

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

Direktor: Professor Dr. med. J. Deckert

Adulte Neurogenese in alten Serotonin-Transporter defizienten Mäusen

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

vorgelegt von
Christian Doenitz
aus Regensburg

Würzburg, April 2010

Referent: Professor Dr. med. Klaus-Peter Lesch

Korreferent: Professor Dr. med. Peter Kugler

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juli 2010

Der Promovend ist Arzt.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Theoretische Grundlagen	1
1.1.1 Das serotonerge System	1
1.1.1.1 Serotonin – Vorkommen, Wirkung und Metabolismus	1
1.1.1.2 Die serotonerge Neurotransmission	5
1.1.1.3 Der Serotonin-Transporter	7
1.1.2 Das serotonerge System und psychische Erkrankungen	8
1.1.3 Das Modell der Serotonin-Transporter-Knockout-Maus	12
1.1.4 Adulte Neurogenese	13
1.1.5 Der Hippocampus	18
1.1.6 Regulation der adulten Neurogenese	21
1.1.7 Adulte Neurogenese und psychische Erkrankungen	25
1.2 Fragestellung	28
2 Material und Methoden	29
2.1 Material	29
2.1.1 Versuchstiere	29
2.1.2 Antikörper	30
2.1.3 Chemikalien	31

2.1.4	Lösungen und Puffer	31
2.1.5	Verbrauchsmaterialien	33
2.1.6	Software	33
2.1.7	Geräte	34
2.2	Methoden	34
2.2.1	BrdU-Injektionen	34
2.2.2	Herstellung der Gewebeschnitte	35
2.2.3	Immunhistochemischer Nachweis von BrdU	36
2.2.4	Auswertung der Gewebeschnitte	37
2.2.5	Nissl-Färbung	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Proliferation adulter Stammzellen im Hippocampus von <i>5-HTT</i> -Knockout-Mäusen	40
3.2	Überlebensrate und Migration neugebildeter Zellen im Hippocampus von <i>5-HTT</i> -Knockout-Mäusen	42
3.3	Vergleich zwischen Proliferations- und 4-Wochen-Versuch	46
3.4	Einfluss von Alter, Geschlecht und Gewicht der Versuchstiere	47
4	Diskussion	51
4.1	Der immunhistochemische Nachweis von BrdU zur Untersuchung der adulten Neurogenese	51
4.2	Proliferation adulter Stammzellen im Hippocampus von alten <i>5-HTT</i> -Knockout-Mäusen	53

4.3 Überlebensrate und Migration neugebildeter Zellen im Hippocampus von alten <i>5-HTT</i> -Knockout-Mäusen	56
4.4 Einfluss von Alter, Geschlecht und Gewicht der Versuchstiere	59
4.5 Ausblick	60
5 Zusammenfassung	63
6 Abkürzungsverzeichnis	66
7 Literaturverzeichnis	69
Danksagung	
Lebenslauf	

„In adult centers the nerve paths are something fixed, ended, immutable. Everything may die, nothing may be regenerated. It is for the science of the future to change, if possible, this harsh decree.”

(Ramón y Cajal 1928)

1 Einleitung

1.1 Theoretische Grundlagen

1.1.1 Serotonerges System

1.1.1.1 Serotonin – Vorkommen, Wirkung und Metabolismus

Serotonin (5-Hydroxytryptamin; 5-HT) gehört wie auch Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin zur Gruppe der biogenen Amine.

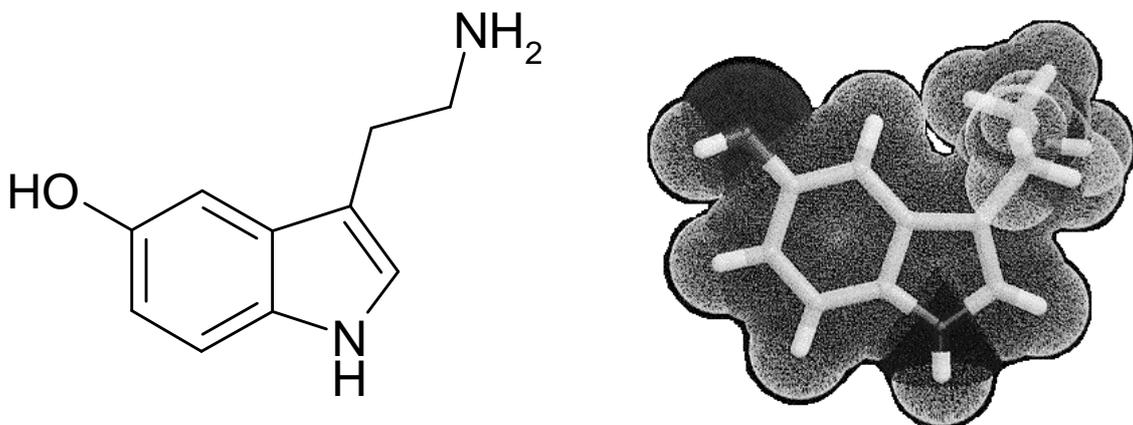


Abb. 1: Strukturformel und 3D-Modell von Serotonin

Hauptbildungsstätten des 5-HT sind die enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltraktes und das Zentralnervensystem (ZNS). Thrombozyten können das von den Darmmukosazellen gebildete 5-HT über einen spezifischen Serotonintransporter (5-HTT) aufnehmen und speichern (Rudnick 1977). Auch in Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten und pulmonalen

neuroendokrinen Zellen konnte 5-HT nachgewiesen werden (Essmann 1978). Als Neurotransmitter des autonomen Nervensystems findet man 5-HT in quergestreifter Muskulatur, glatter Muskulatur von Gefäßen, im Uterus und Ileum, sowie in Plazenta und Lunge (Vandermaelen 1985; Balkovetz et al. 1989). 5-HT hat weitere vielfältige Funktionen im menschlichen Organismus, so führt es im Darm zur Motilitätssteigerung und in den Lungen zu leichter Bronchokonstriktion, in den Pulmonal-, Nieren- und Hirngefäßen kommt es zur Vasokonstriktion, in der Skelettmuskulatur hingegen zur Vasodilatation (Küttler 1996). In hoher Dosis steigert 5-HT den systolischen und diastolischen Blutdruck, in niedriger Dosis aber senkt 5-HT denselben. 5-HT beteiligt sich an der Immunmodulation und Plättchenaggregation und ist die Vorstufe von Melatonin

Im ZNS ist das serotonerge System an vielen Funktionen beteiligt. Dazu gehören die Regulation der Gehirndurchblutung, endokrine und circadiane Rhythmen, Ess- und Sexualverhalten, Schlaf und Vigilanz, Erbrechen, motorische und kognitive Funktionen, Nozizeption, neuroendokrine Funktionen, Körpertemperatur-, Blutdruck- und Reflexmodulation sowie komplexe psychische Funktionen wie Stimmung, Wahrnehmung, Antrieb, Lernen und Aggressivität (Schmidt 1990; Frishman et al. 1995; Westernberg et al. 1996). Eine Dysbalance der zentralen serotonergen Neurotransmission kann zur Entstehung von psychischen Erkrankungen wie Depression, Impulskontrollstörungen, Zwangserkrankungen, Angststörungen und Panikattacken beitragen (Owens et al. 1994; Baumgarten et al. 1995; Murphy et al. 1996). Neurotrophe Eigenschaften von 5-HT zeigen sich durch seine Wirkung auf Proliferation, Migration und Differenzierung von Neuronen während der embryonalen Entwicklung des Nervensystems (Lauder et al. 1981; Whitaker-Azmitia 1991; Moiseiwitsch et al. 1995). 5-HT wird auch als mitogene Substanz eingestuft (Takuwa et al. 1989; Fanburg et al. 1997).

Die Bedeutung des serotonergen Systems spiegelt sich auch in seiner beträchtlichen anatomischen Ausdehnung wieder. Es bildet das größte neuronale Netzwerk des ZNS. Wie aus Abb. 2 zu entnehmen ist, liegen die

Kerngebiete des serotonergen Systems in den Raphekerne des Mittelhirns (RK) und bündeln ihre Axone in 6 Hauptprojektionen. Das ventrale ascendierende Bündel steigt auf zu Thalamus, Hypothalamus, Corpus amygdaloideum und Caudatus-Putamen-Komplex, Hippocampus und Cortex (1). Das dorsal ascendierende, rhombencephale, cerebelläre (2), und bulbospinale (3) Bündel projiziert zu Hirnrinde, Hirnstamm, Kleinhirn und Rückenmark und eine Gruppe serotonerger Neurone bildet am Boden des vierten Ventrikels (4) den supraependymalen Plexus (Nieuwenhuys 1985).

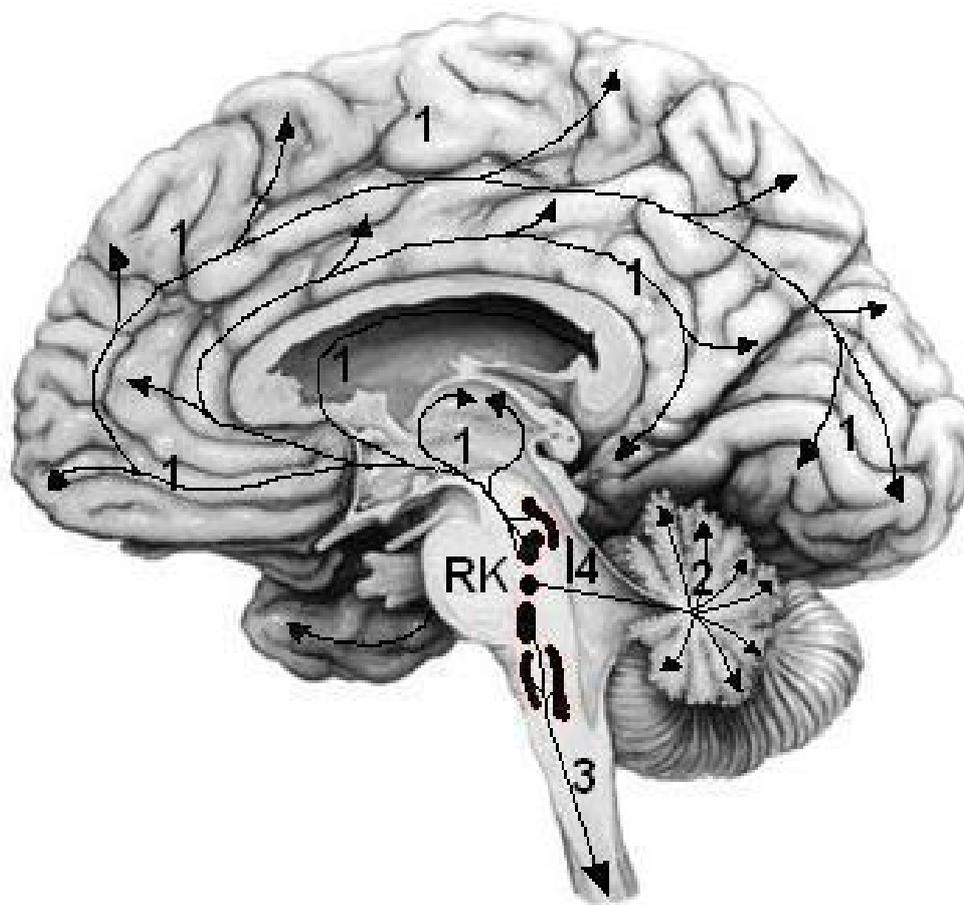


Abb. 2: Anatomie des serotonergen Systems (adaptiert nach Nieuwenhuys R 1985)

Die Raphekerne sind als Ansammlung von Zellgruppen in der Nähe der Mittellinie des Hirnstamms verteilt. Die rostralen Raphe Nuclei projizieren zu einer großen Anzahl von Vorderhirnstrukturen. Die caudalen Raphe Nuclei projizieren hauptsächlich zum Rückenmark und zum Cerebellum. RK – Raphekerne des Mittelhirns; 1 – ventrales ascendierendes Bündel; 2 – cerebelläres Bündel; 3 – bulbospinales Bündel; 4 – supraependymaler Plexus.

Die Biosynthese von 5-HT beginnt mit der Hydroxylierung der essentiellen Aminosäure Tryptophan durch die Tryptophanhydroxylase (TPH) zu 5-Hydroxytryptophan (5-HTP). Anschließend wird 5-HTP mit Hilfe der L-Aminosäure-Decarboxylase (L-ASDC) zum 5-Hydroxytryptamin (5-HT; Serotonin) decarboxyliert.

Der Abbau von 5-HT erfolgt hauptsächlich durch die Monoaminoxidasen (MAO) A (extrazellulärer Abbau) und B (intrazellulärer, mitochondrialer Abbau), sowie die Aldehyddehydrogenase zum Hauptmetabolit 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA), der in Liquor und Urin nachweisbar ist, siehe Abb. 3 (Starke et al. 1992).

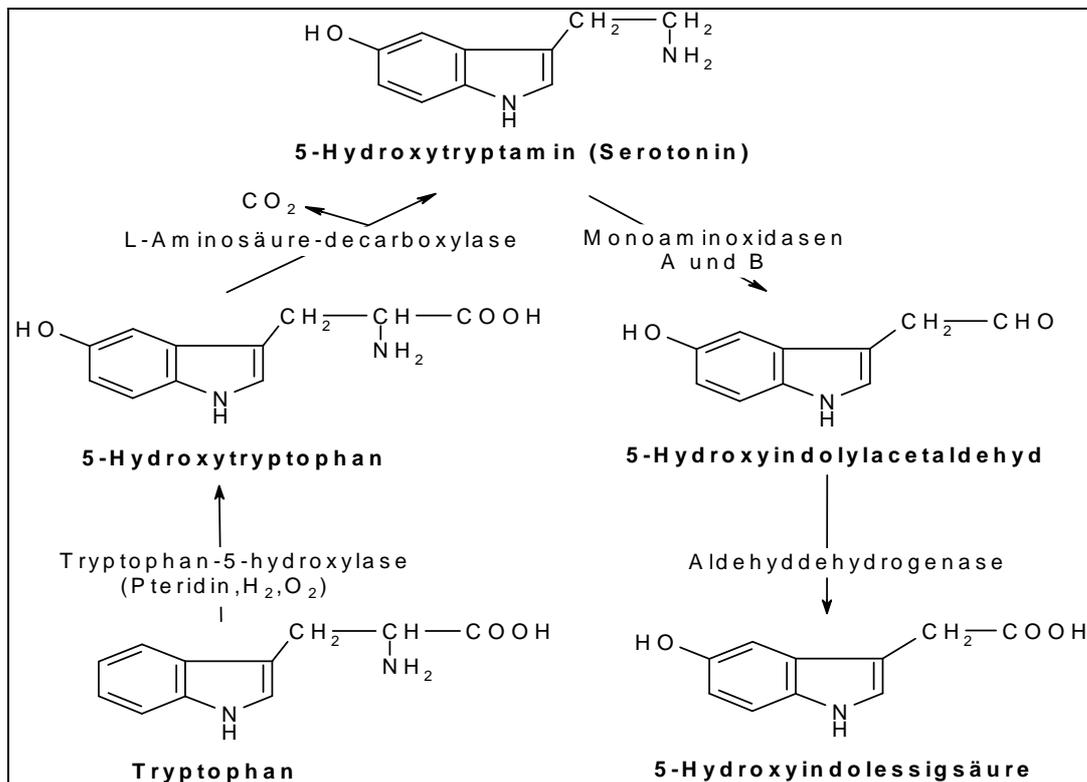


Abb. 3: Metabolismus von Serotonin.

Die Synthese von Serotonin aus der essentiellen Aminosäure Tryptophan erfolgt in 2 Schritten: Hydroxylierung von Tryptophan durch die Tryptophan-Hydroxylase zu 5-Hydroxy-Tryptophan und anschließender Decarboxylierung zu Serotonin. Der Abbau von 5-HT durch die MAO geschieht in zwei Schritten: Zunächst wird Serotonin durch oxidative Desaminierung in 5-Hydroxyindolylacetaldehyd umgewandelt. Dieses wird dann zu Ethanol reduziert oder zu 5-Hydroxyindolessigsäure oxidiert, die sowohl im Liquor als auch im Urin nachweisbar ist.

1.1.1.2 Die serotonerge Neurotransmission

Nach der Synthese wird 5-HT über den vesikulären Monoamintransporter (VMAT) im Austausch gegen zwei H^+ -Ionen in Vesikel transportiert und gespeichert. Beim Eintreffen eines Aktionspotentials entleeren sich die Vesikel exozytotisch in den synaptischen Spalt. 5-HT diffundiert zur postsynaptischen Membran und bindet dort an 5-HT-Rezeptoren, was zur Depolarisation und Auslösung eines Aktionspotentials im postsynaptischen Neuron führt. Derzeit kann mindestens zwischen 15 verschiedenen 5-HT-Rezeptoren unterschieden werden, die in 7 Familien zusammengefasst werden: 5-HT1 bis 5-HT7 (Murphy et al. 1998). Es existieren sowohl metabotrope (z.B. 5-HT1A, 5-HT2A) als auch ionotrope 5-HT-Rezeptoren (5-HT3), die vor allem postsynaptisch lokalisiert sind. Metabotrope Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelt, wohingegen ionotrope Rezeptoren direkt als Kationenkanal wirken. Präsynaptische Rezeptoren beteiligen sich z.B. über sog. Rückkopplungsmechanismen oder durch Modulation der Ausschüttung anderer Neurotransmitter an der Regulation der synaptischen Aktivität, wie in Abbildung 4 zu sehen ist.

Die Neurotransmission wird hauptsächlich durch die Wiederaufnahme des 5-HT ins präsynaptische Neuron beendet. Ein nennenswerter Abbau dieses Transmitters im synaptischen Spalt, wie z.B. von Azetylcholin an der cholinergen Synapse, findet an der serotonergen Synapse nicht statt (Lesch et al. 1995a). Das 5-HT wird durch den membranständigen spezifischen Serotonin-Transporter (5-HTT) wieder ins präsynaptische Neuron aufgenommen, wodurch die extrazelluläre Konzentration von 5-HT sinkt und die Erregung der Postsynapse unterbrochen wird. Der 5-HTT beeinflusst damit Stärke und Dauer der Neurotransmission und ist somit ein wichtiges Regulationsglied des serotonergen Systems (Owens et al. 1994).

In der Präsynapse wieder aufgenommenes 5-HT wird durch den VMAT wieder in Speichervesikel aufgenommen und steht einer erneuten Ausschüttung zur

Verfügung. Nur ein geringer Anteil wird durch die mitochondrienassoziierte Monoaminoxidase B abgebaut.

