosci*, 2004. **20**(4): p. 885-95.
136. Reynolds, B.A., W. Tetzlaff, and S. Weiss, *A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes*. *J Neurosci*, 1992. **12**(11): p. 4565-74.
137. Rickard, N.S., M.E. Gibbs, and K.T. Ng, *Inhibition of the endothelial isoform of nitric oxide synthase impairs long-term memory formation in the chick*. *Learn Mem*, 1999. **6**(5): p. 458-66.

138. Schilling, K., H.H. Schmidt, and S.L. Baader, *Nitric oxide synthase expression reveals compartments of cerebellar granule cells and suggests a role for mossy fibers in their development*. *Neuroscience*, 1994. **59**(4): p. 893-903.
139. Schmidt, H.H. and U. Walter, *NO at work*. *Cell*, 1994. **78**(6): p. 919-25.
140. Schmidt, H.H., T.D. Warner, and F. Murad, *Double-edged role of endogenous nitric oxide*. *Lancet*, 1992. **339**(8799): p. 986.
141. Schmidt, H.H.W., *NO, endogener Botenstoff und Zellgift*. *Med. Mo. Pharm.*, 1994. **17**(6): p. 168-85.
142. Schuman, E.M. and D.V. Madison, *Locally distributed synaptic potentiation in the hippocampus*. *Science*, 1994. **263**(5146): p. 532-6.
143. Schuman, E.M. and D.V. Madison, *A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation*. *Science*, 1991. **254**(5037): p. 1503-6.
144. Seki, T. and Y. Arai, *Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus*. *Neuroreport*, 1995. **6**(18): p. 2479-82.
145. Seri, B., et al., *Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus*. *J Neurosci*, 2001. **21**(18): p. 7153-60.
146. Shen, Q., et al., *Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells*. *Science*, 2004. **304**(5675): p. 1338-40.
147. Shesely, E.G., et al., *Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(23): p. 13176-81.
148. Shors, T.J., et al., *Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories*. *Nature*, 2001. **410**(6826): p. 372-6.

149. Snyder, S.H. and D.S. Bredt, *Nitric oxide as a neuronal messenger*. Trends Pharmacol Sci, 1991. **12**(4): p. 125-8.
150. Snyder, S.H. and C.D. Ferris, *Novel neurotransmitters and their neuropsychiatric relevance*. Am J Psychiatry, 2000. **157**(11): p. 1738-51.
151. Son, H., et al., *Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase*. Cell, 1996. **87**(6): p. 1015-23.
152. Song, H., *Neural stem cells in adult brain - Regulation by neuronal activity and implication in learning and memory*, in *Stem Cells in Developing and Aging Brains - from Neurogenesis to Treatment of Neurological Disorders*.
153. Song, H.J., C.F. Stevens, and F.H. Gage, *Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons*. Nat Neurosci, 2002. **5**(5): p. 438-45.
154. Steiner, B., et al., *Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice*. Glia, 2004. **46**(1): p. 41-52.
155. Stopper, H., et al., *Cytotoxic versus genotoxic effects of nitric oxide (NO)*. Toxicol Lett, 1999. **106**(1): p. 59-67.
156. Tada, E., et al., *X-irradiation causes a prolonged reduction in cell proliferation in the dentate gyrus of adult rats*. Neuroscience, 2000. **99**(1): p. 33-41.
157. Takahashi, T., R.S. Nowakowski, and V.S. Caviness, Jr., *BUdR as an S-phase marker for quantitative studies of cytokinetic behaviour in the murine cerebral ventricular zone*. J Neurocytol, 1992. **21**(3): p. 185-97.

