

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

**Untersuchungen zur Differenzierung
neu gebildeter Zellen
im Hippocampus von adulten
Serotonintransporter-Knockout-Mäusen**

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

vorgelegt von
Matthias R. M. Hermann
aus Konstanz

Würzburg, September 2008

Referent: Prof. Dr. med. K.-P. Lesch

Koreferent: Prof. Dr. med. P. Kugler

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.05.2009

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das serotonerge System und der Serotonintransporter	1
1.2	Serotonin und psychische Erkrankungen	3
1.3	Das Modell der Serotonintransporter-Knockout-Maus	6
1.4	Die adulte Neurogenese und ihre Regulation	8
2	Fragestellung	19
3	Material und Methoden	20
3.1	Material	20
3.1.1	Versuchstiere	20
3.1.2	Immunreagenzien und Antikörper	20
3.1.3	Puffer und Lösungen	21
3.1.4	Geräte	22
3.1.5	Verschiedenes	22
3.2	Methoden	23
3.2.1	BrdU-Injektion und Herstellung der Gewebeschnitte	23
3.2.2	Doppelmarkierung mit Hilfe der Immunfluoreszenz	23
3.2.3	Die konfokale Lasermikroskopie	24
4	Ergebnisse	26
4.1	Identifizierung und quantitative Analyse neu gebildeter Astrozyten	26
4.2	Identifizierung und quantitative Analyse neu gebildeter Neurone	30
4.3	Das Migrationsverhalten neu gebildeter Zellen	34
5	Diskussion	38
5.1	Gliogenese	40

5.2	Neurogenese	44
5.3	Neurogenese und Serotonin	48
5.4	Das Migrationsverhalten neu gebildeter Neurone	51
6	Zusammenfassung	52
7	Anhang	54
7.1	Abkürzungsverzeichnis	54
7.2	Literaturverzeichnis	57
7.3	Veröffentlichung	73
7.4	Danksagung	
7.5	Lebenslauf	

1 Einleitung

1.1 Das serotonerge System und der Serotonintransporter

Das Monoamin Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) ist ein Neurotransmitter, der aus der essentiellen Aminosäure Tryptophan synthetisiert wird. In den präsynaptischen Nervenendigungen wird er in Vesikel aufgenommen und dort gespeichert. Durch ein ankommendes Aktionspotential depolarisiert die Membran und die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration steigt. Dies führt zur Entleerung der Vesikel in den synaptischen Spalt mittels Exozytose. Das nun frei diffundierende 5-HT bindet an die 5-HT-Rezeptoren der post- und präsynaptischen Membran (Abb. 1).

Die Beendigung des Signals kann durch zwei Mechanismen erfolgen. Zum einen wird der Transmitter 5-HT mit Hilfe eines hochaffinen 5-HT-Transporters (5-HTT) wieder in die Präsynapse aufgenommen oder er verlässt durch Diffusion den synaptischen Spalt. In der Präsynapse wird der Hauptteil des 5-HT wieder in Vesikeln gespeichert. Ein geringer Anteil wird durch die Monoaminoxidase-A (MAO-A) zu 5-Hydroxy-indolacetaldehyd abgebaut und nach Oxidation zu 5-Hydroxyindolessigsäure mit dem Harn ausgeschieden [Lodish 2000; Berk 2000; Schmidt und Thews 2000; Silbernagl 2001]. Somit kontrolliert der 5-HTT die extrazelluläre Konzentration von 5-HT und damit die Dauer des Neurotransmissionssignals. Nicht nur Selektive Serotonin Wiederaufnahme-Inhibitoren (SSRI), sondern auch Kokain und Metamfetamine, wie beispielsweise 3,4-Methylendioxyamphetamin (MDMA, „Ecstasy“) entwickeln ihre Wirkung über die Blockade dieses Transporters und führen so zu einer verlängerten Signalübertragung [Bengel et al. 1998; Schmitt et al. 2003].

Das *5-HTT*-Gen gehört zur Gen-Familie der Na^+/Cl^- -abhängigen Transporter. Weitere Mitglieder dieser Gen-Familie sind der GABA-, Dopamin- und Noradrenalin-Transporter. Für den 5-HTT kodiert ein einzelnes Gen. Lesch und Mitarbeitern gelang es, die Organisation des humanen *5-HTT*-Genes zu entschlüsseln [Lesch et al. 1994]. Dieses Gen liegt auf dem Chromosom 17q11.1-q12. Es besitzt eine Länge von 35 kB und setzt sich aus 14 Exons zusammen. Beim Menschen befindet sich innerhalb der 1,4 kB umfassenden Promotorregion eine sich wiederholende Sequenz. Durch Unterschiede in der Anzahl dieses repetierenden Elementes

entstehen Längenvariationen in dieser Promotorregion (5-HTTLPR, *5-HTT* Gene-linked polymorphic region). Der Effekt der 5-HTTLPR-Längenvariation wurde an Lymphoblasten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die kurze Form mit einer geringeren 5-HTT-Expression und 5-HTT-Funktion einhergeht [Lesch et al. 2001].

Der 5-HTT wird vor allem in den serotonergen Neuronen der Raphe-Kerne des Mittelhirns und ihren Projektionen in Cortex, Amygdala, Substantia nigra, Nucleus caudatus, Hypothalamus und der CA3-Region des Hippocampus exprimiert. Aber auch außerhalb des ZNS kann der 5-HTT in Thrombozyten, Lymphoblasten, pulmonalen und plazentaren Zellen sowie den Nebennieren nachgewiesen werden [Schmidt und Thews, 2000; Löffler und Petrides, 1997].

5-HT spielt nicht nur eine Rolle als Neurotransmitter, sondern ist ein wichtiger Regulator in der Morphogenese, der Migration, der Differenzierung und der Synaptogenese von Zellen [Lauder et al. 1981; Whitaker-Azmitia 1991]. Außerdem hat 5-HT einen Einfluss auf die Verhaltensparameter Angst und Aggressivität und spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung affektiver Erkrankungen. 5-HT hat darüber hinaus außerhalb des Gehirnes eine wichtige Rolle im Gastrointestinaltrakt. Im Darm erfolgt die stärkste Produktion von 5-HT durch die Tryptophanhydroxylase (TPH1). Etwa 90% des im Körper produzierten 5-HT wird in den enterochromaffinen Zellen des Magen-Darm-Traktes synthetisiert und gespeichert. Über die 5-HT₃- und 5-HT₄-Rezeptoren regt 5-HT die Darmperistaltik an. Eine weitere Funktion des 5-HT ist die Unterstützung der vaskulären Blutstillung bei Blutgefäßverletzungen. Das in Thrombozyten und den Gefäßwänden gespeicherte 5-HT wird zusammen mit Katecholaminen freigesetzt. Dies führt über 5-HT₂-Rezeptoren zu einer Vasokonstriktion glatter Muskulatur und damit zu einer Verlangsamung des Blutstromes, was die zelluläre Blutstillung begünstigt. Zusätzlich unterstützt 5-HT die Thrombozytenaggregation [Schmidt und Thews 2000; Löffler und Petrides 1997].

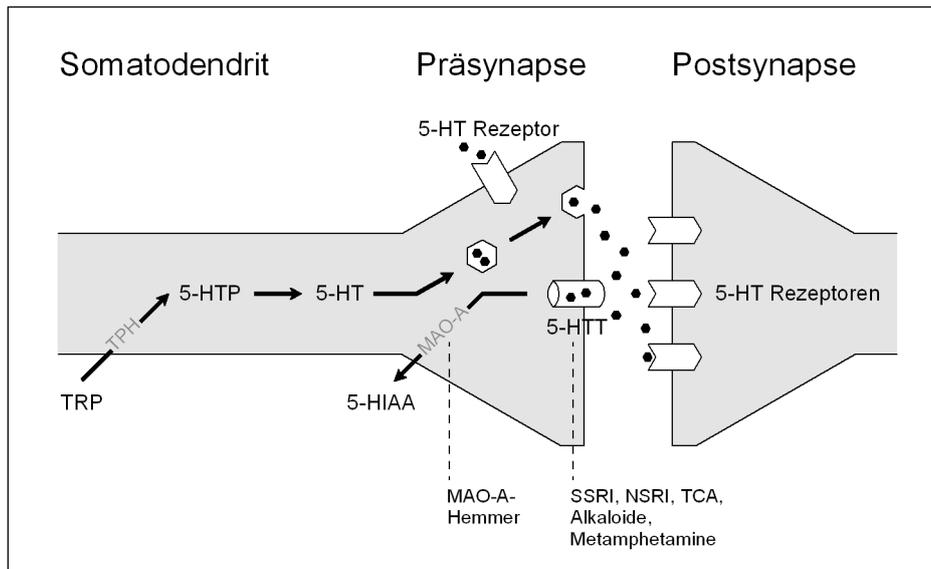


Abb. 1. Die serotonerge Synapse. Schema des Serotonin(5-HT)-Stoffwechsels mit den Syntheseschritten von Tryptophan (TRP) über 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) mittels der Tryptophanhydroxylase (TPH) zu 5-HT. 5-HT wird in Vesikeln gespeichert. Es erfolgt die Ausschüttung mit Exozytose und anschließende Wiederaufnahme in die Präsynapse mit Hilfe des 5-HT-Transporters (5-HTT). Sowohl prä- als auch postsynaptisch befinden sich 5-HT-Rezeptoren. Trizyklische Antidepressiva, TCH (z.B. Imipramin, Amitriptylin), Selektive-Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer, SSRI (z.B. Fluoxetin), Nicht-Selektive-Wiederaufnahme-Hemmer, NSRI, Metamphetamin und Alkaloide hemmen die Wiederaufnahme von 5-HT aus dem synaptischen Spalt in die Präsynapse. Nichtreversible Monoaminoxidase-A-Hemmer, MAO-A-Hemmer (z.B. Tranylcypromin) verhindern den Abbau von 5-HT in der Synapse. 5-HT wird zu 5-HIAA (5-Hydroxyindolessigsäure) abgebaut und über die Niere ausgeschieden.

1.2 Serotonin und psychische Erkrankungen

Schon im fünften Jahrhundert vor Christus hatte Hippokrates eine Erklärung für die Depression. Diese beruhte auf seiner Vier-Säfte-Theorie nach der alle Stimmungen des Menschen von dem Verhältnis von Blut, Schleim, gelber Galle und schwarzer Galle abhängig seien. Ein Überschuss der schwarzen Galle verursachte demnach die Melancholie (griechisch für schwarze Galle), die damalige Bezeichnung für die Depression [Brockhaus, 1999]. Zwar haben wir heute ein anderes Erklärungsmodell, trotzdem behält Hippokrates Recht, dass eine körperliche, pathophysiologische Ursache für die Depression verantwortlich ist [Birbaumer und Schmidt, 2002].

Die Depression wird definiert als eine psychische Krankheit mit einer Störung der Affektivität, der Einheit des Gemüts- und Gefühlslebens, bei der ein depressives Syndrom im Vordergrund steht. Die typischen Symptome sind u.a. eine

niedergedrückte, traurige Stimmung, Gehemmtheit im Denken und Handeln, Interesselosigkeit, Konzentrationsstörungen, Schlaf- und Appetitstörungen, Gewichtsverlust, Leistungsabfall, Isolationsneigung und Rückgang zwischenmenschlicher Kontakte. Dabei wurden in der Vergangenheit drei Formen der Depression unterschieden: die Depression als Teil einer organischen Erkrankung, als psychoreaktive Krankheit oder als körperlich begründbare, endogene Depression. Es hat sich gezeigt, dass eine eindeutige Trennung nicht möglich und empirisch auch nicht haltbar ist. So wird zurzeit hauptsächlich nach der Intensität der Depression und der zusätzlichen Präsenz von psychotischen Symptomen (z.B. Halluzinationen, Wahn) unterschieden [Pschyrembel, 1998; Brunnhuber und Lieb, 2000].

Die Monoamin-Mangel-Hypothese der Depression ist die heute vorherrschende theoretische Vorstellung zur Entstehung der Depression. Diese geht von einer Mangelsituation der Monoamine 5-HT und Noradrenalin im Zentralen Nervensystem (ZNS) als Ursache für die depressive Symptomatik aus. Gestützt wird diese Hypothese durch die Wirksamkeit verschiedener Antidepressiva, wie z.B. den Monoamin-Oxidase-Hemmern (Monoamin-Oxidase-Inhibitoren, MAOI), den trizyklischen Antidepressiva (*non selective monoamine reuptake inhibitors*, NSMRI, TCA), den Selektiven-Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitoren (*selective serotonin reuptake inhibitor*, SSRI) und den Selektiven-Noradrenalin-Aufnahme-Hemmern (*selective noradrenaline reuptake inhibitor*, SNRI). Bei der Depression wird eine verminderte Aktivität serotonerger und adrenerger Neurotransmission vermutet. Es konnte durch Autopsie-Studien gezeigt werden, dass im Hirngewebe von depressiven, nicht medikamentös behandelten Patienten und depressiven Selbstmördern die Dichte der postsynaptischen 5-HT₂-Rezeptoren im frontalen Kortex deutlich erhöht ist [Yates et al. 1990; Owens und Nemeroff, 1994; Risch und Nemeroff, 1992; Biver et al. 1997; Underwood et al. 1999; Arango et al. 2001; Stockmeier et al. 1998; Nemeroff et al. 1998]. Eine Erklärung dafür ist der Regulationsmechanismus der positiven Rückkopplung; aufgrund einer niedrigeren Plasmakonzentration von 5-HT und NA kommt es zu einer kompensatorischen Rezeptorvermehrung und damit zu einer gesteigerten Rezeptordichte. Neben der Wirksamkeit der Pharmakotherapie liefert Argitis und Mitarbeiter ein weiteres Argument für die Monoamin-Mangel-Hypothese. Um die normale Gegenregulation

präsynaptischer Autorezeptoren zu vermeiden, gab er zusätzlich zu einem SSRI (Fluoxetin, Paroxetin) den 5-HT-Autorezeptorblocker Pindolol [Artigas et al. 1996]. So erhöhte sich die 5-HT-Konzentration ohne Gegenregulation und es kam zu einer verstärkten Wirkung der SSRI.

Darüber hinaus scheinen Menschen mit dem kurzen Allel des *5-HTT*-Promotors und einer damit einhergehenden ca. 40%igen Reduktion der 5-HTT-Expression um (siehe 1.1) eine höhere Prävalenz für die Ausbildung von Persönlichkeitsstörungen, die Depressionen und Angststörungen fördern, zu besitzen [Lesch et al. 1996; Lesch und Mössner, 1998].

Zu einer weiteren Ursache für die Entstehung einer Depression wird eine Fehlfunktion der normalen, adäquaten Regulation im Umgang mit akutem und chronischem Stress gezählt [Kendler et al. 1999]. Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse ist beteiligt an der hormonellen Stressreaktion. Bei Depressiven finden sich erhöhte Werte des Corticotropin-Releasing-Hormons (CRH) im Hypothalamus, was zu einer vermehrten Ausschüttung von ACTH im Hypophysenvorderlappen (HVL) und von Glukokortikoiden aus der Nebennierenrinde (NNR) führt. Eine normale Gegenregulation, also eine Reduktion der Glukokortikoidausschüttung bei Injektion von Dexamethason, einem synthetischen Kortikoid mit einer 30-fachen glukokortikoiden Potenz, ist bei Depressiven nicht zu finden. Außerdem konnte in Tierversuchen durch Injektion von CRH depressive Symptome (Schlaflosigkeit, Appetitverlust, verminderte sexuelle Aktivität, Angst) ausgelöst werden [Birbaumer und Schmidt, 2002; John und Pinel, 2001]. Ob es sich bei der Erhöhung des Kortisol-Spiegels um die Ursache oder um eine Folge der Depression handelt, ist noch unklar.

Die Gehirne von depressiven Patienten scheinen auch morphologischen Veränderungen zu unterliegen, so ist eine Verkleinerung des hippocampalen Volumens beobachtet worden. Sheline und Mitarbeiter berichten, dass die Volumenverkleinerung mit der Dauer der Krankheit korreliert [Sheline et al. 1996/1999]. Ob es sich bei diesen Abweichungen der Hirnmorphologie um eine Ursache oder eine Wirkung der Depression handelt, konnte bis jetzt ebenfalls nicht geklärt werden. Außerdem sind diese pathologischen Veränderungen auch bei Patienten mit anderen hirnrorganischen Erkrankungen, wie z.B. dem Morbus Alzheimer, gefunden worden. Es gibt noch keine, für die Depression hinreichende, spezifische Begründung für diese Tatsache. Auch ungeklärt ist bisher, ob diese

Veränderungen des Hippocampus irreversibel sind. In neueren Untersuchungen gibt es Hinweise, dass unter antidepressiver Therapie das Volumen des Hippocampus wieder zunimmt [Bremner et al. 2000; Steffens et al. 2000; Colla et al. 2007; Kasper und McEwen, 2008].

Eine Schwierigkeit bei der Beurteilung der 5-HT-Wirkung liegt in der Vielfältigkeit der Effekte, die dieser Stoff auslöst. Es gibt nicht nur mehr als zwölf verschiedene Rezeptoren mit unterschiedlichen Mechanismen, sondern auch die direkten Einflüsse sind mannigfaltig. So scheint er neben der Regulation der Neurogenese, der Zellreifung und der Zellmigration ebenfalls einen Einfluss auf den programmierten Zelltod, der Apoptose, zu haben [Persico et al. 2003].

1.3 Das Modell der Serotonintransporter-Knockout-Maus

Zur Untersuchung des serotonergen Systems sowie der Funktion des 5-HTT wurden 5-HTT-Knockout(KO)-Mäuse generiert. Diese gentechnisch veränderten Mäuse besitzen ein im zweiten Exon inaktiviertes *5-HTT*-Gen, welches das Start-Codon für den 5-HTT beinhaltet. Daraus resultiert eine Inaktivierung des 5-HTT ohne Veränderung benachbarter Gene (Bengel et al. 1997/1998). Eine erhöhte postnatale Sterblichkeit oder Unfruchtbarkeit im Erwachsenenalter konnte bei diesen gentechnisch veränderten Mäusen nicht festgestellt werden [Persico et al. 2001/2003].

Bei den 5-HTT-KO-Versuchstieren erfolgt, wie bei den entsprechenden Kontrollmäusen (den so genannten Wildtyp-Mäusen), eine normale 5-HT Bildung in der Präsynapse und anschließende Ausschüttung in den synaptischen Spalt. Der Transmitter kann aber aus dem synaptischen Spalt nicht mehr zurück durch die präsynaptische Membran transportiert werden. Mathews und Mitarbeiter konnten in ihren Untersuchungen zeigen, dass das Fehlen des 5-HTT eine Erhöhung der extrazellulären 5-HT-Konzentration um das 5 – 9 fache in den Hirnregionen *Striatum* und *Substantia nigra* bewirkt [Mathews et al. 2004]. Eine weitere Untersuchung demonstrierte, dass bei 5-HTT-KO-Mäusen eine signifikante Erhöhung des

extrazellulären 5-HT um das 6 – 10 fache in den Hirnregionen *Nucleus accumbens*, *Putamen*, *Nucleus caudatus* und Präfrontaler Cortex zu finden ist [Shen et al. 2004]. Andererseits ist die 5-HT-Konzentration im Gehirngewebe der 5-HTT-KO-Mäuse, verglichen mit Wildtyp-Mäusen, um 60 - 80% erniedrigt [Bengel et al. 1998; Fabre et al. 2000; Mathews et al. 2000/2002; Lira et al. 2003]. Die Anzahl der serotonergen Neurone in den dorsalen Raphekernen ist bei 5-HTT-KO-Mäusen um die Hälfte reduziert und gleichzeitig ist die neuronale Aktivität ebenfalls um das 4-fach verringert [Lira et al. 2003].

Eine Gegenregulation der gestörten 5-HT-Homöostase konnte bei den 5-HTT-KO-Mäusen nachgewiesen werden. Der 5-HT-Transport könnte mittels alternativen Monoamin-Transportersystemen, die eine geringere Affinität zu 5-HT haben, geschehen. Dabei kommt es jedoch nicht zu einer Normalisierung der 5-HT-Werte, wie sie dem einer Wildtyp-Maus entsprechen [Mathews et al. 2004; Shen et al. 2004].

Das Fehlen des 5-HTT wirkt sich auch auf die Expression verschiedener 5-HT-Rezeptoren, wie z.B. die 5-HT_{1A}-, 5-HT_{1B}- und 5-HT₃-Rezeptoren, aus [Fabre et al. 2000; Moessner et al. 2004]. Die Veränderungen, die durch den 5-HTT-KO zustande kommen, werden durch verschiedene kompensatorische Mechanismen wenigstens zu einem gewissen Teil ausgeglichen. So übernehmen andere Transporter einen Teil der Funktion des 5-HTT. Schmitt und ihre Mitarbeiter konnten z.B. zeigen, dass die Expression des OCT3 (*organic cation transporter 3*, *Organischer Kationen Transporter 3*) im Hippocampus von 5-HTT-KO-Mäusen deutlich erhöht ist. Dieser organische Kationen-Transporter ist ebenfalls in der Lage, 5-HT in die Präsynapse aufzunehmen, allerdings mit einer viel geringeren Affinität. Zwei weitere Monoamin-Transporter, der Dopamin-Transporter (DAT) und der Noradrenalin-Transporter (NAT) wurden ebenfalls vermehrt in den neuronalen Stammzellen nachgewiesen. Auch diese können das Fehlen des 5-HTT in einem geringen Maße ausgleichen [Schmitt et al. 2003].

Gentechnisch unveränderte Mäuse zeigen bei Gabe von dem Amphetamin MDMA („Ecstasy“) eine bis zu fünffache Steigerung der lokomotorischen Aktivität. 5-HTT-KO-Mäuse zeigten dagegen keine Reaktion auf MDMA, was als Beleg für den 5-HTT als Hauptangriffspunkt des MDMA gewertet werden kann [Bengel et al. 1998; Fox et al. 2007].

Die Gabe des SSRI Fluoxetin führt bei Mäusen mit einem unveränderten Genotyp zu einer deutlich verringerten Immobilität im „Tail-Suspension-Test“. In den 5-HTT-KO-Mäusen dagegen konnten keine Reaktionen auf Fluoxetin beobachtet werden. Andere Antidepressiva, die nicht selektiv den 5-HT-Stoffwechsel beeinflussen, wie die Trizyklischen Antidepressiva Desipramin und Imipramin, die über eine Hemmung von 5-HT-, Noradrenalin- und Dopamin-Transporter wirken, zeigen einen abgeschwächten Effekt [Holmes et al. 2002; Montanez et al. 2003; Fox et al. 2007].

Des Weiteren besitzen die 5-HTT-Mutanten einen bestimmten Verhaltensphänotyp. Sie sind im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen weniger aggressiv, zeigen verstärkte Angstreaktionen und eine geringere Neugier im Erkunden fremder Umgebungen [Holmes et al. 2002/2003; Lesch et al. 2003]. Nach einer peripheren Nervenverletzung haben die 5-HTT-KO-Mäuse kein erhöhtes thermisches Schmerzempfinden im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen [Vogel et al. 2003].

Diese Verhaltensmodifikationen konnten jedoch nur bei C57BL/6J(B6) Mausstämmen, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, beobachtet werden. Andere Stämme, wie der 129S6, hingegen zeigten keine konsistenten Veränderungen des gleichen Verhaltensphänotyps. Dieses Beispiel zeigt, dass der genetische Hintergrund eines Mäusestammes einen maßgeblichen Einfluss auf das Verhalten der gentechnisch modifizierten Versuchstiere hat [Holmes et al. 2003].