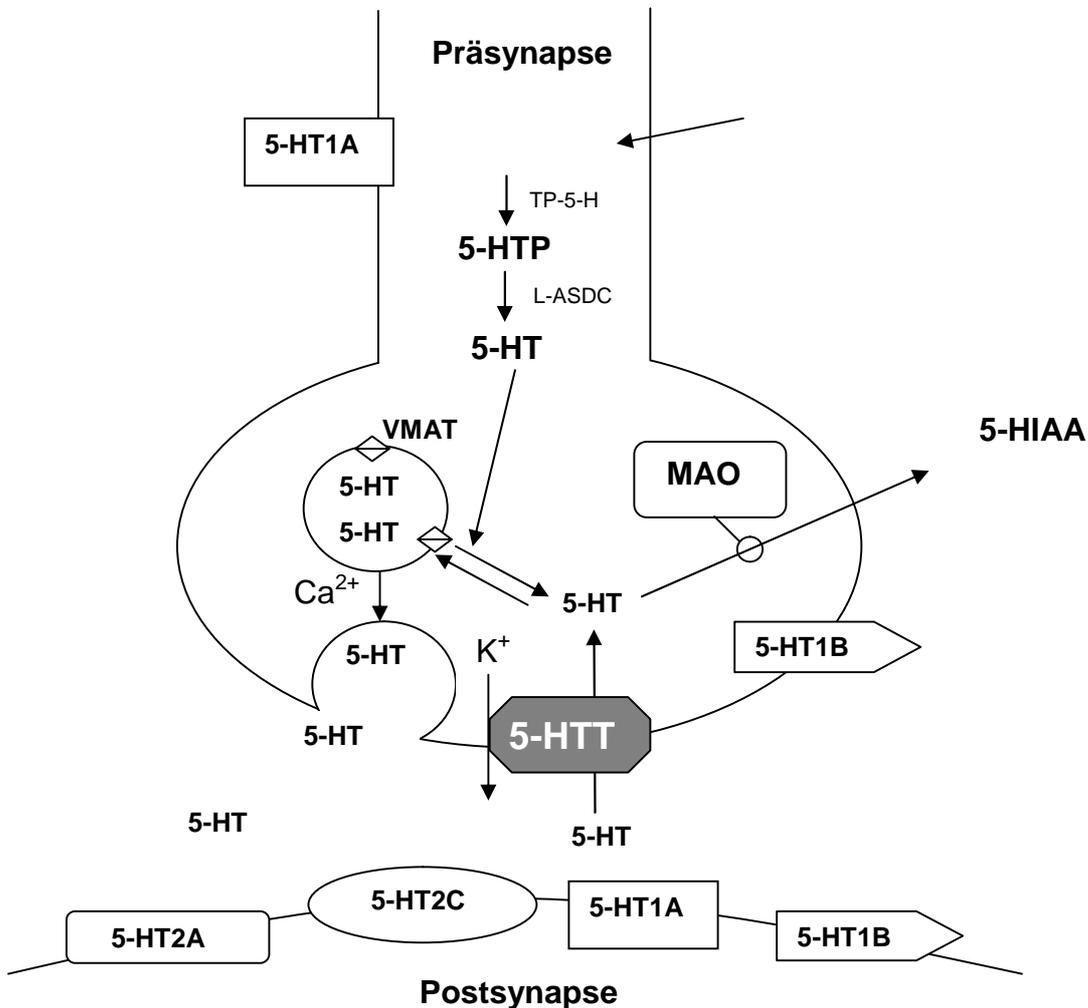


Abb. 4: Schema einer serotonergen Synapse.

Das mit Hilfe des vesikulären Monoamintransporters (VMAT) in Vesikel transportierte und dort gespeicherte Serotonin (5-Hydroxytryptamin; 5-HT) wird bei einem ankommenden Aktionspotential durch die Fusion der Vesikel mit der präsynaptischen Membran in den synaptischen Spalt freigesetzt und bindet an verschiedene prä- und postsynaptische 5-HT-Rezeptoren. Durch den Serotonin-Transporter (5-HTT) wird 5-HT wieder in die präsynaptische Zelle aufgenommen und dort erneut in Vesikel gespeichert oder durch die Monoaminoxidase B (MAO) abgebaut. 5-HIAA, 5-Hydroxyindolessigsäure; 5-HT1A etc., 5-HT-Rezeptortypen; 5-HTP, 5-Hydroxytryptophan; L-ASDC, L-Aminosäure-Decarboxylase; TP-5-H, Tryptophan-5-Hydroxylase

1.1.1.3 Der Serotonin-Transporter

Die Entschlüsselung des *5-HTT*-Gens gelang zuerst bei der Ratte (Blakely et al. 1991; Hoffman et al. 1991). Es folgten das menschliche *5-HTT*-Gen (Ramamoorthy et al. 1993; Lesch et al. 1994) und das der Maus (Gregor et al. 1993; Chang et al. 1996; Bengel et al. 1997). Man kennt bis heute nur einen Transporter, der 5-HT mit hoher Affinität transportiert. Die Proteinstruktur des menschlichen 5-HTT ist in Thrombozyten und Neuronen identisch und wird vom selben Gen kodiert (Lesch et al. 1993c). Dadurch können Thrombozyten als peripher zugängliches Modell zur Untersuchung serotonerger Elemente experimentell genutzt werden. Im Gegensatz zum singulären 5-HTT sind bisher 15 verschiedene 5-HT-Rezeptoren im menschlichen Gehirn nachgewiesen worden (Murphy et al. 1998).

Das Gen des menschlichen *5-HTT* (*h5-HTT*; *hSERT*; *SLC6A4*) mit circa 35 kB und 14 Exons liegt auf Chromosom 17q11.1-17q12 und kodiert für 630 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 70,32 kDa (Lesch et al. 1994). Die Homologie des *5-HTT* bei Mensch und Ratte beträgt 92 %, bei Mensch und Maus 94 % (Lesch et al. 1993c; Ramamoorthy et al. 1993). Der Transporter ist Na^+/Cl^- -abhängig, und die Beförderung des 5-HT erfolgt im Antiport mit Kalium im Verhältnis $1(5\text{-HT}^+):1(\text{Na}^+):1(\text{Cl}^-):1(\text{K}^+)$ mit hoher Affinität für 5-HT (Bruns et al. 1993; Rudnick et al. 1993; Owens et al. 1994).

Der 5-HTT konnte bisher in der Zellmembran von Thrombozyten, Lymphozyten und Neuronen sowie pulmonalem und placentarem Gewebe nachgewiesen werden (Ramamoorthy et al. 1993; Barker et al. 1995). Die höchste Dichte im ZNS findet sich im Mittelhirn-Raphe-Komplex mit seinen Projektionen zum Kortex, zu limbischen Strukturen (CA3-Region des Hippocampus, entorhinaler Kortex, Septum und Thalamus), zur Substantia nigra, zum Nucleus caudatus, Putamen und im medialen Vorderhirnbündel (Cortes et al. 1988; Chen et al. 1992; Hensler et al. 1994; McLaughlin et al. 1996).

1.1.2 Serotonerges System und psychische Erkrankungen

Bereits 1965 vermutete Schildkraut, dass ein Mangel an Monoaminen an der Ätiopathogenese von affektiven Erkrankungen beteiligt ist, worauf er die Katecholaminmangelhypothese der endogenen Depression formulierte (Schildkraut 1965). Es folgten Coppen 1967 mit der Serotonin- und Janowsky 1972 mit der Acetylcholinhypothese der Depression als deren ätiologisches Erklärungsmodell (Coppen 1967; Janowsky et al. 1972; Meltzer et al. 1987).

Dem serotonergen System wird mittlerweile eine entscheidende Rolle bei der Ätiologie und Pathogenese von Depression, Manie, Zwangs- und Angsterkrankungen und bei Störungen des Essverhaltens zugeschrieben (Lesch et al. 1990; Lesch 1991; Ramamoorthy et al. 1993; Owens et al. 1994; Murphy et al. 1996). Für die Beteiligung des serotonergen Systems sprechen neben den bei depressiven Patienten nachgewiesenen zahlreichen Veränderungen u.a. auch die Wirksamkeit verschiedener Psychopharmaka.

So konnte bei Patienten, die an einer Depression litten oder suizidal waren und keine Medikamente nahmen, erniedrigte Werte des 5-HT-Hauptabbauproduktes 5-Hydroxyindolessigsäure im Liquor festgestellt werden (Asberg et al. 1976; Traskman et al. 1981; Roy et al. 1989; Owens et al. 1994). Auch in Gehirnen von depressiven Patienten und Suizidopfern zeigten sich post mortem signifikant reduzierte Werte von 5-Hydroxyindolessigsäure und 5-HT (Shaw et al. 1967; Pare et al. 1969; Owens et al. 1994). Die Anzahl von 5-HT₂-Rezeptorbindungsstellen war in Thrombozyten und vor allem im Frontalkortex von depressiven Patienten und Suizidopfern erhöht (Mann et al. 1986; Arora et al. 1989b; Mann et al. 1989; Biegon et al. 1990a; Biegon et al. 1990b; Pandey et al. 1990), die Anzahl der 5-HT₁, welche durch Imipramin und Paroxetin (Arora et al. 1989a) markiert wurden, waren hingegen erniedrigt (Briley et al. 1980a; Briley et al. 1980b; Langer et al. 1981; Paul et al. 1981; Perry et al. 1983; Mellerup et al. 1988; Backstrom et al. 1989; Nemeroff 1992; Ellis et al. 1994). Depressive Patienten zeigten eine erniedrigte Plasmakonzentration der

Aminosäure Tryptophan, dem Vorläufer des Serotonins (Lesch et al. 1990; Quintana 1992; Owens et al. 1994) und eine verminderte Aufnahme von 5-HT in Thrombozyten (Tuomisto et al. 1976; Meltzer et al. 1981).

Durch die breite Anwendung von Psychopharmaka, die durch Beeinflussung des serotonergen Systems zu Antriebssteigerung, psychomotorischer Aktivierung, Angstlösung und Stimmungsaufhellung führen, konnten Einblicke in die Funktionen von Transmitter, Rezeptoren und Transporter gewonnen werden (Owens et al. 1994). So ist die antidepressive Wirkung von trizyklischen Antidepressiva (Paul et al. 1981) und den neueren selektiven Serotoninwiederaufnahmehemmern (SSRI) (Levine et al. 1987) auf eine reversible Blockierung des 5-HTT zurückzuführen (Langer et al. 1988). Monoaminoxidasenhemmer wie Moclobemid, Tranylcypromin und Selegilin wirken hauptsächlich antriebssteigernd. Sie erhöhen unter anderem indirekt durch die Blockade des 5-HT-Abbaus in der Präsynapse die Konzentration von 5-HT im synaptischen Spalt (Snyder 1990; Pichot 1991). Partielle 5-HT_{1A}-Agonisten aus der Gruppe der Azapirone (z. B. Buspiron oder Gepiron) wirken in hohen Dosen anxiolytisch (vermutlich durch Bindung an 5-HT_{1A}-Autorezeptoren) und antidepressiv (vermutlich durch Bindung an 5-HT_{1A}-Heterorezeptoren). Elektrokonvulsionstherapie (EKT), die bei schweren Fällen endogener Depression eingesetzt werden kann, führt unter anderem zu erhöhten Serotoninausschüttung (Juckel et al. 1999) sowie einer Zunahme von Serotoninrezeptoren auf Thrombozyten im Verlauf der EKT Behandlung (Stain-Malmgren et al. 1998). Das blutdrucksenkende Medikament Reserpin entleert Noradrenalin- und Serotoninspeicher und hat die unerwünschte Wirkung einer Depression (Brodie et al. 1956). Und nicht zuletzt besitzt die dem 5-HT chemisch nah verwandte Designerdroge (+)Lysergsäure-Diethylamid (LSD) eine ausgeprägte halluzinogene Wirkung (Snyder 1990; Pichot 1991). Trizyklische Antidepressiva wie Imipramin oder Amitriptylin wirken dämpfend, angstlösend oder antriebssteigernd. Sie hemmen die Wiederaufnahme von 5-HT aus dem synaptischen Spalt in die Präsynapse durch reversible Blockade des 5-HTT, wodurch die Konzentration von 5-HT im synaptischen Spalt steigt.

Gleichzeitig wird jedoch auch der Transporter für Noradrenalin durch diese Antidepressiva gehemmt. Die neueren, selektiven Serotoninwiederaufnahmehemmer (SSRI) wie Paroxetin, Fluoxetin oder Citalopram hemmen selektiv die Wiederaufnahme von 5-HT, indem sie die 5-HT-Bindungsstelle am Transporter besetzen. Im Gegensatz zu den trizyklischen Antidepressiva zeigen sie keine unerwünschten anticholinergen Wirkungen (Blakely et al. 1991; Hoffman 1994; Owens et al. 1994). Das Amphetamin MDMA (3,4-Methylenedioxyamphetamin, die sogenannte Designerdroge Ecstasy) bindet ebenfalls am 5-HTT. MDMA führt zu einer erhöhten 5-HT-Ausschüttung und auch Wiederaufnahmehemmung der endogenen Transmitter 5-HT, Dopamin, und Noradrenalin, wirkt jedoch durch Lebermetabolite und folgende Bildung von Sauerstoffradikalen insbesondere auf serotonerge Neurone neurotoxisch (Tucker et al. 1994; Shankaran et al. 1999; Burgess et al. 2000). Auch Kokain und weitere Amphetaminderivate bewirken eine Blockade des 5-HTT, wobei nur bei Doppel-KO-Mäusen für 5-HTT und den Dopamintransporter eine Aufhebung der Wirkung von Amphetaminderivaten festgestellt werden konnte (Fukushima et al. 2007), da Amphetaminderivate auch am Dopamintransporter binden (Ricaurte et al. 1985; Ritz et al. 1989; Hoffman 1994)

Neben seiner wichtigen Rolle in der antidepressiven Therapie gibt es weitere Hinweise für die Beteiligung des 5-HTT an der Pathogenese der Depression. So zeigten Thrombozyten depressiver Patienten eine verminderte 5-HT Aufnahme (Tuomisto et al. 1976) sowie eine geringere Anzahl von Bindungsstellen für Antidepressiva am Serotonin-Transporter (markiert durch [3H]-Imipramin) (Briley et al. 1980a). Dies lässt auf eine Dysfunktion oder verminderte Expression des 5-HTT schließen. Es wurde auch gezeigt, dass die Zahl von 5-HTT im Hirnstamm Depressiver reduziert ist (Malison et al. 1998). Außerdem wurde eine veränderte Expression von 5-HTT-mRNS in den Raphekernen von Ratten festgestellt, die mit SSRI behandelt wurden. Dabei zeigten sich jedoch widersprüchliche Ergebnisse einer Abnahme (Lesch et al. 1993a) und einer Zunahme (Lopez et al. 1994) von 5-HTT-mRNS.

Wichtig bleibt die Frage, auf welcher Ebene die Funktion des 5-HTT bei Menschen mit emotionaler Dysregulation verändert ist. Auf der Ebene der Erbinformation kann heute davon ausgegangen werden, dass eine Veränderung der Aminosäuresequenz des *5-HTT*-Gens für die Entstehung mono- oder bipolarer Depressionen und Zwangsstörungen keine Rolle spielt (Lesch et al. 1995b; Altemus et al. 1996; Di Bella et al. 1996), da die Aminosäurenabfolge der ersten und siebten transmembranären Domäne, die für den Substrattransport als entscheidend erachtet werden, bei depressiven Patienten gegenüber Gesunden unverändert ist (Lesch et al. 1995b). Denkbar sind hingegen Modifikationen der Promoterregion, der mRNA-Bildung oder der Phosphorylierung oder Glykosylierung des 5-HTT. So sind Glykosylierungsstellen und Phosphorylierungsstellen innerhalb des Proteinmoleküls nachgewiesen, die für post-translationale Modifizierungen und dadurch für die Regulierung der Transporteraktivität verantwortlich sind (Lesch et al. 1993b; Lesch et al. 1993c). Des Weiteren konnte in der Promotorregion des 5-HTT-Gens ein TATA-Box-ähnliches Motiv identifiziert werden, das durch Kombination positiver und negativer cis-Elemente moduliert wird und am 5'-Ende Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (AP1, AP2, SP1) sowie ein cAMP response element (CRE) aufweist (Heils et al 1995). Zusätzlich befindet sich beim Menschen innerhalb der 1,4 kB umfassenden Promotorregion eine sich wiederholende Sequenz. Durch Unterschiede in der Anzahl dieses repetitiven Elements entstehen beim Menschen Längenvariationen in der Promotorregion (*5-HTTLPR*, 5-HTT gene-linked polymorphic region). Der Effekt der *5-HTTLPR*-Längenvariation auf die 5-HTT Funktion wurde an menschlichen Lymphoblasten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die kurze Form mit einer geringeren 5-HTT-Expression und Funktion einhergeht (Lesch 2001b; Lesch 2001a), und dass Menschen mit dem kurzen Allel eine höhere Prävalenz für die Ausbildung von Persönlichkeitszügen besitzen, die Depressionen und Angststörungen fördern (Lesch et al. 1996; Lesch et al. 1998).

1.1.3 Das Modell der Serotonin-Transporter-Knockout-Maus

Die herausragende Funktion des 5-HTT bei der Feinabstimmung der serotonergen Neurotransmission führte zu der Idee, durch gezielte Inaktivierung des *5-HTT*-Gens (einem sogenannten knockout) Mausmutanten zu schaffen. Anhand dieses Tiermodells sollte der Einfluss des 5-HTT auf Verhalten, neuronale Entwicklung und Plastizität genauer untersucht werden. Das *5-HTT*-Gen des Menschen und der Maus stimmen in 94 % ihrer Gensequenz überein, so dass Rückschlüsse auf die Funktion des 5-HTT des Menschen möglich sind.

Die Inaktivierung des murinen *5-HTT*-Gens erfolgte durch homologe Rekombination im 2. Exon (Bengel et al. 1998). Die daraus resultierende *5-HTT*-KO-Mäusezuchtlinie umfasst heterozygote (HET, +/-) und homozygote knockout (KO, -/-) *5-HTT*-KO-Mäuse als auch Kontrolltiere, die sog. Wildtypen (WT, +/+). Der Erfolg der Inaktivierung wurde bei den *5-HTT*-KO Mäusen durch fehlende [³H]5-HT Aufnahme mit hoher Affinität, einer gendosisabhängigen Reduktion [¹²⁵I]RTI-55 markierter 5-HTT-Bindungsstellen und einer deutlichen Reduktion der 5-HT-Konzentration im Gewebe um 60–80 % bestätigt. Die homozygoten *5-HTT*-defizienten Mäuse sind auf den ersten Blick phänotypisch unauffällig, fertil und bringen normalgewichtige Nachkommen zur Welt, ohne dass eine erhöhte postnatale Sterblichkeit nachgewiesen werden konnte. Amphetamin und MDMA führten bei den *5-HTT*-KO-Tieren im Gegensatz zu den Kontrollmäusen nicht zu lokomotorischer Hyperaktivität (Bengel et al. 1998; Mathews et al. 2002).

Außerdem wurden mit Hilfe der Mikrodialyse im Extrazellularraum von *5-HTT*-KO-Mäusen erhöhte 5-HT-Konzentrationen festgestellt, z.B. 14fach im Striatum und 6fach in der Substantia nigra (Fabre et al. 2000; Mathews et al. 2000). Es gibt auch Hinweise auf eine reduzierte Anzahl serotonerger Neurone in den dorsalen Raphekernen von *5-HTT*-KO Mäusen (Lira et al. 2003). Das Fehlen des 5-HTT wirkt sich auch auf die Expression verschiedener 5-HT-Rezeptoren, wie z.B. 5-HT1A-, 5-HT1B- und 5-HT3, aus (Fabre et al. 2000; Mossner et al.

2004). Die Hochregulation des polyspezifischen organischen Kationen-Transporters 3 (organic cationic transporter 3, OCT3) in *5-HTT*-KO-Mäusen könnte zur Kompensation der erhöhten extrazellulären 5-HT-Konzentration beitragen (Schmitt et al. 2003). Der OCT3 nimmt ein weites Spektrum an organischen Kationen, unter anderem auch 5-HT, mit niedriger Affinität auf.

Darüber hinaus zeigten *5-HTT*-KO-Mäuse einen ängstlichen und weniger aggressiven Phänotyp als Wildtyp-Tiere (Holmes et al. 2002a; Holmes et al. 2002b; Holmes et al. 2002c; Holmes et al. 2003), was die These der entscheidenden Rolle des serotonergen Systems bei affektiven Erkrankungen stützt. Das im „elevated zero maze“ und in der „light/dark box“ gezeigte ängstlichere Verhalten der *5-HTT*-KO-Tiere wurde durch die Gabe des anxiolytisch wirksamen Benzodiazepins (Diazepam) deutlich abgeschwächt (Wichems et al. 2000). Eine Reduktion des aggressiven Verhaltens zeigte sich im „resident intruder test“, die Käfigaktivität war hierbei vermindert. Die Gabe eines selektiven Serotoninwiederaufnahmehemmers (Fluoxetin) zeigte keine antidepressive Wirkung.

1.1.4 Adulte Neurogenese

Im menschlichen Körper sind fast alle Gewebe in der Lage, durch Teilung sog. Stammzellen Schäden in gewissen Grenzen selbst zu reparieren (z.B. Schnittwunde, Knochenbruch, Blut, Nieren, Darmschleimhaut). Durch asymmetrische Teilung entstandene Tochterzellen können zu verschiedenen Zelltypen differenzieren. Bekanntestes Beispiel sind die Stammzellen des blutbildenden Systems, aus welchen Thrombozyten, Erythrozyten und die unterschiedlichen Gruppen der Leukozyten entstehen. Solche Zellen bezeichnet man als multipotente Stammzellen, da sie die Zellarten eines Gewebes hervorbringen können, im Gegensatz zu den pluripotenten Stammzellen des Embryos, die alle Gewebe des Individuums generieren können und der totipotenten befruchteten Zygote, die sowohl Embryo als auch Plazenta bilden kann. Multipotente Stammzellen haben das Potential

unbegrenzter Selbsterneuerung für die gesamte Lebenszeit des Individuums (Brook et al. 1997).