158. Tanapat, P., et al., *Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat*. J Neurosci, 1999. **19**(14): p. 5792-801.
159. Trepel, M., *Neuroanatomie - Struktur und Funktion*. 1995, München Wien Baltimore: Urban und Schwarzenberg.
160. Umans, J.G. and R. Levi, *Nitric oxide in the regulation of blood flow and arterial pressure*. Annu Rev Physiol, 1995. **57**: p. 771-90.
161. Valtschanoff, J.G., et al., *Neurons in rat hippocampus that synthesize nitric oxide*. J Comp Neurol, 1993. **331**(1): p. 111-21.
162. van Praag, H., et al., *Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(23): p. 13427-31.
163. van Praag, H., et al., *Functional neurogenesis in the adult hippocampus*. Nature, 2002. **415**(6875): p. 1030-4.
164. Vanderwinden, J.M., et al., *Nitric oxide synthase activity in infantile hypertrophic pyloric stenosis*. N Engl J Med, 1992. **327**(8): p. 511-5.
165. Wiencken, A.E. and V.A. Casagrande, *Endothelial nitric oxide synthetase (eNOS) in astrocytes: another source of nitric oxide in neocortex*. Glia, 1999. **26**(4): p. 280-90.
166. Xie, K., et al., *Destruction of bystander cells by tumor cells transfected with inducible nitric oxide (NO) synthase gene*. J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(6): p. 421-7.
167. Yun, H.Y., V.L. Dawson, and T.M. Dawson, *Neurobiology of nitric oxide*. Crit Rev Neurobiol, 1996. **10**(3-4): p. 291-316.

168. Yun, H.Y., V.L. Dawson, and T.M. Dawson, *Nitric oxide in health and disease of the nervous system*. Mol Psychiatry, 1997. **2**(4): p. 300-10.
169. Zhang, R., et al., *A nitric oxide donor induces neurogenesis and reduces functional deficits after stroke in rats*. Ann Neurol, 2001. **50**(5): p. 602-11.
170. Zhao, M., et al., *Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(13): p. 7925-30.
171. Zhao, X., X. Lu, and Q. Feng, *Deficiency in endothelial nitric oxide synthase impairs myocardial angiogenesis*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(6): p. H2371-8.
172. Zhu, D.Y., et al., *Inducible nitric oxide synthase expression in the ischemic core and penumbra after transient focal cerebral ischemia in mice*. Life Sci, 2002. **71**(17): p. 1985-96.
173. Zhu, D.Y., et al., *Expression of inducible nitric oxide synthase after focal cerebral ischemia stimulates neurogenesis in the adult rodent dentate gyrus*. J Neurosci, 2003. **23**(1): p. 223-9.
174. Zhu, Y., et al., *Vascular endothelial growth factor promotes proliferation of cortical neuron precursors by regulating E2F expression*. Faseb J, 2003. **17**(2): p. 186-93.
175. Zigova, T., et al., *Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb*. Mol Cell Neurosci, 1998. **11**(4): p. 234-45.

## Danksagung

Bei allen, die zur Entstehung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich herzlich bedanken. Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Lesch für die Übernahme des Referates und die Überlassung des hochinteressanten Themengebietes. Frau Prof. Dr. Sommer danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Koreferates und für die Bereitstellung der Versuchstiere. Meinen beiden Betreuern Dr. Andreas Reif und Dr. Angelika Schmitt danke ich für die hervorragende Einarbeitung, für die exzellente Anleitung zu wissenschaftlichem Arbeiten und für viele produktive wissenschaftliche Diskussionen. Die technischen Assistent(inn)en Iris Fischer, Gabriela Ortega, Marion Winnig und Thomas Elpel verdienen hohe Anerkennung dafür, dass sie stets freundliche und hilfsbereite Ansprechpartner bei technischen Fragen waren. Frau cand. med. Sybille Groß danke ich für die zuvorkommende Einweisung in die Auswertung mit dem Programm Digitrace. Dem leider verstorbenen Prof. Dr. Beckmann und Herrn Dr. Senitz sei für die freundliche Überlassung des neurobiologischen Labors der Psychiatrischen Universitätsklinik gedankt, in dem die Versuche der vorliegenden Arbeit größtenteils durchgeführt wurden. Das gesamte Team der Tierpfleger im Labor der Neurologischen Klinik der Universität Würzburg verdient Anerkennung für die optimale Pflege und Aufzucht der Versuchstiere. Dr. B. Holtmann und H. Brünner (Neurologische Universitätsklinik Würzburg) übernahmen freundlicherweise die Genotypisierung der Versuchstiere.