1.4 Die adulte Neurogenese und ihre Regulation

Bis vor kurzem bestand die landläufige Meinung, dass eine Bildung von neuronalen Zellen nur während der embryonalen und frühen postnatalen Entwicklung beim Säugetier stattfindet [Cajal, 1897; Rakic, 1985]. Dieses Dogma, dass im adulten Gehirn keine neuen Neurone gebildet werden können und dass es nach Ausreifung des Gehirnes nur noch ein langsames Absterben der Hirnzellen gibt, war noch sehr lange weit verbreitet. Doch schon 1965 konnten Altman und Das die Aktivität neuronaler Stammzellen in Hirnen von Ratten nachweisen [Altman und Das, 1965]. Die Neurogenese (von manchen Autoren auch Neuroneogenese genannt) ist definiert als die Entstehung neuer, voll funktionsfähiger Zellen aus Stammzellen bzw.

Vorläuferzellen. Im allgemeinen Sprachgebrauch wird nicht zwischen der Bildung von Neuronen, Gliazellen oder Gefäßzellen unterschieden, die korrekterweise als Neurogenese, Gliogenese oder Angiogenese bezeichnet werden müsste. Der Hippocampus und die Subventrikulärzone (SVZ) sind die beiden Hauptregionen mit ständig proliferierenden Stammzellen [Reynolds et al.1992; Richards et al. 1992; Palmer et al.1997; Gage, 2002].

Bei Mäusen und Ratten wird die Anzahl der neu gebildeten Zellen auf 1000 - 3000 Zellen/Tag geschätzt. Verglichen mit der Gesamtzahl der Zellen der KZS des Hippocampus von ca. 1 - 2 Millionen scheint dies relativ wenig. Auf die Lebenszeit einer Maus gerechnet sind dies jedoch ca. 20 - 30% der Gesamtzellzahl, die ausgetauscht wurde [Cameron und McKay, 2001; Shors et al. 2001; Jacobs, 2002].

Zum Nachweis von *in vivo* neu gebildeten Zellen wird Bromodeoxyuridine (BrdU) verwendet. Bromodeoxyuridin wird systemisch verabreicht und anstelle von Thymidin während der Synthesephase der Mitose in die DNA eingebaut. Nach histologischer Bearbeitung des Gewebes mit Antikörpern gegen BrdU können diese immunhistochemisch sichtbar gemacht werden. BrdU ist im Körper nur kurz verfügbar, so dass nur die zum Zeitpunkt der BrdU-Injektion sich teilenden Zellen markiert werden. Etwa vier Wochen nach der BrdU-Gabe sind die Migration und Ausdifferenzierung der neu gebildeten Zellen abgeschlossen, so dass zu diesem Zeitpunkt eine Doppelmarkierung mit Markern für Neurone oder Astrozyten möglich ist [Miller und Nowakowski, 1988; Del Rio und Soriano, 1989; Takahashi et al. 1992; Kempermann et al. 1998; Cameron und McKay, 2001].

Im *Gyrus dentatus* des Hippocampus sind die Stamm- bzw. Vorläuferzellen in der Subgranuläre Zone (SGZ) lokalisiert. Von dort wandern die neu gebildeten Zellen unter gleichzeitiger Ausdifferenzierung zu ihrem Funktionsort, der Körnerzellschicht (KZS, *Stratum granulosum*) oder dem Hilus [Trepel, 1999]. Auch bei anderen Nagetieren wie z.B. mongolischen Wüstenrennmäusen und bei Primaten konnte eine adulte Neurogenese nachgewiesen werden [Reynolds und Weiss, 1992; Gould et al. 1999; Gage et al. 2000; Taupin und Gage, 2002]. Aber auch beim Menschen konnte die adulte Neurogenese nachgewiesen werden [Eriksson et al. 1998; Gross et al. 2000]. Im Rahmen einer klinischen Studie wurde Patienten zur Überwachung von Tumorstadium BrdU verabreicht. Nach ihrem Ableben konnte bei diesen Patienten im Hippocampus Neurogenese nachgewiesen werden [Eriksson et al. 1998].

Der Hippocampus (aus dem Griechischen: das Seepferdchen) ist der Hauptteil des Archicortex, einem der entwicklungsgeschichtlich ältesten Teile des Gehirns. Es handelt sich um einen Teil des limbischen Systems mit der Funktion eines Integrationsorgans, das über Verbindungen mit dem Hypothalamus über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse, den Septumkernen und dem *Gyrus cinguli* das endokrine, viszerale und emotionale Geschehen beeinflusst. Dabei scheint er eine besondere Rolle für die Merkfähigkeit zu spielen. Beim Menschen liegt der Hippocampus basal in den Temporallappen. Bei niederen Säugern, wie z.B. den Mäusen, liegt er zentral über dem Zwischenhirn [Trepel, 1999]. Der Hippocampus besteht hauptsächlich aus zwei unterschiedlichen Bereichen, dem innen liegenden *Gyrus dentatus* und dem Ammonshorn (CA)(Abb.2).

In vielen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die neu gebildeten Zellen strukturell und funktionell im Hippocampus integriert sind. Diese Zellen haben die gleiche neuronale Morphologie und zeigen die gleichen passiven Membranfunktionen, Aktionspotentiale und synaptischen Funktionen wie bereits bestehende Zellen der Körnerzellschicht [Van Praag et al. 2002; Song et al. 2002]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die reifen BrdU-positiven Zellen in der KZS des Hippocampus Axone bilden, die in der CA3 Pyramidenzellschicht enden, was der normalen neuronalen Anatomie entspricht. Außerdem sind die neu gebildeten Zellen von Synapsen umgeben, ein Hinweis auf mögliche Vernetzung und Interaktion mit anderen Zellen sein kann [Suzuki et al. 1997; Markakis und Gage, 1999].

Welche Rolle die neu gebildeten Zellen im adulten ZNS einnehmen, ist bisher nicht eindeutig geklärt. Zwei Möglichkeiten wären, zum einen, dass sie als Ersatz für absterbende Zellen dienen und ihre Funktion die Erhaltung des bestehenden Status wäre. Eine zweite Möglichkeit wäre, dass diese neu gebildeten, jungen Zellen dem ausgewachsenen ZNS eine größere Plastizität bzw. Anpassungsfähigkeit auf vielfältige Einflüsse geben [Biebl et al. 2000].

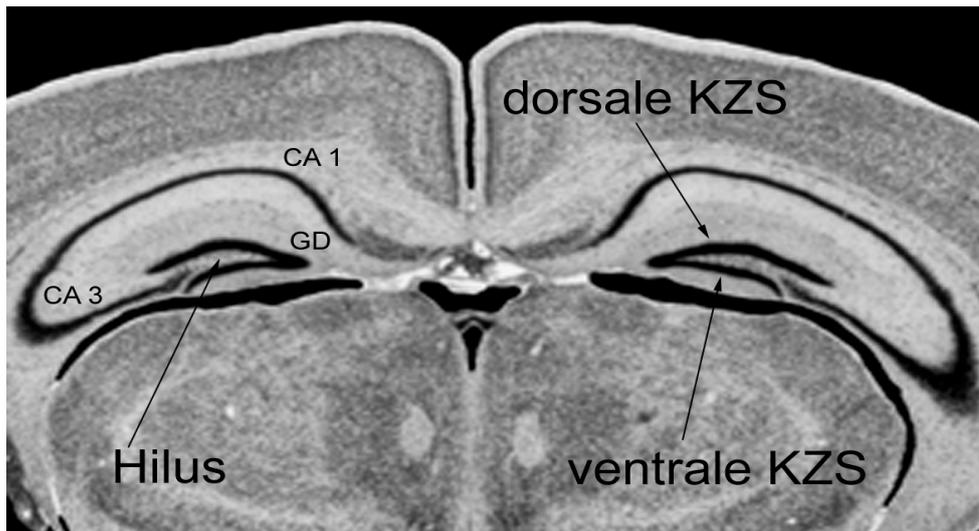


Abb. 2. Histologische Färbung eines murinen koronaren Gehirnschnittes mit Cresylechtviolett (aus www.mbl.org/atlas). Deutlich ist die Trennung in zwei symmetrische Hemisphären mit jeweils einem Hippocampus zu erkennen. Die Körnerzellschicht (KZS) des *Gyrus dentatus* (GD) kann in die dorsale und ventrale KZS, welche den Hilus umschließen, unterteilt werden. Angeschlossen an den GD liegt das Ammonshorn (*Cornu ammonis*, CA), welches in die Abschnitte CA 1 bis CA 4 unterteilt wird.

Die Regulation der Neurogenese ist sehr komplex und noch lange nicht in allen Details verstanden. In den letzten Jahren sind bereits zahlreiche genetische, physiologische und pathophysiologische Faktoren sowie Umwelteinflüsse erforscht worden [Owens und Nemeroff, 1994; Duman et al. 2001; Malberg 2004; Campbell et al. 2004; Banasr et al. 2004; Ming und Song, 2005; Lledo et al. 2006; Duman und Monteggia, 2006; Nithianantharajah und Hannan, 2006; Elder et al. 2006].

In diesem Abschnitt soll ein Teil der Faktoren, die einen negativen Einfluss auf die adulte Neurogenese haben, dargestellt werden. Anschließend werden dann einige der Faktoren genannt, die die adulte Neurogenese positiv beeinflussen.

So konnten z.B. in Mäusen mit verschiedenem genetischem Hintergrund (verschiedene Mäusestämme) unterschiedliche Neurogeneseraten nachgewiesen werden [Kempermann et al. 1997; Perfilieva et al. 2001].

Außerdem hat das Alter der Versuchstiere einen Einfluss auf die Fähigkeit, neue Zellen bilden zu können; ältere Ratten im Alter von 12 - 27 Monaten weisen eine deutlich geringere Neubildung von Zellen im *Gyrus dentatus* auf als junge Ratten mit einem Alter von 6 Monaten [Kuhn et al. 1996]. In einer anderen Untersuchung wurde ebenfalls die Neubildungsrate von Zellen im *Gyrus dentatus* bei Ratten im Alter von

18 Monaten und mit einem Alter von 35 Tagen mit dem gleichen Ergebnis verglichen [Seki et al. 1995].

Einer der Umwelteinflüsse, die die adulte Neurogenese beeinflussen, ist akuter und chronischer Stress. Dieser führt zu einer reduzierten Neubildungsrate von Neuronen im Hippocampus. Gould und Mitarbeiter zeigten dies in einem Versuch mit adulten Weißbüschelaffen (*Gallithrix jacchus*). Die männlichen Affen wurden für ein Zeitintervall von 1h in den Heimatkäfig eines zweiten männlichen Affen gesetzt, was zu erheblichem Stress führte. Im Vergleich zu Kontrolltieren hatten diese Affen eine signifikant niedrigere Proliferationsrate neuer Zellen [Gould et al. 1998]. Ein ähnlicher Versuch mit Spitzhörnchen zeigte ebenfalls eine deutlich reduzierte adulte Neurogenese im Hippocampus [Gould et al. 1997]. Stress induziert über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse die vermehrte Ausschüttung von Glukokortikoiden wie Cortisol. Die Gabe von Cortisol als Modell des durch Stress erhöhten Cortisolspiegels hemmt die Neurogenese sowohl in adulten als auch in heranwachsenden Tieren [Gould et al. 1992/1994; Cameron et al. 1994]. Allerdings scheint dies kein direkter Effekt von Cortisol zu sein, da neu entstandene hippocampale Zellen nur sehr wenige Typ-I- und Typ-II-Glukokortikoid-Rezeptoren besitzen [Cameron et al. 1993]. Die Hemmung der Neurogenese durch Cortisol scheint also über einen indirekten Weg zustande zu kommen. Ein Faktor, der dafür in Frage kommen könnte, ist der *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF). In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Stress und Glukokortikoide einen negativen Einfluss auf den BDNF-Spiegel im Hippocampus haben [Smith et al. 1995; Schaaf et al. 1998]. Eine Verbindung von BDNF und 5-HT konnten Nibuya und Mitarbeiter nachweisen, als sie zeigten, dass die chronische Gabe diverser Antidepressiva, wie Tranylcypromin, Sertralin, Desipramin und Mianserin, die BDNF-Expression erhöhten [Nibuya et al. 1995].

In einer Umkehrung der o.g. Versuche konnte durch Adrenalektomie (Entfernung der Nebenschilddrüse) und der daraus resultierender Senkung des Cortisol-Spiegels die Neurogenese angeregt werden. Dabei beobachtet man gleichzeitig auch eine Anhebung des 5-HT-Spiegels und eine Erhöhung der 5-HT_{1A}-Rezeptordichte. Dies unterstreicht die wichtige Rolle, die 5-HT bei der Beeinflussung der adulten Neurogenese spielt [Hayakawa et al. 1994].

Die durch Stress verminderte Neurogenese und damit einhergehende geringere Anzahl an Körnerzellen im adulten Hippocampus könnte eine Erklärung für die kleineren Hippocampus-Volumina bei depressiven Patienten sein [Duman et al. 2001].

Zusammenfassend kann man sagen, dass Stress zu einer verringerten Neurogenese führt und dies wiederum zu kleineren Hippocampus-Volumina [Gould et al. 1992/1994; Duman et al. 2001]. Eine hinreichende Erklärung für das Auftreten depressiver Symptome ist damit jedoch noch nicht gegeben, da es sich bei der Depression um eine Erkrankung mit einer multifaktoriellen Genese (u.a. hereditäre, genetische Ursachen) handelt. Die Depression auf eine reduzierte adulte Neurogenese und stressabhängige Cortisol- und 5-HT-Spiegel zu reduzieren, wäre eine zu einfache Erklärung.

Im folgenden Abschnitt werden einige der Faktoren dargestellt, die einen positiven Einfluss auf die adulte Neurogenese im adulten ZNS, v.a. dem Hippocampus, haben. Dass diese vermehrte Zellneubildung nicht nur mit morphologischen Veränderungen einhergeht, sondern auch zu messbaren Veränderungen des Verhaltens führt, konnte in einigen Untersuchungen nachgewiesen werden.

In typischen Lernaufgaben, die mit dem Hippocampus assoziiert sind, zeigten Tiere mit erhöhter adulter Neurogenese deutlich verbesserte Leistungen im „*Morris water maze task*“. Bei diesem Test besteht die Aufgabe der Mäuse darin, eine Plattform in einem Wasserbecken zu finden. Die Schnelligkeit im Auffinden der Plattform war nach den Behandlungen, die zu gesteigerter Neurogenese führten, ebenfalls erhöht [Van Praag et al. 1999; Gould et al. 1999]. Daraus kann geschlossen werden, dass die neu gebildeten Zellen im Hippocampus von adulten Mäusen eine Rolle beim Lernen und der Gedächtnisleistung spielen.

Reizreiche Umgebung sowie Lern- und Gedächtnistraining fördert im Gegensatz zu einer Standardkäfighaltung die Proliferation adulter Stammzellen [Kempermann et al. 1997/1998; Nilsson et al. 1999; Matsumori et al. 2006; Rossi et al. 2006,]. Den größten Einfluss auf die adulte Neurogenese scheint im Zusammenhang mit reizreicher Umgebung die Förderung motorischer Aktivität mit Hilfe eines Laufrades zu sein. [Van Praag et al. 1999; Nilsson et al. 1999; Keller et al. 2000; Hattori et al.

2007]. Die Mechanismen, die dieser vermehrten Neurogenese zugrunde liegen sind nicht eindeutig geklärt. *Plasma-Insulin-like-Growth-Factor 1* (IGF-1) spielt ebenfalls eine Rolle bei der Hirnentwicklung. Carro und Mitarbeiter zeigten, dass durch vermehrte Bewegung eine Stimulation des systemischen IGF-1 erfolgt und dies zu einer vermehrten Neurogenese führt [Carro et al. 2000]. Ebenfalls durch Bewegung ist der Fibroblasten-Wachstums-Faktor (*Fibroblast-Growth-Factor 2*, FGF-2) erhöht und hat einen positiven Einfluss auf die adulte Neurogenese [Gomez-Pinilla et al. 1997]. Für beide Faktoren konnte auch unabhängig von vermehrter Bewegung gezeigt werden, dass sie die adulte Neurogenese erhöhen [Gomez-Pinilla et al. 1997; Carro et al. 2000].

In weiterführenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Faktoren die bereits im Zusammenhang mit Bewegung und Neurogenese untersucht wurden auch alleine systemisch appliziert eine positive Wirkung auf die adulte Neurogenese haben können. Für verschiedene Wachstumsfaktoren wie *Insulin-like-Growth-Factor* (IGF-1), intrazerebral oder nasal appliziert [Aberg et al. 2000] oder *Fibroblast-Growth-Factor* (FGF-2) [Yoshimura et al. 2001] konnte dieser Effekt nachgewiesen werden.

Aber auch andere körpereigene Substanzen wie z.B. das weibliche Geschlechtshormon Estrogen fördert nach Untersuchungen von Tanapat und Mitarbeitern die Proliferation von Neuronen im *Gyrus dentatus* von adulten, weiblichen Ratten [Tanapat et al. 1999].

Als eine direkte Antwort auf Verletzungen des Gehirns und fokale zerebrale Hirninfarkte kommt es zur Förderung der Neurogenese sowohl in der ipsilateralen als auch in der kontralateralen Hirnhemisphäre [Jin et al. 2001; Matsumori et al. 2006].

Besonderes Interesse gilt dem Einfluss von Psychopharmaka auf die adulte Neurogenese, vor allem im Hinblick auf das Verständnis von affektiven Erkrankungen und deren Therapiemöglichkeiten [Lesch et al. 1998/2000/2001/2001; Benninghoff et al. 2002; Malberg et al. 2000/2004/2005/2005; Schechter et al. 2005; Duman et al. 2001/2001]. Verschiedene Substanzen sind in ihrer Wirkung auf die Neubildung von Neuronen im adulten Gehirn untersucht worden. Dexfenfluramin bzw. sein aktiver Hauptmetabolit N-Norfenfluramin wirkt als 5-HT-Releaser und

erhöht so den extrazellulären 5-HT-Spiegel. Daneben ist er ein direkter 5-HT_{2C}-Agonist. Fenfluramin ist strukturellchemisch mit den Amphetaminen verwandt, hat aber keine psychostimulierenden Begleiteffekte. (Fenfluramin wurde zeitweilig als Appetitzügler verwandt, jedoch wegen Nebenwirkungen im Langzeitgebrauch, wie Herzklappenschäden und pulmonale Hypertonie wurde die Zulassung entzogen. Verantwortlich für die Nebenwirkungen soll die agonistische Wirkung auf 5-HT_{2B}-Rezeptoren, z.B. am Herzen, sein [Khan et al. 1998; Setola et al. 2005].)

Der Effekt auf die adulte Neurogenese kommt über die erhöhten 5-HT-Werte zustande. Nach Untersuchungen von Azmitia läuft diese Wirkung von 5-HT über den 5-HT_{1A}-Rezeptor [Azmitia et al. 1996]. Einen negativen Einfluss auf die adulte Neurogenese haben 5-HT-Antagonisten. In Untersuchungen war in der Wirkstoffgruppe der 5-HT-Antagonisten (NAN-190, p-MPPI und WAY-100635) eine um ca. 30% geringere Zellproliferation der BrdU-positiven Zellen im Gyrus dentatus des Hippocampus festgestellt worden [Radley und Jacobs, 2002]. Eine Studie von Brezun und Daszuta zeigte, dass durch eine Hemmung der Synthese von 5-HT oder durch Verletzungen des 5-HT-Systems und der daraus folgenden Erniedrigung des 5-HT-Spiegels zu einer verminderten Neurogenese kommt [Brezun und Daszuta, 1999].

Eine positive Beeinflussung der adulten Neurogenese im Hippocampus durch die verschiedenen Substanzgruppen von Antidepressiva konnte nachgewiesen werden. Nach chronischer Gabe des klassischen Trizyklischen Antidepressivums (TCA, *Non selective Monoamino Reuptake Inhibitors*, NSMRI) Imipramin konnte eine gesteigerte Neubildungsrate von Zellen im adulten Hippocampus beobachtet werden [Sairanen et al. 2005]. Aber auch andere Medikamente aus der Gruppe der Antidepressiva mit unterschiedlichen Wirkmechanismen wie Desipramin (Trizyklisches Antidepressivum, TCA), Fluoxetin (Selektiver-Serotonin-Wieder-aufnahme-Hemmer, SSRI), Reboxetin (Selektiver-Noradrenalin-Wiederaufnahme-Hemmer, SNRI), Tranylcypromin (Monoaminoxidase-Hemmer, MAOI) bewirken eine deutlich gesteigerte Neurogenese im adulten Hippocampus von Ratten [Malberg et al. 2000; Duman et al. 2001; Malberg und Duman, 2003; Chen et al. 2006]. Auch neuere Therapieansätze bei Depressionen mit Phosphodiesterase-IV-Inhibitoren wie Rolipram führen zu einer gesteigerten Neurogeneserate im Hippocampus von adulten Mäusen [Nakagawa et al. 2002; Sasaki et al. 2007].

Aber auch Medikamente, die seit Jahrzehnten in der Psychiatrie zur Behandlung bipolarer Depressionen verwendet werden und keine klassischen Antidepressiva sind, die über den 5-HT-, bzw. NA-Stoffwechsel wirken, haben einen Effekt auf die adulte Neurogenese. So konnte gezeigt werden, dass die chronische Gabe von Lithiumsalzen eine erhöhende Wirkung auf die Neurogenese bei ausgewachsenen Nagetieren hat [Chen et al. 2000; Song et al. 2003].

Die positive Wirkung auf die adulte Neurogenese ist bei den verwendeten medikamentösen Antidepressiva unterschiedlich stark ausgeprägt. So zeigen die Trizyklischen Antidepressiva die höchste Zellneubildung, dann abnehmend die SSRI, die MAOI und die SNRI mit der vergleichsweise kleinsten Neubildungsrate [Malberg et al. 2000; Duman et al. 2001; Kemperman et al. 2002]. Allerdings tritt dieser Effekt nicht bei einer einmaligen oder kurzzeitigen (bis 5 Tage) Gabe dieser Substanzen ein, sondern eine mindesten 14-tägige Behandlung ist dafür notwendig [Malberg et al. 2000]. Diese zeitliche Verzögerung der adulten Neurogenese stimmt mit dem verzögerten Einsetzen der klinischen Wirkung der antidepressiven Therapie überein [Karow und Lang, 2003]. Nicht die direkte Wirkung der Antidepressiva scheinen den therapeutischen, antidepressiven Effekt auszulösen, sondern langsamere, neurophysiologische und strukturelle Veränderungen müssen für dieses Ergebnis verantwortlich sein.

Der gemeinsame Nenner aller o.g. pharmakologischen Ansätze zur Behandlung der Depression, die über verschiedene pharmakologische Mechanismen wirken, scheint eine erhöhte 5-HT-Aktivität und darüber hinaus eine verstärkte Neurogeneserate im adulten Hippocampus zu sein.

Eine nicht medikamentöse, aber sehr wirksame Therapie der Depression ist die Elektrokonvulsionstherapie (EKT). Sie ist eine der effektivsten Wege, die Neurogeneserate zu erhöhen und bewirkte in Untersuchungen die höchste Neubildungsrate aller antidepressiven Therapien bei adulten Ratten und Affen [Madsen et al. 2000; Malberg et al. 2000; Bolwig und Madsen, 2007; Perera et al. 2007]. Scott und Mitarbeiter zeigten, dass die Verabreichung von EKT zu einer Verdoppelung der BrdU-positiven Zellen führt [Scott et al. 2000]. In einer weiterführenden Arbeit wurde gezeigt, dass auch in einem Ratten-Modell für Depression, hervorgerufen durch chronische Gabe eines Kortikosteroids, eine starke

Zunahme der Neurogenese nach einmaliger und insbesondere nach mehrmaliger EKT zu verzeichnen war [Hellsten et al. 2002].