Beim Gehirn war man hingegen lange Zeit der Ansicht, dass Schäden des Hirngewebes nur durch Neuvernetzung der noch funktionsfähigen und ausdifferenzierten Nervenzellen kompensiert werden könne und andere Reparaturmechanismen durch Zellersatz oder Erneuerung abgetrennter Axone nicht möglich seien. Die Existenz adulter Stammzellen im ZNS wurde lange Zeit nicht für möglich gehalten. Die Vorstellung, die Zahl unserer Nervenzellen unterliege von der Geburt an einem ständigen Niedergang, geht z.T. auf den spanischen Hirnforscher und Nobelpreisträger Santiago Ramón y Cajal zurück, der 1928 folgende Ansicht über das ZNS vertrat: „*In adult centers the nerve paths are something fixed, ended, immutable. Everything may die, nothing may be regenerated. It is for the science of the future to change, if possible, this harsh decree.*“ („Im erwachsenen Gehirn sind die Nervenbahnen etwas starres, beendetes, unveränderliches. Alles kann sterben, nichts regenerieren. Es liegt in der Wissenschaft der Zukunft, wenn möglich, dieses strenge Dogma zu widerlegen.“) (Ramón y Cajal 1928). In der Tat sprach lange Zeit vieles dafür, dass die Nervenzellen eines Menschen nahezu alle in der Embryogenese bis kurz nach der Geburt gebildet werden.

Während der Wirbeltierevolution wurde mit zunehmender Komplexität des Gehirns auch zunehmend die Fähigkeit eingebüßt, auch im adulten Stadium noch neue Nervenzellen bilden zu können. Bei Eidechsen ist z.B. nach einer Hirnverletzung noch massive Regeneration möglich, bei Säugern kommt es hingegen kaum zu Reaktionen. Daher kam man zu der Überzeugung, dass beim hoch entwickelten und komplexen Säugergehirn neu hinzukommende Neuronen den geregelten Signalfluss nur stören würden. Doch schon 1965 fand man Hinweise auf adulte Neurogenese (aN) bei Ratten (Altman et al. 1965). Es folgte 1983 der Nachweis von aN im Striatum erwachsener Kanarienvögel, insbesondere während des Erlernens eines neuen Gesangrepertoires (Goldman et al. 1983), und im Hippocampus nordamerikanischer Meisen

(Barnea et al. 1994). In den nächsten Jahren konnten adulte Stammzellen auch bei phylogenetisch höher stehenden Tierarten, wie Spitzhörnchen (Tupajas) (Gould et al. 1997), Weißbüscheläffchen (Gould et al. 1998) und Menschenaffen (Gould et al. 1999b) nachgewiesen werden. Der Nachweis von Neurogenese beim Menschen gelang 1998 (Eriksson et al. 1998). Eriksson und Mitarbeiter konnten belegen, dass sich auch im Hippocampus des erwachsenen Menschen regelmäßig Zellen teilen. Sie bedienten sich einer eleganten und bereits bekannten Nachweismethode zum Nachweis mitotisch aktiver Zellen. Während der Zellteilung wird die Erbinformation in Form der DNS dupliziert. Dazu wird der DNS-Doppelstrang aufgebrochen und Nukleotide lagern sich an die freien Bindungsstellen beider Einzelstränge an, um zwei neue DNS-Doppelstränge zu bilden. Injiziert man nun dem lebenden Versuchsobjekt das Thymidinanalogon Bromodeoxyuridine (BrdU), so tritt BrdU in Konkurrenz mit Thymidin und paart sich mit Adenin.

Sich teilende Zellen, die nach der Teilung in der DNS BrdU enthalten, können dann post mortem mit geeigneten immunhistochemischen Reaktionen sichtbar gemacht werden (siehe Abb. 7). Durch Mehrfachmarkierungen mit neuronalen Markern kann die Identität der neu gebildeten Zellen bestimmt werden.

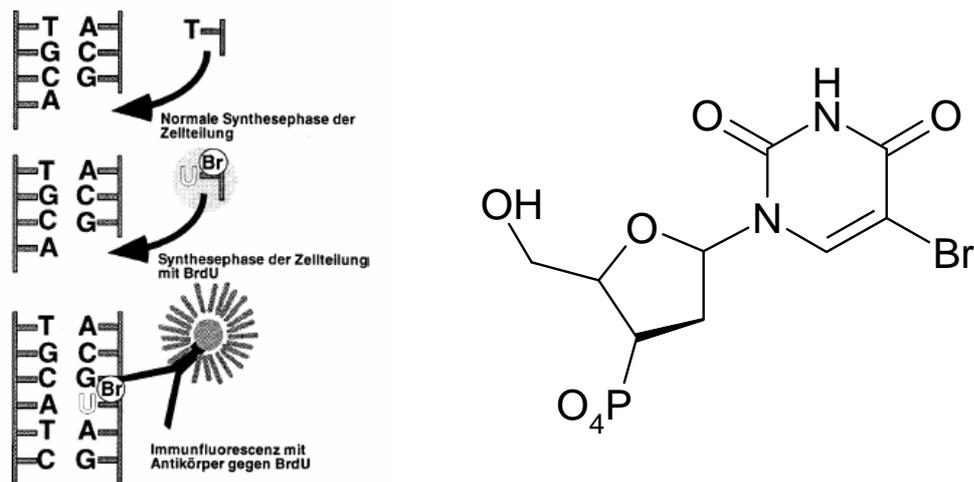


Abb. 7: Schema des Mitosenachweises durch Markierung mit BrdU (links), Strukturformel von BrdU (rechts): Nach Aufbrechen des DNS-Doppelstranges während der Synthesephase der Mitose bindet sich alternativ zu Thymin BrdU an Adenosin. BrdU kann z.B. durch einen Immunfluoreszenz-markierten Antikörper sichtbar gemacht werden. Abb. aus (Kempermann 2001).

Mit der Entdeckung neuraler Stammzellen, welche die Fähigkeit haben, neue Neuronen und Gliazellen zu bilden, wurde das Dogma durchbrochen, es gäbe nach der Geburt des Menschen nur postmitotische neuronale Zellen im ZNS, von denen man lebenslang zehren müsste.

Bisher konnten die mitotischen Aktivitäten neuraler Stammzellen primär in zwei Regionen nachgewiesen werden (Kempermann et al. 1999). Zum einen im Gebiet um die Seitenventrikel, in der sogenannten subventrikulären Zone (SVZ) (Reynolds et al. 1992; Alvarez-Buylla et al. 2002), wo die dort gebildeten Tochterzellen nach ihrer Entstehung entlang des Tractus olfactorius wandern und für Zellersatz im Bulbus olfactorius sorgen (Pagano et al. 2000; Bernier et al. 2002). Zum anderen in einem phylogenetisch alten Hirnabschnitt, dem Gyrus dentatus (GD) des Hippocampus (s. Abb. 8). Hier entstehen die Tochterzellen in der Subgranulärzellschicht und wandern nur eine kurze Strecke in die sogenannte Körnerzellschicht (KZS) ein.

Der Prozess der Neurogenese kann in drei verschiedene Phasen eingeteilt werden und soll hier am Beispiel des Hippocampus dargestellt werden (siehe auch Abbildung 8). Zuerst durchlaufen neurale Vorläuferzellen, die sich im GD an der Grenze zwischen Hilus und KZS in der SGZ befinden, die Mitose. In der zweiten Phase wandert ein Teil der neugebildeten Tochterzellen in die KZS ein, differenziert sich bereits bei der Migration zunehmend in Neurone und integriert sich in der letzten Phase in das neuronale Netzwerk. Nun werden auch neuronale Marker wie NSE oder NeuN exprimiert (Kuhn et al. 1996) und die Axone gehen Verknüpfungen mit Dendriten von Pyramidenzellen der CA3-Region ein (Stanfield et al. 1988; Markakis et al. 1999). Bei neu gebildeten Astrozyten können diese auch über entsprechende Markerproteine wie z.B. GFAP identifiziert werden.

Die meisten der neu entstandenen Zellen im Hippocampus, wie auch in der subventrikulären Zone, sterben. (Kempermann et al. 1997a; Biebl et al. 2000; Kempermann et al. 2002). Ein weiterer Teil differenziert sich in astrozytäre

Zellen oder führt zu Angiogenese, was für den Hippocampus gezeigt werden konnte (Palmer et al. 2000). Es ist bis heute noch nicht endgültig geklärt, ob es sich bei den in der SVZ und im DG nachgewiesenen mitotisch aktiven Zellen um multipotente Stammzellen im Sinne der Definition unbegrenzter Selbsterneuerung handelt, oder um Vorläuferzellen, die nicht die gesamte Lebenszeit des Menschen bestehen (van der Kooy et al. 2000).

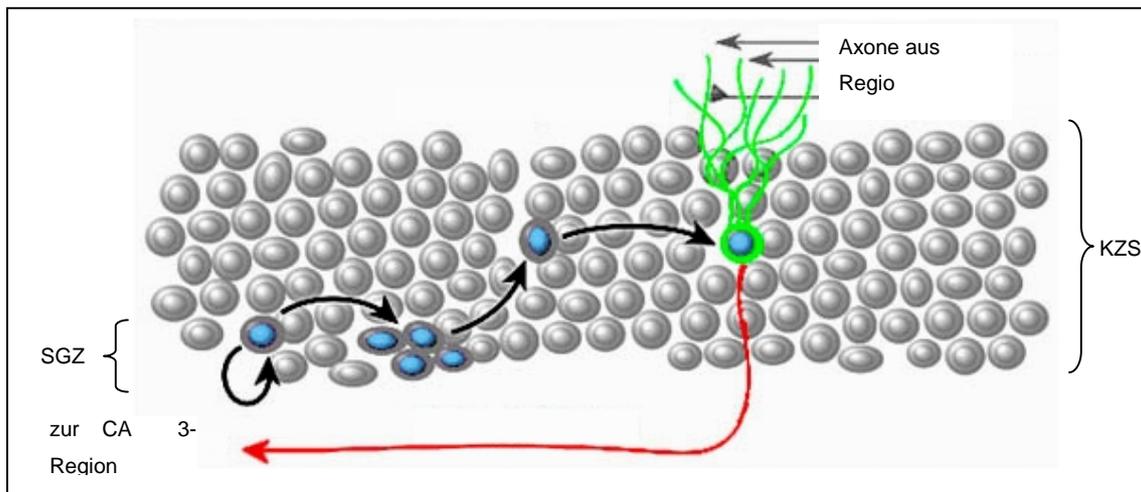


Abb. 8: Schema des Neurogenese-Prozesses am Beispiel des Hippocampus in drei Schritten, adaptiert nach (Lie et al. 2004):

1 – Die Stammzelle bildet durch Mitose Tochterzellen in der SGZ; 2 – Migration und Differenzierung eines Teils der Tochterzellen in die KZS; 3 – Integration der Neurone durch Verknüpfung mit Afferenzen aus der Regio entorhinalis und Aussendung von Axonen in die CA3-Region.

1.1.5 Der Hippocampus

Der Gyrus dentatus (GD) des Hippocampus ist eine der Regionen im menschlichen Gehirn, in der die Proliferation adulter Stammzellen nachgewiesen werden konnte.

Die Hippocampusformation ist die zentrale Struktur des limbischen Systems und liegt im menschlichen Gehirn im medialen Temporallappen am Boden des Cornu inferior der Seitenventrikel (siehe Abb. 9).

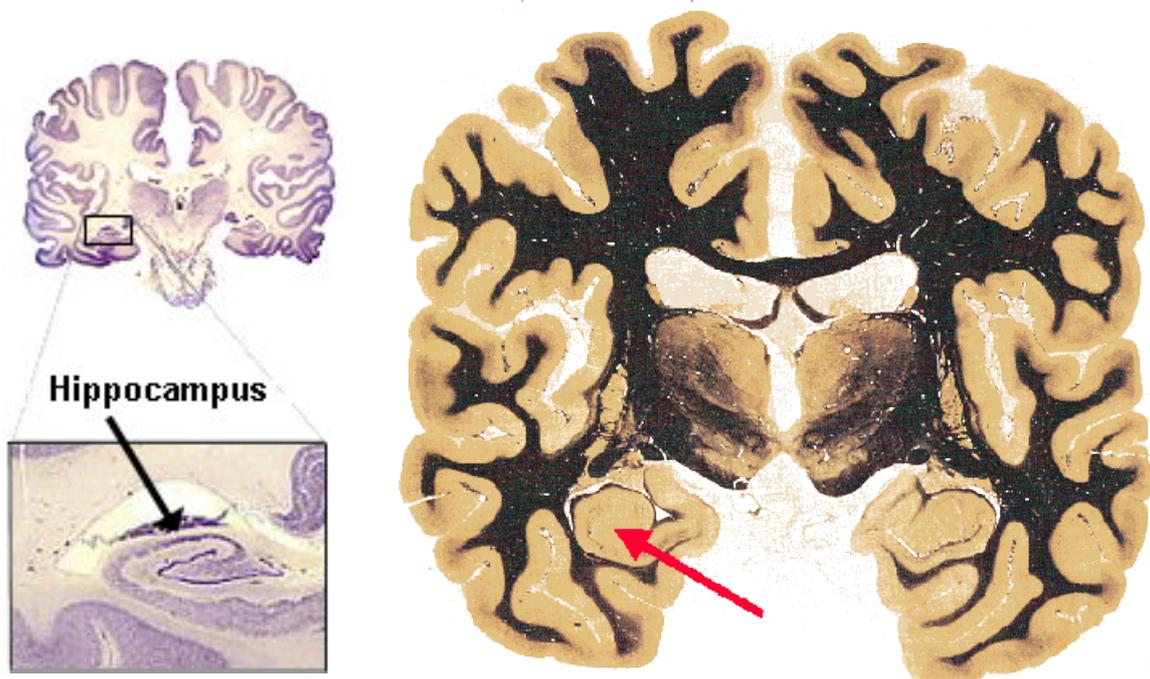


Abb. 9: Lage des Hippocampus im menschlichen Gehirn

Histologisches Präparat nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung (links), anatomisches Präparat im Koronarschnitt (rechts)

Wie in Abbildung 10 ersichtlich, unterteilt er sich in das Cornu ammonis (CA), mit den Sektoren CA1-4, den GD und das Subiculum, welches mit dem Präsubiculum und dem Parasubiculum in den angrenzenden parahippocampalen Gyrus und die Regio entorhinalis übergeht. CA und GD ähneln zwei U-förmigen ineinandergreifenden Schalen, die durch den Sulcus hippocampalis (SH) voneinander getrennt sind. Der GD umhüllt dabei das CA4 Segment. Die drei Schichten des Allokortex, das Stratum moleculare, Stratum

granulosum (Körnerzellschicht) und Stratum multiforme sind im GD besonders gut erkennbar. Im Stratum granulare liegen die kleinen, runden Körnerzellen dicht gepackt nebeneinander (Duvernoy 1988; Nieuwenhuys et al. 1988).

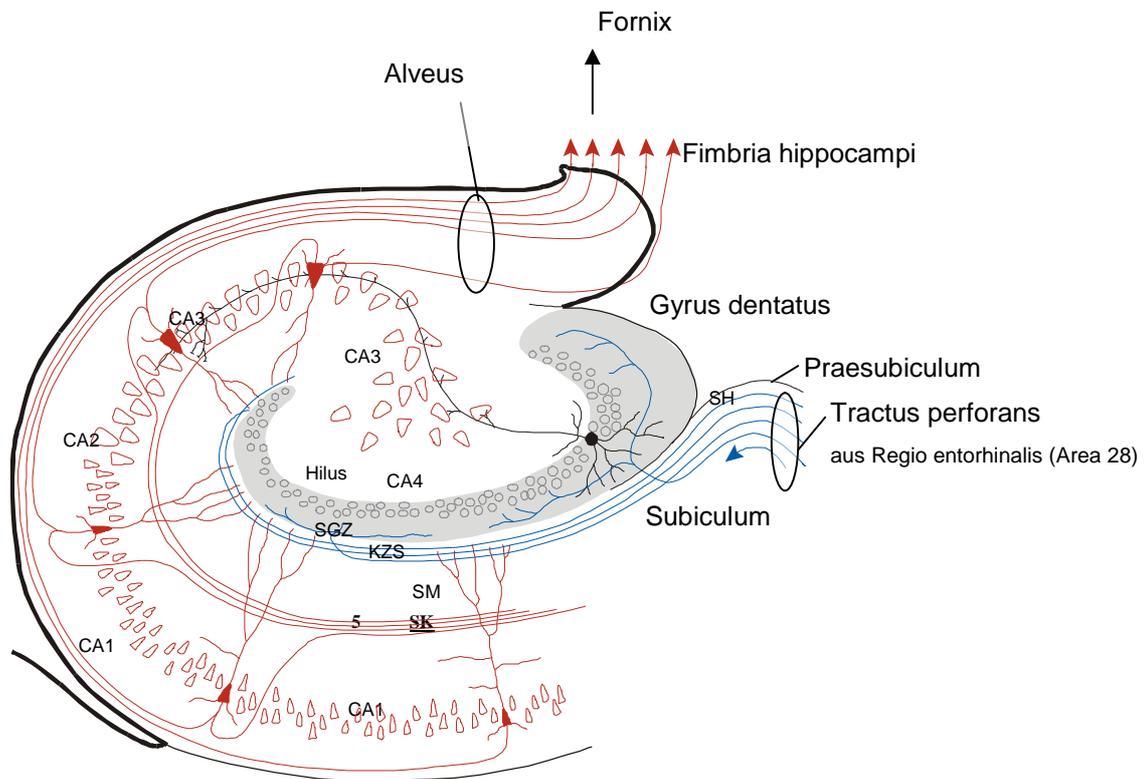


Abb. 10: Schematische Darstellung des Hippocampus, adaptiert nach (Duman et al. 1999).

Die Hauptafferenzen erreichen den Hippocampus aus der Regio entorhinalis über den Tractus perforans, wo olfaktorische, sensosomatische, visuelle, auditorische und motorische Projektionen aus den kortikalen Assoziationsgebieten konvergieren. Der Hauptanteil des Tractus perforans durchbohrt das Subiculum und endet an Dendriten von Körnerzellen im Stratum moleculare des GD, nur ein kleiner Teil endet direkt in den CA-Feldern. Die Axone der Körnerzellen, die sogenannten Moosfasern, durchziehen das Stratum multiforme und enden an den apikalen Dendriten der Pyramidenzellen der CA3- und CA4-Sektoren. Deren Axone wiederum ziehen im Alveus zur Fimbria hippocampi, der Hauptafferenz der Hippocampusformation, nachdem Schaffer-Kollaterale abgezweigt sind, welche die Verbindung mit den CA1-Pyramidenzellen herstellen. CA1-4, Cornu ammonis Sektoren 1-4; KZS, Körnerzellschicht; MF, Moosfasern; SK, Schaffer-Kollaterale; SGZ, Subgranulärzone; SM, Stratum moleculare; SH, Sulcus hippocampalis

Der Hippocampus ist an seiner ventralen Seite vom Alveus bedeckt, der aus Afferenzen und Efferenzen besteht. Der Alveus setzt sich in die Fimbria hippocampi fort, die in den Fornix übergeht und den Hippocampus mit zahlreichen kortikalen und subkortikalen Gebieten verbindet. Die wichtigsten Afferenzen erreichen den Hippocampus aus der Regio entorhinalis (Area 28 nach Brodmann), einem wichtigen multimodalen Assoziations- und Integrationszentrum (Braak 1972). Hier konvergieren olfaktorische, somatosensuelle, visuelle, auditorische und motorische Projektionen aus den kortikalen Assoziationsgebieten und finden über den Tractus perforans Eingang ins limbische System. Diese Region bildet auch den Übergang zwischen dem 6-schichtigen Neokortex und dem 3-schichtigen Allokokortex und ermöglicht die für Gedächtnisfunktionen essentielle Zusammenarbeit zwischen Isokortex und limbischem System. Der Hauptanteil des Tractus perforans durchbohrt das Subiculum und endet an Dendriten von Körnerzellen im Stratum moleculare des GD, nur ein kleiner Teil endet direkt in den CA-Feldern. Die Axone der Körnerzellen, die sogenannten Moosfasern, durchziehen das Stratum multiforme und enden an den apikalen Dendriten der Pyramidenzellen der CA3- und CA4-Sektoren. Deren Axone wiederum ziehen im Alveus zur Fimbria hippocampi, nachdem Schaffer-Kollaterale (SK) abgezweigt sind, welche die Verbindung mit den CA1-Pyramidenzellen herstellen. Die CA1-Pyramidenzellen sind für die Gedächtnisfunktion besonders wichtig. Sie zeigen bei tetanischer Reizung das Phänomen der Langzeitpotenzierung: wiederholte Reizung verstärkt bei erneuter Stimulation die Reizantwort über Wochen. Es zeigt sich ein „Lernprozess“ der Synapsen in ihren Übertragungseigenschaften. Die Axone von CA1-Pyramidenzellen projizieren zum Subiculum, dessen efferente Fasern sich dann in der Fimbria bzw. im Fornix, der Hauptefferenz der Hippocampusformation sammeln.