Abschließend bin ich allen Menschen zu großem Dank verpflichtet, die die mich in den vergangenen Jahren unterstützt, begleitet und gefördert haben.

# Lebenslauf

## Daten zur Person

Name: Matthias Ralf Wycislo  
Geburtsdatum: 10.11.1972  
Geburtsort: Ansbach  
Adresse: Eichenstr. 1, 91522 Ansbach  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig

## Schulbildung

1979-1983 Waldschule Ansbach (Grundschule)  
1983-1992 Platen-Gymnasium Ansbach (mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium)  
1992 Abitur, Gewährung eines Hochschulstipendiums des Freistaates Bayern (BayBFG)

## Grundwehrdienst

1992-1993 im Sanitätsdienst der Bundeswehr (München, Hamm)

## Hochschulausbildung

1993-1994 Beginn der Hochschulausbildung in der Fachrichtung Chemie (Diplom) an der Universität Würzburg  
1994-2001 Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg  
09/1996 Ärztliche Vorprüfung / Physikum  
03/1998 1. Staatsexamen / 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
04/2000 2. Staatsexamen / 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
06/2001 3. Staatsexamen, Abschließen der Ärztlichen Prüfung  
06/2001 Erlaubnis zur Arbeit als Arzt im Praktikum / Teilapprobation

01/2004                      Approbation als Arzt

### **Wissenschaftliche Tätigkeit**

1998-1999                      Wissenschaftliche Tätigkeit und Assistent im Praktikum der Physiologischen Chemie am Lehrstuhl für Physiologische Chemie I (Biozentrum) der Universität Würzburg (Arbeitsgruppe Prof. Dr. D. Palm)

2001-2004                      Doktorarbeit in der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität Würzburg (Abteilung für Klinische Psychobiologie, Leiter: Prof. Dr. K.-P. Lesch)

2002-2003                      Wissenschaftliche Tätigkeit in der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität Würzburg (Arbeitsgruppe Physiologie des menschlichen Kortex / Zentrale Motorik, Leiter: Prof. Dr. J. Claßen)

2004-2007                      Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Assistenzarzt am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie / Klinisch-Chemisches Zentrallaboratorium, Universitätsklinikum der RWTH Aachen (Direktor: Prof. Dr. med. Prof. h. c. (RCH) A. M. Gressner)

seit 2007                      Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Assistenzarzt am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (Zentrallabor), Klinikum der Universität Regensburg (Direktor: Prof. Dr. med. G. Schmitz)

### **Berufliche Tätigkeit**

2002-2003                      Tätigkeit als Arzt im Praktikum (AiP), Neurologische Universitätsklinik Würzburg (Direktor: Prof. Dr. K. V. Toyka)

01/2004                      Approbation als Arzt

2004-2007                      Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Assistenzarzt am

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie /  
Klinisch-Chemisches Zentrallaboratorium,  
Universitätsklinikum der RWTH Aachen (Direktor: Prof.  
Dr. med. Prof. h. c. (RCH) A. M. Gressner),  
Weiterbildung zum Facharzt für Laboratoriumsmedizin  
und zum Klinischen Chemiker

seit 2007

Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Assistenzarzt am  
Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin  
(Zentrallabor), Klinikum der Universität Regensburg  
(Direktor: Prof. Dr. med. G. Schmitz), Weiterbildung  
zum Facharzt für Laboratoriumsmedizin und zum  
Klinischen Chemiker

Regensburg, den 22.10.2007

Matthias Wycislo