Andere Substanzen, die über verschiedene Rezeptoren im ZNS wirken und eine psychotrope Wirkung haben, wurden ebenfalls auf ihre neurogenetischen Eigenschaften untersucht.

Cannabinoide, die eine vielfältige psychotrope Wirkung haben und teilweise schon in der Schmerz- und Tumorthherapie eingesetzt werden, fördern die adulte, hippocampale Neurogenese bei Versuchen mit Ratten. Gleichzeitig zeigen die untersuchten Tiere in Verhaltenstests vermindertes Angst- und Depressionsverhalten [Jiang et al. 2005].

Im Gegensatz dazu induziert die chronische Gabe von anderen psychotropen, nicht antidepressiv-wirksamen Substanzen wie Morphin und Heroin eine Abnahme der Neurogenese im adulten Hippocampus von Ratten [Eisch et al. 2000; Yamaguchi et al. 2004; Kahn et al. 2005]. Auch das Antipsychotikum Haloperidol wurden auf seine neurogenetische Wirkung hin untersucht. Allerdings sind die Ergebnisse der unterschiedlichen Studien nicht einheitlich. Eine Erhöhung der adulten Neurogenese wird von Dawirs und Mitarbeiter, eine verringerte Neurogeneserate von Backhouse und Mitarbeitern berichtet [Dawirs et al. 1998; Backhouse et al. 1982]. Die aktuellere Untersuchung von Malberg et al. zeigte hingegen keinen Einfluss auf die adulte Neurogenese [Malberg et al. 2000]. Aus der Substanzgruppe der Neuroleptika wurde die Wirkung von Clozapin auf die Neurogenese untersucht. In Versuchen mit adulten Ratten konnte kein Einfluss auf die adulte Zellneubildung im Hippocampus gefunden werden [Halim et al. 2004; Wang et al. 2004].

Aber auch Medikamente, die keine direkte psychotrope Wirkung haben können die adulte Neurogenese beeinflussen. So induziert der Phosphodiesterase-V-Hemmer Sildenafil (Viagra[®]) die Neurogenese im Hippocampus von Mäusen. Dieses Medikament wird normalerweise als Reservemedikament zur Behandlung von Bluthochdruck (Hypertonie), bei der Behandlung der pulmonalarteriellen Hypertonie und v.a. der erektilen Dysfunktionen verwendet. Den Versuchstieren wurde nach einem künstlichen Hirninfarkt der *Arteria cerebri media*, Sildenafil verabreicht, welches eine vermehrte Zellneubildung im *Gyrus dentatus* und der Subventrikulärzone anregte [Zhang et al. 2002].

Eine weitere wichtige Frage der Neurogeneseforschung ist die welche Funktion die neu gebildeten Zellen im adulten Hippocampus einnehmen.

Die Beteiligung der adulten Neurogenese an Lern- und Gedächtnisprozessen würde eine Erklärung für die zunehmenden oder abnehmenden Lern- und Gedächtnisfunktion bei Erkrankungen wie der Depression erklären. Bei Stress, welcher eng mit der Entstehung von Depressionen assoziiert ist, kommt es zu einer verminderten Neurogenese. So wird postuliert, dass eine zunehmende oder abnehmende Neurogenese im Hippocampus einen Zusammenhang mit der Auftreten oder Abklingen einer klinischen Depression hat [Jacobs et al. 2000; Taupin et al. 2005].

Die zugrunde liegenden Mechanismen von Lern- und Gedächtnisprozessen im Hippocampus sind allerdings noch lange nicht abschließend aufgeklärt, so dass noch weitere Untersuchungen für ein besseres Verständnis dieser Vorgänge notwendig sind.

Das Ziel des Wissens um die physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge der adulten Neurogenese und v.a. die Funktion, die diese neu gebildeten Zellen einnehmen, wird die Frage sein, welcher therapeutische Nutzen im Bereich der neurodegenerativen und neuropathophysiologischen ZNS-Erkrankungen daraus gezogen werden kann.

2 Fragestellung

Erst seit wenigen Jahrzehnten ist wissenschaftlich anerkannt, dass die Neubildung von Neuronen, die sogenannte Neurogenese, auch im erwachsenen Tier und Menschen stattfindet. Zahlreiche Faktoren sind an der Regulation der adulten Neurogenese beteiligt. Einen besonders hohen Stellenwert bei der Förderung der Stammzellproliferation hat 5-HT. Deshalb ist das 5-HTT-KO-Mausmodell mit der veränderten 5-HT-Homöostase und dem verstärkten Angstverhalten zur weiteren Untersuchung der Bedeutung des serotonergen Systems für die adulte Neurogenese geeignet.

Der Neurotransmitter Serotonin (5-HT) nimmt einen hohen Stellenwert in der Funktion des ZNS ein. So hat er nicht nur Einfluss auf Stimmung, Schlaf-Wach-Rhythmus und Schmerzwahrnehmung, sondern dessen Dysbalance wird als ein wichtiger Faktor bei der Entstehung von affektiven Störungen, insbesondere der Depression, angesehen. Bei der serotonergen Neurotransmission spielt der 5-HTT eine zentrale Rolle und ist auch therapeutischer Angriffspunkt vieler Antidepressiva.

In dieser Arbeit soll die Neuronen- und Astrozyten-Neubildung im Hippocampus 5-HTT-defizienter Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe quantitativ bestimmt werden. Dazu soll Mäusen mit unterschiedlichem 5-HTT-Genotyp das Thymidinanalogon BrdU mehrfach appliziert werden. Vier Wochen nach den erfolgten BrdU-Injektionen werden dann die Überlebensraten der neu gebildeten Zellen in den Hippocampi der Versuchstiere mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik nachgewiesen. Zur Identifizierung des Differenzierungsendpunktes der neugebildeten Zellen sollen Doppelmarkierungen mit spezifischen Antikörpern für reife Neurone (NeuN) und Astrozyten (GFAP) durchgeführt werden. Die Analyse der durchgeführten Einfach- und Doppelmarkierungen wird anschließend mit Hilfe des konfokalen Lasermikroskops erfolgen. Dabei wird vor allem die Anfertigung serieller Schnitte durch den gesamten Umfang des Zellkörpers der markierten Zellen dienen. Durch Überlagerung der mit BrdU- und NeuN- bzw. GFAP-markierten Zellen kann dargestellt werden, ob Neurone bzw. Astrozyten neu entstanden sind. Da die neu gebildeten Zellen vier Wochen nach ihrer Entstehung sowohl in die Körnerzellschicht, als auch in den Hilus eingewandert sein können, soll deren Lokalisation zusätzlich dokumentiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Versuchstiere

Die Versuchstiere stammten aus einer 5-HTT-Knockout (KO)-Zuchtlinie des National Institute for Mental Health (NIMH, Washington D.C., USA) mit dem genetischen Hintergrund eines C57/BL6-Mausstammes. Verwendet wurden die Gehirne von insgesamt 15 Mäusen. Die 15 Tiere waren entweder homozygot für das ausgeschaltete 5-HTT-Gen (KO; n=7) oder homozygot für das ursprüngliche so genannte Wildtyp-Gen (WT; n=8). Das durchschnittliche Alter der Tiere betrug 3½ Monate (50 – 52 Tage). Bei Beginn des Experimentes wogen sie zwischen 15 und 25g. Sie hatten freien Zugang zu Wasser und Futter und waren einem, dem natürlichen Tag-Nachtwechsel entsprechenden, artifiziellen Lichtwechsel ausgesetzt.

3.1.2 Immunreagenzien und Antikörper

NHS (<u>n</u> ormal <u>h</u> orse <u>s</u> erum)	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
<u>Primärantikörper</u>	
Anti-BrdU (5- <u>B</u> romo-2'- <u>D</u> eoxy <u>u</u> ridin-5'-Monophosphat)-IgG1 von der Maus, monoklonaler Antikörper	Roche, Indianapolis, USA
Anti-BrdU IgG2a von der Ratte, polyklonaler Antikörper	Serotec Ltd., Kidlington, Oxford, UK
Anti-NeuN (<u>N</u> euronal <u>N</u> uclei) von der Maus, monoklonaler Antikörper	Chemicon International, Inc., Temecula, USA
Anti-GFAP (<u>G</u> lial <u>F</u> ibrillary <u>A</u> cidic <u>P</u> rotein) vom Kaninchen, polyklonaler Antikörper	DAKO Diagnostica GmbH, Hamburg, Deutschland

Sekundärantikörper

Cy³-konjugierter AffiniPure
Anti-Ratten IgG (H+L)
von der Ziege

Jackson ImmunoResearch
Laboratories, Inc., USA

Cy³-konjugierter AffiniPure
Anti-Kaninchen IgG (H+L)
von der Ziege

Jackson ImmunoResearch
Laboratories, Inc., USA

Cy²-konjugierter AffiniPure
Anti-Maus IgG (H+L)
von der Ziege

Jackson ImmunoResearch
Laboratories, Inc., USA

3.1.3 Puffer und Lösungen

TBS (Tris buffered saline)

0,1 M Tris-HCl, pH 7,5

0,15 M NaCl

0,1 M PBS (Phosphate buffered saline)

0,137 M NaCl

2,7 mM KCl

8,1 mM Na₂HPO₄

1,5 mM KH₂PO₄

20 x SSC

3 M NaCl,

0,3 M NaCitrat

0,1M Borsäure, pH 8,5

4% PFA (Paraformalaldehyd)

4% PFA in PBS

Blocklösung

5% NHS

0,25% Triton X-100

2% BSA (bovine serum albumin)
in TBS

5 M Salzsäure (HCl)

Merck, Darmstadt, Deutschland

10% Natriumazid (NaN₃)

Merck, Darmstadt, Deutschland

Thymol >99%

Merck, Darmstadt, Deutschland

3.1.4 Geräte

Konfokales Lasermikroskop Leica TCS SP2	Leica Microsystems GmbH, Heidelberg , Deutschland
Vibratom 752 M Vibroslice	Campden Instruments Ltd., Sileby, UK

3.1.5 Verschiedenes

Rinder Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
5-Bromo-2-Deoxyuridin (BrdU)	Roche, Mannheim, Deutschland
Triton X-100 (t-Octylphenoxypoly- ethoxyethanol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Vitro-Clud	Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Sekundenkleber	UHU GmbH, Bühl, Deutschland
Valet Blades (Vibratomklingen)	World Precision Instruments Ltd., Sileby, UK
Objektträger SuperFrost® Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Deckgläser 24 x 50 mm	A. Hartenstein, Deutschland
Immersionsöl, fluoreszenzfrei	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Microsoft Word 2000	Microsoft, USA
Microsoft Excel 2000	Microsoft, USA
Photoshop 5.5	Adobe Incorporated Systems, USA

3.2 Methoden

3.2.1 BrdU-Injektionen und Herstellung der Gewebeschnitte

Die BrdU-Injektionslösung wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml verwendet. Als Lösungsmittel diente NaCl 0,9 % in A.bidest. Die BrdU-Lösung wurde steril filtriert und vor der Injektion auf Körpertemperatur (37° C) erwärmt. Jeder Maus wurden 75 mg/kg Körpergewicht BrdU intraperitoneal appliziert. Es erfolgten insgesamt vier Injektionen im Abstand von jeweils 2 h. Zur Untersuchung der Überlebensrate und der Differenzierungsrichtung der durch Proliferation neu gebildeten Zellen wurden die Tiere 4 Wochen nach der letzten BrdU-Gabe in Äthernarkose mittels Genickbruch getötet. Die daraufhin entnommenen Hirne wurden für 48 - 72 h in frisch hergestelltem 4%igem PFA bei 4° C fixiert. Danach wurden die Hirne für 4 x 15 min in TBS gespült. Am Vibratom wurden serielle Schnitte des Hippocampus mit einer Dicke von 40 µm hergestellt und bei 4° C in mit Thymol versetztem PBS gelagert. Die Gehirne wurden hierzu mit Sekundenkleber orbital auf dem Schlitten befestigt und in PBS gebadet.

3.2.2 Doppelmarkierungen mit Hilfe der Immunfluoreszenz

Von allen Mäusehirnschnitten wurde jeder sechste Schnitt einer immunhistochemischen Färbung zum gleichzeitigen Nachweis von BrdU und NeuN unterzogen. Nach zweimaligem Spülen der Schnitte in TBS für jeweils 10 min erfolgte eine Inkubation des Gewebes in 50 % Formamid / 2 x SSC bei 65° C für 2 h bei leichtem Schütteln. Anschließend wurden die Schnitte zweimal in TBS und danach in 2 N HCl bei 37° C für 30 min gespült. Die Säurebehandlung führt zur Denaturierung der DNA, damit das darin integrierte BrdU für die Antikörpererkennung frei zugänglich ist. Danach wurden die Schnitte in 0,1 M Borsäure (pH 8,5) für 10 min neutralisiert und dreimal in TBS für jeweils 10 min gespült. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Gewebeschnitte mit Blocklösung bei Raumtemperatur (RT) für mindestens 1 h versetzt. Die gleichzeitige Inkubation der Gewebeschnitte mit dem gegen BrdU gerichteten polyklonalen Antikörper von der Ratte (Verdünnung 1:200 in Blocklösung) und dem gegen NeuN gerichteten

monoklonalen Antikörper von der Maus (Verdünnung 1:2000 in Blocklösung) erfolgte bei 4° C über Nacht. Nach dreimaligem Spülen mit TBS für 10 min folgte die Inkubation mit den Sekundärantikörpern: Cy²-markierter Anti-Ratte-IgG (Verdünnung 1:200) und Cy³-markierter Anti-Kaninchen-Antikörper (Verdünnung 1:200) in TBS bei Raumtemperatur für 2 h. Dieser letzte Schritt erfolgte unter Ausschluss von Licht, um ein Ausbleichen der Fluorochrome Cy² und Cy³ möglichst zu vermeiden. Zum Abschluss wurden die Schnitte 3 x 10 min in TBS gewaschen, anschließend auf Objektträger aufgezogen, über Nacht getrocknet und mit Vitro-Clud und einem Deckplättchen abgedeckt.

Außerdem wurde eine zweite Serie von Hippocampusschnitten einer immunhistochemischen Färbung zum gleichzeitigen Nachweis von BrdU und GFAP unterzogen. Das hierfür verwendete Färbeprotokoll unterscheidet sich nur in Bezug auf die Zusammensetzung der Primär- und Sekundärantikörperlösungen von dem bereits detailliert beschriebenen Immunfluoreszenznachweis (s.o.). Der gegen BrdU gerichtete monoklonale primäre Antikörper von der Maus (Verdünnung 1:400) wurde zusammen mit dem gegen GFAP gerichteten polyklonalen Primärantikörper (Verdünnung 1:2000) eingesetzt. Die Zweitantikörperlösung bestand aus Cy²-markierten, gegen Maus-IgGs gerichtete Antikörper (Verdünnung 1:150) und aus Cy³-markierten, gegen Kaninchen-IgGs gerichtete Antikörper (Verdünnung 1:150). Als Spezifitätskontrolle dienten Inkubationen ohne Primärantikörper.

3.2.3 Die konfokale Lasermikroskopie

Die immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte (siehe 3.2.2) wurden mit Hilfe eines Leica TCS SP2 konfokalen Lasermikroskopes mit der Leica Confocal Software 2.871-6A untersucht. Es wurden verschiedene Leica N-PLAN und PLANPO Objektive mit 20 – 100facher Vergrößerung für die Einzelbilder und die Serienbilder eingesetzt. Die Verwendung von Immersionsöl verringerte die sich am Deckglas reflektierenden Lichtstrahlen, was den Einsatz hochauflösenderer Objektive ermöglichte.

Bei der konfokalen Lasermikroskopie werden die zu untersuchenden Gewebeschnitte in einer Ebene durch bewegliche Laserlichtpunkte verschiedener Wellenlänge abgetastet, die Veränderungen im von dem Schnitt emittierenden Licht

werden mittels einer photoelektrischen Zelle detektiert, elektronisch verarbeitet und zu einer bildlichen Darstellung umgewandelt. Die BrdU-markierten Zellstrukturen wurden mit einem Primärantikörper gekennzeichnet. An diesen bindet der Sekundärantikörper, welcher mit den Cytochromen Cy² bzw. Cy³ markiert ist. Cytochrome Cy² hat eine Emissionswellenlänge von 510nm bei einer Anregungswellenlänge von 492nm (Argon-Ionen-Laser). Das Cytochrome Cy³ hat eine Emissionswellenlänge von 570nm bei einer Anregungswellenlänge von 550nm (Krypton-Laser). Die Lasermikroskopie ermöglicht es, optische Ebenen in der x- und y-Achse aber auch in der z-Achse abzubilden. Dies wurde bei etwa einem Drittel der Aufnahmen gemacht. Aus den Serien dieser mit unterschiedlicher Laseranregung und unterschiedlichen z-Achsenquerschnitten erstellten Bilder konnten anschließend mit dem Computer die Zellstrukturen rekonstruiert und dargestellt werden. So konnten bestehende Kolokalisationen von BrdU und NeuN sowie von BrdU und GFAP in einer Zelle bestätigt werden [Lichtmann, 1994, www.confocal-microscopy.com, www.jireurope.com/technical/f-cy3-5.asp].

Die Untersuchung und Zählung der neu entstandenen Zellen erfolgte in den anatomischen Strukturen SGZ, Hilus und KZS. Die KZS wurde annähernd in drei Drittel, einem unteren (der SGZ am nächsten gelegen), mittleren und oberen Drittel, unterteilt. Betrachtet wurden jeweils einzelne Gesichtsfelder, in denen die neu entstandenen Zellen gezählt und mittels der verschiedenen Farbemissionen den unterschiedlichen Zelltypen (Neurone oder Astrozyten) zugeordnet wurden. Aufgrund des Ausbleichens der Fluorochrome bei der Analyse einzelner Gesichtsfelder konnten Überschneidungen der Gesichtsfelder bzw. Doppelzählungen weitgehend vermieden werden.

Durch die im Färbeprozess erfolgten mechanischen Beanspruchungen der Schnitte kam es teilweise zu Schäden und dem Verlust einzelner Hippocampi. Deshalb wurde die Zahl der einfach- oder doppelt markierten Zellen pro Tier auf die Anzahl der analysierten Hippocampi umgerechnet. Aus den absoluten Zahlenwerten wurde dann der Durchschnitt aller neu entstandenen Zellen pro Hippocampus und die entsprechende Standardabweichung (STABW) berechnet. Die Verteilung der Zellen in den einzelnen Zonen wurde in Prozent angegeben. Die Darstellung erfolgte in Diagrammen, die mit Microsoft Excel und VectorWorks erstellt wurden. Für die statistische Auswertung wurden Microsoft Excel und die Biostatistik von Köhler, Schachtel und Voleske (2002) verwendet.

4 Ergebnisse

Zur Untersuchung der Differenzierung neu gebildeter Zellen im Hippocampus wurden Kolokalisationsstudien mit Hilfe von Antikörpern gegen BrdU und den Zelltyp-Markern NeuN und GFAP durchgeführt. BrdU kennzeichnet alle zum Zeitpunkt der BrdU-Applikationen mitotisch aktiven (neu gebildeten) Zellen. NeuN ist ein spezifischer Marker für reife Neurone und GFAP ist ein Marker für Astrozyten. Die mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbungen doppelt markierten Zellen konnten dadurch verschiedenen Zelltypen, den Neuronen und Astrozyten, zugeordnet werden.

Die untersuchten Versuchstiergruppen umfassten insgesamt 15 C57/BL6-Mäuse, die im Tierlabor der Universitätsklinik Würzburg gezüchtet worden sind. Die ursprüngliche Zuchtlinie wurde im National Institute for Mental Health (NIMH, Washington D.C., USA) generiert. Dabei handelte es sich um sieben Tiere mit einem homozygoten Knockout (KO) für das *5-HTT*-Gen sowie acht Kontrolltiere mit einem voll funktionsfähigen *5-HTT*-Gen. Die Versuchstiere wurden 28 Tage nach Applikation von BrdU getötet, ein Zeitraum, bei dem nicht vorwiegend die Proliferation der adulten Stammzellen untersucht werden kann, sondern die Überlebensrate (survival rate) und die Differenzierungsrichtung der neu gebildeten Zellen. Die Hirnschnitte wurden, wie unter 3.2.1 und 3.2.2 beschrieben, behandelt und die Auswertung erfolgte mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie (siehe 3.2.3).

4.1 Identifizierung und quantitative Analyse neu gebildeter Astrozyten

GFAP (glial fibrillary acidic protein) ist ein im Cytoplasma von Astrozyten lokalisiertes Intermediärfilamentprotein, das als ein spezifischer Marker für Astrozyten verwendet wurde. Abb. 3 zeigt beispielhaft Aufnahmen einer Immunfluoreszenzfärbung zur Untersuchung der Kolokalisation von BrdU und GFAP. BrdU ist in diesen Aufnahmen mit einem grün fluoreszierenden Marker gekennzeichnet (Abb. 3a). In Abb. 3b erfolgte der GFAP-Nachweis mit Hilfe eines roten Fluorochroms. Die meisten Astrozyten sind in der SGZ und im Hilus lokalisiert und nur eine geringere Anzahl an Astrozyten konnte in der KZS nachgewiesen werden. Durch Fusionierung bzw. Überlagerung der Aufnahmen 3a und 3b entsteht Abb. 3c mit der Möglichkeit

Kolokalisationen von BrdU und GFAP zu erkennen und damit neu gebildete Astrozyten zu identifizieren. Abb. 3d zeigt einen neu gebildeten Astrozyten mit dem durch das Überlagern grün und rot fluoreszierender Aufnahmen gelb fluoreszierenden Zellkern und den für Astrozyten typischen Cytoplasmfortsätzen bei stärkerer Vergrößerung. Mit BrdU und GFAP doppelt markierte Zellen waren bei den Kontrolltieren als auch bei den 5-HTT-KO-Mäusen überwiegend in der SGZ lokalisiert (75-80%; siehe auch Abb. 3c und d). Die restlichen 20% bzw. 25% waren im unteren Drittel der KZS zu finden. Im Hilus konnten keine BrdU/GFAP-doppelt markierten Zellen identifiziert werden.