Die Erregungen gelangen über den Fornix zum Corpus mamillare. Von diesem Kerngebiet zieht der Tractus mamillothalamicus (Vicus d'Azyrsches Bündel) zum Nucleus anterior des Thalamus. Nach der Umschaltung verläuft die Erregung über die Radiatio thalamocingularis zum Gyrus cinguli und von dort zurück zum

Hippocampus. Über diesen sogenannten Papez-Kreis ist der Hippocampus mit den anderen Teilen des limbischen Systems, dem Thalamus und Kortex verbunden. Die serotonerge Innervation des Hippocampus gelangt vom medialen Raphekern des Hirnstamms zum Hilus des GD sowie zu den CA1-4 Regionen, die mit 5-HT_{1A} Rezeptoren angereichert sind (Verge et al. 1986; Joels et al. 1991; Azmitia et al. 1996; Kia et al. 1996) .

Der Hippocampus ist entscheidend an der Gedächtnisbildung und Lernfunktionen beteiligt. Die doppelseitige Entfernung des Hippocampus (zur Epilepsiebehandlung) führt beim Menschen zu einem Verlust der Merkfähigkeit. Während die alten Erinnerungen (Langzeitgedächtnis) erhalten bleiben, kann Neues (Kurzzeitgedächtnis) nur für Sekunden behalten werden. Er ist aber auch ein Integrationsorgan, das über seine Verbindungen mit dem Hypothalamus, den Septumkernen und dem Gyrus cinguli das endokrine, viscerale und emotionale Geschehen beeinflusst.

1.1.6 Regulation der adulten Neurogenese

Seit der Entdeckung der Neurogenese im Gehirn von adulten Tieren und Menschen wurden viele Anstrengungen unternommen, festzustellen, durch was sie beeinflusst wird. Mittlerweile wurde in zahlreichen Untersuchungen eine Reihe von Faktoren gefunden, die die aN hemmen oder fördern.

Zunächst beeinflusst ein unterschiedlicher genetischer Hintergrund, d.h. interindividuelle Unterschiede, die aN, wie an verschiedenen Mäusestämmen gezeigt werden konnte (Kempermann et al. 1997a; Lemaire et al. 1999). Zu den negativen Faktoren gehört ein höheres Alter, in dem die Proliferationsrate adulter Stammzellen sinkt (Kuhn et al. 1996). Genauso verringert Stress wahrscheinlich über erhöhte Adrenalin- und Cortisolspiegel und eine verstärkte Glutamatfreisetzung (Gould et al. 1992; Jacobs et al. 2000) und damit verbundene NMDA-Rezeptoraktivierung (Gould et al. 1997) ebenfalls die Zahl

neugebildeter Zellen (Gould et al. 1998; Lemaire et al. 1999; Czeh et al. 2002). Im Gegensatz hierzu konnte gezeigt werden, dass eine reizreiche Umgebung und rege körperliche Aktivität die aN bei Nagern steigern können (Kempermann et al. 1997b; Kempermann et al. 1998; Gould et al. 1999a; Nilsson et al. 1999; Jacobs et al. 2000). In diesen Untersuchungen kamen die Versuchstiere in Kontakt mit Artgenossen, konnten ihre Umwelt erforschen, sich in Laufrädern bewegen und sich mit verschiedenem Spielzeug beschäftigen. Es konnte gezeigt werden, dass in dieser Umgebung die Überlebensrate der neu gebildeten Zellen im Hippocampus der Mäuse um 60% erhöht ist, und die Tiere zudem besser in Lerntests abschnitten (Kempermann et al. 1997b).

Zudem konnte für verschiedene Zytokine eine Wirkung auf die aN nachgewiesen werden. Mehrere Wachstumsfaktoren zeigten einen positiven Einfluss auf die aN: Shh (*Sonic hedgehog*), ein wichtiges Regulationsprotein der embryonalen Gehirnentwicklung, erhöhte die Proliferation neuraler Stammzellen nach vektor-vermitteltem Einbringen von Shh-cDNS in den GD (Lai et al. 2003). Genauso führten EGF (*epidermal growth factor*) und bFGF (*basic fibroblast growth factor*) (Gensburger et al. 1987; Ray et al. 1993; Kuhn et al. 1997; Cheng et al. 2002), VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Jin et al. 2002) sowie TGF α (*transforming growth factor alpha*) (Reynolds et al. 1992) und IGF-1 (*Insulin-like growth factor-I*) (Arsenijevic et al. 1998; Aberg et al. 2000) zu einer gesteigerten aN. Untersuchungen zur Wirkung von BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) zeigten eine Anregung der Zellteilung ohne das Überleben neugebildeter Neurone zu beeinflussen (Ahmed et al. 1995). Weitere Beobachtungen konnten nachweisen, dass SSRI zur Hochregulation von BDNF-mRNS führt (Nibuya et al. 1995).

Des Weiteren konnte im Laufe der letzten Jahre auch ein Zusammenhang zwischen verschiedenen Hormonen und aN festgestellt werden. Eine Adrenalectomie, die zu einem Erliegen der Kortikosteroidausschüttung führt, konnte genauso wie eine NMDA-Rezeptorblockade durch den Glutamatantagonist MK801 die aN steigern (Gould et al. 1994; Cameron et al.

1996; Fischer et al. 2002; Nacher et al. 2003). Aldosteron steigerte bei adrenaletomierten Mäusen die Zahl BrdU-positiver Zellen (Fischer et al. 2002). Erhöhte Östrogenwerte während des weiblichen Zyklus von Ratten wirkten positiv auf die Bildung neuer Zellen im GD (Küttler 1996; Tanapat et al. 1999). Prostaglandin E2 (*Sulprostone*) erhöhte die Zahl BrdU-positiver Zellen im GD, wobei nicht-selektive Cyclooxygenasehemmer die aN im GD von Ratten supprimierten, weil offenbar neurotrophe Faktoren wie Prostaglandin E2 vermindert gebildet werden (Uchida et al. 2002).

Außerdem führen Noxen und Läsionen im Hippocampus zu einer gestörten aN. Schädigungen des Hippocampus, welche durch epileptische Anfälle, Ischämien sowie mechanische Verletzungen hervorgerufen wurden, verstärkten nachfolgend die aN, im Sinne der Aktivierung von Reparaturmechanismen (Scharfman et al. 2000; Scott et al. 2000; Ferland et al. 2002; Kokaia et al. 2003). In diesem Zusammenhang stehen auch Untersuchungen über die Auswirkungen von Alkohol und Nikotin. So starben durch 14tägige Ethanolgabe bei Mäusen Neurone in CA1 und CA2 ab, die aN im Gyrus dentatus wurde jedoch angekurbelt (Pawlak et al. 2002). Im Gegensatz dazu zeigten Befunde von Nixon und Mitarbeitern, dass hohe Dosen von Ethanol zu einer verminderten Neurogenese im GD der Ratte führen (Nixon et al. 2002). Nikotin führt zur Abnahme von aN im GD und zu vermehrtem Zelltod (Abrous et al. 2002). Hierzu passt auch eine Untersuchung, die zeigen konnte, dass Tocopherol (*Vitamin E*), ein wichtiges Antioxidans zum Schutz von Membranlipiden und Lipoproteinen vor freien Radikalen, die Körnerzellzahl durch eine Verlängerung der Überlebenszeit erhöht (Cuppini et al. 2002).

Zugleich spielen der Neurotransmitter 5-HT und seine zahlreichen Rezeptoren eine wichtige Rolle in der frühen Hirnentwicklung und der aN (Shuey et al. 1993; Whitaker-Azmitia 2001; Gaspar et al. 2003). So konnte z.B. nachgewiesen werden, dass die Zerstörung serotonerger Innervation oder die Blockierung der Serotoninsynthese zu verminderter Neurogenese im Hippocampus führt. Nach Wiederherstellung der serotonergen Innervation

kehrte die Neurogenese auf das Normalmaß zurück (Brezun et al. 2000). Pharmakologische Untersuchungen zeigten, dass die Langzeitbehandlung mit verschiedenen Antidepressiva (AD), wie z.B. Fluoxetin (selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer), Reboxetin (selektiver Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer), Tranylcypromin (MAO-Hemmer), und mit Lithium die aN steigern (Jacobs et al. 1999; Chen et al. 2000; Malberg et al. 2000; Duman et al. 2001). Als Gemeinsamkeit beeinflussen alle AD, neben anderen Wirkmechanismen, das serotonerge System. So wird durch Wiederaufnahmehemmung von 5-HT in die Präsynapse durch trizyklische AD und die modernen selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer die Konzentration von 5-HT im synaptischen Spalt erhöht. Lithium führt zu einer erhöhten Ausschüttung von 5-HT. Reboxetin hemmt neben der Wiederaufnahme von Noradrenalin auch die Wiederaufnahme von 5-HT und MAO-Hemmer verlangsamen den Abbau von Aminen wie 5-HT. Die Gabe des Appetitzüglers Fenfluramin, der eine erhöhte Serotoninausschüttung verursacht, erhöhte ebenfalls die aN im Hippocampus (Jacobs et al. 1998b).

Von anderen Psychopharmaka, die nicht den Antidepressiva zugerechnet werden, konnte bislang eine stimulierende Wirkung auf die aN nicht sicher gezeigt werden. So ist die Studienlage zu dem Neuroleptikum Haloperidol inkonstant (Backhouse et al. 1982; Dawirs et al. 1998; Eisch et al. 2000). Für Morphin wurde gezeigt, dass es die Zahl von Körnerzellen erniedrigt. (Eisch et al. 2000). Diese Untersuchungen weisen daraufhin, dass die Steigerung der Neurogenese pharmakologisch wahrscheinlich auf Antidepressiva beschränkt ist.

Da ein wichtiger Wirkmechanismus der AD die Beeinflussung der serotonergen Transmission ist, fiel der Blick auf den Neurotransmitter 5-HT als potentiellen Kandidaten für die Stimulation der Körnerzellgenese, der ja schon zeigen konnte, dass er in nicht-neuronalen Systemen Zellproliferation anregen kann (Takuwa et al. 1989; Fanburg et al. 1997). Erhöhte Konzentrationen von 5-HT

im Hippocampus steigerten die Proliferationsrate von Körnerzellvorläuferzellen über Aktivierung des 5-HT_{1A}-Rezeptors (Jacobs et al. 1998a), der als somatodendritischer Autorezeptor und als postsynaptischer Rezeptor auftritt. Der 5-HT_{1A}-Rezeptor scheint an der Pathogenese von Angsterkrankungen und Depression beteiligt zu sein (Lesch et al. 1999). So zeigte eine Langzeitgabe von AD (trizyklisches AD Imipramin, selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer Paroxetin, MAO-A Hemmer Befloxon, 5-HT_{1A}-Rezeptorantagonist Gepiron) und Elektrokrampftherapie bei Mäusen eine tonische Aktivitätszunahme postsynaptischer 5-HT_{1A}-Rezeptoren im Hippocampus der Ratte (Haddjeri et al. 1998).

1.1.7 Adulte Neurogenese und psychische Erkrankungen

Ein Zusammenhang zwischen der aN und einer Reihe psychiatrischer und neurologisch bedingter Erkrankungen wurde in den vergangenen Jahren von zahlreichen Arbeitsgruppen postuliert und diskutiert. Besonderes Interesse gilt hierbei der möglichen Beteiligung der aN am Wirkmechanismus verschiedener Antidepressiva. Denn die kurze Zeit nach der Applikation von trizyklischen Antidepressiva und SSRIs beobachtete akute Hemmung der 5-HT-Wiederaufnahme kann die klinische Wirklatenz von i.d.R. 2-3 Wochen nicht erklären. Die Wirkung der Antidepressiva scheint deshalb auf komplexeren Mechanismen als der reinen Hoch- und Herabregulation synaptischer Neurotransmitterspiegel zu beruhen und es wird die Beteiligung verschiedenster neuroadaptiver Prozesse diskutiert (Lesch et al. 1993a; Kuroda et al. 1994; Lopez et al. 1994; Pineyro et al. 1994; Rattray et al. 1994; Lesch et al. 1995a). In diesem Zusammenhang könnte die aN im GD des Hippocampus und die funktionelle Integration der neu gebildeten Neurone in das hippocampale Netzwerk die entscheidende Rolle spielen.

Für eine Beteiligung der aN an der Ätiopathogenese affektiver Erkrankungen als auch an der Wirkung von Psychopharmaka spricht u.a. die zentrale Rolle

des Hippocampus bei der Entstehung und dem klinischen Bild einer depressiven Erkrankung. So konnte z.B. gezeigt werden, dass das Volumen des Hippocampus depressiver Patienten reduziert ist und die Gabe von AD dieser Volumenreduktion entgegenwirkt. Dabei korreliert die Volumenminderung des Hippocampus bei Depressiven mit der Dauer der Erkrankung (Sheline et al. 1996).

Es konnte auch ein Zusammenhang zwischen Mediatoren der sog. Stressachse, die auch einen negativen Einfluß auf die Stammzellproliferation im GD besitzen, und der Volumenminderung des Hippocampus gezeigt werden. So scheinen hippocampale Neurone durch erhöhte Glukokortikoidkonzentrationen geschädigt zu werden. Eine Erhöhung des Glukokortikoidlevels ist bei älteren Menschen mit einem reduzierten Hippocampusvolumen vergesellschaftet, und es treten vermehrt vom Hippocampus abhängige Gedächtnis- und Lernstörungen auf (Lupien et al. 1998). Bei Patienten mit Depression ist ein funktionelles Defizit der Hypothalamus – Hypophysen – Nebennierenrinden - Achse (der sogenannten HPA-Achse) nachgewiesen worden (Young et al. 1991), und die graue Substanz im Hippocampus ist stark vermindert (Bremner et al. 2000). Auf zellulärer Ebene konnte man nachweisen, dass bei Patienten mit bipolarer Störung Interneurone im vorderen Gyrus cinguli (Vincent et al. 1997) und Neurone der CA2 Region (Benes et al. 1998) signifikant vermindert sind. Es wird vermutet, dass chronischer Stress mit Anregung der HPA-Achse und erhöhten Glukokortikoidkonzentrationen zu morphologischen Veränderungen im Hippocampus im Sinne von Schädigung und Untergang hippocampaler Neurone führt (Czeh et al. 2002).

Auch Untersuchungen an Tieren stützen die These von der Schlüsselrolle des Hippocampus beim Wirkmechanismus von Antidepressiva. Bei 5HT-1A-Knockout Mäusen zeigte eine Behandlung mit Fluoxetin keinen antidepressiven Effekt, wie auch eine Röntgenbestrahlung des Hippocampus mit Schädigung der Neurogenese den Effekt von Fluoxetin aufhob (Santarelli et al. 2003).

Wie in Abb. 10 schematisch dargestellt, ist eine Funktionsstörung des Hippocampus möglicherweise für das klinische Bild einer Depression mitverantwortlich. Es ist zu vermuten, dass in diesem Zusammenhang einer gestörten Regulation der aN im Hippocampus eine wichtige Rolle zukommt.

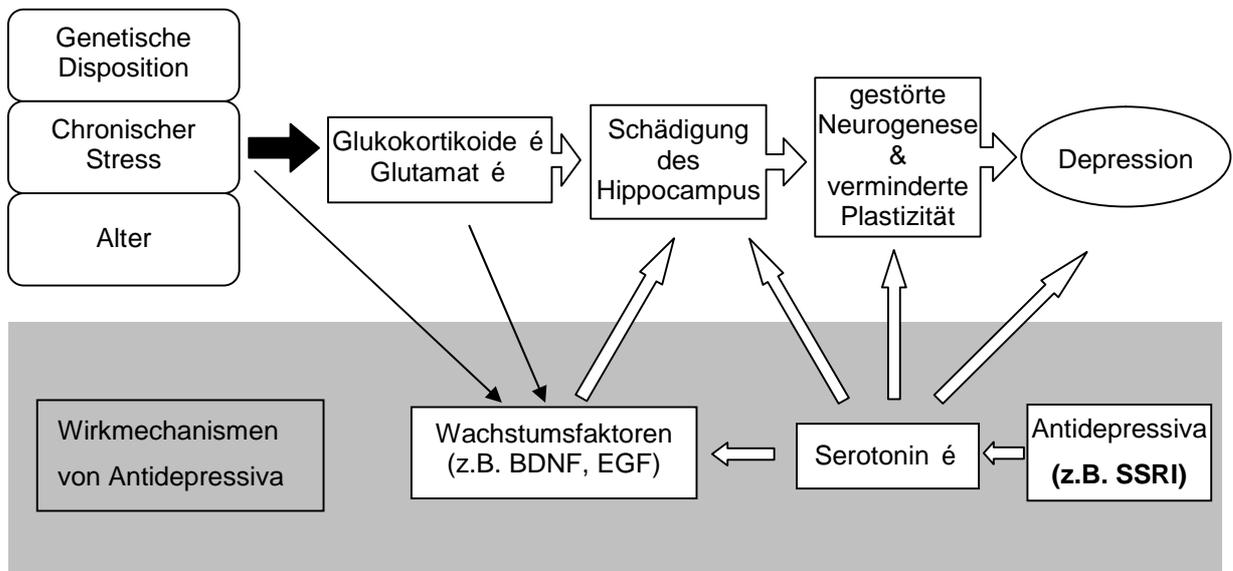


Abb. 10: Mögliche Beteiligung und Wechselwirkung einzelner Faktoren an der Ätiopathogenese und Therapie der Depression (adaptiert nach Benninghoff et al. 2002). Genetische Disposition, höheres Alter und chronischer Stress führen über morphologische und funktionelle Veränderungen im Hippocampus zur manifesten Depression. Medikamente, die das Angebot an 5-HT erhöhen (z.B. SSRI) können über die Erhöhung von Wachstumsfaktoren (z.B. BDNF) oder direkt die Neurogenese anregen und die Plastizität verbessern.

1.2 Fragestellung

Das serotonerge System des Gehirns ist an der Pathogenese der Depression und anderer neuropsychiatrischer Erkrankungen beteiligt. Bei der serotonergen Neurotransmission spielt der 5-HTT eine zentrale Rolle, und ist auch therapeutischer Angriffspunkt bei der Behandlung depressiver Erkrankungen. Das Tiermodell der *5-HTT*-Knockout-Maus mit erhöhten extrazellulären 5-HT-Konzentrationen und einem ängstlichen und weniger aggressiven Phänotyp ist zur Untersuchung des serotonergen Systems besonders im Zusammenhang mit affektiven Störungen geeignet.

Neuere Untersuchungen konnten aN auch im erwachsenen Tier und Menschen nachweisen. Ein wichtiger Ort der aN ist der GD des Hippocampus. Der Hippocampus, ein zentraler Teil des limbischen Systems, besitzt eine Schlüsselfunktion bei Lernprozessen und Gedächtnisbildung, und ist auch stark serotonerg innerviert. Zahlreiche Faktoren sind an der Regulation der aN beteiligt. Einen besonders hohen Stellenwert bei der Förderung der Stammzellproliferation hat 5-HT. Deshalb bietet sich 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 aN an.

Die vorliegende Arbeit soll überprüfen, ob im GD von alten *5-HTT*-defizienten Mäusen eine erhöhte Teilungsrate neuraler Vorläuferzellen vorliegt. Darüber hinaus soll untersucht werden, ob die Überlebensrate und/oder das Migrationsverhalten der neu gebildeten Zellen im GD dieser alten Mäuse verändert ist. Dazu soll Mäusen verschiedenen *5-HTT* Genotyps das Thymidinanalogon BrdU appliziert werden. Entweder 24 h oder vier Wochen nach den erfolgten BrdU-Injektionen werden dann BrdU-positive Zellkerne mit Hilfe der Immunhistochemie nachgewiesen und quantitativ ausgewertet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Die Versuchstiere stammten aus einer Serotonintransporter(5-*HTT*)-Knockout-Zuchtlinie mit dem genetischen Hintergrund eines C57-BL6 Mäusestamms. Dabei handelt es sich um Tiere, die entweder heterozygot (HET) oder homozygot (KO) für das ausgeschaltete *5HTT*-Gen sind sowie Kontrolltiere, welche keinen Gendefekt aufweisen, die so genannten Wildtypen (WT). Die Haltung erfolgte in den Tierställen der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg in Gruppenhaltung mit freiem Zugang zu Nahrung und Wasser und einem 12 Stunden Tag-Nachtwechsel. Die Gehirne von insgesamt 36 Mäusen im Alter zwischen 331 (~ 10,8 Monate) und 503 Tagen (~ 16,5 Monate) wurden zum Nachweis BrdU-markierter Zellkerne verwendet.

Genotypen	gesamt	WT	HET	KO
Anzahl der Versuchstiere	18	7	5	6
Anzahl männlicher Tiere	12	5	3	4
Anzahl weiblicher Tiere	6	2	2	2
Durchschnittsalter der Tiere	420,6 d ± 65,2	419,7 d ± 65,1	418,0 d ± 74,2	422,7 d ± 70,2
Durchschnittsgewicht der Tiere	40,7 g ± 6,4	39,0 g ± 6,2	39,6 g ± 6,9	43,5 g ± 6,4

Tabelle 1 : Übersicht zu den Versuchstieren bei der Untersuchung der Proliferation adulter Stammzellen im Hippocampus von 5HTT-Knockout-Mäusen

Genotypen	gesamt	WT	HET	KO
Anzahl der Versuchstiere	18	6	6	6
Anzahl männlicher Tiere	13	4	5	4
Anzahl weiblicher Tiere	5	2	1	2
Durchschnittsalter der Tiere	421,3 d \pm 64,5	415,3 d \pm 71,9	411,0 d \pm 67,9	431,4 d \pm 62,2
Durchschnittsgewicht der Tiere	38,8 g \pm 4,8	37,7 g \pm 4,0	36,0 g \pm 4,5	42,8 g \pm 3,2

Tabelle 2 : Übersicht zu den Versuchstieren bei der Untersuchung der Überlebensrate und Migration neu gebildeter Zellen im Hippocampus von 5HTT-Knockout-Mäusen

2.1.2 Antikörper

Erstantikörper:

Monoklonale Anti-BrdU (5-bromo-2'-
deoxyuridine-5'-monophosphate)-IgG₁
von der Maus

Roche, Indianapolis, USA

Zweitantikörper:

biotinylierter Anti-Maus-IgG
von der Ziege

Vector Laboratories, Burlingame,
USA

Enzymkomplex:

Peroxidase-konjugierter Streptavidin-Biotin-Komplex Vectastain®	Vector Laboratories, Burlingame, USA
---	---

2.1.3 Chemikalien

Thymol krist. reinst (C ₁₀ H ₁₄ O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton® X-100 (t-Octylphenoxyethoxyethanol)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA; (CH ₂ O) _n)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
BrdU	Roche, Mannheim, Deutschland
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland

2.1.4 Lösungen und Puffer

0,1 M Borsäure (H ₃ BO ₃), pH 8,5	Merck, Darmstadt, Deutschland
DAB Substrate Kit (3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride)	Roche, Mannheim, Deutschland
Eisessig (C ₂ H ₄ O ₂) (100 %ige Essigsäure)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (C ₂ H ₅ OH)	Merck, Darmstadt, Deutschland

Formamid (CH ₃ NO)	Merck, Darmstadt, Deutschland
NHS (Normal Horse Serum)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
4 % PFA in PBS	4 g PFA in PBS, pH 7,4
5 N Salzsäure (HCl)	Combi-Titrisol® Merck, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), 30 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol (C ₈ H ₁₀)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Blocklösung 1	5 % NHS 0,25 % Triton X-100 2 % BSA in TBS
Blocklösung 2	2 % NHS 0,25 % Triton X-100 2 % BSA in TBS
Cresylviolettlösung	83 ml 10 %ige Essigsäure 0,1 % Cresylviolett ad 1000 ml Aqua dest.
PBS (Phosphate Buffered Saline)	0,137 M NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ PO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄
TBS (Tris Buffered Saline)	0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 0,15 M NaCl

SSC (20x) (Saline Sodium Citrate) 3 M NaCl
0,3 M NaCitrat

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

24-well-Platten Nunclon® Nunc, Roskilde, Dänemark

Objektträger SuperFrost® Plus Menzel-Gläser, Braunschweig,
Deutschland

Deckgläser 24x50 mm A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland

Parafilm M American National Can, Chicago, USA

Vibratomklingen Valet Blades World Precision Instruments, Sarasota,
USA

Sekundenkleber UHU® Gel 3g UHU, Bühl, Deutschland

Vitro-Clud® R. Langenbrinck, Emmendingen,
Deutschland

2.1.6 Software

DIGITRACE® Imatec, Neufahrn, Deutschland

Excel® Microsoft, Kalifornien, USA

StatView® Abacus Concepts, London,
Großbritannien

2.1.7 Geräte

Vibratom 752 M Vibroslice	Campden Instruments, Sileby, Großbritannien
Tauchbecken für free floating Technik	Eigenbau
Wasserbadschüttler GFL 1083	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Schüttler IKA-Vibrax-VXR	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Olympus BX40F mit Fluoreszenzaufsatz und Quecksilberdampflampe	Olympus Optical, Japan
CCD Video Camera Module XC77CE	Sony, Japan

2.2 Methoden

2.2.1 BrdU-Injektionen

Die BrdU-Injektionslösung (10 mg/ml) wurde mit isotonischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) hergestellt. Der Lösungsvorgang wurde durch Schütteln und Erwärmen auf 37 °C beschleunigt. Nachdem die Lösung steril filtriert worden ist, wurde sie erneut auf 37 °C erwärmt, damit die Versuchstiere durch die Injektion keinen Temperaturschock erleiden. Vor der ersten Injektion wurden die Tiere gewogen, um die exakte Dosis berechnen zu können. Die Versuchstiere wogen durchschnittlich 25 g. Jede Maus sollte pro Injektion 75 mg/kg Körpergewicht BrdU erhalten (z.B. 25 g x 75 mg/kg = 1875 µg). Die intraperitoneale Injektion

erfolgte ohne Äthernarkose, da die Narkose für die Tiere belastender ist, als die Injektion mitzerleben.

Die Bioverfügbarkeit von BrdU zur Aufnahme in Zellen wird auf mindestens 2 h geschätzt (Packard et al. 1973). Deswegen wird nur ein Teil der Zellen markiert, die sich in 24 h teilen. Aus diesem Grunde wurde jeder Maus insgesamt viermal im Abstand von zwei h die entsprechende individuelle Dosis BrdU-Lösung appliziert, um die Anzahl der markierten Zellen zu erhöhen. Zur Untersuchung der reinen Proliferation von Vorläuferzellen im GD, den sog. Proliferationsuntersuchungen, wurden die Mäuse 24 h nach der ersten BrdU-Gabe nach Äthernarkose durch anschließende Dekapitation getötet und das Gehirn entnommen. Zur Untersuchung des Überlebens und der Migration neu gebildeter Zellen, den sog. Survival-Untersuchungen, wurden die Tiere erst 4 Wochen nach BrdU-Gabe getötet.

2.2.2 Herstellung der Gewebeschnitte

Die entnommenen Gehirne wurden für 48 – 72 h in frisch hergestelltem 4 %igem PFA bei 4 °C fixiert. Es folgte ein viermaliger Waschvorgang von 15 min mit PBS. Mit Hilfe des Vibratoms 752 M Vibroslice wurden serielle Schnitte des Hippocampus mit einer Dicke von 40 µm hergestellt. Dazu wurde das Gehirn nach dem Abtrennen des Kleinhirns (mit einem Skalpell) am Okzipitalpol mit Sekundenkleber UHU® Gel auf dem Kunststoffblocks des Vibratoms befestigt und in einer Wanne mit PBS gebadet. Die mit einer Geschwindigkeit von 8 und der Schubstärke 3 hergestellten seriellen Gewebeschnitte mit einer Schichtdicke von 40 µm wurden anschließend einzeln in die Vertiefungen einer 24-well-Platte überführt und in mit Thymol versetztem PBS bei 4 °C gelagert.

2.2.3 Immunhistochemischer Nachweis von BrdU

Jeder sechste Schnitt des Vorderhirns, der Strukturen des GD des Hippocampus enthielt, wurde einer immunhistochemischen Färbung in Free floating-Technik zum Nachweis von BrdU unterzogen. Inkubations- und Waschvorgänge wurden in einem extra hierfür hergestellten Tauchbecken für bis zu 81 Gewebescheiben gleichzeitig durchgeführt, wodurch einer ungleichen Behandlung der Schnitte vorgebeugt werden sollte.

Nach zweimaligem Spülen der Schnitte in TBS für 10 min wurden die Schnitte für 30 min in frisch zubereiteter 0,6 %iger H_2O_2 -Lösung in TBS inkubiert, um die Aktivität der endogenen Peroxidase zu blockieren. Es folgte ein dreimaliges Waschen der Schnitte für jeweils 5 min in TBS. Zur DNS-Denaturierung und der damit verbundenen Freilegung der BrdU-Antigene wurden die Schnitte für 2 h bei $65^\circ C$ in 50 %igem Formamid in 2x SSC bei leichtem Schütteln inkubiert, anschließend in TBS für 2x 5 min gewaschen, und dann für 30 min in 2 N HCl bei $37^\circ C$ inkubiert. Nach dem Neutralisieren mit 0,1 M Borsäure (pH 8,5) für 10 min wurde noch dreimal für je 10 min in TBS bei Raumtemperatur gespült. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Gewebsschnitte mit Blocklösung 1 für mindestens 1 h bei Raumtemperatur versetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem gegen BrdU gerichteten Erstantikörper von der Maus (Verdünnung 1:400 in Blocklösung 1) bei $4^\circ C$ für mindestens 12 h bei leichtem Schwenken. Nach dreimaligem Spülen der Schnitte für jeweils 10 min in TBS wurden sie mit biotinyliertem Anti-Maus Antikörper (Verdünnung 1:400 in Blocklösung 2) für 2 h bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln inkubiert und anschließend dreimal für je 10 min in TBS gewaschen. Daraufhin wurden die Schnitte mit dem Peroxidase-konjugierten Streptavidin-Biotin-Komplex für 2 h bei Raumtemperatur versetzt. Dabei galt es zu beachten, dass der Komplex mindestens eine halbe Stunde vor Gebrauch nach Anweisung des Herstellers in TBS angesetzt wird. Anschließend wusch man die Schnitte dreimal für 10 min und führte die Peroxidase-Nachweisreaktion durch Inkubation in DAB-Substrat-

Lösung für 6 min durch. Auf Mundschutz und Handschuhe beim Umgang mit DAB musste geachtet werden.

Abschließend wurden die Schnitte zweimal für jeweils 5 min in TBS gewaschen, bevor sie mit einem Pinsel auf Objektträger aufgezogen und für mehrere h getrocknet wurden. Danach wurden die Schnitte für je 2 min durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt (70 % / 80 % / 95 % / 100 % Ethanol, 2x 100 % Xylol) und mit Vitro-Clud® eingedeckt.

2.2.4 Auswertung der Gewebeschnitte

Zur Bestimmung der Proliferationsaktivität neuraler Stammzellen als auch der Überlebensrate neu gebildeter Zellen wurden die immunhistochemisch mit dem BrdU-Antikörper gefärbten Gehirnschnitte der Maus (siehe 2.2.3) unter dem Lichtmikroskop analysiert. Die im GD angefärbten Zellkerne wurden gezählt, wobei speziell bei der Untersuchung der Überlebensrate und Migration zwischen den in der SGZ lokalisierten und denen, die in die KZS migriert waren, unterschieden wurde. Die Zellzahl wurde in Bezug zum Volumen der KZS angegeben (Zellen/mm³ KZS), welche mit Hilfe einer CCD-Videokamera und des Computerprogramms DigiTrace® vermessen wurde. Dazu wurden die Präparate unter Verwendung des Olympus®-Mikroskops und einem 4-fach Objektiv über eine CCD-Videokamera in die DIGITRACE® Software eingelesen. Anschließend wurden die von Hilus und KZS eingeschlossenen Flächen umfahren und voneinander subtrahiert, woraus sich die Fläche der KZS ergab. Die in der vorliegenden Untersuchung zu messenden Flächen von Hilus und KZS wurden folgendermaßen definiert: die KZS lässt sich mikroskopisch durch ihre starke Anfärbung in mit Nissl angefärbten Schnitten und durch ihre relativ schwache Anfärbung nach erfolgter BrdU-Immunhistochemie gut vom Hilus und dem Stratum moleculare abgrenzen, der Hilus wurde als der Bereich ausgemessen, der von den Schenkeln der KZS eingeschlossen ist und von einer gedachten Verbindungslinie zwischen den Enden derselbigen begrenzt wird. Im Grenzbereich zwischen Hilus und KZS liegt die circa zwei Zellschichten

umfassende SGZ, welche beim Messen der KZS-Fläche miterfasst wurde. Die vorher auf die Mikroskopoptik geeichte Software berechnete die Flächen der KZS in μm^2 .

Um BrdU-positive Zellkerne, die teilweise sehr dicht zusammenlagen, voneinander unterscheiden zu können, wurde zur Analyse ein 100-fach Objektiv mit Immersionsöl verwendet. Außerdem wurden BrdU-markierte Zellkernsignale in den äußersten Fokalebene nicht mitgezählt, um Zellen, welche hauptsächlich in den benachbarten Schnitten liegen, nicht mit zu erfassen und dadurch Doppelzählungen zu vermeiden.

Die SGZ gilt als der Geburtsort neuer Zellen, die durch Teilung aus ortsständigen Stammzellen bzw. Vorläuferzellen entstehen. Diese wandern nach ihrer Bildung teilweise in die KZS ein und differenzieren sich in Neurone oder Gliazellen. Zellen wurden der SGZ zugerechnet, wenn die Entfernung zur Hilus/KZS-Grenze nicht mehr als zwei Zelldurchmesser betrug. Im Survivalversuch wurden Zellen als eingewandert bezeichnet, wenn sie in der KZS lagen und mindestens zwei Zelldurchmesser von der Hilus/KZS-Grenze entfernt lokalisiert waren.

Die Daten von Flächen und Zellkernsignalen wurden danach mit der Software Excel[®] zusammengefasst und nach folgender Formel ausgewertet:

$$c = \frac{\sum_{i=1}^z n_i}{\sum_{i=1}^z A_i \cdot 0,04\text{mm}}$$

- c Konzentration der Signale in mm^{-3}
- z Anzahl der ausgewerteten Gewebeschnitte
- n Anzahl der gezählten BrdU-positiven Zellen im ausgewerteten Gewebeschnitt
- A gemessene Fläche der KZS im ausgewerteten Gewebeschnitt

Die Bestimmung der Konzentration von mit BrdU markierten Zellkernen schließt im Gegensatz zur Bestimmung der Absolutzahl von vornherein eine Vielzahl von Fehlerfaktoren, wie z.B. verändertes Schrumpfverhalten während der Fixation in höherem Alter, aus.

Abschließend folgte die statistische Auswertung der Daten durch Student'schen t-Test für unabhängige Variablen und Korrelationsberechnungen unter Verwendung der Statistiksoftware SigmaStat®. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant, ein p-Wert von $< 0,005$ als hochsignifikant gewertet.

2.2.5 Nissl-Färbung

Zur besseren Orientierung und Zuordnung einzelner anatomischer Strukturen innerhalb der zu analysierenden Gewebeschnitte wurde mit einzelnen Gewebsschnitten eine Nissl-Färbung durchgeführt. Die auf Objektträger aufgebrauchten und getrockneten Gewebeschnitte wurden für 5 min in Cresylviolettlösung getaucht. Es folgte ein kurzes Schwenken in Aqua dest. Danach wurden die Präparate in 96 %igem Ethanol mit einigen Tropfen Eisessig wieder leicht entfärbt bis sie den gewünschten Entfärbungsgrad erreicht hatten, was unter Sichtkontrolle mit Hilfe eines Mikroskops stattfand. Daraufhin wurden die Schnitte für 2 min in 100 % Ethanol und anschließend für mindestens zweimal 5 min in Xylol getaucht. Abschließend wurden die Präparate mit Entellan und Deckgläschen eingedeckt.

3 Ergebnisse

3.1 Proliferation adulter Stammzellen im Hippocampus von *5-HTT*-Knockout-Mäusen

Im ersten Versuchsansatz wurde die Proliferation der adulten Stammzellen in der Subgranulärzone (SGZ) des Gyrus dentatus (GD) von Mäusen der *5-HTT*-Knockout (KO)-Zuchtlinie quantitativ bestimmt. Dazu wurden die Versuchstiere 24 h nach den erfolgten BrdU-Injektionen getötet und die Gehirne, wie unter 2.2.2 – 2.2.4 beschrieben, prozessiert. Abb. 1 zeigt den Ausschnitt eines Gewebeschnittes mit GD nach erfolgter immunhistochemischer Färbung zum Nachweis von BrdU. Es zeigte sich, dass die BrdU-markierten Zellen vorwiegend in der SGZ lagen. Sie waren dabei in der Regel in Gruppen von zwei bis vier Zellen angeordnet.

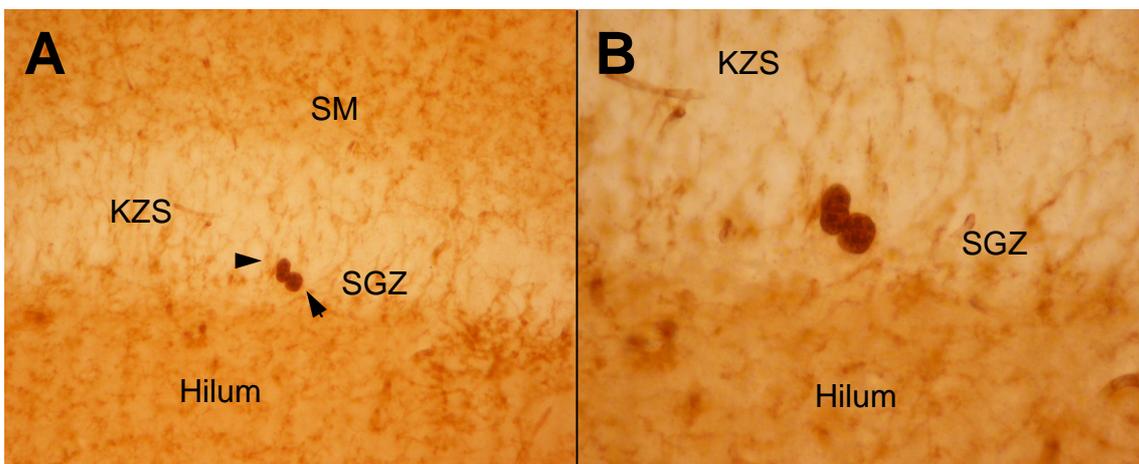


Abb.1: Proliferation adulter Stammzellen im Gyrus dentatus von *5-HTT*-KO-Mäusen. Zur Untersuchung der Zellproliferation wurden die Mäuse 24 h nach der ersten BrdU-Injektion getötet. Der immunhistochemische Nachweis von BrdU erfolgte mithilfe der ABC-Methode und DAB als Substrat der Peroxidase. Beispiel für zwei eng benachbart liegende BrdU-markierte Zellkerne (Pfeilspitzen in A) in der SGZ des GD. In Abb. B zeigen die Zellkerne eine ungleichmäßig starke Anfärbung. In A: Verwendung eines 40x-Objektivs; In B: Verwendung eines 100x-Objektivs; KZS - Körnerzellschicht; SM - Stratum moleculare.