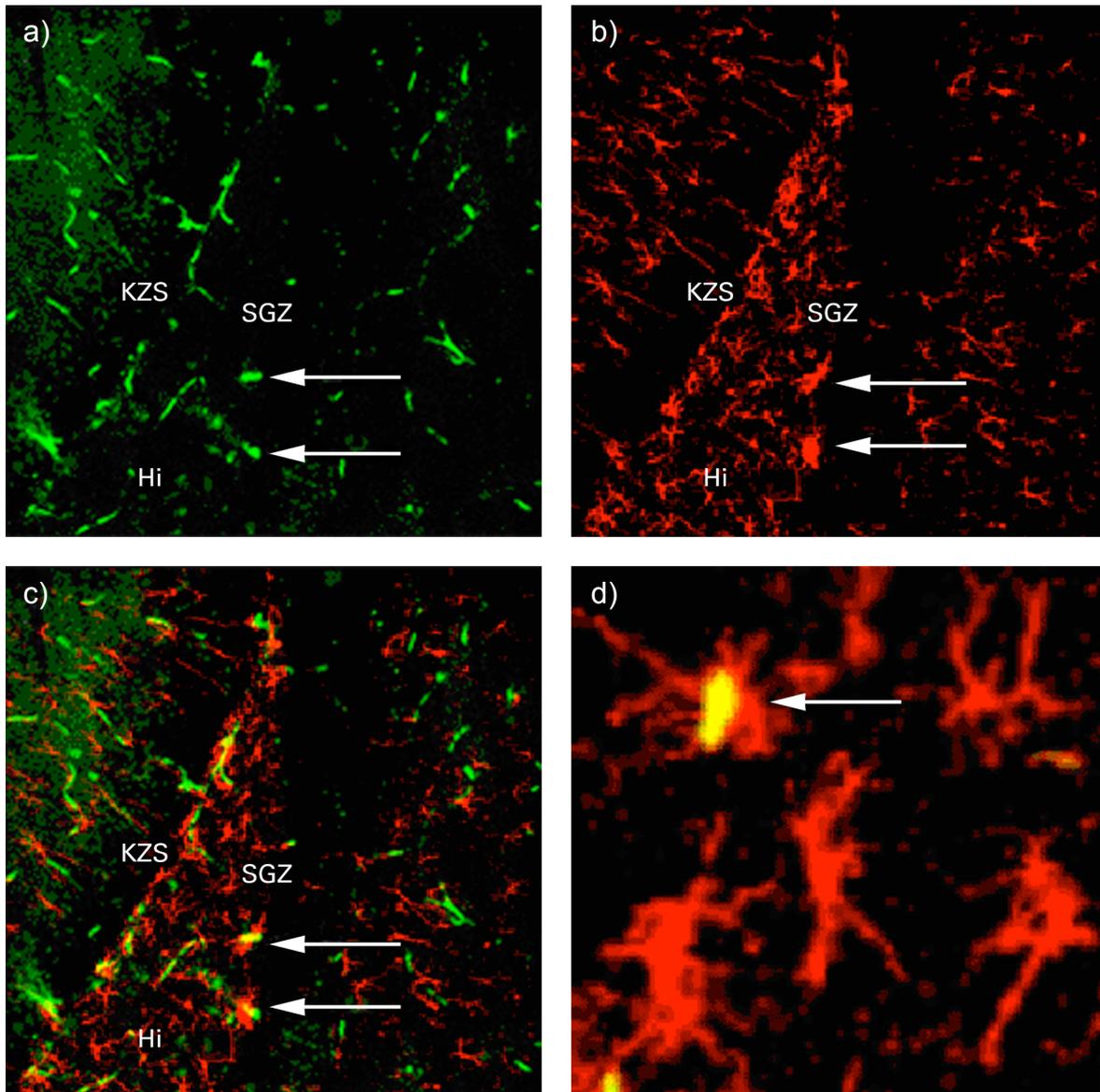


Abb. 3. *BrdU/GFAP-doppelt markierte Zellen in der Subgranulärzone (SGZ) des Gyrus dentatus - Aufnahmen mit Hilfe des konfokalen Lasermikroskops. a) BrdU-positive Zellen (grün, Pfeile), b) GFAP-positive Zellen (rot, Pfeile), c) Fusionierung von a) und b) zur Darstellung doppelt markierter Zellen. Die Pfeile markieren Zellen, welche durch die Kolokalisation von BrdU und GFAP als neu gebildete Astrozyten identifiziert werden konnten. In d) ist ein vergrößerter Ausschnitt aus dem Gyrus dentatus eines weiteren Gewebeschnittes dargestellt. GFAP-positive Fortsätze umschließen in der mit einem Pfeil gekennzeichneten Zelle den gelben Zellkern des neu gebildeten Astrozyten. Hi, Hilus; KZS, Körnerzellschicht.*

Bei der Immunofluoreszenz-Färbereihe mit BrdU/GFAP konnte zwischen den Versuchsgruppen der 5-HTT-KO- und der WT-Mäuse weder in Bezug auf die Gesamtzahl BrdU-positiver Zellen (siehe Abb. 4) noch in Bezug auf die Anzahl neu gebildeter Astrozyten (siehe Abb. 5) ein signifikanter Unterschied gezeigt werden (student's t-test).

Es wurden durchschnittlich 44,34 BrdU-positive Zellen (STABW 15,73) in der KZS (welche die SGZ mit beinhaltet) beider Hippocampi von Kontrollmäusen und 47,99 BrdU-positive Zellen (STABW 11,17) in der KZS von 5-HTT-KO-Mäusen nachgewiesen. Unter Einbeziehung der BrdU-positiven Zellen des Hilus erhöhten sich die Mittelwerte auf 53,34 Zellen (STABW 20,54) bei Kontrolltieren und 55,9 Zellen (STABW 14,03) bei 5-HTT-KO-Tieren (siehe Abb. 4).

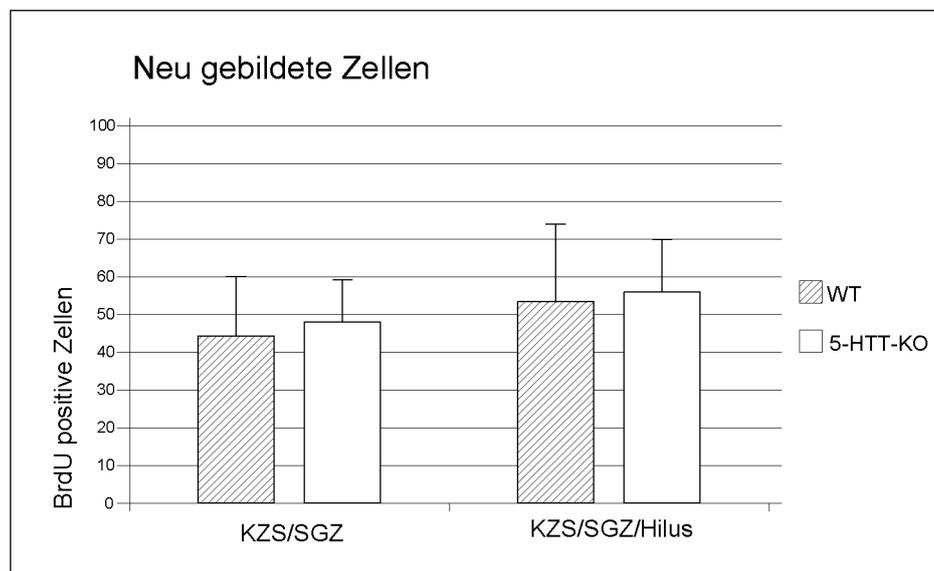


Abb. 4. Durchschnittliche Anzahl BrdU-positiver Zellen pro Gehirn in beiden Hippocampi bei der BrdU/GFAP-Immunofluoreszenz-Färbung in der KZS incl. SGZ und in KZS incl. SGZ und Hilus. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und STABW bei Wildtyp (WT) und 5-HTT-Knockout (5-HTT-KO) Mäusen.

Wie Abb. 5 zeigt, betrug der Anteil an BrdU-positiven Zellen, die gleichzeitig mit dem spezifischen Astrozyten-Marker GFAP markiert werden konnten, in den Hippocampi der WT-Mäusen durchschnittlich 1,54% (STABW 0,65) und bei den 5-HTT-KO-Tieren 1,75% (STABW 0,71).

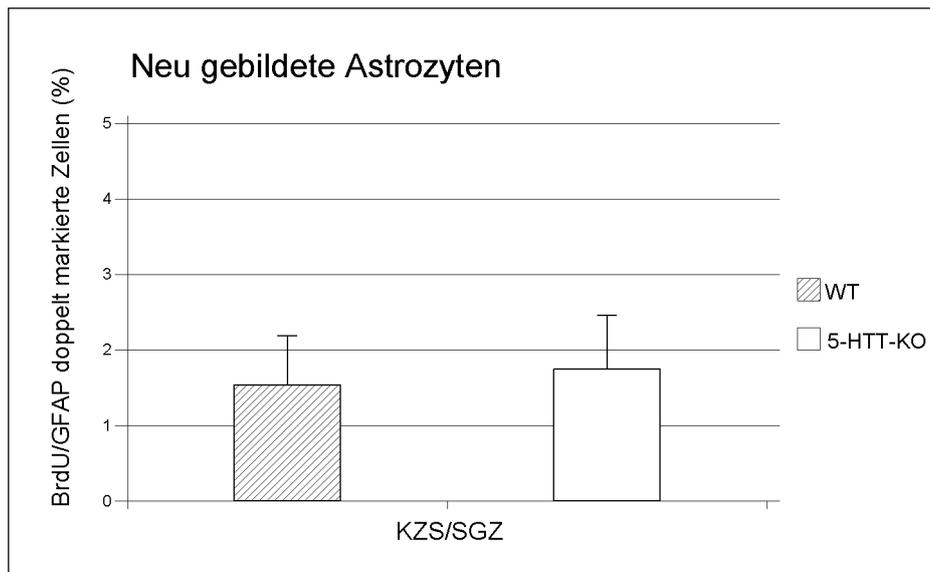


Abb. 5. Durchschnittlicher Anteil der BrdU/GFAP-doppelt markierten Zellen, Astrozyten, an den BrdU-positiven Zellen pro Gehirn in beiden Hippocampi der KZS incl. SGZ. In diesem Diagramm sind die Mittelwerte und STABW bei WT- und 5-HTT-KO-Mäusen dargestellt.

4.2 Identifizierung und quantitative Analyse neu gebildeter Neurone

NeuN (neuronaler Nukleus) ist ein spezifischer Marker für neuronale Zellkerne und wurde bei der immunohistochemischen Färbung zur Kennzeichnung reifer Neurone verwendet. Somit sind Zellen, die sowohl BrdU- als auch NeuN-positiv markiert sind, neu gebildete, adulte Neurone (Abb. 6, 7, 8).

Abb. 6. zeigt Aufnahmen des *Gyrus dentatus* nach Immunofluoreszenzfärbung zur Untersuchung der Kolo-kalisation von BrdU und NeuN. Diese wurden mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops angefertigt. In Abb. 6a wird BrdU über ein rot fluoreszierendes Fluorochrom nachgewiesen. Abb. 6b zeigt den gleichen Bildausschnitt wie in Abb. 6a, wobei bei dieser Aufnahme ein grün fluoreszierendes Fluorochrom NeuN-positive Zellen markiert. Deutlich ist das grüne Band der Körnerzellen der KZS des *Gyrus dentatus* zu sehen. Abb. 6c entsteht durch die Überlagerung der Abb. 6a und 6b, wobei durch die additive Farbmischung gelb fluoreszierende Strukturen entstehen. Diese belegen die Kolo-kalisation von BrdU und NeuN und ermöglichen so die Identifizierung neu gebildeter Neurone.

Die Abbildungen Abb. 7 und Abb. 8 zeigen weitere Aufnahmen von immunhisto-chemische Fluoreszenz-Färbungen des *Gyrus dentatus* vier Wochen nach BrdU-

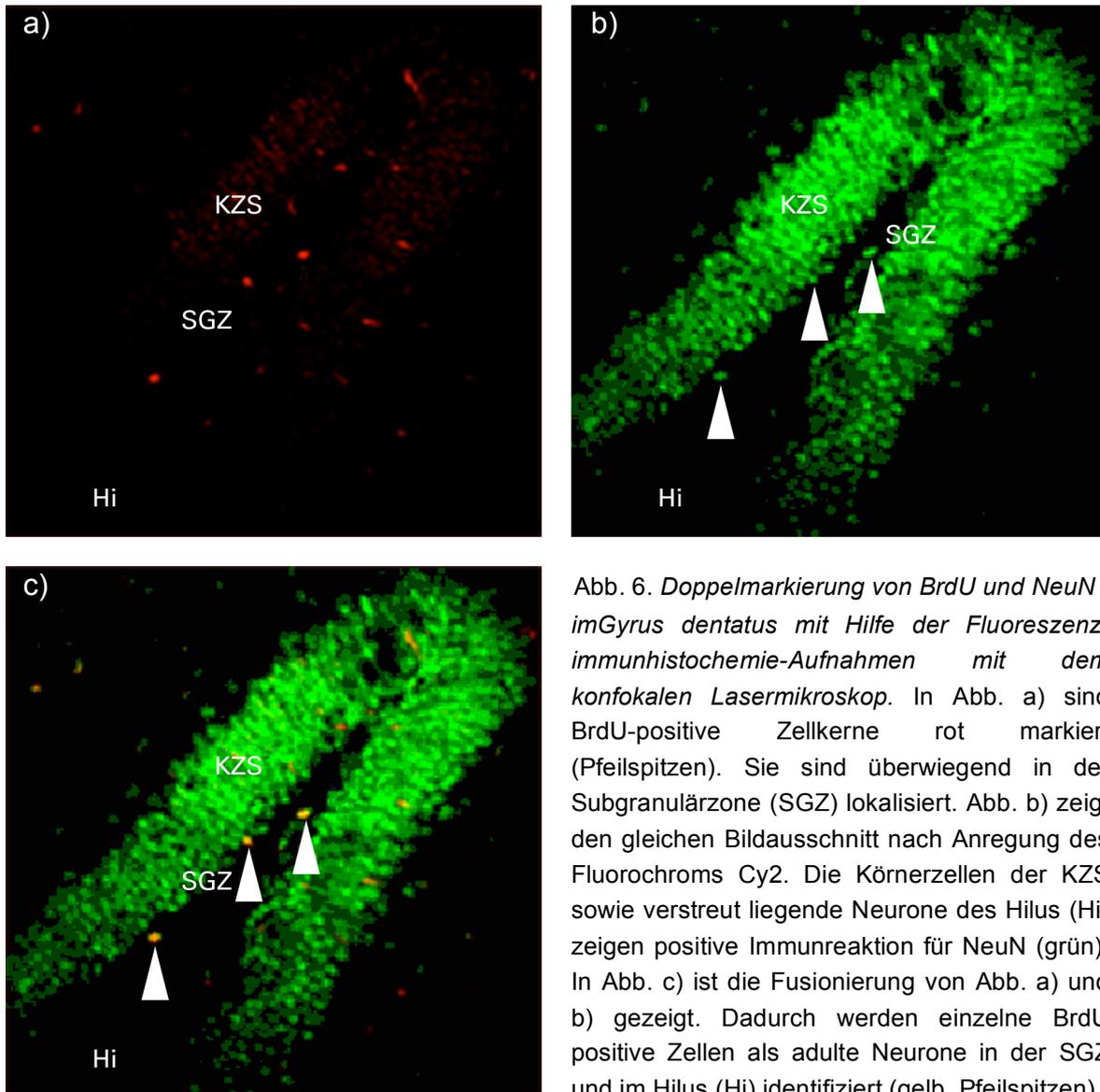


Abb. 6. Doppelmarkierung von BrdU und NeuN im Gyrus dentatus mit Hilfe der Fluoreszenz-immunhistochemie-Aufnahmen mit dem konfokalen Lasermikroskop. In Abb. a) sind BrdU-positive Zellkerne rot markiert (Pfeilspitzen). Sie sind überwiegend in der Subgranulärzone (SGZ) lokalisiert. Abb. b) zeigt den gleichen Bildausschnitt nach Anregung des Fluorochroms Cy2. Die Körnerzellen der KZS sowie verstreut liegende Neurone des Hilus (Hi) zeigen positive Immunreaktion für NeuN (grün). In Abb. c) ist die Fusionierung von Abb. a) und b) gezeigt. Dadurch werden einzelne BrdU-positive Zellen als adulte Neurone in der SGZ und im Hilus (Hi) identifiziert (gelb, Pfeilspitzen).

Gabe zum Nachweis neu gebildeter Neurone. Diese Bilder wurden ausgewählt, um die Unterscheidung von nur BrdU-positiven Zellen und sowohl BrdU- als auch NeuN-positiven Zellen zu zeigen. In Abb. 7 sind fusionierte Aufnahmen in stärkerer Vergrößerung zu sehen, wobei keine Kolokalisation von BrdU- und NeuN-positiven Zellen zu erkennen ist. Es sind nur rot-markierte, BrdU-positive, also durch Proliferation adulter Stammzellen neu gebildete Zellen zu sehen. Lokalisiert sind diese Zellen in Abb. 7a in der SGZ und in Abb. 7b im unteren Drittel der grün-markierten Neuronen der KZS. Im Gegensatz dazu ist in Abb. 8 die eindeutige Kolokalisation von BrdU- und NeuN-positiven Zellen zu sehen, so dass diese gelb erscheinenden Zellen neu gebildete Neurone in der SGZ sind.

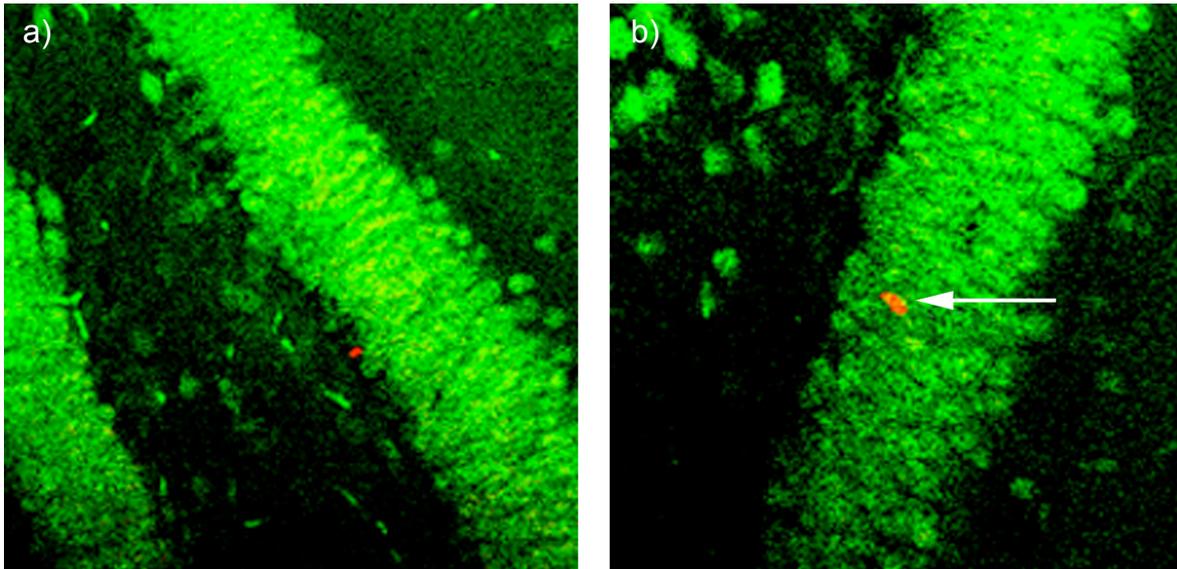


Abb. 7. Nach vier Wochen konnten nicht alle neu gebildeten, BrdU-positiven Zellen im Gyrus dentatus als Neurone identifiziert werden. Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis von BrdU- und NeuN-positiven Zellen. Die Körnerzellen der KZS sowie verstreut liegende Neurone des Hilus zeigen eine positive Immunreaktion für NeuN (grün). In der SGZ (a) und im unteren Drittel der KZS (b) liegen neu gebildete, nur BrdU-positive Zellen, die somit nicht eindeutig den Neuronen zugeordnet werden konnten. Die Pfeile zeigen die Lage der BrdU-positiven Zellkerne an.

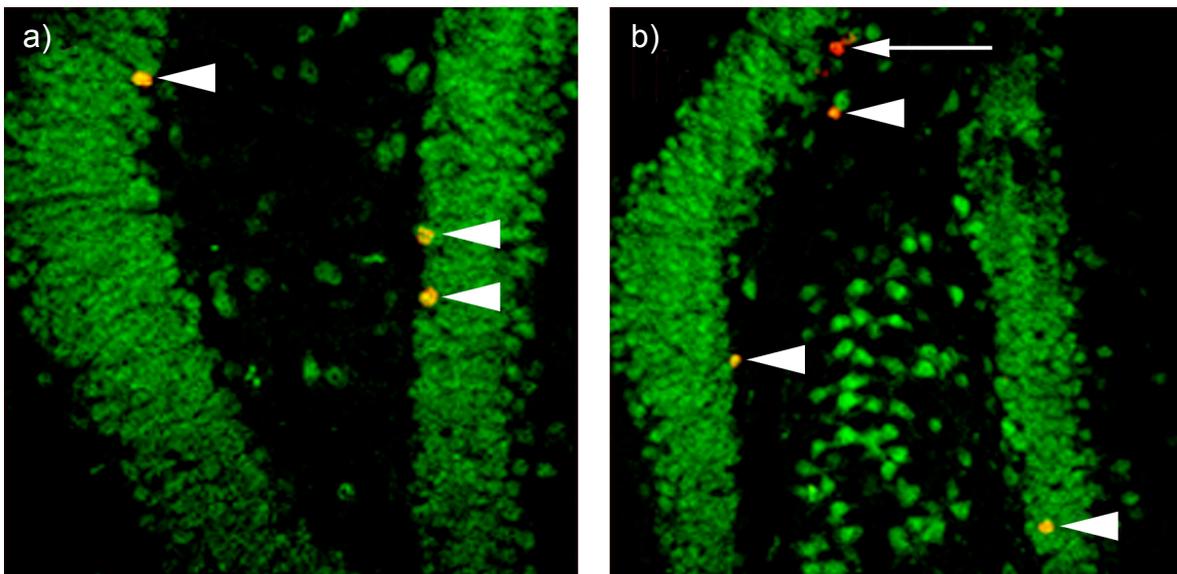


Abb. 8. Im Gyrus dentatus konnten nach vier Wochen sowohl neu gebildete Neurone aber auch andere neu gebildete, BrdU-positive Zellen gefunden werden. Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis von BrdU- und NeuN-positiven Zellen. Die Körnerzellen in der KZS sind für den Neuronenmarker NeuN (grün) positiv. In a) sind drei sowohl BrdU-positive als auch NeuN-positive Zellen, also Neurone, in der SGZ zu sehen (gelb, Pfeilspitzen). Bild b) zeigt doppelt markierte Neurone (gelb, Pfeilspitzen) und eine nur mit dem BrdU-Antikörper markierte Zelle (rot, Pfeil) im gleichen Bildausschnitt in der SGZ und dem unteren Drittel der KZS.

Die quantitative Analyse sowohl der BrdU- (Abb. 9) als auch der BrdU/NeuN-positiven Zellen, Neurone, (Abb. 10) in der KZS (welche die SGZ einschließt) von 5-HTT-KO- und WT-Mäusen ergab keinen signifikanten Unterschied (student's t-test).

Es konnten in der KZS beider Hippocampi durchschnittlich 53,56 (STABW 16,16) BrdU-positive Zellen bei den Kontrollmäusen und 57,58 (STABW 19,76) BrdU-positive Zellen bei den 5-HTT-KO-Mäusen gezählt werden. Durch Einbeziehung aller im Hilus lokalisierten BrdU-positiven Zellen erhöhten sich die Mittelwerte auf 59,31 (STABW 17,91) und 63,96 (STABW 20,2) BrdU-positive Zellen in den Hippocampi von WT- und KO-Versuchstieren (Abb. 9).