Die untersuchte Gruppe bestand aus insgesamt 18 Versuchstieren (n=18). Dabei handelte es sich um 6 Tiere mit einem homozygoten Knockout (KO) des

5-HTT-Gens (die sog. *5-HTT*-KO-Mäuse), 5 Tiere mit einem heterozygoten KO des *5-HTT*-Gens (sog. *5-HTT*-HET-Mäuse) sowie um 7 Kontrolltiere (sog. Wildtypen; WT) mit einem vollständigen *5-HTT*-Genbestand. Die Versuchsgruppe bestand aus 12 männlichen und 6 weiblichen Tieren. Das Durchschnittsalter betrug $420,6 \pm 65,2$ Tage (ca. 14 ± 2 Monate). Das Durchschnittsgewicht lag bei $40,7 \pm 6,4$ g. Die Durchschnittskonzentration BrdU-markierter Zellkerne in der KZS des GD betrug $569,5 \pm 228,4$ Zellen/mm³. Bei den WT-Mäusen zeigten sich im Durchschnitt $396,8 \pm 120,4$ Zellen/mm³, bei den *5-HTT*-HET-Mäusen $667,4 \pm 217,8$ Zellen/mm³ (168,2% der WT) und bei den *5-HTT*-KO-Tieren $689,3 \pm 231,4$ Zellen/mm³ (173,7% der WT).

Die Daten wurden statistisch mit dem Student'schen t-Test (homoskedastisch, zweiseitig) ausgewertet. Ein signifikanter Genotypeneffekt entsprach einem p-Wert $< 0,05$. Wie aus Abb. 2 ersichtlich ist, wurden signifikante Unterschiede bei der Konzentration BrdU-markierter Zellkerne in der SGZ zwischen homozygoten *5-HTT*-KO-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren, den sogenannten WT-Mäusen gefunden ($p=0,014$). *5-HTT*-HET-Mäuse zeigten ebenfalls eine signifikant höhere Konzentration BrdU-markierter Zellkerne in der SGZ gegenüber WT-Mäusen ($p=0,020$). Dabei unterschieden sich die berechneten Volumina der KZS bei den verschiedenen *5-HTT*-Genotypen nicht signifikant.

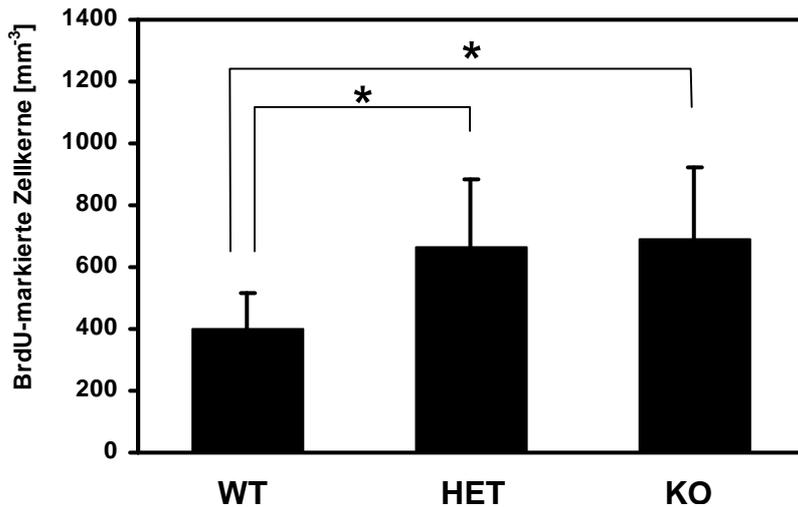


Abb. 2: Die Proliferation adulter Vorläuferzellen ist im Hippocampus von 5-HTT-KO- und 5-HTT-HET-Mäusen im Vergleich zu den WT-Kontrollen erhöht. Die Konzentration BrdU-markierter Zellkerne in der SGZ homozygoter 5-HTT-Knockout(KO)-Mäuse ist im Vergleich zu den Kontrolltieren, den sogenannten Wildtyp-Mäusen (WT), signifikant erhöht ($p=0,014$). Mäuse mit einem halben 5-HTT-Gensatz (5-HTT-HET-Mäuse) zeigten ebenfalls signifikant höhere Konzentrationen BrdU-markierter Zellkerne in der SGZ im Vergleich zu WT-Mäusen ($p=0,020$). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die Statistik basiert auf dem Student'schen t-Test (homoskedastisch, zweiseitig). * : signifikanter Genotypeneffekt mit p -Wert $< 0,05$.

3.2 Überlebensrate und Migration neu gebildeter Zellen im Hippocampus von 5-HTT-Knockout-Mäusen

Im zweiten Versuchsansatz, dem sog. 4-Wochen-Versuch, wurden die Überlebensrate der durch Proliferation der adulten Stammzellen neu gebildeten Tochterzellen und ihre Migration quantitativ bestimmt. Dazu wurden die Versuchstiere 4 Wochen nach den BrdU-Injektionen getötet und die Gehirne, wie unter 2.2.2 – 2.2.4 beschrieben, prozessiert. Ein Beispiel für den immunhistochemischen Nachweis BrdU-markierter Zellen in den Mäusegehirnen dieser Versuchsreihe zeigt Abb. 3, wo drei BrdU-markierte Zellen in die KZS migriert sind und eine BrdU-markierte Zelle in der SGZ verblieben ist. Die BrdU-markierten Zellen lagen bei den Untersuchungen zur Überlebensrate und Migration zum einen in der SGZ, zum etwa gleichen Teil aber auch in der KZS in unterschiedlicher Entfernung von der SGZ. Insgesamt

waren dabei deutlich weniger BrdU-markierte Zellen als im Proliferationsversuch detektierbar, was in Kapitel 3.3. ausgeführt wird.

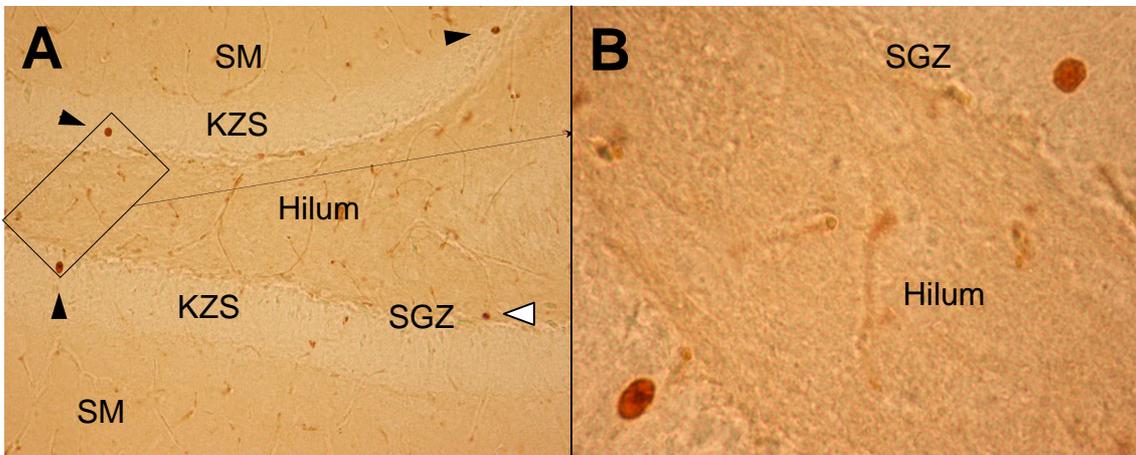


Abb. 3: Überleben und Migration von BrdU-markierten Zellkernen. Zur Untersuchung der Überlebensrate und Migration neu gebildeter Zellen wurden die Mäuse 28 Tage nach den BrdU-Injektionen getötet. Der immunhistochemische Nachweis von BrdU erfolgte mithilfe der ABC-Methode und DAB als Substrat der Peroxidase. Abbildung A zeigt ein Beispiel für drei gewanderte BrdU-markierte Zellkerne (Pfeilspitzen in A) in der Körnerzellschicht (KZS), jenseits der Subgranulärzellschicht (SGZ) sowie ein BrdU-markierter Zellkern (weiße Pfeilspitze in A), der in der SGZ verblieben ist. SM - Stratum moleculare. In A: Verwendung eines 10x Objektivs; In B: Ausschnittsvergrößerung unter Verwendung eines 100x Objektivs.

Die untersuchte Gruppe bestand aus insgesamt 18 Versuchstieren ($n = 18$). Dabei handelte es sich um 6 5-HTT-KO- und 6 5-HTT-HET-Mäuse sowie um 6 WT-Kontrolltiere. Von den Versuchstieren waren 13 männlich und 5 weiblich. Das Durchschnittsalter betrug $421,3 \text{ Tage} \pm 64,5$ (ca. 14 Monate ± 2). Das Durchschnittsgewicht lag bei $38,8 \text{ g} \pm 4,8$. Die Durchschnittskonzentration BrdU-markierter Zellkerne in der KZS aller Tiere betrug nach vier Wochen $113,9 \text{ Zellen/mm}^3 \pm 62,9$. Bei den 5-HTT-WT-Mäusen zeigten sich im Durchschnitt $90,5 \text{ Zellen/mm}^3 \pm 33,8$, bei den 5-HTT-HET-Mäusen $157,6 \text{ Zellen/mm}^3 \pm 91,4$ (174,1 % der WT) und bei den 5-HTT-KO-Mäusen $93,6 \text{ Zellen/mm}^3 \pm 22,6$ (103,4 % der WT).

Wie aus Abb. 4 ersichtlich, wurden bei der Gesamtkonzentration BrdU-markierter Zellkerne in der KZS des Gyrus dentatus keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen festgestellt.

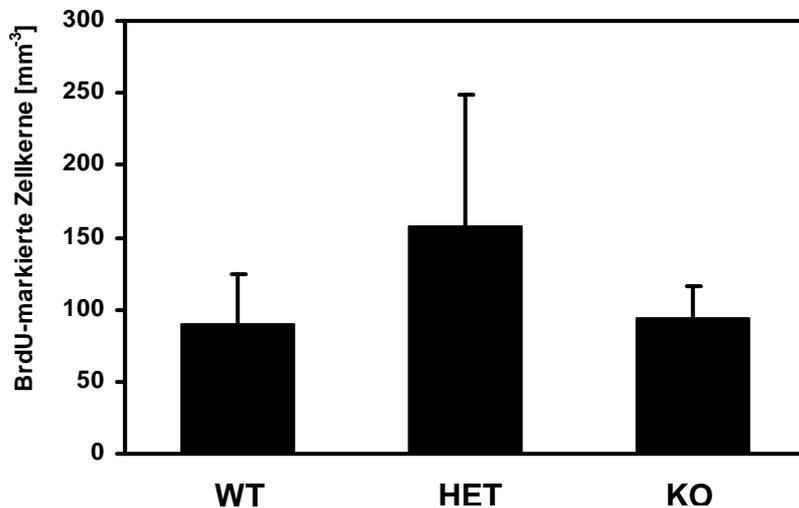


Abb. 4: Überlebensrate nach 28 Tagen der durch Proliferation der adulten Stammzellen neu gebildeten Tochterzellen in der KZS des Hippocampus. Die Konzentration BrdU-markierter Zellkerne in der KZS von heterozygoten 5-HTT-Knockout-Mäusen (HET), homozygoten 5-HTT-Knockout-Mäusen (KO) und Kontrolltieren (WT) zeigten keine signifikanten Unterschiede. Die Statistik basiert auf dem Student'schen t-Test (homoskedastisch, zweiseitig). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Signifikanter Genotypeneffekt entspricht p-Wert < 0,05.

Zur Untersuchung der Migration wurden die Zellen in der KZS gezählt, die mindestens zwei Zelldurchmesser von der Hilus/KZS Grenze entfernt lagen und somit im Verlauf der 28 Tage nach BrdU-Injektion von der SGZ als Bildungsstätte herausgewandert waren. Im Durchschnitt waren 46,1% aller BrdU-markierten Zellkerne in der KZS zu finden, und somit aller Wahrscheinlichkeit nach von der SGZ in die KZS eingewandert. Bei den ermittelten Konzentrationen und dem Anteil der gewanderten Zellen wurden zwischen den einzelnen 5-HTT-Genotypen keine signifikanten Unterschiede detektiert, wie Abbildung 5 zu entnehmen ist.

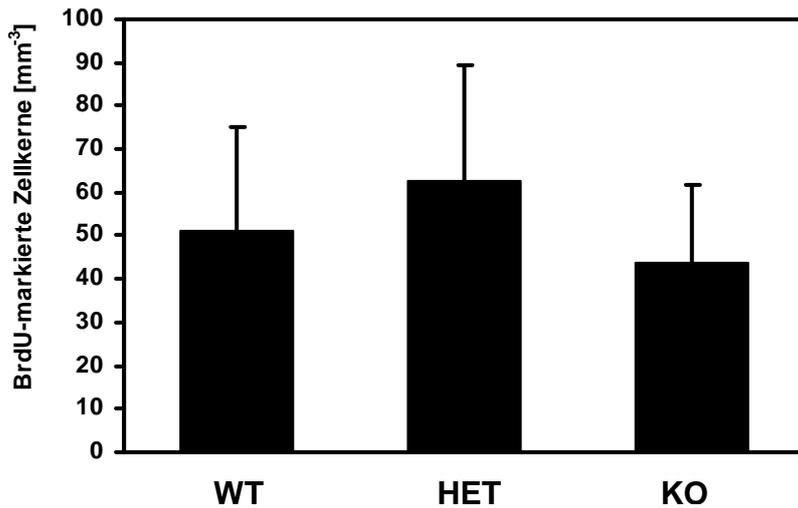


Abb. 5: Migration der durch Proliferation der adulten Stammzellen neu gebildeten Tochterzellen in die KZS des Hippocampus. Die Konzentration BrdU-markierter Zellkerne, die von der SGZ ausgehend in die KZS eingewandert sind, zeigt zwischen 5-*HTT*-KO-, den 5-*HTT*-HET-Mäusen sowie den Wildtyp-Kontrolltieren (WT) keine signifikanten Unterschiede. Die Statistik basiert auf dem Student'schen t-Test (homoskedastisch, zweiseitig). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Abbildung 6 zeigt die prozentuale Verteilung von in der SGZ verbliebenen und der in die KZS eingewanderten BrdU-markierten Zellen bei den verschiedenen 5-*HTT*-Genotypen.

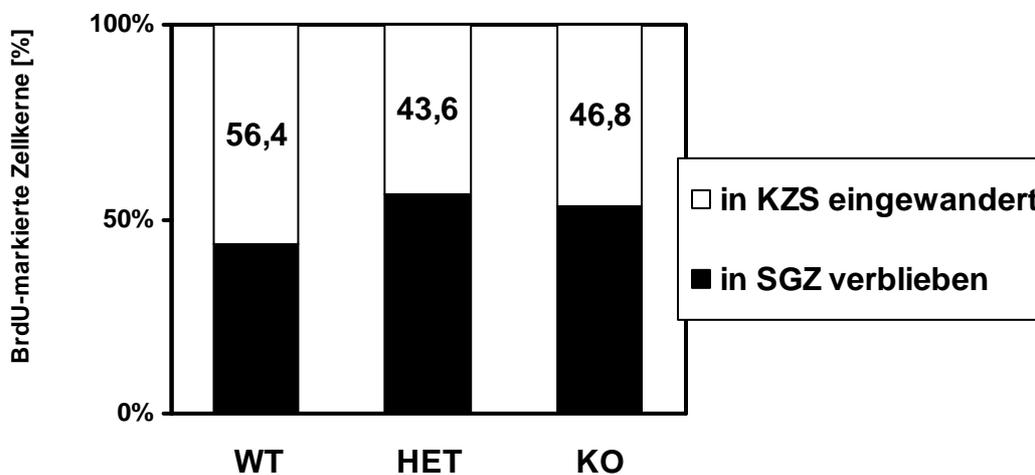


Abb. 6: Prozentuale Darstellung der Migration der durch Proliferation der adulten Stammzellen neu gebildeten Tochterzellen in die KZS des Hippocampus. Dargestellt sind die einzelnen Genotypen und deren prozentuale Anteile an in der SGZ verbliebenen bzw. in die KZS eingewanderten Zellen an der Gesamtkonzentration (=100%) der BrdU-markierten Zellkerne. Der schwarze Balkenanteil entspricht dem Prozentsatz der in der SGZ verbliebenen BrdU-markierten Zellen, der weiße Balkenanteil entspricht dem Prozentsatz der in die KZS eingewanderten BrdU-markierten Zellen.

3.3 Vergleich zwischen Proliferations- und 4-Wochen-Versuch

Um die Entwicklung der BrdU-markierten Zellen über einen Zeitraum von 28 Tagen abschätzen zu können, wurden Proliferationsversuch und der Versuch zur Überlebensrate und Migration miteinander verglichen. Nur durchschnittlich 20,0% der im Proliferationsversuch mit BrdU markierten Zellkerne konnten 4 Wochen nach BrdU-Gabe nachgewiesen werden (Überlebensrate). Des Weiteren wanderten nur 9,2% der im Proliferationsversuch nachgewiesenen Zellen aus der SGZ in die KZS ein. Die im Vergleich zum Proliferationsversuch stark reduzierte Anzahl BrdU-markierter Zellkerne im Hippocampus von Mäusen des 4-Wochen-Versuches war für alle Genotypen hochsignifikant (Student'scher t-Test (homoskedastisch, zweiseitig), $p < 0,005$), wie auch Abbildung 7 zu entnehmen ist.

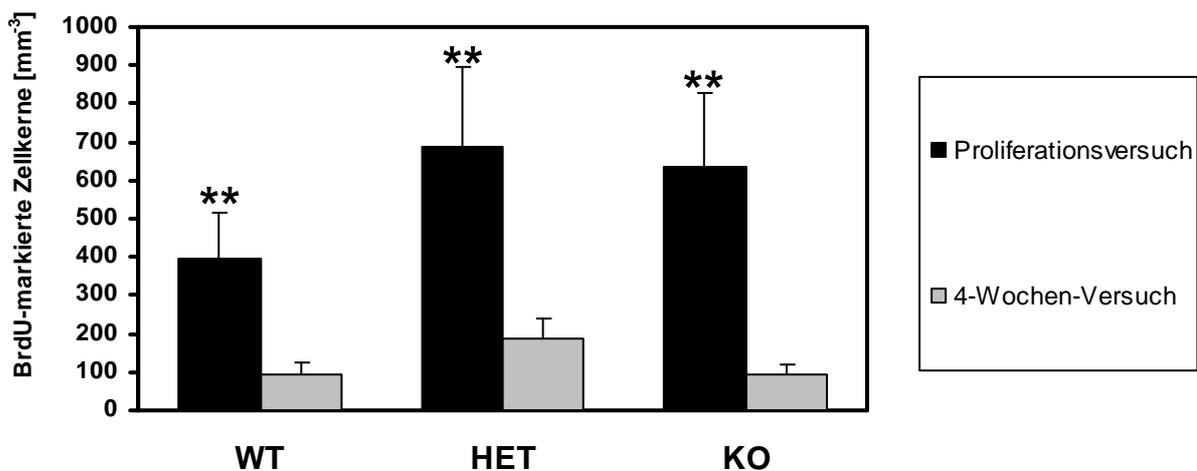


Abb. 7: Vergleich der Konzentration BrdU-markierter Zellen des Proliferationsversuchs mit dem 4-Wochen-Versuch. Bei allen 5-HTT-Genotypen (WT, HET, KO) ist die Konzentration BrdU-markierter Zellkerne in der gesamten KZS beim Proliferationsversuch hochsignifikant höher als die Konzentration BrdU-markierter Zellkerne beim 4-Wochen-Versuch. Nur durchschnittlich 20,0% der im Proliferationsversuch mit BrdU markierten Zellkerne konnten vier Wochen nach BrdU-Gabe nachgewiesen werden (Überlebensrate). Die Statistik basiert auf dem Student'schen t-Test (homoskedastisch, zweiseitig). **: hochsignifikanter Genotypeneffekt mit p -Wert $< 0,005$. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

3.4 Einfluss von Alter, Geschlecht und Gewicht der Versuchstiere

Um einen möglichen Einfluss von Alter, Geschlecht und Gewicht auf die aN zu überprüfen, wurden die vorliegenden Daten auf einen Zusammenhang überprüft.

Bei den Versuchstieren, die im Durchschnitt 420,9 Tage bzw. 13,8 Monate alt waren gab es Altersunterschiede von $\pm 63,9$ Tagen bzw. 2,1 Monaten. Hierbei zeigte sich aber kein signifikanter Einfluss auf die Konzentration BrdU-markierter Zellkerne, weder im Proliferationsversuch (Korrelationskoeffizient $r = -0,23$; $p = 0,36$), noch im Survivalversuch ($r = -0,17$; $p = 0,49$), noch bei der Anzahl gewanderter Zellen ($r = -0,28$, $p = 0,26$). Das Alter zeigte jedoch zum Gewicht der Versuchstiere eine hochsignifikante positive Korrelation mit $r = 0,43$ ($p = 0,008$). Je älter das Tier, desto schwerer war es im Durchschnitt.

Wie aus Abb. 8 hervorgeht, gab es im Proliferations- als auch im 4-Wochen-Versuch keine geschlechtsabhängigen signifikanten Unterschiede der Konzentration BrdU-markierten Zellkerne in der KZS. Dabei war die die Auftrennung in die unterschiedlichen Genotypen aufgrund der geringen n-Zahl statistisch nicht sinnvoll.

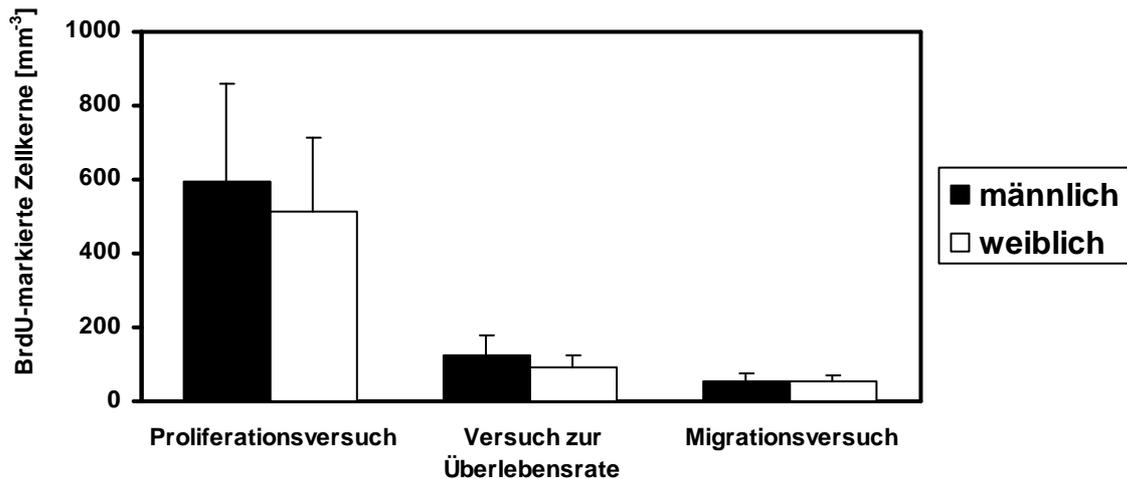


Abb. 8: Einfluss des Geschlechts der Versuchstiere auf die Konzentration BrdU-markierter Zellen im Proliferations-, Überlebens- und Migrationsversuch. Die quantitative Analyse der Proliferation adulter Stammzellen, der Überlebensrate als auch der Migration neu gebildeter Zellen zeigte keinen geschlechtsspezifischen Unterschied. Die Statistik basiert auf dem Student'schen t-Test (homoskedastisch, zweiseitig). Signifikanter Genotypeffekt mit p-Wert <0,05. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Es zeigte sich aber ein Einfluss des Geschlechts auf das Durchschnittsgewicht aller Versuchstiere aus Proliferations- und 4-Wochen-Versuch. Wie aus Abbildung 9 zu entnehmen ist waren die Männchen (\bar{x} 41,5 g \pm 5,4) hochsignifikant (p=0,0038) schwerer als die Weibchen (\bar{x} 35,8 g \pm 4,2).

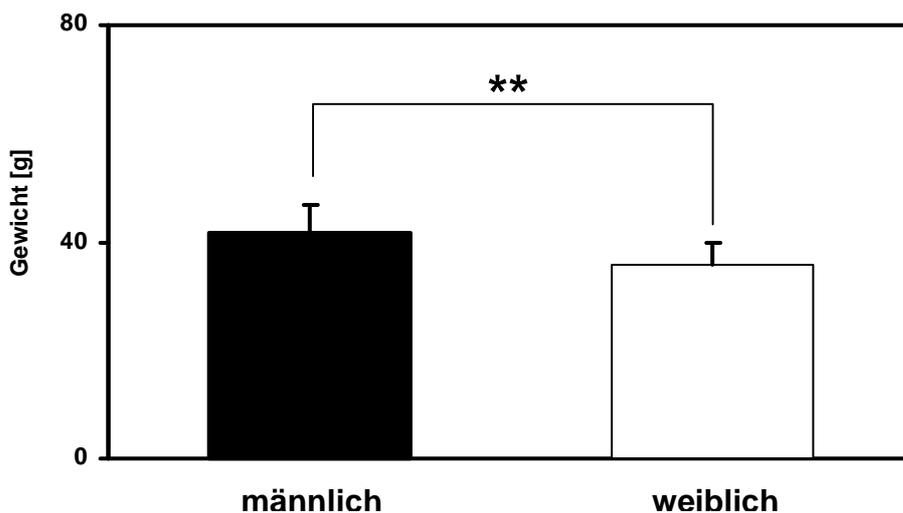


Abb. 9: Zusammenhang von Geschlecht und Gewicht. Es zeigte sich ein hochsignifikant größeres Gewicht männlicher Tiere im Vergleich zu den weiblichen. Die Statistik basiert auf dem Student'schen t-Test (homoskedastisch, zweiseitig). **: hochsignifikanter Effekt mit p-Wert <0,005. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Das Gewicht der Versuchstiere (\bar{x} 39,7 g \pm 5,6) hatte aber weder im Proliferationsversuch ($r=0,06$; $p=0,82$) noch im 4-Wochen-Versuch ($r=-0,20$; $p=0,42$) einen signifikanten Einfluss auf die Konzentration BrdU-markierter Zellkerne. Hingegen zeigte sich eine signifikante negative Korrelation $r=-0,49$ ($p=0,038$) beim Zusammenhang zwischen Gewicht der Versuchstiere im 4-Wochen-Versuch und der Zahl der in die KZS eingewanderten Zellen, wie Abbildung 10 zu entnehmen ist.

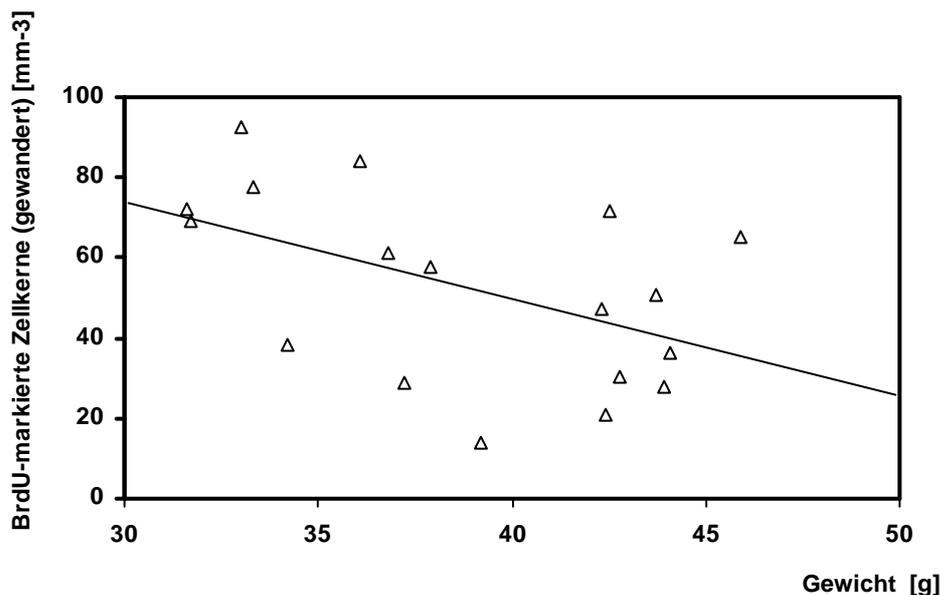


Abb. 10: Zusammenhang von Gewicht und Anzahl von in die KZS eingewandelter BrdU-markierter Zellen beim 4-Wochen-Versuch. Es besteht eine signifikante negative Korrelation von $r=-0,49$ ($p=0,038$), d.h. leichtere Tiere haben im Mittel eine höhere Anzahl BrdU-markierter Zellen, die in die KZS eingewandert sind.

Im Vergleich von *5-HTT*-Genotyp und dem Gewicht aller Versuchstiere aus dem Proliferations- und 4-Wochen-Versuch zeigten die homozygoten *5-HTT*-KO-Mäuse (\bar{x} 43,1 g \pm 4,8) im Vergleich zu den *5-HTT*-HET-Mäusen (\bar{x} 37,6 g \pm 5,7; $p=0,02$) und den Kontrolltieren (\bar{x} 38,4 g \pm 5,1; $p=0,02$) ein signifikant höheres Gewicht, wie es auch in Abbildung 11 zu sehen ist.

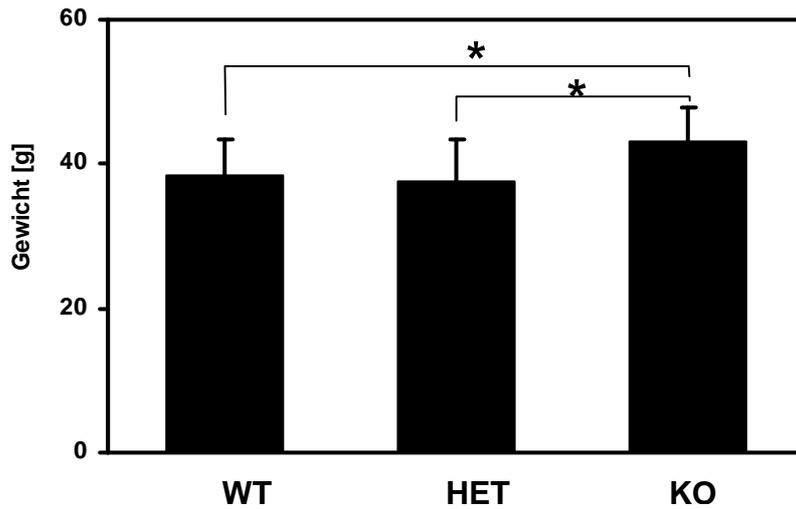


Abb. 11: Zusammenhang von Genotyp und Körpergewicht. Signifikant erhöhtes Gewicht bei homozygoten *5-HTT*-Knockout-Mäusen (KO) im Vergleich zu heterozygoten *5-HTT*-Knockout-Mäusen (HET) und Kontrolltieren (WT) ($p=0,02$). Die Statistik basiert auf dem Student'schen t-Test (homoskedastisch, zweiseitig). * : signifikanter Genotypeffekt mit p -Wert $<0,05$. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung an.

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die quantitative Bestimmung der Proliferation von Vorläuferzellen und des Überlebens und der Migration neu gebildeter Zellen im Hippocampus von alten *5-HTT*-KO-Mäusen.

4.1 Der immunhistochemische Nachweis von BrdU zur Untersuchung der adulten Neurogenese

In dieser Arbeit wurde der Nachweis von während der DNA-Synthese inkorporiertem BrdU zum Nachweis von Zellteilungen verwendet. Skeptiker äußern dabei die Ansicht, dass die BrdU-Inkorporation keine Mitoseaktivität, sondern nur Reparaturmechanismen der DNS widerspiegelt. Dies wurde schon mehrfach diskutiert (Palmer et al. 2000; Cooper-Kuhn et al. 2002; Grassi Zucconi et al. 2002), wobei folgende Argumente dagegen sprechen:

- Radioaktive Strahlung, die DNS-Strangbrüche verursacht, führte nicht zu gesteigerter Aufnahme von BrdU weder *in vivo* (Parent et al. 1999) noch *in vitro* (Palmer et al. 2000).
- aN kann auch durch retrovirale Markierung nachgewiesen werden, welche keine DNS-Reparatur markieren würde (van Praag et al. 2002).
- Ki-67, ein nukleares Protein, das in fast allen Phasen der Zellteilung exprimiert wird, zeigt im GD ein ähnliches Verteilungsmuster wie die BrdU-Färbung (Reif et al. 2006). Es wurden im Gegensatz zu BrdU circa 50 % mehr Zellen markiert, da BrdU nur in der S-Phase der Mitose aufgenommen werden kann. Experimentelle Steigerung (durch Ischämie) oder Verminderung (durch Bestrahlung) der Zahl mitotischer Zellen zeigten parallele Änderungen von BrdU- und Ki-67-Signalen. (Kee et al. 2002)
- Von der Vorläuferzelle zum reifen Neuron exprimieren die BrdU-markierten Zellen nacheinander verschiedene Marker der neuronalen Entwicklung, was einem Nachweis von DNA-Reparatur in bereits reifen Zellen widerspricht (Kempermann et al. 2003).

Es wurde bereits in vorangegangenen Untersuchungen gezeigt, wie viele der neu gebildeten Zellen sich in Neurone differenzieren und ob diese sich wirklich auch funktionell in das neuronale Netzwerk integrieren. Die Zeit von 4 Wochen nach der Teilung ist ausreichend, um immunhistochemisch beurteilen zu können, ob es sich bei den neu entstandenen Zellen um Neuronen oder Gliazellen handelt (Malberg et al. 2000). Indem man Markierungssubstanzen für spezifische Proteine ausgereifter Neuronen, wie neuronenspezifische Enolase (NSE), den neuronalen Marker Neuronal Nuclei (NeuN) und Calbindin, und für Astrozyten saures Gliafaserprotein (GFAP) verwendet, kann der Phänotyp durch Triple-Immunfluoreszenzfärbung unter dem Konfokalmikroskop nachgewiesen werden. Malberg und Mitarbeiter (2000) berichten über 75 % Neurone, 13 % Astrozyten und 12 % Zellen die keine Doppelmarkierung zeigten, weil sie entweder von den Antikörpern in der Mitte des Gewebeschnitts nicht erreicht wurden oder es sich aber um undifferenzierte Zellen handelt. Dieses Verhältnis von markierten Neuronen zu Gliazellen wurde auch durch andere Arbeiten bestätigt (Eriksson et al. 1998; Nilsson et al. 1999; van Praag et al. 1999).

Daneben wurden auch morphologische Kriterien herangezogen, um die Funktionsfähigkeit neu entstandener Neuronen zu demonstrieren. So konnte nachgewiesen werden, dass neu entstandene Körnerzellen ihre Axone in die CA3 Region senden und synaptische Kontakte ausbilden, was darauf hinweist, dass sie synaptische Signale aufnehmen (Stanfield et al. 1988; Markakis et al. 1999). Die Zellmorphologie entspricht der von Neuronen und die neu entstandenen Neurone bilden Aktionspotentiale aus und integrieren sich ins neuronale Netzwerk. Deshalb können wir nicht nur von „numerischer Neurogenese“, sondern von funktioneller Neurogenese sprechen (Song et al. 2002; van Praag et al. 2002).

Wir haben uns, wie auch andere Autoren, bei der Quantifizierung der BrdU-markierten Zellkerne für eine arbeitsaufwändige Volumenkonzentrationsbestimmung entschieden. Andere Arbeitsgruppen verwenden z.T.

Absolutzahlen pro GD, die aber schwierig exakt zu ermitteln sind, da es fraglich bleibt, ob jeweils der gesamte GD aufbereitet wurde. Zudem ist die Beurteilung des Volumens wichtig ist, um zu überprüfen, ob bei den Gruppen gleiche GD-Volumina vorhanden sind, da bekannt ist, dass Stress bei Tieren und depressive Erkrankungen beim Menschen einen Einfluss auf das GD Volumen haben (Hviid et al.; Lee et al. 2009).

Zu bedenken ist auch, dass die Bioverfügbarkeit von BrdU zur Aufnahme in Zellen auf etwa 2 h geschätzt wird (Packard et al. 1973; Takahashi et al. 1992). Wir injizierten BrdU deshalb viermalig alle zwei Stunden und konnten so einen Zeitraum von acht Stunden erreichen, indem alle Zellen in der S-Phase der Mitose BrdU inkorporieren konnten, wie es auch in vergleichbaren Studien durchgeführt wurde (Duman et al. 2001).

4.2 Proliferation adulter Stammzellen im Hippocampus von alten *5-HTT*-Knockout-Mäusen

Im Proliferationsversuch wurde ein signifikanter Unterschied bei der Konzentration BrdU-markierter Zellkerne in der SGZ zwischen *5-HTT*-KO-Mäusen im Vergleich zu den WT-Tieren gefunden. *5-HTT*-HET-Mäuse zeigten ebenfalls eine signifikant höhere Konzentration BrdU-markierter Zellkerne in der SGZ gegenüber WT-Mäusen. In diesem Experiment war somit ein positiver Einfluss des heterozygoten und homozygoten *5-HTT*-Genotyps auf die Entstehungsrate neuer Zellen in der KZS des GD im Vergleich zu den Wildtypen feststellbar.

Mehrere Untersuchungen widmeten sich bereits dem Einfluss des serotonergen Systems auf die Neurogenese. So konnte zunächst gezeigt werden, dass AD die Expression von *5-HTT*-mRNS beeinflussen (Hoffman et al. 1991; Lesch et al. 1993a; Lopez et al. 1994). Jacobs und Mitarbeiter (1998) fanden heraus, dass 5-HT, durch Fenfluramingabe ausgeschüttet, die Produktion neuer Neuronen im GD der erwachsenen Ratte über den 5-HT_{1A}-Rezeptor stimuliert (Jacobs et al. 1998a). 5-HT_{1A}-Antagonisten wie NAN, p-MPPI und WAY-

100635 führten zu einer signifikanten Reduktion BrdU-markierter Zellen im GD um ca. 30% (Radley et al. 2002). Die Langzeitgabe von AD (das SSRI Fluoxetin und NA-Wiederaufnahmehemmer) über 14-28 Tage steigerten die Entstehung neuer Zellen im Hippocampus der Ratte, die Kurzzeitgabe über 1-5 Tage führte zu keiner Änderung, was den klinischen Erfahrungen eines verzögerten Wirkungseintritts von AD entspricht (Malberg et al. 2000). Dies bestätigten auch Untersuchungen von Jacobs und Mitarbeitern (1999), bei denen unter 3-wöchiger Gabe des SSRI Fluoxetin 70% mehr neue Zellen entstanden (Jacobs et al. 1999). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine Störung der 5-HT-Synthese und die Läsion serotonerger Neurone durch Dihydroxytryptamin die Zahl neu gebildeter Zellen im GD und in der Subventrikulärzone vermindert (Brezun et al. 1999). Im Rahmen der Erholung und der damit verbundenen Reinnervierung serotonerger Neurone kam es dann wieder zu einer Zunahme neu gebildeter Zellen im GD der Ratte (Brezun et al. 2000).