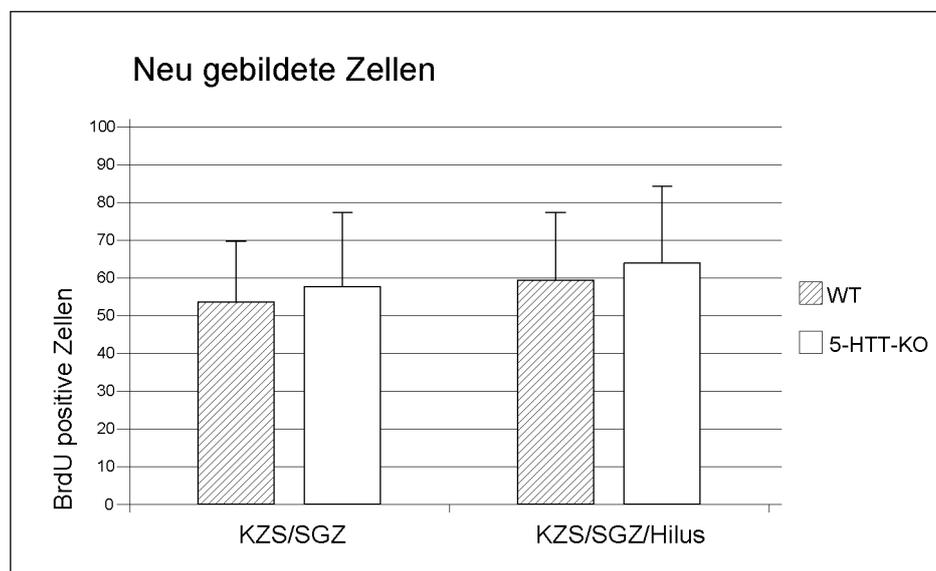


Abb. 9. Durchschnittliche Anzahl BrdU-positiver Zellen pro Gehirn in beiden Hippocampi bei der BrdU/NeuN-Immunofluoreszenz-Färbung in der KZS incl. SGZ und in der KZS incl. SGZ und Hilus. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und STABW von WT und 5-HTT-KO-Mäusen.

Wie Abb. 10 zeigt, betrug der Anteil an BrdU-positiven Zellen, die gleichzeitig mit dem spezifischen Neuronen-Marker NeuN markiert werden konnten, in den Hippocampi der Wildtyp-Tiere durchschnittlich 44,98% (STABW 22,03) und 49,11% (STABW 19,65) bei den 5-HTT-KO-Tieren (Abb. 10.).

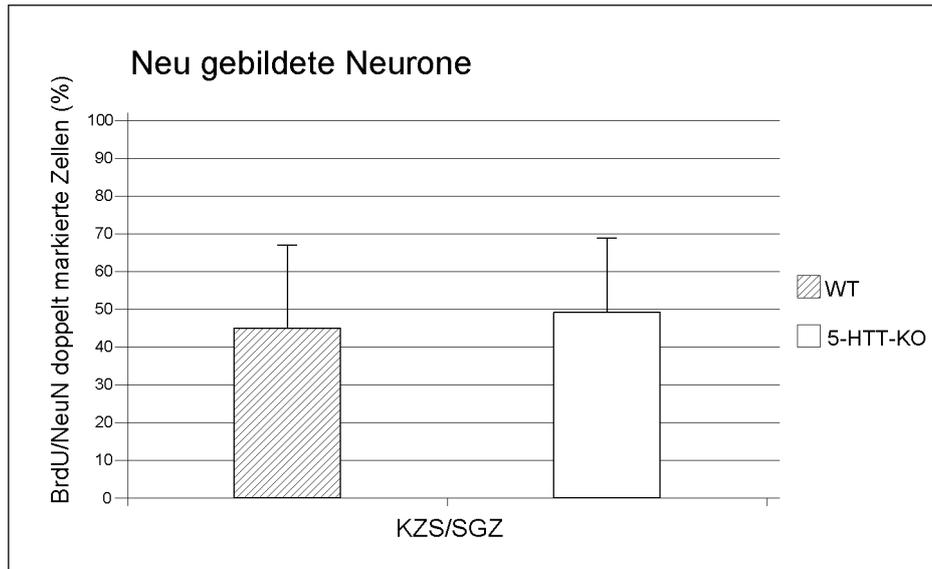


Abb. 10. Durchschnittlicher Anteil der BrdU/NeuN-doppelt markierten Zellen, Neurone, an den BrdU-positiven Zellen pro Gehirn in beiden Hippocampi der KZS incl. SGZ. In diesem Diagramm sind die Mittelwerte und STABW bei WT- und 5-HTT-KO-Mäusen dargestellt.

4.3 Das Migrationsverhalten neu gebildeter, neuronaler Zellen

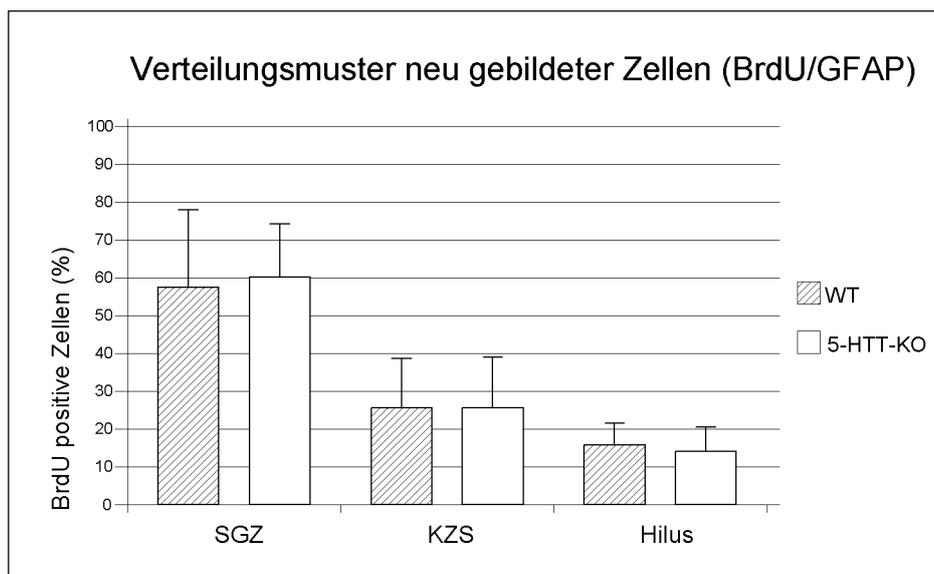
Neben der Anzahl und der Art wurde auch die Lokalisation der neu gebildeten Zellen untersucht. Die Stammzellen, aus denen die neuen Zellen entstehen, befinden sich in der SGZ. Von dort wandern diese Zellen an den Ort ihrer späteren Funktion in der KZS oder dem Hilus.

Zwischen dem Mobilitätsverhalten BrdU-positiver Zellen (ohne Berücksichtigung einer zusätzlich bestehenden Doppelmarkierung) im *Gyrus dentatus* von 5-HTT-KO- und WT-Mäusen konnte sowohl bei den Färbereihen zum Nachweis neu gebildeter Astrozyten (Abb. 11a) als auch zum Nachweis neu gebildeter Neurone (Abb. 11b) kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. In beiden Färbereihen waren die BrdU-positiven Zellen des Hippocampus überwiegend in der SGZ lokalisiert. Ein Teil der neu gebildeten Zellen fand sich in der KZS und im Hilus.

Jedoch ergab die quantitative Analyse der zwei unterschiedlichen Färbereihen ein unterschiedliches Verteilungsmuster der BrdU-positiven Zellen. Bei den Wildtypen waren 57,43% (STABW 20,54) der neu gebildeten Zellen in der SGZ, 25,71% (STABW 13,6) waren in die KZS und 15,82% waren im Hilus lokalisiert. Im Vergleich

dazu waren bei den 5-HTT-KO-Tieren 60,26% (STABW 14,03) in der SGZ, 25,61% (STABW 13,36) in der KZS und 14,13% im Hilus lokalisiert (Abb. 11a). Bei der Färbereihe zum Nachweis neu gebildeter Neurone waren bei den WT-Tieren 70,84% (STABW 17,91) der Zellen in der SGZ, 19,52% (STABW 5,4) in der KZS und 9,64% (STABW 5,81) im Hilus zu finden. Bei den 5-HTT-KO-Tieren waren 68,92% (STABW 20,2) der neu gebildeten Zellen in der SGZ, 20,59% (STABW 9,84) in der KZS und 10,49% (STABW 5,02) im Hilus lokalisiert (Abb. 11b)

a)



b)

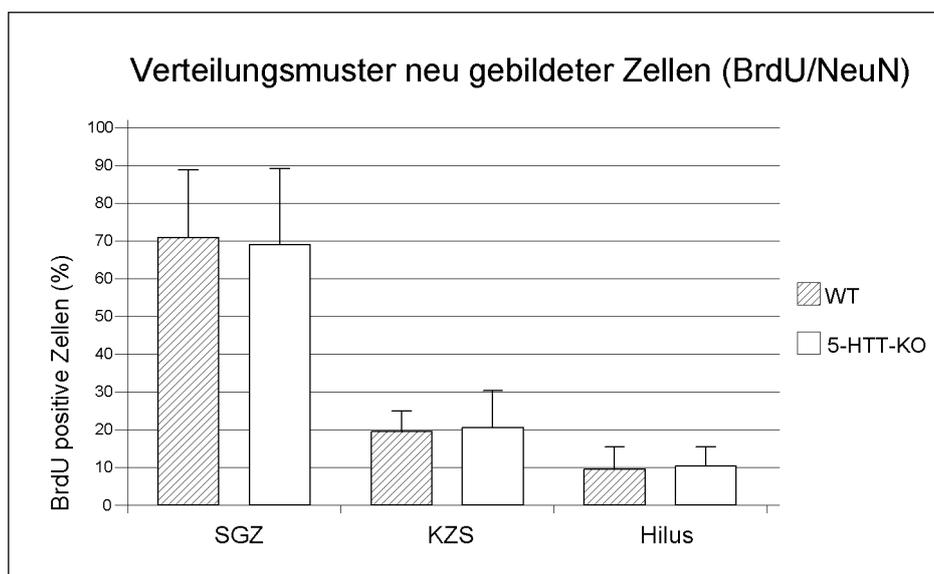


Abb. 11. Verteilungsmuster der neu gebildeten Zellen, unabhängig von ihrem Differenzierungsendpunkt, in der KZS, im Hilus und in der SGZ bei WT- und 5-HTT-KO-Mäusen. a) Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbereihe mit BrdU- und GFAP-Antikörpern. b) Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbereihe mit BrdU- und NeuN-Antikörpern.

Bei der Analyse der Zählungen der BrdU/NeuN-Immunofluoreszenzfärbereihe wurde auch das Verteilungsmuster im *Gyrus dentatus* der neu gebildeten Neurone untersucht. Vier Wochen nach der BrdU-Gabe konnten in der KZS (ohne SGZ) deutlich weniger neu gebildete, differenzierte Neurone nachgewiesen werden als in der SGZ (Abb. 12.).

Darüber hinaus war bei der Untersuchung der Lokalisation der neu gebildeten, durch Doppelmarkierung mit den Markern BrdU und NeuN als Neurone identifizierte Zellen kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrolltieren und den 5-HTT-defizienten Tieren zu erkennen. In der SGZ konnten bei den WT-Tieren durchschnittlich 48,54% (STABW 23,84) und bei den 5-HTT-KO-Tieren 54,55% (STABW 21,02) aller BrdU-positiven Zellen als Neurone identifiziert werden. In der KZS waren bei den WT-Mäusen ein geringerer Anteil von 28,32% (STABW 16,56) beziehungsweise 29,63% (STABW 14,55) bei den 5-HTT-KO-Mäusen aller BrdU-positiven Zellen neu gebildete Neurone. Der kleinste Anteil an Neuronen war im Hilus lokalisiert. Dabei waren bei den WT-Mäusen 23,14% (STABW 9,98) und bei den 5-HTT-KO-Mäusen 15,82% (STABW 6,04) der BrdU-positiven Zellen Neurone (Abb. 12).

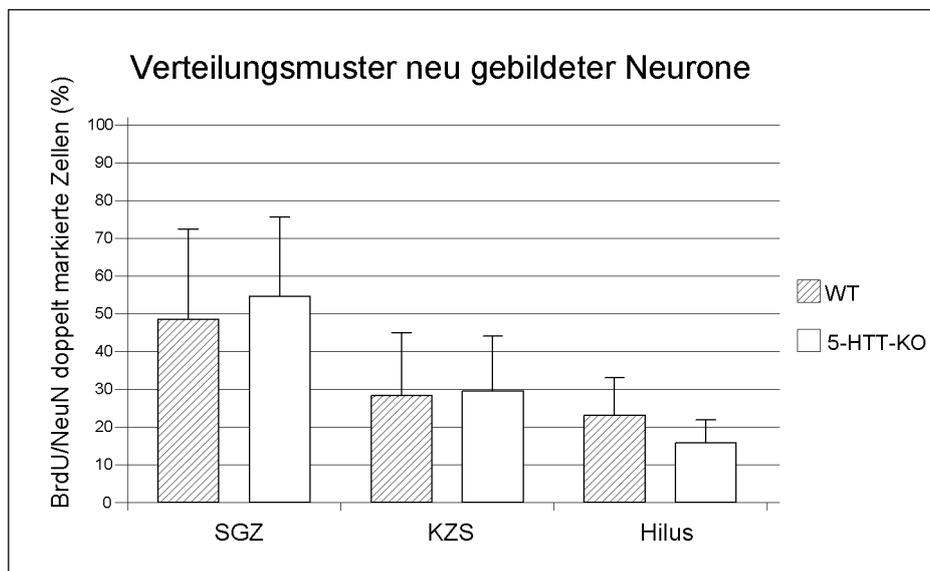


Abb. 12. Verteilungsmuster der neu gebildeten Neurone in Prozent aller neu gebildeten Zellen in SGZ, KZS und Hilus. Darstellung der Anteile und STABW der Ergebnisse der Immunofluoreszenzfärbereihe zum Nachweis von BrdU und NeuN bei WT- und 5-HTT-KO-Mäusen.

In der BrdU/GFAP-Immunofluoreszenzfärbereihe zum Nachweis von neu gebildeten Astrozyten fand sich ein sehr ähnliches Verteilungsmuster der Zellen wie bei der BrdU/NeuN-Färbereihe. Die Astrozyten waren mit ca. 75 – 80% fast ausschließlich in

der SGZ lokalisiert, wobei sich die ca. 20 – 25% übrigen Astrozyten in dem unteren Drittel der KZS lokalisiert waren. Im Hilus fanden sich keine Astrozyten. Aufgrund der sehr geringen Anzahl der doppelt markierten Zellen in dieser Färberreihe wurde auf ein gleichartiges Diagramm des Verteilungsmusters wie bei der BrdU/NeuN-Färberreihe (Abb. 12) verzichtet.

5 Diskussion

Die adulte Neurogenese im Zentralen Nervensystem (ZNS) ist vor mehr als 40 Jahren erstmalig beschrieben worden und heute eine allgemein akzeptierte Tatsache. Viele physiologische und pathologische Faktoren haben einen Einfluss auf die Zellneubildung. 5-HT ist dabei ein Faktor mit einem besonderen Stellenwert, da es eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung, der Zellproliferation, Migration und Differenzierung spielt. Außerdem ist es von besonderem Interesse für die Depressionsforschung, die auf der Monoamin-Mangel-Hypothese, welche niedrige 5-HT-Spiegel als Ursache der Depression ansieht, beruht. Eine antidepressive Therapie beruht auf einer Erhöhung der 5-HT-Spiegel. In dieser Arbeit wurde das Modell eines Mausstammes verwendet, bei dem ein Knockout für den 5-HTT zu erhöhten 5-HT-Werten führt. Es sollte geklärt werden, ob die Differenzierungsrichtung der durch Stammzellproliferation neu gebildeten Zellen im Hippocampus von 5-HTT-Knockout (KO)-Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Kontrollen verändert ist.

Zur Klärung dieser Frage wurden 5-HTT-defiziente und wildtypische Mäuse mit Hilfe der Immunofluoreszenz untersucht. In einer Versuchsreihe wurde die Neubildung von Astrozyten, einem Gliazellen-Subtyp, quantitativ bestimmt. Eine zweite Versuchsreihe beschäftigte sich mit der Darstellung zu Neuronen ausdifferenzierter Zellen, die auch als die eigentliche Neuroneogenese angesehen werden kann. Um den aus adulten Stammzellen gebildeten neuen Zellen ausreichend Zeit für ihre Differenzierung zu geben, betrug die Zeitspanne zwischen BrdU-Gabe und Tötung der Tiere 28 Tage.

Die Neubildung von Zellen im adulten Hippocampus, sowohl Astrozyten als auch Neuronen konnte in beiden Versuchsgruppen nachgewiesen werden. Allerdings ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der neu gebildeten Zellen zwischen den Kontrolltieren und den 5-HTT-KO-Tieren. Der Schwerpunkt der Untersuchung lag in der Frage, in welche Zelltypen sich die neu gebildeten Zellen differenzieren. Es zeigte sich, dass etwa 1,6 - 3% der BrdU-positiven Zellen positiv für GFAP waren und somit den Astrozyten zugerechnet werden konnten. In der zweiten Versuchsreihe konnte auf 45 - 50% der BrdU-positiven Zellen NeuN nachgewiesen werden. Somit sind diese Zellen den reifen Neuronen zuzuordnen.

Der Großteil der neu gebildeten BrdU-positiven Zellen (60 – 70%) war in der Subgranulärzone (SGZ), dem Sitz der Stamm- bzw. Vorläuferzellen, lokalisiert. Ungefähr ein Viertel (20 - 25%) der neu gebildeten Zellen befanden sich in der Körnerzellschicht (KZS) und ca. 10 - 16% waren nach vier Wochen im Hilus zu sehen.

Der Zellteilungszyklus von neuronalen Stammzellen bei Mäusen dauert ungefähr 16 Stunden, wovon etwa acht Stunden die Synthese-Phase der DNA einnehmen [Takahashi und Nowakowski, 1992]. Damit trotz der kurzen Bioverfügbarkeit des DNA-Markers BrdU von ca. zwei Stunden eine möglichst gute Markierung aller sich in der S-Phase befindlichen Zellen erreicht wird, wurden vier intraperitoneale Injektionen im Abstand von zwei Stunden appliziert [Nowalsky und Lewin, 1989]. So stand für den gesamten Zeitraum einer S-Phase BrdU ausreichend bereit. Detektiert wurden somit alle Zellen, die sich zu Zeiten der BrdU-Applikation in der DNA-Synthesephase befanden sowie deren Nachkommen. Die Anzahl der neu entstandenen Zellen repräsentiert einen Ausschnitt der kontinuierlich aus Stammzellen proliferierenden Zellen.

Bisher wurde angenommen, dass BrdU, in einer geringen Dosis verabreicht, alle sich teilenden Zellen im ZNS markiert und dass die Gabe von hohen BrdU-Dosen neurotoxisch sei oder unspezifische Färbungen zur Folge habe. Cameron und McKay untersuchten den Effekt verschiedener BrdU-Injektionsmengen von 50 bis 300 mg/kg Körpergewicht (mg/kg KG) auf die Neurogenese im Hippocampus von Ratten. Mit der geringsten Dosis konnte nur ein Teil der sich in der S-Phase befindlichen Zellen markiert werden. Erst mit einer um das sechsfach höheren Dosis konnten alle neu gebildeten Zellen gefärbt werden [Cameron und McKay, 2001].

In der vorliegenden Untersuchung wurde BrdU in einer Dosis von 75 mg/kg KG appliziert, was einer relativ niedrigen Dosis entspricht. So wäre es möglich, dass nur ein Teil der neu gebildeten Zellen mit BrdU markiert und gezählt wurden. Die Ergebnisse könnten also nicht der tatsächlichen Anzahl der neu entstandenen Zellen entsprechen. Allerdings wurden in früheren Untersuchungen ebenfalls niedrige BrdU-Dosen von 50 - 75 mg/kg KG verabreicht, so dass die hier durchgeführte Studie mit Literaturdaten vergleichbar ist.

Die Tiere waren zum Zeitpunkt der BrdU-Gabe zwischen 50 und 52 Tage alt und sind 28 Tage später, im Alter von 78 - 80 Tagen, getötet worden. Dieser Zeitabstand

gewährleistet die volle Ausdifferenzierung der Zellen, wie Van Praag und Mitarbeiter anhand der elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen nachweisen konnte [Van Praag et al. 2002]. Nach diesem Zeitraum waren die neu gebildeten Zellen nicht mehr von den bereits vor der Markierung bestehenden Zellen zu unterscheiden. Für die Versuche wurden junge Tiere benutzt, da sie eine im Vergleich zu älteren Tieren höhere Proliferationsrate besitzen [Kuhn et al. 1996; Kempermann, Kuhn und Gage, 1998].

5.1 Gliogenese

In einer ersten Versuchsreihe wurden von insgesamt zwölf Versuchstieren (jeweils sechs Kontrollmäuse und sechs 5-HTT-KO-Mäuse) 28 Tage nach BrdU-Gabe Hirnschnitte angefertigt und eine Kolokalisationsstudie zur Identifizierung neu gebildeter Astrozyten durchgeführt. Dazu wurden Immunofluoreszenz-Doppelfärbungen mit gegen BrdU und GFAP gerichteten Antikörpern durchgeführt und mit Hilfe der Konfokal-Mikroskopie analysiert. Als Astrozyten wurden Zellen identifiziert, bei welchen BrdU im Zellkern und GFAP im Cytoplasma nachgewiesen werden konnte.

Gliazellen besitzen eine große Bedeutung im ZNS. Es existieren etwa zehnmal mehr Gliazellen als Neuronen im menschlichen Hirngewebe und etwa sechsmal mehr im Hirngewebe von Nagetieren. Doch nicht nur ihre Zahl, sondern auch ihre Bedeutung, in Bezug auf ihre strukturelle und physiologische Funktion, wurden lange unterschätzt. Die drei Grundtypen, Oligodendrozyten, Mikroglia und Astrozyten werden hier kurz dargestellt [Trepel, 1999; Schmidt, 2000].

Die Oligodendrozyten (Oligodendroglia) entstammen dem Neuroektoderm. Sie besitzen kleine, runde Zellkerne und ihre zellulären Fortsätze bilden Markscheiden aus Myelin, welche die Zellfortsätze (Axone) der Nervenzellen umhüllen und damit elektrisch isolieren. Sie entsprechen den Schwann'schen Zellen im peripheren Nervensystem. Ein Oligodendrozyt kann im Gegensatz zu den Schwann'schen Zellen Axonabschnitte mehrerer Nervenzellen umschließen [Trepel, 1999; Schmidt, 2000].

Der zweite Typ von Gliazellen sind die Hortega-Zellen (Mikroglia, Mesoglia), welche während der Hirnentwicklung aus dem Mesenchym über Blutgefäße in das Gehirn einwandern. Sie sind kleinere Zellen mit länglichem, chromatinreichen Kern und schmalen Zytoplasmasaum, von denen Büschel feiner verzweigter Fortsätze abgehen. Ihre Funktion entspricht den Makrophagen in anderen Geweben. Nach Aktivierung bewegen sie sich amöboid fort und beseitigen durch Phagozytose abgestorbene Zellsubstanzen und Fremdkörper. Dabei geben sie spezifische Zytokine wie Interleukin-1, Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α) und Interferon- γ ab [Trepel, 1999; Schmidt, 2000].

Ein weiterer Zelltyp sind die vom Neuroektoderm abstammenden, sternförmigen Astrozyten (Makroglia). Diese haben nicht nur eine Stützfunktion, sondern ziehen mit ihren Fortsätzen zu den Blutgefäßen und sind dort am Austausch von Stoffwechselprodukten zwischen Neuronen und Blutgefäßen beteiligt. Besonders im heranreifenden Hirn fungiert ein spezieller Typ der Astrogliazellen, die Radialglia, als ein Leitgerüst für die Neuronen. An dieser Radialglia können die Neuronen von ihrem Entstehungsort zu ihrem Funktionsort entlang wandern.

Die komplexe Interaktion zwischen Nervenzellen und Astrozyten zeigt sich auch darin, dass die Gliazellen wachstumsfördernde Substanzen ausschütten, wie z.B. den Nervenwachstumsfaktor NGF (*Neurotrophic Growth Factor*). Außerdem sind sie entscheidend an der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt. Das Stützskelett dieser Zellen wird durch ein saures, faserartiges Protein, GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) gebildet, welches spezifisch für die Astrozyten und somit ein sehr gutes Identifizierungsmerkmal ist [Kimelberg und Norenberg, 1989].

Im folgenden Abschnitt wird dargelegt, dass aus unterschiedlichen Untersuchungsmethoden bzw. unterschiedlichen BrdU-Injektionsschemata und Überlebenszeiten, also dem Zeitintervall zwischen BrdU-Injektion und dem Zeitpunkt der Tötung der Tiere, unterschiedliche Ergebnisse resultieren. Diese müssen deshalb nicht im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit stehen.

Ein Teil der detektierten BrdU-positiven Zellen konnte durch Färbung gegen GFAP als neu gebildete Astrozyten identifiziert werden. Der Anteil doppelt markierter Zellen beträgt in den vorliegenden Untersuchungen 1,54 - 1,75%, wovon sich annähernd 80% in der SGZ befanden. Andere Untersuchungen kommen auf höhere Anteile von Astrozyten, die aber nicht immer direkt vergleichbar sind, da unterschiedliche BrdU-

Injektionsschemata angewandt wurden. So kommen Aberg und Mitarbeiter auf Gliazellanteile von 17 - 20% bei einem Zeitintervall von 15 Tagen; allerdings erfolgten die BrdU-Injektionen an fünf aufeinander folgenden Tagen, so dass Zellen mehrerer Proliferationszyklen durch Doppelmarkierung identifiziert wurden [Aberg et al. 2000]. In Arbeiten anderer Arbeitsgruppen, die die Kolo-kalisation von BrdU und GFAP ebenfalls 28 Tage nach erfolgter BrdU-Gabe untersucht haben, sind die Werte jedoch deutlich geringer und nähern sich den Werten der vorliegenden Untersuchung an. So berichten Malberg und Mitarbeiter von einem Anteil von 13% an Gliazellen, dabei gaben sie vier BrdU-Gaben in zweistündigem Abstand mit einer Dosis von 75 mg/kg KG [Malberg et al. 2000]. Auf Werte von 3 - 5% an BrdU- und GFAP-doppelpositiven Zellen kommen Palmer und Mitarbeiter [Palmer et al. 2000]. Dies ist insofern interessant, da sie diese Werte bei einem Zeitintervall von zwei Tagen, aber auch bei 28 Tagen angeben und damit keine großen Unterschiede zwischen proliferierenden und ausdifferenzierten Zellen sehen. BrdU wurde in dieser Studie in einer Dosis von 50 mg/kg KG einmal täglich an einem bis zu sechs aufeinander folgenden Tagen appliziert. Eine andere und vereinfachende Meinung vertreten Yoshimura und Mitarbeiter, die die Kolo-kalisation von BrdU und GFAP nicht quantifizieren, da diese ihrer Meinung nach zu selten auftreten. Sie applizierten BrdU an drei Tagen jeweils zwei Gaben in einer Dosis von 50 mg/kg KG [Yoshimura et al. 2001].

Einen wichtigen Stellenwert nimmt die Frage ein, aus welchen Zellen die Astrozyten entstehen. Bisher ging man auch davon aus, dass Gliazellen durch Teilung von Stamm- oder Vorläuferzellen gebildet werden, die seit dem Beginn der Entwicklung des Hirnes dort ortsständig sind. Eglitis und Mezey konnten zeigen, dass sowohl Mikroglia- als auch Makrogliazellen aus hämatopoetischen Stammzellen entstehen können. Dazu wurden den Versuchstieren genetisch markierte Knochenmarkszellen transplantiert. Diese konnten nach 3 bis 70 Tagen in verschiedenen Hirnregionen wie Kortex, Klein- und Stammhirn sowie dem Hippocampus nachgewiesen werden. Überraschenderweise hatten zwischen 0,5% und 2% eine Markierung mit GFAP, konnten also als Astrozyten identifiziert werden. Dieses Ergebnis stellt die rein neuroektodermale Herkunft dieser Zellen in Frage [Eglitis und Mezey, 1997].

Eine mögliche Erklärung für die sinkende Anzahl von Astrozyten über die Zeit geben Seri und Mitarbeiter, indem sie den Differenzierungsprozess von Astrozyten beobachteten. Sie leiteten aus ihren Untersuchungen ab, dass Gliazellen als

teilungsfähige Vorläuferzellen von Neuronen der KZS dienen können. Dazu zeigten sie in *in vivo*-Versuchsreihen zunächst, dass nach einer einmaligen BrdU-Injektion und anschließender Tötung der Mäuse zwei Stunden später ca. 60% der BrdU-positiven Zellen gleichzeitig auch positiv für den GFAP-Marker sind. Aufnahmen dieser Zellen zeigten ein für Astrozyten typische Gestalt mit unterschiedlicher Ausprägung der Stadien der Heterochromatinaggregation. Dies zeigt, dass sich die Astrozyten in verschiedenen Stadien des Zellzyklus befanden. 24 Stunden später konnten sie mit einem Anteil von 25% der BrdU-positiven Zellen deutlich weniger doppelt markierte Zellen nachweisen. Mit Hilfe einer retroviralen Markierung der DNA der Astrozyten in der SGZ zeigten sie außerdem, dass die DNA-Markierung zu einem späteren Zeitpunkt in Neuronen der KZS zu finden ist. Eine mögliche Erklärung wäre die Umdifferenzierung der Astrozyten in Neurone der KZS [Seri et al. 2001].

Bereits frühere Untersuchungen beschäftigten sich mit der Entstehung und Entwicklung von Astrozyten und Neuronen aus neuronalen Stammzellen bzw. Vorläuferzellen (Progenitorzellen). Es konnte gezeigt werden, dass bereits Progenitorzellen typische Charakteristika ausdifferenzierter Astrozyten aufweisen können, wie das Expressieren von GFAP [Doetsch et al. 1999, Laywell et al. 2000]. Diese Ergebnisse stellen GFAP als ausschließlichen Marker ausdifferenzierter Astrozyten in Frage [Bignami et al. 1972].

Eine Theorie von Alvarez-Buylla geht davon aus, dass Astrozyten die Fähigkeit der Rückbildung zu Progenitorzellen haben, aus denen sich neue Astrozyten und Neurone bilden können [Alvarez-Buylla et al. 2001/2002/2002].

Als Erklärung für das neurogene Potential der Astrozyten wäre die Abstammung aus Radialgliazellen während der fetalen und frühen postnatalen Entwicklung möglich [Levitt und Rakic, 1980; Eckenhoff und Rakic, 1989]. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass Radialgliazellen Vorläuferzellen bei der Neubildung von Neuronen sind [Gaiano et al. 2000; Malatesta et al. 2000; Noctor et al. 2001; Merkle et al. 2004]. Radialgliazellen wären damit Vorläuferzellen sowohl für Neurone als auch für Astrozyten.

So kann nicht abschließend geklärt werden, ob die in dieser Arbeit gefundenen GFAP-positiven Zellen nun ausdifferenzierte Astrozyten oder Progenitorzellen sind. Auch die Lokalisation der neu entstandenen Zellen lässt darüber keine Aussage zu. Die BrdU/GFAP-positiven Zellen befanden sich zu einem überwiegenden Teil in der

SGZ befanden, wo Progenitorzellen ebenfalls typischerweise lokalisiert sind [Cameron et al. 1993; Gage, 2000; Anderson, 2001].

GFAP scheint dementsprechend als selektiver Marker zum Nachweis ausdifferenzierter Astrozyten nicht ausreichend zu sein. Die Entwicklung neuer Marker zur selektiven Darstellung ausdifferenzierter Astrozyten wird in Zukunft sicherlich Fragen zur Entstehung und Differenzierung genauer beantworten können.

5.2 Neurogenese

Das Neuron ist definiert als eine Nervenzelle mit verschiedenen Fortsätzen, die eine morphologische, funktionelle, trophische und regenerative Einheit bilden. Es besteht aus einem Zellkörper sowie einem oder mehreren Dendriten und einem Neurit (Achsenzylinder) [Trepel, 1999; Pschyrembel, 1998].

Die Neurone des Gyrus dentatus befinden sich hauptsächlich in der Körnerzellschicht (KZS), die ihren Namen durch die kleinen, dicht gelagerten Nervenzellkörper erhielt. Entwicklungsgeschichtlich haben diese Zellen ihren Ursprung in neuroektodermalen Stamm- und Vorläuferzellen. Zur Mitose fähige Zellen sind auch noch im adulten Gyrus Hippocampus in der Zwischenzone zwischen dem Hilus und der KZS, der Subgranulärzone (SGZ), anzutreffen. Für einen sehr geringen Teil dieser Zellen kann aber auch eine Herkunft aus Makrogliazellen diskutiert werden, die eine Differenzierung durchmachen und zu Neuronen werden [Seri et al. 2001; Benninghoff, 1994].

Zu Beginn der Neurogenese-Forschung war es noch sehr umstritten, ob die neu entstandenen Zellen eine echte Funktion im Hippocampus einnehmen. Van Praag und Mitarbeiter konnten überzeugend darlegen, dass sich bereits nach etwa vier Wochen die neu gebildeten Zellen strukturell und funktionell integriert haben [Van Praag et al. 2002]. Zu diesem Zweck untersuchten sie die elektrophysiologischen Aktionspotentiale und den spontanen postsynaptischen Stromfluss. Darüber hinaus zeigten Song und Mitarbeiter, dass neu gebildete Zellen die gleichen Transmitterrezeptoren exprimieren und die gleichen Transmitterstoffe ausschütten wie bereits länger etablierte Körnerzellen [Song et al. 2002]. In beiden Arbeiten war die Gestalt der neu entstandenen Neurone nicht von länger bestehenden oder

bereits früher gebildeten Neuronen zu unterscheiden. Die Anzahl und Dichte der Dendriten und Synapsen war nahezu identisch.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Bestimmung des Anteiles der durch die adulte Neurogenese neu gebildeter Neuronen bei Mäusen mit unterschiedlichem 5-HTT-Genotyp. Zur Identifizierung reifer Neurone wurde der neuronale Marker NeuN verwendet, einem für den neuronalen Kern (*Neuronal Nuclei*) spezifischem Antigen. Zur Kolokalisation von BrdU und NeuN wurden die entsprechenden Antikörper gleichzeitig bei der immunhistochemischen Färbung eingesetzt. Konnten nun mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie Zellen mit beiden Markern gefunden werden, handelte es sich um neu entstandene, reife Neurone. Zur Überprüfung der Kolokalisation wurden die Schnitte in der z-Achse in einzelne Bildebenen mehrfach aufgeteilt, um die Überlagerung der Färbungen im gesamten Bereich des Zellkerns zu bestätigen. Dabei konnten wir ca. 45% mit BrdU und NeuN doppelt markierte Zellen bei den Kontrolltieren und ca. 50% bei den 5-HTT-KO-Tieren nachweisen.

Betrachtet man den Anteil der Neurone an allen neu entstandenen Zellen ergeben sich teilweise deutliche Unterschiede zu anderen Veröffentlichungen. Ein direkter Vergleich der jeweils erzielten Ergebnisse ist jedoch nur eingeschränkt möglich, da zum einen die BrdU-Injektionen unterschiedlich oft und mit unterschiedlichen Zeitabständen erfolgten und zum anderen unterschiedliche Zeitintervalle zwischen BrdU-Gabe und Tötung der Versuchstiere gewählt wurden (siehe Kapitel 5.1). Darüber hinaus wurden z.T. auch verschiedene Zellzählungsmethoden, wie z.B. die stereologische dreidimensionale Zellzählung (Stereologie), angewandt. Einen geringen Einfluss hatten möglicherweise auch die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper, die sich von denen in anderen Untersuchungen unterschieden.

Anhand einiger Beispiele soll im folgenden Abschnitt dargestellt werden, was für einen Einfluss die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden auf die Ergebnisse haben können.

So beschrieben Chen und Mitarbeiter ca. 65% doppelt markierte Zellen in Mäusen, die über zwölf Tage einmal täglich BrdU-Injektionen erhielten und 24 h nach der letzten BrdU-Injektionen getötet wurden [Chen et al. 2000]. Die Kolokalisation von BrdU- und NeuN-Marker wurde mit einem Konfokalen Lasermikroskop (Leica TCS) untersucht, die Zählung der Zellen erfolgte dann mit der stereologischen dreidimensionalen Zellzählung (Stereologie) mit der NIH Image Software. Yoshimura

und Mitarbeiter gaben an zwei aufeinander folgenden Tagen intraperitoneale BrdU-Injektionen und beendeten die Versuche wie in der vorliegenden Untersuchung nach 28 Tagen. Sie verwendeten ebenfalls die Stereologie zur Berechnung der Anzahl neu gebildeter Zellen und kamen damit auf Werte von durchschnittlich 74% [Yoshimura et al. 2001]. Palmer und Mitarbeiter arbeiteten mit einem Konfokalen Lasermikroskop und kamen bei ihren Versuchstieren, die an sechs aufeinander folgenden Tagen jeweils eine BrdU-Injektion erhielten und 28 Tage nach der ersten BrdU-Injektion getötet wurden, auf einen Anteil von ca. 70% Neurone [Palmer et al. 2000]. Malberg und ihre Mitarbeiter untersuchten die adulte Neurogenese nach chronischer Gabe des SSRI Fluoxetin. Dazu verabreichten sie BrdU-Injektion viermal täglich jeweils in einem Abstand von 2 Stunden. Anschließend erfolgte die Behandlung mit dem Antidepressivum. 28 Tage nach der letzten BrdU-Gabe wurden die Tiere getötet und die Hirnschnitte mit einem Konfokalen Mikroskop untersucht. Der Anteil der BrdU/NeuN-positiven Zellen an neu gebildeten Zellen wird von ihnen mit 75% angegeben [Malberg et al. 2000]. Andere Autoren wie z.B. Aberg und seine Mitarbeiter fanden in ihren Untersuchungen Anteile der Neurone von ca. 54%, was annähernd den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit entspricht. In der Untersuchung von Aberg et al., die sich mit dem Einfluss von IGF-1 auf die Neurogenese beschäftigt, wurde BrdU fünf Tage lang verabreicht und die Mäuse 15 Tage nach der letzten Gabe getötet. Die Auswertung erfolgte mit einem Konfokalen Mikroskop [Aberg et al. 2000].

Den großen Einfluss unterschiedlicher Untersuchungsmethoden und Antikörper auf erzielte Ergebnisse zeigte auch folgende Studie von Van Praag und Mitarbeitern. Sie schleust mit Hilfe eines retroviralen Vektors das GFP-Gen (*Green Fluorescent Protein*) ausschließlich in die sich teilende Zellen ein. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass nicht nur der Zellkern wie bei der BrdU-Methode sichtbar gemacht werden kann, sondern, dass sich das gesamte Neuron mit seinen Dendriten durch die Lokalisation von GFP im Kern und Zytoplasma darstellen lässt. So sind außerdem strukturelle und morphologische Analysen möglich. Bei Doppelmarkierungen mit GFP und NeuN zur Darstellung neu gebildeter Neurone ergab sich bei diesen Untersuchungen ein Anteil von nur 27,4% [Van Praag et al. 2002].

In anderen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, die ebenfalls die Neurogenese bei 5-HTT-KO-Mäusen untersuchten, wurden ähnliche Ergebnisse wie in dieser

Arbeit erzielt. Sie beschäftigten sich mit der Quantifikation, Migration und Pyknose von neu gebildeten Zellen nach 28 Tagen im *Gyrus dentatus* des Hippocampus bei jungen (4 Monate) und alten (14,5 Monate) Tieren. Diese erste Arbeit zeigte, dass es zwar einen sehr geringen, aber nicht signifikanten Unterschied zwischen WT und 5-HTT-KO Mäusen gibt im Bezug auf die Anzahl der neu entstandenen Zellen. Dabei wurden die neu gebildeten Zellen immunhistochemisch gefärbt und lichtmikroskopisch ausgezählt. Eine zweite Untersuchung, die sich mit der Lokalisation neu gebildeter Zellen in SGZ und KZS beschäftigte, konnte leicht erhöhte Neurogeneseraten bei den 5-HTT-KO-Tieren feststellen. Diese waren allerdings ebenfalls nicht signifikant. Wie in der vorliegenden Arbeit befanden sich etwa 60% der BrdU-positiven Zellen in der SGZ.

In der Arbeitsgruppe fand sich ein homogenes Bild der Ergebnisse. Einen positiven Einfluss auf die Neurogenese konnte bei den 5-HTT-KO-Mäusen mit ihrer lebenslang veränderten 5-HT-Homöostase nicht nachgewiesen werden.

In den verschiedenen o.g. beispielhaft ausgewählten Publikationen über die adulte Neurogenese zeigt sich kein einheitliches Bild des Anteiles der neu entstandenen Neurone an der Gesamtzahl der neu entstandenen Zellen. Ursachen dafür sind z.T. in den unterschiedlichen Untersuchungsmethoden wie der Zellzählung mit Hilfe der Stereologie oder dem Konfokalen Lasermikroskop zu finden. Ein weiterer Unterschied liegt in der Verschiedenheit der Anzahl der BrdU-Gaben, die von mehrfachen BrdU-Injektionen an einem Tag, wie in dieser Untersuchung, bis zu BrdU-Injektionen an sechs bzw. zwölf aufeinander folgenden Tagen reichen. Eine Erklärung für den größeren Anteil an Neuronen könnte eine längere Zeitspanne zur Ausdifferenzierung von Astrozyten bzw. Gliazellen in Neurone sein, so dass sich ein höherer Anteil an Neuronen ergäbe. Eine größere Anzahl an neu entstandenen Zellen wäre durch eine größere Anzahl an durchlaufenden Zellteilungszyklen während der BrdU-Injektionen dagegen erklärbar.

5.3 Neurogenese und Serotonin

5-HT spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation von Stimmungen wie z.B. Angst, Appetit, Aggression und v.a. Depression. Viele der Medikamente, die zur Behandlung dieser Gemütskrankheiten verwendet werden, wirken am 5-HTT (siehe Kapitel 1.2).

Die meisten Antidepressiva wirken über eine Erhöhung von 5-HT und/oder Noradrenalin. Die am häufigsten verschriebenen Antidepressiva sind die selektiven Serotonin Reuptake Inhibitoren (SSRI), die den 5-HTT blockieren und damit die Wiederaufnahme von 5-HT in die Synapse verhindern, so dass sich eine extrazelluläre 5-HT-Erhöhung ergibt.

Bei den 5-HTT-KO-Mäusen wird der gleiche Effekt durch das Fehlen des 5-HTT erzielt [Mathews et al. 2004; Shen et al. 2004]. So kann die 5-HTT-KO-Maus als ein Modell für die chronische Gabe von Antidepressiva verwendet werden.

Eine Gegenregulation der gestörten 5-HT-Homöostase mit alternativen Transportersystemen ist bei den 5-HT-KO-Mäusen nachzuweisen. Dabei kommt es jedoch nicht zu einer Normalisierung der 5-HT-Werte, wie sie dem einer Wildtyp-Maus entsprechen [Bengel et al. 1998; Li et al. 1999; Fabre et al. 2000; Schmitt et al. 2003; Mathews et al. 2004; Shen et al. 2004].

In vielen Untersuchungen, z.B. von Malberg und Mitarbeitern konnte die adulte Neurogenese nach chronischer Gabe von Antidepressiva über mindestens 14 aufeinander folgenden Tagen gezeigt werden. Ein Anteil von 75% der neu gebildeten Zellen konnten mit spezifischen Markern als ausdifferenzierte Neurone identifiziert werden. Neurogenese unter chronischer Therapie mit Antidepressiva wurde dabei nur im Hippocampus nachgewiesen und nicht in anderen Hirnregionen wie z.B. der Subventrikulärzone (SVZ), in denen normalerweise adulte Neurogenese ebenfalls erfolgt [Malberg et al. 2000; Duman et al. 2001; Alvarez-Buylla et al. 2002].

Der grundlegende Unterschied zwischen der chronischen Gabe von Antidepressiva und der 5-HTT-KO-Maus ist die schon während der Ontogenese bestehende veränderte 5-HT-Homöostase. Im Gegensatz dazu führt die antidepressive Behandlung zu einer akuten Veränderung des 5-HT-Haushaltes. Es kommt mit einer Latenz von ca. 14 Tagen nach Beginn der Antidepressiva-Gaben zu einer erhöhten Neurogenese [Malberg et al. 2000]. Der klinisch-therapeutische Effekt tritt noch verzögerter nach ca. 3 – 4 Wochen auf (Karow und Lang, 2003).

Allerdings kommt dieser Effekt nicht alleine durch das 5-HT zustande, sondern 5-HT wirkt über den 5-HT_{1A}-Rezeptor. Die Expression dieses Rezeptors war ca. 14 Tage nach Beginn der 5-HT-Erhöhung durch Gabe des 5-HT-Releasers Fenfluramin erhöht [Jacobs et al. 1998/2000; Brezun und Daszuta, 1999]. Jacobs und Mitarbeiter zeigten, dass die direkte Stimulation des 5-HT_{1A} mit dem 5-HT_{1A}-Agonisten 8-OH-DPAT eine erhöhte Neurogeneserate im *Gyrus dentatus* zur Folge hatte [Jacobs et al. 1998]. Santarelli und Mitarbeiter bestätigten diese Untersuchung und verwendeten den gleichen 5-HT_{1A}-Agonisten (8-OH-DPAT), den sie Wildtyp-Mäusen und Mäusen mit einem Knockout für den 5-HT_{1A}-Rezeptor verabreichten. Bei den Kontrolltieren kam es zu einem signifikanten Anstieg der neu gebildeten Zellen, bei den 5-HT_{1A}-KO-Tieren traten dagegen keine Veränderungen auf [Santarelli et al. 2003]. In einer weiteren Untersuchung demonstrierten Radley und Jacobs, dass durch die Gabe verschiedener 5-HT_{1A}-Rezeptor-Antagonisten eine signifikante Verminderung der Neurogeneserate im *Gyrus dentatus* von adulten Ratten induziert werden kann [Radley und Jacobs, 2002/2003]. Es ist also anzunehmen, dass die Aktivität dieses Rezeptors eine wichtige Rolle bei der adulten Neurogenese spielt.

Der Anstieg der Anzahl der 5-HT-Rezeptoren lässt sich auch bei den 5-HTT-KO-Mäusen zeigen. In verschiedenen Untersuchungen fand sich eine erhöhte Expressionen und Funktion von 5-HT_{1A} und 5-HT_{1B} Rezeptoren im Hippocampus von 5-HTT-KO-Mäusen. Dabei konnte jedoch keine Veränderungen im 5-HT Umsatz nachgewiesen werden. Fabre spricht von einer veränderten Funktion des Rezeptors im Sinne einer Desensibilisierung [Fabre et al. 2000; Mannoury la Cour et al. 2001].

In einer neueren Arbeit zeigte Jha und seine Mitarbeiter, dass eine isolierte 5-HT-Erhöhung durch Gabe des Neurotoxins p-Chloroamphatamine, welches eine selektive 5-HT-Ausschüttung im ZNS bewirkt, weder einen positiven noch eine negativen Einfluss auf die Neurogenese hat. Auch eine Erhöhung von 5-HT durch eine Behandlung mit dem Monoaminoxidase-Hemmer (MAOI) Tranylcypromin und gleichzeitiger Gabe der Aminosäure L-Tryptophan zeigte keine erhöhten Neurogenesewerte [Jha et al. 2006]. Eine Reduzierung von 5-HT mit dem Neurotoxin 5,7-Dihydroxytryptamin, welches selektiv serotonerge Neurone zerstört, hatte keinen Einfluss auf die Neurogenese im *Gyrus dentatus* [Ueda et al. 2005; Jha et al. 2006].

In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls keine signifikanten Änderungen in der adulten Neurogenese zwischen 5-HTT-KO-Mäusen und den Kontrollmäusen festgestellt werden. Die Untersuchungen von Jha und Mitarbeitern und Ueda und Mitarbeitern decken sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und zeigen, dass eine selektive Beeinflussung des 5-HT-Stoffwechsels alleine keinen Einfluss auf die adulte Neurogenese hat. Diese Untersuchungen stellen 5-HT als allein stehenden Neurogenesefaktor in Frage und geben einen Hinweis darauf, dass 5-HT wahrscheinlich nur im Zusammenspiel mit anderen Faktoren, z.B. dem Monoamin Noradrenalin, eine positive Wirkung auf die adulte Neurogenese hat.

Obwohl die wichtige Rolle von 5-HT bei der Hirnentwicklung, dem Einfluss auf die Neurogenese sowie auf das Wachstum der Axone und auf die Dendritogenese unbestritten ist, scheint der 5-HT-Spiegel keinen Einfluss auf das relative Verhältnis von neu entstandenen Neuronen zu Astrozyten zu haben. Dies deckt sich mit den Beobachtungen in anderen Veröffentlichungen. So zeigten Kulkarni und Mitarbeiter, dass die Erschöpfung von Norepinephrin durch ein selektives noradrenerges Neurotoxin die Proliferation von Vorläuferzellen im Gyrus dentatus verringert, dabei aber keinen Einfluss auf den Quotient von neu gebildeten Neuronen zu Gliazellen hat [Kulkarni et al. 2002]. Malberg und Mitarbeiter beschäftigten sich mit der Dauerbehandlung mit Antidepressiva, die auf das 5-HT-System wirken (Kapitel 1.2). Ihre Ergebnisse zeigten eine Erhöhung der Neurogeneserate, aber ebenfalls keinen Unterschied im Verhältnis von Neuronen (75%) und Gliazellen (13%) [Malberg et al. 2000]. Ebenso konnte für Lithium eine erhöhte Neurogeneserate gezeigt werden, wiederum mit dem gleichen Verhältnis der entstandenen Zelltypen [Chen et al. 2000; Steiner et al. 2004; Gaspar et al. 2003].

Die adulte Neurogenese ist jedoch von multiplen Faktoren beeinflusst, so dass noch lange nicht abschließend geklärt ist, welche Korrekturmechanismen zu einem Ausgleich der 5-HT-Homöostase und damit zu einer stabilen und nicht zu einer gesteigerten Neurogenese bei den 5-HTT-KO-Mäusen führen. Es sind sicherlich noch weitere Untersuchungen notwendig, um diese Fragen zu klären.

Diese Fragen sind jedoch noch lange nicht abschließend beantwortet. Weitere Untersuchungen zu diesem Thema sind notwendig, um ein genaueres Verständnis der Regulation der 5-HT-Homöostase und dem Einfluss von 5-HT auf die adulte Neurogenese zu erlangen. Eine wichtige Rolle dabei wird weiterhin das 5-HTT-KO-Mausmodell spielen.

5.4 Das Migrationsverhalten neu gebildeter Neurone

Ein interessantes Phänomen bei der Neubildung von Zellen ist die Wanderung der Zellen an den Fortsätzen der schon bestehenden Astrozyten entlang zu dem Ort in der SGZ, an dem sie ihre spätere Funktion wahrnehmen [Alvarez-Buylla und Nottenbohm, 1988; Alvarez-Buylla et al. 1990; Kimelberg und Norenberg, 1989]. Der größte Anteil mit durchschnittlich 59% in der GFAP-Färbereihe und mit 70% in der NeuN-Färbereihe an BrdU-markierten Zellen blieb allerdings in der Stammzellschicht. Kempermann und Mitarbeiter kommen zu einem sehr ähnlichen Ergebnis mit 62% in der SGZ verbleibenden Zellen. In ihren Versuchen stand der zeitliche Verlauf von einem Tag bis zu elf Monaten im Vordergrund. Hierbei konnten sie zeigen, dass nach den ersten drei Tagen noch ca. 70-75% aller neu gebildeten Zellen in der SGZ lokalisiert sind, der Anteil der in der SGZ lokalisierten Zellen jedoch ab der vierten Woche mit ca. 60% stabil bleibt. Im gleichen Zeitverlauf erhöht sich komplementär die Anzahl der BrdU-positiven Zellen in der KZS. Kempermann sieht darin einen eindeutigen Hinweis, dass sich die neu gebildeten Zellen vom Ort ihrer Entstehung, der SGZ, innerhalb von ca. vier Wochen in die KZS bewegen [Kempermann, 2002/2003].

Bei unseren Untersuchungen zeigten sich 28 Tage nach BrdU-Gabe 26% in der GFAP-Färbereihe und 20% in der NeuN-Färbereihe aller BrdU-markierten Zellen in der KZS.

Darüber hinaus untersuchte Kempermann die Verteilung der neuen Zellen innerhalb der KZS. Diese wurde in eine äußere, mittlere und innere Schicht, die an den Hilus angrenzt, geteilt. Die meisten markierten Zellen fanden sich im inneren und mittleren Bereich, was sich mit Ergebnissen dieser Arbeit deckt. Nur 15% (BrdU/GFAP-Färbereihe) bzw. 10% (BrdU/NeuN-Färbereihe) der BrdU-positiven Zellen wanderten in die KZS. Nur ein sehr kleiner Anteil BrdU-markierter Zellen war im Hilus zu finden. Aus diesen Beobachtungen der Migration der neuen Zellen und dem Wissen, dass diese Zellen die gleichen elektrophysiologischen Eigenschaften wie die umgebenden „alten“ Zellen haben, kann geschlossen werden, dass die von den Zellen eingenommene Position innerhalb der KZS ihrer Funktion entspricht, aber nicht von dem Alter der Zelle abhängig ist.

6 Zusammenfassung

Das Phänomen der adulten Neurogenese existiert auch bei Säugetieren während der gesamten Ontogenese. In den letzten Jahren wurden viele physiologische und pathologische Faktoren bestimmt, die einen Einfluss auf die adulte Neurogenese haben. Ein bedeutender Einfluss auf die adulte Neurogenese übt dabei der 5-HT-Spiegel aus. 5-HT reguliert nicht nur während der embryonalen Entwicklung die Zellproliferation, Migration und Differenzierung, sondern ist auch ein wichtiger Faktor bei der adulten Neurogenese. Dabei wirkt 5-HT über den 5-HT_{1A}-Rezeptor positiv auf die Stammzellproliferation und die adulte Neurogenese. Durch eine Therapie mit Antidepressiva kommt es ebenfalls zu einer 5-HT-Erhöhung im Extrazellulärraum, dessen anregende Wirkung auf die Proliferation adulter Stammzellen im Gehirn nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus spielt 5-HT auch eine große Rolle bei neurophysiologischen Vorgängen im ZNS, die im Zusammenhang mit Emotionen, Lernen und Motorik stehen. Eine wichtige Grundlage der Depressionsforschung ist die Monoamin-Mangel-Hypothese, welche niedrige 5-HT-Spiegel als Ursache der Depression ansieht.

In dieser Arbeit sollte der Einfluss eines existenten lebenslang erhöhten extrazellulären 5-HT-Spiegel auf die Neurogenese und vor allem auf die Differenzierungsrichtung neu gebildeter Zellen untersucht werden. Als Modell wurde eine transgene Mauslinie verwendet, bei der durch Knockout des 5-HTT ein permanent erhöhter extrazellulärer 5-HT-Spiegel vorliegt.

Die Stammzellproliferation konnte eindeutig durch eine Markierung sich teilender Zellen mit BrdU nachgewiesen werden. Kollaborationsstudien mit Hilfe von Immunofluoreszenzfärbungen und der anschließenden Darstellung mit dem Konfokalen Lasermikroskop konnten die Neubildung von Neuronen und Gliazellen und deren Migration an ihren funktionellen Ort darstellen.

Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl von im Hippocampus neu gebildeten Neuronen und Astrozyten zwischen Wildtyp- und 5-HTT-KO-Mäusen nachgewiesen werden. Auch die Lokalisation der neu entstandenen und 48 Tage nach BrdU-Applikation nachgewiesenen Zellen war bei den Wildtyp- und 5-HTT-KO-Tieren annähernd gleich. Die überwiegende Zahl mit 70% befand sich in der SGZ, 10 - 15% waren in der KZS lokalisiert und ein kleiner Teil befand sich im Hilus.

Wir sind erst am Anfang des Verständnisses der exakten molekularen Mechanismen in der neuroendokrinen Interaktion zwischen Neuronen und deren Transmitter, vor allem dem an zentraler Stelle stehenden 5-HT. Neue Techniken, die nicht nur die morphologische, sondern auch die funktionelle Darstellung der neuronalen und neurophysiologische Tätigkeit liefern, werden in Zukunft neue Erkenntnisse bringen.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
aN	adulte Neurogenese
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BrdU	Bromodesoxyuridine
BMP2	<i>Bone Morphogenetic Protein 2</i>
bzw.	beziehungsweise
CRH	<i>Corticotropin Releasing Hormon</i>
d	Tag
DAT	Dopamintransporter
DM	Doppelmarkierung
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>desoxyribonucleic acid</i>
EKT	Elektrokonvulsionstherapie
FGF-2	<i>Fibroblast-growth-factor-2</i>
GABA	γ -Amino-Buttersäure, <i>γ-amino-butyric acid</i>
GD	<i>Gyrus dentatus</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
GH	<i>Growth Hormone</i>
h	Stunden
Hc	Hippocampus
Hi	Hilus
5-HIAA	5-Hydroxyindolessigsäure
HCl	Salzsäure

5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
5-HT _{1A}	Serotonin-Rezeptor 1A
5-HTT	5-Hydroxytryptamintransporter
HVL	Hypophysenvorderlappen
ICD-10	<i>International Statistical Classification of Diseases</i>
Id1	<i>Inhibitor of Differentiation 1</i>
IGF-1	<i>Insulin-like-growth-factor-1</i>
incl.	inklusive
kB	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KO	<i>Knockout</i>
KZS	Körnerzellschicht
M	Molar
m	männlich
MAO	Monoaminoxidase
MAOI	Monoaminoxidase-Hemmer
MDMA	3,4-Methylendioxyamphetamin
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
μl	Mikroliter
n	Anzahl
Na	Natrium
NA	Noradrenalin
NAT	Noradrenalin-Transporter
NeuN	Neuronaler Nukleus, <i>neuronal nuclei</i>
NIMH	<i>National Institute for Mental Health</i>
nm	Nanometer

Nr.	Nummer
OCT	<i><u>O</u>rganic <u>C</u>ation <u>T</u>ransporter</i>
o.g.	oben genannt
RT	Raumtemperatur
SGZ	Subgranuläre Zone
SSRI	Selektiver-Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer, <i><u>s</u>elective-<u>s</u>erotonin-<u>r</u>euptake-<u>i</u>nhibitor</i>
SNRI	Selektiver-Noradrenalin-Wiederaufnahme-Hemmer, <i>selective noradrenaline reuptake inhibitor</i>
STABW	Standardabweichung
TBS	<i><u>t</u>ris <u>b</u>uffered <u>s</u>aline</i>
TCA	Trizyklische Antidepressiva, s. NSMRI
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
w	weiblich
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
z.T.	zum Teil

7.2 Literaturverzeichnis

- Aberg MAI, Aberg ND, Hedbäck H, Oscarsson J, Eriksson PS. (2000). Peripheral Infusion of IGF-1 Selectively Induces Neurogenesis in the Adult Rat Hippocampus. *J Neurosci*. 20(8): 2896-2903
- Ajo R, Cacicedo L, Navarro C, Sanchez-Ranco F. (2003). Growth hormone action on proliferation and differentiation of cerebral cortical cells from fetal rat. *Endocrinology* Mar; 144(3): 1086-1097
- Altman J, Das GD. (1965). Autoradiographic and histologic evidence of postnatal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124: 319-335
- Alvarez-Buylla A, Nottebohm F. (1988). Migration of young neurons in adult avian brain. *Nature* 335 : 353-354
- Alvarez-Buylla A, Theelen M, Nottebohm F. (1990). Proliferation «hot spots» in adult avian ventricular zone reveal radial cell division. *Neuron* 5 : 101-109
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Tramantín AD. (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2(4): 287-293
- Alvarez-Buylla A, Seri B, Doetsch F. (2002). Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Res Bull* 57(6): 751-758
- Anderson DJ. (2001). Stem cells and pattern formation in the nervous system: the possible versus the actual. *Neuron* 30: 19-35
- Arango V, Underwood MD, Boldrin M, Tamir H, Kassir SA, Hsiung S, Chen J, Mann JJ. (2001). Serotonin 1A Receptors, Serotonin Transporter Binding and Serotonin Transporter mRNA Expression in the Brainstem of Depressed Suicide Victims. *Neuropsychopharmacology* 25: 892-903
- Artigas F, Romero L, de Montigny C, Blier P. (1996). Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A}-antagonist. *Trends in Neuroscience* 19, 378-383
- Azmitia EC, Gannon PJ, Kheck NM, Whitaker-Azmitia PM. (1996). Cellular Location of the 5-HT_{1A} Receptor in Primate Neurons and Glial Cells. *Neuropsychopharmacology* 14:35-46
- Backhouse B, Barochovsky O, Malik C, Patel A, Lewis P. (1982). Effect of haloperidol on cell proliferation in the early postnatal rat brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 8: 109-118

- Banasr M, Hery M, Printemps R, Daszuta A. (2004). Serotonin-Induced Increase in Adult Cell Proliferation and Neurogenesis are mediated Through Different and Common 5-HT Receptor Subtypes in the Dentate Gyrus and the Subventricular Zone. *Neuropsychopharmacology* 29: 450-460
- Barry L, Jacobs BL. (2001). Adult neurogenesis and depression. *Brain, Behavior, and Immunity* 16,5: 602-609
- Beal MF, Ferrate RJ, Schwarcz R. (1991). Chronic Quinolinic Acid Lesions in Rats closely resemble Huntingtons Disease. *J Neurosci* 11(6): 1649-1659
- Bengel D, Murphy DL, Andrews AM. (1998). Altered Brain Serotonin Homeostasis and Locomotor Insensitivity to 3,4-Methylen-edioxymethamphetamine ("Ecstasy") in Serotonin Transporter-Deficient Mice. *Mol Pharmacol* 53: 649-655
- Bengel D, Heils A, Petri S, Seemann M, Glatz K, Andrews A, Murphy DL, Lesch KP. (1997). Gene structure and 5-flanking regulatory region of the murine serotonin transporter. *Mol Brain Res* 44: 286-292
- Benninghoff, Anatomie. Makroskopische und Mikroskopische Anatomie des Menschen. 15.Auflage 1994. Urban & Schwarzenberg, München-Wien
- Benninghoff J, Schmitt A, Moessner R, Lesch KP. (2002). When cells become depressed: focus on neural stem cells in novel treatment strategies against depression. *J Neural Transmission* 109(5-6): 947-962
- Biebl M, Cooper C, Winkler J, Kuhn HG. (2000). Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 291: 17-20
- Birbaumer, Schmidt. Biologische Psychologie. 5.Auflage 2002. Springer-Verlag
- Biver F, Wikler D, Lotstra F, Damhaut P, Goldman S, Mendlewicz J. (1997). Serotonin 5-HT₂ receptor imaging in major depression: focal changes in orbito-insular cortex. *Br J Psychiatry* Nov; 171: 444-448
- Blaschke AJ, Staley K, Chun J. (1996). Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex. *Development* 122: 1165-1174
- Bolwig TG, Madsen TM. (2007). Electroconvulsive therapy in melancholia: the role of hippocampal neurogenesis. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 433: 130-135
- Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS.

- (2000). Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry* 157(1): 115-118
- Brezun JM, Daszuta A. (1999). Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience* 89: 999-1002
- Brockhaus. Lexikon. F.A. Brockhaus GmbH, Leipzig-Mannheim 1997/1999
- Brunnhuber S, Lieb K. (2000). *Kurzlehrbuch Psychiatrie*. 4. Auflage. Urban und Fischer Verlag
- Cajal SR. *Textura del sistema nervioso del hombre y los vertebrados*. 1897-1899
- Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E. (1993). Differentiation of newlyborn neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56: 337-344
- Cameron HA, Gould E. (1994). Adult Neurogenesis is Regulated by Adrenal Steroids in the Dentate Gyrus. *Neuroscience* 61:203-209
- Cameron HA, McKay RD. (1999). Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci* 2: 894-897
- Cameron HA, McKay RD. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 435: 406-417
- Cameron HA, Woodley CS, Gould E. (1993). Adrenal steroid receptor immunoreactivity in cells born in the adult rat dentate gyrus. *Brain Res* 611(2): 342-6
- Campbell S, MacQueen G. (2003). The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. *J Psychiatry Neurosci* 29(6): 417-426
- Carro E, Nunez A, Busiguina S, Torres-Aleman I. (2000). *Journal of Neuroscience* 20(8): 2926-33
- Chen G, Rajkowska G, Du F, Seraji-Bozorgzad N, Manji HK. (2000). Enhancement of Hippocampal Neurogenesis by Lithium. *J Neuro-chemistry* 75 (4): 1729-1734
- Chen H, Pandey GN, Dwivedi Y. (2006). Hippocampal cell proliferation regulation by repeated stress and antidepressants. *Neuroreport* 17(9): 863-867
- Colla M, Kronenberg G, Deuschle M, Meichel K, Hagen T, Bohrer M, Heuser I. (2007). Hippocampal volume reduction and HPA-system activity in major depression. *Biol Psychiatr Res* 41(7): 553-560

- Crain B, Cotman C, Taylor D, Lynch G. (1973). A quantitative electron microscopic study of synaptogenesis in the dentate gyrus of the rat. *Brain Res* 63: 195-204
- Dawirs RR, Hildebrandt K, Teucher-Noodt G. (1998). Adult treatment with haloperidol increases dentate granule cell proliferation in the gerbil hippocampus. *J Neural Transm* 105: 317-327
- del Rio JA, Soriano E. (1989). Immunocytochemical detection of 5'-Bromo-deoxyuridine incorporation in the central nervous system of the mouse. *Brain Res Dev Brain Research* 49 (2): 311-317
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (1999). Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain. *Cell* Vol. 97: 703-716
- Duman RS, Nakagawa S, Malberg J. (2001). Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment. *Neuropsychopharmacology* Vol. 25, No. 6: 836-844
- Duman RS, Monteggia LM. (2006). A neurotrophic Model for Stress-Related Mood Disorders. *Biol Psychiatry* 59: 1116-1127
- Duman RS, Malberg J, Nakagawa S. (2001). Regulation of adult neurogenesis by psychotropic drugs and stress. *J Pharmacol Exp Ther* 299 (2): 401-407
- Eglitis MA, Mezey E. (1997). Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* Vol. 94: 4080-4085
- Eisch AJ, Barrot M, Schach CA, Self DW, Nestler EJ. (2000). Opiates inhibit neurogenesis in adult rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci* 97: 7579-7584
- Elder GA, De Gasperi R, Gama Sosa M. (2006). Neurogenesis in Adult Brain and Neuropsychiatric Disorders. *The Mount Sinai Journal of Medicine* Vol. 73 No. 7: 931-940
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine* 4,11: 1313-1317
- Fabre V, Beaufour C, Evrad A, Rioux A, Hanoun N, Lesch KP, Murphy DL, Lanfumey L, Hamon M, Martres MP. (2000). Altered expression and functions of serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in knock-out mice lacking the 5-HT transporter. *Eur J Neurosci* 12: 2299-2310

- Fox MA, Andrews AM, Wendland JR, Lesch KP, Holmes A, Murphy DL. (2007).
A pharmacological analysis of mice with a targeted disruption of the serotonin transporter. *Psychopharmacology* 195 : 147-166
- Gage FH. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* 287: 1433-1438
- Gage FH. (2002). Neurogenesis in the Adult Brain. *Journal of Neuroscience*.
Feb. 1.2002.22(3): 612-613
- Gaiano N, Nye JS, Fishell G. (2000). Radial glia identity is promoted by notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron* 26: 395-404
- Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV. (2004). GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nature Neuroscience* 7(11): 1233-1241
- Gaspar P, Cases O, Maroteaux L. (2003). The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nature Neuroscience* Dec 2003 Vol. 4: 1002-1012
- Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG. (1996).
Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature (London)* 379: 606-612
- Gomez-Pinilla F, Dao L, So V. (1997). Physical exercise induces FGF-2 and its mRNA in the hippocampus. *Brain Research* 764 (1-2): 1-8
- Gould E, Gross CG. (2002). Neurogenesis in Adult Mammals: Some Progress and Problems. *J Neuroscience* 22(3): 619-623
- Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LAM, Fuchs E. (1997). Neurogenesis in the dentate gyrus of the Adult tree shrew is Regulated by Psychosocial Stress. *J Neuroscience* 17.2492-2498
- Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E. (1998). Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci* 95: 260-265
- Gould E, Tanapat P, Hastings NB, Shors TJ. (1999). Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. *Trends Cogn Sci* 3: 186-192
- Gross CG. (2000). Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Neuroscience* 1: 67-73
- Halim ND, Weickert CS, McClintock BW, Weinberger DR, Lipska BK. (2004). Effects of chronic haloperidol and clozapine treatment in the adult rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 29(6): 1063-1069

- Hattori S, Hashimoto R, Miyakawa T, Yamanaka H, Maeno H, Wada K, Kunugi H. (2007). Enriched environments influence depression-related behavior in adult mice and the survival of newborn cells in their hippocampi. *Behavior Brain Research* Feb 28: (Epub ahead of print)
- Hayakawa H, Shimizu M, Nishida A, Motohashi N, Yamawaki S. (1994). Increase in 5-HT_{1A} in the dentate gyrus. *Neuropsychology* 30:53-56
- Hellsten J, Wennström M, Mohapel P, Ekdahl CT, Bengzon J, Tingström A. (2002). Electroconvulsive seizures increase hippocampal neurogenesis after chronic corticosterone treatment. *Eur J of Neuroscience*, Vol. 16: 283-290
- Hermann MRM. (2007). Neverending writing of the dissertation: stressful life event and the onset of major depression. *Private Life* 35: 2000-2008
- Hildebrandt K, Teuchert-Noodt G, Dawirs RR. (1999). A single dose of metamphetamine suppresses dentate granule cell proliferation in adult gerbils which is restored to control values by acute doses of haloperidol. *J Neural Trans* 106: 549-558
- Hnasko TS, Sotak BN, Palmiter RD. (2007). Cocaine-Conditioned Place Preference by Dopamine-Deficient Mice Is Mediated by Serotonin. *J Neuroscience* 27(46): 12484-12488
- Holmes A, Murphy DL, Crawley JN. (2002). Reduced aggression in mice lacking the 5-HT transporter. *Psychopharmacology* 161: 160-167
- Holmes A, Yang RJ, Murphy DL, Crawley JN. (2002). Evaluation of antidepressant-related behavioral responses in mice lacking the serotonin transporter. *Neuropsychopharmacology* 27: 914-923
- Holmes A, Li Q, Murphy DL, Gold E, Crawley JN. (2003). Abnormal anxiety-related behavior in serotonin transporter null mutant mice: the influence of genetic background. *Genes, Brain and Behavior* 2: 365-380
- Jacobs BL, Tanapat P, Reeves AJ, Gould E. (1998). Serotonin stimulates the production of new hippocampal granule neurons via the 5HT_{1A} receptor in the adult rat. *Soc Neuroscience* 24: 1992
- Jacobs BL, VanPraag H, Gage FH. (2000). Adult brain neurogenesis and psychiatry: A novel theory of depression. *Mol Psychiat* 5: 262-269
- Jacobs BL. (2002). Adult brain neurogenesis and depression. *Brain, Behavior, and Immunity* 16: 602-609
- Jha S, Rajendran R, Davda J, Vaidya VA. (2006). Selective serotonin depletion

- does not regulate hippocampal neurogenesis in the adult rat brain: differential effects of p-chlorophenylalanine and 5,7-dihydroxytryptamine. *Brain Res* 1075(1): 48-59
- Jiang W, Zhang Y, Xiao L, Van Cleemput J, Ji SP, Bai G, Zhang X. (2005). Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *J Clinical Investigation* 115(11): 3104-16
- Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Batteur S, Simon RP, Greenberg DA. (2001). Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *PNAS*, Vol. 98 no. 8: 4710-4715
- Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. (2003). Cerebral Neurogenesis is Induced by Intranasal Administration of Growth Factor. *Ann Neurol* 53(3); 405-409
- John PJ Pinel. *Biopsychologie*. 2. Auflage 2001. Spektrum Akademischer Verlag
- Kahn L, Alonso G, Normand E, Manzoni OJ. (2005). Repeated morphine treatment alters polysialylated neural cell adhesion molecule, glutamate decarboxylase-67 expression and cell proliferation in the adult rat hippocampus. *Eur J Neuroscience* 21(2): 493-500
- Karow, Lang-Roth. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 11. Auflage 2003
- Kasper S, McEwen BS. (2008). Neurobiological and clinical effects of the antidepressant tianeptine. *CNS Drugs* 22(1): 15-26
- Keller A, Bagorda F, Hildebrandt K, Teuchert-Noodt G. (2000). Effects of Enriched and of Restricted Rearranging on Both Neurogenesis and Synaptogenesis in the Hippocampal DG of Adult Gerbils. *Neurology, Psychiatry and Brain Research* 8, 101-108
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386: 493-495
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. (1997). Genetic Influence on Neurogenesis in the Dentate Gyrus of Adult Mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10409-10414
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. (1998). Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neuroscience* 18: 3206-3212

- Kempermann G, Brandon EP, Gage FH. (1998). Environmental Stimulation of 129/SvJ mice results in increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Curr Biol* 8: 939-942
- Kempermann G. (2002). Regulation of adult hippocampal neurogenesis: implications for novel theories of major depression. *Bipolar Disord* 4: 17-33
- Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH. (2003). Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development and Disease* 130: 391-399
- Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA. (1999). Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am J Psychiat* 156: 837-841
- Khan MA, Herzog CA, St Peter JV, Hartley GG, Madlon-Kay R, Dick CD, Asinger RW, Vessey JT. (1998). The prevalence of cardiac valvular insufficiency assessed by transthoracic echocardiography in obese patients treated with appetite-suppressant drugs. *N Engl J Med* 339 (11): 765-6
- Kim DK, Tolliver TJ, Huang SJ, Martin BJ, Andrews AM, Wichems C, Holmes A, Lesch KP, Murphy DL. (2005). Altered serotonin synthesis, turnover and dynamic regulation in multiple brain regions of mice lacking the serotonin transporter. *Neuropharmacology* 49: 798-810
- Kimelberg HK, Norenberg MD. (1989). Astrozyten und Hirnfunktion. *Spektrum der Wissenschaft*. Juni 1989
- Köhler, Schachtel, Voleske. *Biostatistik*. 3. Auflage 2002. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Deutschland
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. (1996). Neurogenesis in the Dentate Gyrus of the Adult Rat: Age-Related Decrease of Neuronal Progenitor Proliferation. *J Neuroscience* 16: 2027-2033
- Kulkarni VA, Jha S, Vaidya VA. (2002). Depletion of norepinephrine decreases the proliferation, but does not influence the survival and differentiation, of granule cell progenitors in the adult rat hippocampus. *Eur J Neurosci*. Nov; 16(10): 2008-2012
- Lauder JM, Wallace JA, Krebs H. (1981). Roles of serotonin in neuro-embryogenesis. *Adv Exper Med-Biol* 133 : 477-506
- Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, Holland EC, Steindler D. (2000).

- Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13883-13888
- Lemaire V, Koehl M, Le Moal M, Abrous DN. (2000). Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *PNAS* 97 (20): 11032-11037
- Lesch KP, Balling U, Gross J, Strauss K, Wolozin BL, Murphy DL, Riederer P. (1994). Organization of the human serotonin transporter gene. *J Neural Transm Gen Sect.* 95(2): 157-62
- Lesch KP, Mössner R. (1998). Genetically Driven Variation in Serotonin Uptake: Is there a Link to affective Spectrum, Neurodevelopment, and Neurodegenerative Disorders? *Biol Psychiatry* 44, 179-192
- Lesch KP, Zeng Y, Reif A, Gutknecht L. (2003). Anxiety-related traits in mice with modified genes of the serotonergic pathway. *Eur J Pharmacol* 7; 480 (1-3) 185-204
- Lesch KP. (2001). Serotonin transporter: from genomics and knockouts to behavioral traits and psychiatric disorders. In: Briley M, Sulser F, editors. *molecular genetics of mental disorders*. London: Martin Dunitz Publishers. p 221-267.
- Lesch KP. (2001). Serotonergic gene expression and depression: implications for developing novel antidepressants. *J Affect Disorders* 62 (1-2): 57-76
- Lewis DA, Smith RE. (1983). Steroid-induced psychiatric syndromes. *J Affect Disorders* 5: 319-322
- Lichtmann JW. (1994). Konfokale Mikroskopie. *Spektrum der Wissenschaft* 10: 78-84
- Lira A, Zhou M, Castanon N, Ansorge M, Gordon JA, Francis JH, Bradley-Moore M, Lira J, Underwood MD, Arango V, Kung HF, Hofer MA, Hen R, Gingrich JA. (2003). Altered depression-related behaviors and functional changes in the dorsal raphe nucleus of serotonin-deficient mice. *Biol Psychiatry* 15; 54 (10): 960-971
- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature Reviews (Neuroscience)* 7: 179-193
- Lodish, Berk (Editors). *Molecular Cell Biology*, fourth edition 2000. W.H. Freeman and Company, New York
- Löffler, Petrides Hrsg. *Biochemie und Pathobiochemie*. 5. Auflage 1997.

Springer Verlag.

- Madsen TM, Treschow A, Bengzon J, Bolwig TG, Lindvall O, Tingstrom A. (2000). Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. *Biol Psychiatry* 47(12): 1043-1049
- Malatesta P, Hartfuss E, Götz M. (2000). Isolation of radial glia cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 127: 5253-5263
- Malberg JE, Duman RS. (2003). Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 28(9): 1562-71
- Malberg JE, Eisch A, Nestler EJ, Duman RS. (2000). Chronic Antidepressant Treatment Increases Neurogenesis in Adult Rat Hippocampus. *J Neurosci* 20(24): 9104-9110
- Malberg JE. (2004). Implication of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action. *J Psychiatry Neuroscience*: 29(3): 196-205
- Malberg JE, Schechter LE. (2005). Increasing hippocampal neurogenesis: a novel mechanism for antidepressant drugs. *Curr Pharm Des* 11 (2): 145-155
- Malberg JE, Blendy JA. (2005). Antidepressant action: to the nucleus and beyond. *Trends Pharmacol Science* 26 (12): 631-638
- Mannoury la Cour C, Boni C, Hanoun N, Lesch KP, Hamon M, Lanfumey L. (2001). Functional Consequences of 5-HT Transporter Gene Disruption on 5-HT_{1A} Receptor-Mediated Regulation of Dorsal Raphe and Hippocampal Cell Activity. *J Neurosci* 21 (6): 2178-2185
- Markakis E, Gage FH. (1999). Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J Comp Neurol* 406: 449-460
- Mathews TA, Fedele DE, Coppelli FM, Avila AM, Murphy DL, Andrews AM. (2004). Gene dose-dependent alterations in extraneuronal serotonin but not dopamine in mice with reduced serotonin transporter expression. *J Neuroscience Methods* 30; 140 (1-2): 169-181
- Mathews TA, Fedele DE, Unger EL, Copelli FA, Lesch KP, Murphy DL, Andrews AM. (2002). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine-induced dopamine release does not stimulate locomotor activity in serotonin

- transporter-knockout mice: role of serotonin and the 5-HT_{1B}-receptor. Manuscript in preparation.
- Mathews TA, Fedele DE, Unger EL, Lesch KP, Murphy DL, Andrews AM. (2000). Effects of serotonin transporter inactivation on extracellular 5-HT levels, in vivo microdialysis recovery, and MDMA-induced release of serotonin and dopamine in mouse striatum. *Soc Neurosci Abstr* 30: 624.3
- Matsumori Y, Hong SM, Fan Y, Kayama T, Hsu CY, Weinstein PR, Liu J. (2006). Enriched environment and spatial learning enhance hippocampal neurogenesis and salvages ischemic penumbra after focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 22 (1): 187-198
- Mehler MF. (2002). Mechanisms regulating lineage diversity during mammalian cerebral cortical neurogenesis and gliogenesis. *Results Probl Cell Differ* 39: 27-52
- Merkle FT, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (2004). Radial glia Give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *PNAS* vol.101, no. 50: 17528-17532
- Miller MW, Nowakowski RS. (1988). Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain Research* 457: 44-52
- Ming G, Song H. (2005). Adult Neurogenesis in the Mammalian Central Nervous System. *Annual Review Neuroscience* 28: 223-50
- Montanez S, Owens WA, Gould GG, Murphy DL, Daws LC. (2003). Exaggerated effect of fluvoxamine in heterozygote serotonin transporter knockout mice. *J Neurochem* 86: 210-219
- Murphy DL, Lerner A, Rudnick G, Lesch KP. (2004). Serotonin transporter: gene, genetic disorders and pharmacogenetics. *Mol Inter* 4: 109-123
- Nakagawa S, Kim JE, Lee R, Malberg JE, Chen J, Steffen C. (2002). Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by camp and the camp response element-binding protein. *J Neurosci* 22(9): 3673-82
- Nemeroff CB. (1998). The neurobiology of depression. *Scientific American* 278, 42-49
- Nemeroff CB. (1992). The presynaptic 5-HT uptake site in depression. *Clinical Neuropharmacol.* 15 Suppl 1Pt A: 347A-348A

- Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. (1995). Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatment. *J Neuroscience* 15: 7539-7547
- Nithianantharajah J, Hannan AJ. (2006). Enriched environments, experience-Dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience* 7 (9): 697-709
- Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson PS. (1999). Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *Journal of Neurobiology* 39 (4): 569-78
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR. (2001). Neurons derived from radial glia cells established radial units in neocortex. *Nature* 409: 714-720
- Nowakowski RS, Lewin RD. (1989). BrdU immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J Neurocytol* 18: 311-318
- Owens MJ, Nemeroff CB. (1994). Role of Serotonin in the Pathophysiology of Depression: Focus on the Serotonin Transporter. *Clin Chem* 40: 288-295
- Palmer TD, Takahashi J, Gage FH. (1997). The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci* 8:389-404
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. (2000). Vascular Niche for Adult Hippocampal Neurogenesis. *J Comp Neurology* 425: 479-494
- Perera TD, Coplan JD, Lisanby SH, Lipira CM, Arif M, Carpio C, Spitzer G, Santarelli L, Scharf B, Hen R, Rosoklija G, Sacckheim HA, Dwork AJ. (2007). Antidepressant-induced neurogenesis in the hippocampus of adult nonhuman primates. *J Neuroscience* 27(18): 4894-4901
- Perfilieva E, Risedal A, Nyberg J, Johansson BB, Eriksson PS. (2001). Gender and strain influence on neurogenesis in dentate gyrus of young rats. *J Cereb Blood Flow Metabolism* 21 (3): 211-217
- Persico AM, Baldi A, Dell'Aqua ML, Moessner R, Murphy DL, Lesch KP, Keller F. (2003). Reduced programmed cell death in brains of 5-HT transporter KO mice. *Neuroreport* 14,3: 341-344
- Persico AM, Mengual E, Mössner R, Hall FS, Revay RS, Lesch KP. (2001). Barrel pattern formation requires serotonin uptake by thalamocortical afferents, and not vesicular monoamine release. *J Neurosci* 21: 6862-6873

- Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch, 258.Auflage, W de Gruyter-Verlag, 1998
- Rakic P. (1985). Limits of neurogenesis in primates. *Science* 227(4690): 1054-1056
- Radley JJ, Jacobs BL. (2002). 5-HT_{1A} receptor antagonist administration decreases cell proliferation in the dentate gyrus. *Brain Research* 955: 264-267
- Radley JJ, Jacobs BL. (2003). Pilocarpine-induced status epilepticus increases cell proliferation in the dentate gyrus of adult rats via a 5-HT_{1A} receptor-dependent mechanism. *Brain Research* 966: 1-12
- Reh TA. (2002). Neuronal stem cells: form and function. *Nature Neuroscience* 5: 392-394
- Reynolds BA, Weiss S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255: 1707
- Richards LJ, Kilpatrick TJ, Bartlett PF. (1992). De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8591-8595
- Risch SC, Nemeroff CB. (1992). Neurochemical alterations of serotonergic neuronal systems in depression. *J Clin Psychiatry* 53 Suppl: 3-7
- Rossi C, Angelucci A, Costatin L, Braschi C, Mazzantini M, Babbini F, Fabbri ME, Tessarollo L, Maffei L, Berardi N, Caleo M. (2006). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Eur J Neuroscience* 24(7): 1850-56
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R. (2003). Requirement of hippocampal Neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* Vol. 301: 805-808
- Sasaki T, Kitagawa K, Omura-Matsuoka E, Todo K, Terasaki Y, Sugiura S, Hatazawa J, Yagita Y, Hori M. (2007). The phosphodiesterase inhibitor rolipram promotes survival of newborn hippocampal neurons after ischemia. *Stroke* 38(5): 1597-605
- Schaaf MJ, de Jong J, de Kloet ER, Vreugdenhil E. (1998). Downregulation of BDNF mRNA and protein in the rat hippocampus by corticosterone. *Brain Research* 813: 112-120

- Schechter LE, Ring RH, Beyer CE, Hughes ZA, Khawaja X, Malberg JE, Rosenzweig-Lipson S (2005). Innovative approaches for the development of antidepressant drugs: current and future strategies. *NeuroRx* 2 (4): 590-611
- Schmidt, Thews. *Physiologie des Menschen*, 28. Auflage, Springer-Verlag, 2000
- Schmitt A, Mössner R, Gossmann A, Fischer IG, Gorboulev V, Murphy DL, Koepsell H, Lesch KP. (2003). Organic Cation Transporter Capable of Transporting Serotonin Is Up-Regulated in Serotonin Transporter-Deficient Mice. *J Neuroscience Research* 71: 701-709
- Scott BW, Wojtowicz JM, Burnham WM. (2000). Neurogenesis in the dentate gyrus of the rat following electroconvulsive shock seizures. *Experimental Neurology* 165, 231-236
- Seemann M. (1998). Inaktivierung des Serotonin-Transportergens bei der Maus. UWÜ
- Seki T, Arai Y. (1995). Age-Related Production of New Granule Cells in the Adult DG. *Neuroreport* 6: 2479-2482
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. (2001). Astrocytes Give Rise to New Neurons in the Adult Mammalian Hippocampus. *J Neurosci* 21(18): 7153-7160
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. (2004). Cell types, lineage and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J comp Neurol* 478(4): 359-78
- Setola V, Dukat M, Glennon RA, Roth BL. (2005). Molecular Determinants for the Interaction of the Valvulopathic Anorexigen Norfenfluramine with the 5-HT_{2B} Receptor. *Molecular Pharmacology* 68: 20-33
- Sharp FR, Liu J, Bernabeu R. (2002). Neurogenesis following brain ischemia. *Brain Res Dev Brain Res* 31; 134(1-2)
- Sheline YI, Wang P, Gado M, Csernansky J, Vannier M. (1996). Hippocampal atrophy in major depression. *Proc Natl Acad Science USA* 93: 3908-3913
- Sheline YI, Shangavi M, Mintun MA, Gado MH. (1999). Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression. *J Neurosci* 19(12): 5034-5043
- Shen HW, Hagino Y, Kobayashi H, Shinohara-Tanaka K, Ikeda K, Yamamoto H, Yamamoto T, Lesch KP, Murphy DL, Halls FS, Uhl GR, Sora I. (2004).

- Regional differences in extracellular dopamine and serotonin assessed by in vivo microdialyses in mice lacking the dopamine and/or serotonin transporters. *Neuropsychopharmacology* 29(10): 1790-1799
- Shors TJ, Miesegaes G, Beyline A, Zhao M, Rydel T, Gould E. (2001). Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410: 372-76
- Silbernagl. Taschenatlas der Physiologie, 5.Auflage, Thieme-Verlag, 2001
- Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM. (1995). Stress alters the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J Neuroscience* 15: 1768-1777
- Son H, Yu IT, Hwang SJ, Kim JS, Lee SH, Lee YS, Kaang BK. (2003). Lithium enhances long-term potentiation independently of hippocampal neurogenesis in the rat dentate gyrus. *J Neurochemistry* 85(4): 872-881
- Song H, Stevens CF, Gage FH. (2002). Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nature Neuroscience*. 5: 438-445
- Sora I, Hall FS, Andrews AM, Itikawa M, Li XF, Wie HB, Wichems C, Lesch KP, Murphy DL, Uhl GR. (2001). Molecular mechanisms of cocaine reward: Combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference. *PNAS* Vol. 98, No. 9: 5300-5305
- Steffens D, Byrum CE, McQuoid DR, Greenberg DL, Payne ME, Blichington TF, MacFall JR, Krishnan KRR. (2000). Hippocampal volume in geriatric depression. *Biol Psychiatry* 48: 301-309
- Steiner B, Kronenberg G, Jessberger S, Brandt MD, Reuter K, Kempermann G. (2004). Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia* 1;46(1): 41-52
- Stockmeier CA, Shapiro LA, Dilley GE, Kolli TN, Friedman L, Rajkowska G. (1998). Increase in Serotonin-1A Autoreceptors in the Midbrain of Suicide Victims with Major Depression- Postmortem Evidence for Decreased Serotonin Activity. *J of Neuroscience* 18(18): 7394-7401
- Sun W, Winseck A, Vinsant S, Park O, Kim H, Oppenheim RW. (2004). Programmed Cell Death of Adult-Generated Hippocampal Neurons Is Mediated by the Proapoptotic Gene Bax. *J Neuroscience* 24(49): 11205-11213

- Suzuki F, Makiura Y, Guilhem D, Sorensen JC, Onteniente B. (1997). Correlated axonal sprouting and dendritic spine formation during kainite-induced neuronal morphogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Exp Neurol* 145: 203-213
- Szapacs ME, Mathews TA, Tessarollo L, Ernest Lyons W, Mamounas LA, Andrews AM. (2004). Exploring the relationship between serotonin and brain-derived neurotrophic factor: analysis of BDNF protein and extraneuronal 5-HT in mice with reduced serotonin transporter or BDNF expression. *J Neurosci Methods* 30; 140 (1-2): 81-92
- Takahashi T, Nowakowski RS. (1992). BrdU as an S-phase marker for quantitative studies of cytokinetic behaviour in the murine cerebral ventricular zone. *J Neurocytology* 21: 185-197
- Tanapat P, Gales LAM, Gould E. (1998). Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus. *Int J Dev Neurosci* 16 (3/4): 235-239
- Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E. (1999). Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci* 19: 5792-5801
- Taupin P. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system: functionality and potential clinical interest. *Med Sci Monit* 11(7): 247-252
- Taupin P, Gage FH. (2002). Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res* 69: 745-749
- Trepel M. *Neuroanatomie*. 2. Auflage 1999. Urban & Fischer-Verlag
- Ueda S, Sakakibara S, Yoshimoto K. (2005). Effect of long-lasting serotonin depletion on environmental enrichment-induced alterations neurogenesis in adult rat hippocampus and spatial learning. *Neuroscience* 135(2): 395-402
- Underwood MD, Khaibulina AA, Ellis SP, Moran A, Rice PM, Mann JJ, Arango V. (1999). Morphometry of the dorsal raphe nucleus serotonergic neurons in suicide victims. *Biol Psychiatry* 15; 46 (4): 473-483
- Van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. (2002). Functional Neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415: 1030-1034
- Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat. Neuroscience* 2: 593-598

- Vogel C, Mossner R, Gerlach M, Heinemann T, Murphy DL, Riederer P, Lesch KP, Sommer C. (2003). Absence of thermal hyperalgesia in serotonin transporter-deficient mice. *J Neuroscience* Jan 15; 23(2): 708-715
- Wang HD, Dunnavant FD, Jarman T, Deutch AY. (2004). Effects of antipsychotic drugs on neurogenesis in the forebrain of the adult rat. *Neuropsychopharmacology* 29(7): 1230-1238
- Whitaker-Azmitia PM. (1991). Role of serotonin and other neurotransmitter receptors in brain development: basis for development pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 553-561
- www.confocal-microscopy.com
- www.jireurope.com/technical/f-cy3-cy5.asp
- www.leica-microsystems.com
- www.wikipedia.de/com
- Yates M, Leake A, Candy JM, Fairbairn AF, KcKeith IG, Ferrier IN. (1990). 5-HT₂ receptor changes in major depression. *Biol Psychiatry*, 27: 489-96
- Yamaguchi M, Suzuki T, Seki T, Namba T, Juan R, Arai H, Hori T, Asada T. (2004). Repetitive cocaine administration decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. *Ann N Y Acad Sci*, 1025: 351-62
- Yoshimura S, Takagi Y, Harada J, Teramoto T, Thomas S, Waeber C, Bakowska JC, Breakefield XO, Moskowitz MA. (2001). FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury. *PNAS*, Vol. 98 no. 10: 5874-5879
- Zhang R, Wang Y, Zhang L, Zhang Z, Tsang W, Lu M, Zhang L, Chopp M. (2002). Sildenafil (Viagra®) induces neurogenesis and promotes functional recovery after stroke in rats. *Stroke* 33(11): 2675-2680

7.3 Veröffentlichung

- Schmitt A, Benninghoff J, Moessner R, Rizzi M, Paizanis E, Doenitz C, Gross S, Hermann M, Gritti A, Lanfumey L, Fritzen S, Reif A, Hamon M, Murphy DL, Vescovi A, Lesch KP. (2007). Adult neurogenesis in serotonin transporter deficient mice. *J Neural Transm* 114(9): 1107-1109

7.4 Danksagung

Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch für die Möglichkeit dieses interessante Thema in seiner Arbeitsgruppe bearbeiten zu dürfen sowie die Bereitstellung der nötigen Materialien und für die Bereiterklärung als Erstgutachter diese Doktorarbeit zu betreuen.

Prof. Dr. Andreas Fallgatter für die Bereiterklärung die Doktorarbeit als Zweitgutachter zu beurteilen.

Prof. Dr. Peter Riederer für die Bereitstellung der Laborräume.

PD Dr. Thomas Rüdiger vom Pathologischen Institut der Universität Würzburg für die Möglichkeit das Konfokale Mikroskop zu nutzen. Und Fr. Roth für die Einweisung und Anleitung.

Mein besonderer Dank gilt Fr. Dr. Angelika Schmitt für ihre Kompetenz, Geduld und Detailgenauigkeit, ohne die diese Arbeit nicht möglich geworden wäre.

Dem Team des Labors, welches immer große Hilfsbereitschaft zeigte und ein tolles Arbeitsklima schaffte.

Meinen Eltern und Freunden die mich während dieser Arbeit technisch und emotional unterstützt haben.