Im vorliegenden Experiment wäre vor dem Hintergrund dieser Arbeiten, die für einen positiven Einfluss von 5-HT auf die Proliferation neuer Zellen im GD sprechen, eine Zunahme neu gebildeter Zellen im GD bei den *5-HTT*-KO-Mäusen zu erwarten gewesen. Grundlage dieser Annahme war die Beobachtung erhöhter extrazellulärer 5-HT-Spiegel im Mikrodialysat von *5-HTT*-KO Mäusen, d.h. es liegt im synaptischen Spalt der Versuchstiere eine erhöhte Konzentration von 5-HT vor, wie z.B. 14fach im Striatum und 6fach in der Substantia nigra (Fabre et al. 2000; Mathews et al. 2000). Das Fehlen des 5-HTT wirkt sich aber auch auf die Expression verschiedener 5-HT-Rezeptoren, wie z.B. 5-HT_{1A}-, 5-HT_{1B}- und 5-HT₃, aus (Fabre et al. 2000; Mossner et al. 2004). Man kann somit bei *5-HTT*-KO Mäusen von deutlichen Veränderungen der 5-HT-Homöostase und 5-HT-abhängiger Regelkreise ausgehen.

Der angenommene Zusammenhang zwischen *5-HTT*-KO und einer erhöhten Neubildung von Vorläuferzellen wurde in unserem Proliferationsversuch bestätigt. Eine weitere Arbeit aus unserem Hause (Schmitt et al. 2007) zeigte hingegen keinen Zusammenhang zwischen *5-HTT*-Genotyp und der Zahl neugebildeter Zellen im GD der Maus. Man untersuchte sieben Wochen alte

Tiere (Versuch A) und Tiere mit einem Alter von 3.0 ± 0.5 Monaten (Versuch B). Die Versuchsdurchführung variierte, da in Versuch A nur eine einmalige BrdU-Injektion erfolgte und die Tiere nach 2 h getötet wurden, in Versuch B erfolgte hingegen eine viermalige BrdU-Injektion mit Tötung nach 24 h. Die Zahl BrdU-positiver Zellen in der SGZ war im Vergleich zu den Tieren dieser Arbeit um ca. 400 % erhöht. Es zeigten sich dabei keine signifikanten Unterschiede in Proliferation, Überlebensrate und Migration zwischen den Genotypen.

Diese auf den ersten Blick widersprüchlichen Ergebnisse könnten ihre Ursache im unterschiedlichen Alter der Versuchstiere haben. Wir wissen, dass die Neurogenese zwar bis ins hohe Alter erfolgt, jedoch bei alten Tieren drastisch erniedrigt ist (Seki et al. 1995; Kempermann et al. 1998; Nacher et al. 2003; Walter et al. 2009). So war bei Kuhn und Mitarbeitern (1996) bei 21 Monate alten Ratten die Anzahl BrdU-markierter Zellen in der KZS des GD weniger als 10 % des Wertes von 6 Monate alten Tieren. Im Moment geht man davon aus, dass eine verminderte mitotische Aktivität neuronaler Stammzellen im GD der Grund für die im Alter erniedrigte Zahl von BrdU-markierten Zellen ist (Kuhn et al. 1996). Die Kompensationsfähigkeit des gealterten Hippocampal-serotonergen Systems scheint auch gegenüber Schädigungen deutlich gemindert zu sein (Dugar et al. 2001). Beim Menschen ist zudem eine Abnahme des 5-HTT im Alter nachgewiesen worden (Yamamoto et al. 2002). Tiere, die auch aus der von uns verwendeten 5-HTT-KO Zuchtlinie stammten, zeigten ebenfalls altersabhängige Veränderungen. So wiesen Andrews und Mitarbeiter nach, dass die altersgemäße Reduktion der Anzahl serotonerger Fasern in den 5-HTT-KO-Mäusen gegenüber Wildtypen gleichen Alters reduziert ist (Unger et al. 2002). Es konnten auch altersabhängige Effekte beim räumlichen Lernen und Gedächtnis von Mäusen nachgewiesen werden (Wolff et al. 2004), so zeigten junge 5-HT1A-KO-Mäuse im Wasserlabyrinth schlechtere Leistungen als Wildtypen. Bei alten Mäusen (22 Monate) waren diese Unterschiede nicht mehr nachweisbar. Bei 5-HT1B-KO-Mäusen zeigte sich ein verbessertes Lernen in den jungen und auch alten Mäusen.

In Zusammenschau der Untersuchungen scheint das gealterte Gehirn von einer veränderten 5-HT Homöostase zu profitieren. Bei adulten Mäusen bestehen offenbar Kompensationsmechanismen, die eine vielleicht unnötige Erhöhung der aN verhindern. Im alten Gehirn scheint jedoch ein erhöhter 5-HT Spiegel im Vergleich zu gleich alten WT-Mäusen einen positiven Effekt auf die aN zu entfalten. Dies ist möglicherweise durch im Alter verminderte Kompensationsmechanismen zu erklären. Lebenslang erhöhte 5-HT Spiegel in *5-HTT-KO*-Mäusen könnten neben einer vermehrten Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen mit einer erhöhten Widerstandskraft gegen altersabhängige Degeneration serotonerger Axone verbunden sein. Das Aufrechterhalten einer hyperserotonergen Umgebung könnte somit ein protektiver Faktor in der aN von alten Mäusen sein und damit in Zukunft klinische Bedeutung für die antidepressive Behandlung älterer Menschen mit Depression erlangen.

4.3 Überlebensrate und Migration neugebildeter Zellen im Hippocampus von alten *5-HTT*-Knockout-Mäusen

Die aus der Teilung von Vorläuferzellen entstandenen Zellen bleiben entweder als zukünftige Mutterzellen in der SGZ liegen oder wandern in die KZS ein, um dort ihre Funktion als Neuron aufzunehmen. Im olfaktorischen System wandern die neu entstandenen Neuronen bis zu mehreren Millimetern entlang des rostralen Migrationstrakts zum Bulbus olfactorius (Luskin 1993; Lois et al. 1996). Im GD der Maus beträgt die maximale Wanderungsentfernung von der SGZ bis zu 100 μm , wobei viele Zellen nicht wandern, sondern in der SGZ „liegen bleiben“.

Nach Beobachtung der reinen Neubildung von Vorläuferzellen im Proliferationsversuch war es nun interessant zu untersuchen, ob die neu entstandenen Zellen überlebten und ob sie in der SGZ verblieben oder in die KZS migrierten. Deshalb wurden im 4-Wochen-Versuch zum einen die Überlebensrate BrdU-markierter Zellen nach 28 Tagen bestimmt, zum anderen die Migration der BrdU-markierten Zellen von der SGZ in die KZS untersucht.

Bei der Überlebensrate waren im Durchschnitt nur noch 20,0 % der im Proliferationsversuch detektierten BrdU-positiven Zellen nachzuweisen. Dies entspricht Erfahrungswerten anderer Untersuchungen (Kempermann et al. 2003; Choi et al. 2009), bei denen die Zahl BrdU-markierter Zellkerne innerhalb der ersten Wochen auf circa 20 % absinkt. Danach bleibt die Zahl relativ stabil, was bis zu 11 Monaten nachgewiesen werden konnte. Es bleibt zu bedenken, dass eine asymmetrische Zellteilung der Vorläuferzellen vorliegt, so dass weiter proliferierende Stammzellen durch eine zunehmende Ausdünnung von BrdU unentdeckt bleiben können. Des Weiteren nehmen Vorläuferzellen, die sich innerhalb von etwa zwei Stunden nach BrdU-Applikationen nicht in der S-Phase der Mitose befinden, kein BrdU auf, womit auch deren weitere Teilungsaktivität unentdeckt bleibt. Bei der Überlebensrate zeigten die verschiedenen *5-HTT*-Genotypen keinen signifikanten Unterschied in der Zahl BrdU-markierter Zellkerne. Diese Ergebnisse konnten bei Versuchen mit jüngeren Tieren der gleichen *5-HTT*-KO-Mauslinie bestätigt werden (Schmitt et al. 2007). Unterschiedliche *5-HT* Spiegel haben offenbar keinen Einfluss auf die Überlebensrate von neugebildeten Neuronen im Hippocampus von Mäusen.

Neben der reinen Überlebensrate ist auch die örtliche Verteilung der neu entstandenen Zellen von Interesse, da Neuronen in die KZS einwandern, um sich dort in das neuronale Netzwerk zu integrieren. Bei der Untersuchung der Migration von Zellen in die KZS waren im Durchschnitt 46,1 % der nach vier Wochen noch vorhandenen BrdU-positiven Zellen von der SGZ in den GD eingewandert (WT: 56,5 %; HET: 39,8 %; KO: 46,8 %). Diese Werte entsprechen im Wesentlichen den Ergebnissen von Kempermann und Mitarbeitern (Kempermann et al. 2003), bei denen sich circa 60 % in der SGZ und im inneren Drittel, circa 30 % im mittleren Drittel und circa 10 % im äußeren Drittel der KZS fanden. Weiterhin konnte Kempermann und Mitarbeiter zeigen, dass die Migration nach circa vier Wochen weitgehend abgeschlossen ist, weshalb wir in unserem Versuchsablauf auch eine Untersuchung der Tiere nach 28 Tagen vornahmen. Auch bei der Anzahl der in die KZS eingewanderten Zellen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den

verschiedenen Genotypen festgestellt werden. Offenbar hat weder der heterozygote noch der homozygote *5-HTT-KO* einen Einfluss auf das Migrationsverhalten neu entstandener Zellen.

Im Versuch zur Überlebensrate und Migration konnte somit kein Einfluss eines *5-HTT-KO* auf die Überlebensrate und Einwanderung von Zellen in die KZS gefunden werden. Dabei ist zu bedenken, dass aufgrund der deutlich geringeren Anzahl von Brdu-markierten Zellen im Alter gerade geringe Unterschiede statistisch schwer zu belegen sind. Ein Grund für den fehlenden Einfluss des *5-HTT-KO* auf Überlebensrate und Migration könnte die bei den *5-HTT-KO* seit Entwicklungsbeginn veränderte 5-HT Homöostase im synaptischen Spalt darstellen. Im Gegensatz zu Experimenten, bei denen vor dem Hintergrund eines „natürlichen und gesunden“ Rezeptor-, Transmitter- und Transporter-Status externe Einflüsse getestet werden, fehlt den *5-HTT*-defizienten Tieren bereits während ihrer Embryonal- als auch Postnatalentwicklung ein funktioneller 5-HTT. Dies kann bereits pränatal zu zahlreichen Anpassungsvorgängen führen, um zu einem gesunden Gleichgewicht zurückzukehren. In unserem Fall könnte das bedeuten, dass der chronisch erhöhte 5-HT-Spiegel zur Rezeptor-Downregulation oder Desensibilisierung führt, wie es für verschiedene 5-HT Rezeptoren gezeigt werden konnte (Li et al. 2000; Murphy et al. 2008). Zusätzlich könnte es zur Hemmung anderer Neurogenese- und Migrationsfaktoren sowie Signalkaskaden kommen, um eine chronisch erhöhte und dadurch vielleicht auch schädigende Neurogenese zu vermeiden.

4.4 Einfluss von Geschlecht, Gewicht und Alter der Versuchstiere

Die Mäuse aller Untersuchungen hatten ein Durchschnittsalter von $420,9 \pm 63,9$ Tagen ($\sim 13,8 \pm 2,1$ Monate), wobei innerhalb der Untersuchungsgruppen kein Einfluss des Alters auf die Konzentration BrdU-markierter Zellkerne weder im Proliferations-, noch im Survival- und Migrationsversuch feststellbar war. Auf den bekannten Zusammenhang zwischen hohem Alter und geringer Proliferation von Vorläuferzellen wurde bereits unter 4.2. eingegangen. Da wir in unseren Untersuchungen keinen altersabhängigen Effekt sehen konnten, gehen wir davon aus, dass die relativ geringe Altersspanne von 13,8 Tagen bei der Zahl von 44 Versuchstieren nicht zu einem statistisch signifikanten Unterschied führte, zudem die größte Abnahme der aN in den ersten Lebensmonaten zu sehen ist.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur aN in *5-HTT-KO*-Mäusen konnte weder bei der Gruppe zur Untersuchung der Proliferationsrate noch bei der Untersuchung zur Überlebensrate und Migration eine Abhängigkeit der ermittelten Konzentration BrdU-markierter Zellen vom Geschlecht gefunden werden. Dies bestätigte auch eine Studie, die keine geschlechtsabhängige Änderung der Proliferation bei Mäusen feststellen konnte, zudem war die Steigerung der Neurogenese nach Gabe von SSRI bei beiden Geschlechtern gleich hoch (Lagace et al. 2007).

Es zeigte sich jedoch eine signifikante negative Korrelation zwischen dem Gewicht der Tiere und dem Anteil gewanderter Zellen im Migrationsversuch, d.h. leichtere Tiere hatten einen signifikant höheren Anteil von BrdU-markierten Zellen, die in die KZS eingewandert waren. Bei der Untersuchung der Proliferation und Überlebensrate zeigte sich diese Korrelation jedoch nicht. Dieser Zusammenhang wurde bisher noch nicht beschrieben. Ein geringeres Gewicht eines Versuchstieres lässt sich u.a. durch Stress, Aggressivität oder Neugier erklären. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass milder vorhersehbarer Stress, d.h. Alltagsstress bei Futtersuche, Revierabgrenzung und Partnersuche,

zu einer erhöhten Neurogenese bei Ratten führt (Parihar et al. 2009). Eine andere Studie konnte nachweisen, dass eine anregendes Lebensumfeld die aN signifikant steigert (Kempermann et al. 1997b). Möglicherweise sind dies Bedingungen, die auch eine erhöhte Anpassung an die Umwelt erfordern und somit in einer funktionellen aN münden. Umgekehrt ließe sich anführen, dass Tiere mit einer erhöhten funktionellen aN möglicherweise mehr Interesse an ihrer Umgebung zeigen (Neugier) und somit aktiver werden und Gewicht verlieren. Man sollte diese Beobachtung zum Anlass nehmen, in folgenden Experimenten zur Klärung des Zusammenhangs zwischen Gewicht und funktioneller Neurogenese auch Verhaltenstests durchzuführen.

4.5 Ausblick

Untersuchungen zur aN der letzten Jahre zeigten, dass neuronale Plastizität nicht länger auf synaptische Reorganisation und dendritische Verzweigungen beschränkt bleibt, sondern auch die Addition neuer Neurone in wichtige Regelkreise beinhaltet. Zugleich kommt es zum Abbau bereits länger vorhandener Neurone, d.h. es besteht in gewissen Grenzen ein turn-over von Nervenzellen. Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen psychiatrischen Erkrankungen und der aN gefunden werden. So zeigten z.B. Hippocampi von Schizophrenen eine deutlich erniedrigte Zahl von neuronalen Vorläuferzellen, bei Depressiven konnte man nach Gabe von trizyklischen Antidepressiva und selektiven Serotoninwiederaufnahmehemmern eine Erhöhung feststellen (Reif et al. 2006; Boldrini et al. 2009). Ob die veränderte aN dabei Ursache oder Folge einer psychiatrischen Erkrankung ist, ist unklar. Pharmakologische Untersuchungen zeigten des Weiteren, dass die Langzeitbehandlung mit verschiedenen Antidepressiva (AD), wie z.B. Fluoxetin (selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer), Reboxetin (selektiver Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer), Tranylcypromin (MAO-Hemmer), und mit Lithium die aN steigern (Jacobs et al. 1999; Chen et al. 2000; Malberg et al. 2000; Duman et al. 2001).

Bei an einer Depression erkrankten Menschen konnte man nach Gabe von trizyklischen Antidepressiva und selektiven Serotoninwiederaufnahmehemmern eine Erhöhung der aN feststellen (Boldrini et al. 2009). Hierbei ist auch bislang ungeklärt, ob die erhöhte Anzahl von neuronalen Vorläuferzellen die entscheidende antidepressive Wirkung verursacht oder nur eine Nebenwirkung der Antidepressiva darstellt.

Es bleibt festzustellen, dass die physiologische Funktion der aN beim Menschen und die Auswirkungen einer Störung noch nicht geklärt sind und der weiteren Grundlagenforschung bedürfen. Der erste Schritt liegt dabei in der Erforschung der Signale, die neuronale Stammzellen zur Proliferation als ersten Schritt der Neubildung von Neuronen anregen, denn wenn man die normalen Mechanismen der aN aufklärt, wird man auch die Konsequenzen einer Störung dieses Prozesses verstehen können. Für eine mögliche Therapie bei Störungen der aN sind prinzipiell zwei Ansätze denkbar:

- Zum einen könnte man versuchen, die Bedingungen für die Neubildung von Neuronen in vivo zu verbessern. Dies könnte zur pharmakotherapeutischen Anwendung regulatorischer Schlüsselmoleküle und anderer Wirkstoffe führen. Vielleicht auch durch die Gentherapie in Form eines Gentransfers, um die Bildung regulierender Substanzen im Körper selbst zu veranlassen (Lesch 1999). Die Stammzellen werden somit an Ort und Stelle zur Proliferation angeregt, teilen sich und wandern in die geschädigte oder kranke Gehirnregion ein, wo sie funktionellen Zellersatz leisten. Spekulativ gibt es vielleicht im ganzen Hirn Vorläuferzellen, die nur durch die richtigen Stimuli geweckt werden müssen? Dann wäre vielleicht auch eine Heilung von Krankheiten möglich, die mit geschädigten oder zerstörten Nervenzellen einhergehen, wie z.B. Alzheimer, Parkinson, Schlaganfälle und Traumata (Tatebayashi et al. 2003).

- Zum anderen bestünde die Möglichkeit der Transplantation neuronaler, in vitro gezüchteter Stammzellen, die an der benötigten Stelle reimplantiert werden (Takahashi et al. 2009).

Die Idee, die aN zu therapeutischen Zwecken zu stimulieren, hat bereits einige Forscher in ihrer Phantasie beflügelt. So gibt es bereits eine Studie zur Förderung der aN mit verschiedenen Wachstumsfaktoren in Form eines Nasensprays (Jin et al. 2003). Andere wiederum sehen in der Akupunktur eine Erfolg versprechende Methode zur Erhöhung der aN (Kim et al. 2001; Park et al. 2002).

Es bleibt zu hoffen, dass die Grundlagenforschung zur aN bald zu großem Nutzen für psychisch Kranke, Unfallopfer und alte Menschen führen wird.

5 Zusammenfassung

Das serotonerge System des Gehirns mit seinen Projektionen ins limbische System ist an der Pathogenese der Depression und anderer neuropsychiatrischer Erkrankungen beteiligt. Bei der serotonergen Neurotransmission spielt der Serotonintransporter (5-HTT) eine wichtige Rolle und ist auch therapeutischer Angriffspunkt verschiedener Antidepressiva. Das Tiermodell der *5-HTT*-Knockout(KO)-Maus dient der Untersuchung des serotonergen Systems. Diese Tiere besitzen neben einem verstärkten angstähnlichen Verhalten auch erhöhte 5-HT-Konzentrationen im synaptischen Spalt.

Lange Zeit war man der Meinung, dass nahezu alle Nervenzellen während der Embryogenese bis kurz nach der Geburt gebildet werden. Neuere Untersuchungen konnten Neurogenese jedoch auch im Gehirn adulter Tiere und auch des Menschen nachweisen. Eine wichtige Gehirnregion mit adulter Neurogenese (aN) bis ins hohe Alter ist der Gyrus dentatus (GD) des Hippocampus. Der Hippocampus ist zentraler Teil des limbischen Systems und hat Schlüsselfunktionen bei Lernprozessen und der Gedächtnisbildung und unterliegt durch seine serotonerge Innervation auch dem Einfluss von 5-HT.

Die Zusammenfassung dieser Beobachtungen führte zu folgender Arbeitshypothese: Eine erniedrigte Zahl von 5-HTT führt zu chronisch erhöhten 5-HT-Spiegeln im synaptischen Spalt. Die damit verbundene Stimulation des serotonergen Systems führt zu einer veränderten aN.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die quantitative Bestimmung von Proliferation, Überleben und Migration neu entstandener Zellen in der KZS des GD von heterozygoten (HET) und homozygoten *5-HTT*-Mäusen (KO), die mit Wildtyptieren (WT) verglichen wurden. Dabei wurden ältere Mäusen mit einem Durchschnittsalter von 13,8 Monaten verwendet. In der Gruppe zur Untersuchung der Proliferation wurden die Versuchstiere (n=18) 24 h nach Injektionen mit BrdU getötet und histologische Schnitte des Hippocampus post

mortem untersucht. In der Gruppe zur Untersuchung der Überlebensrate und Migration wurden die Mäuse (n=18) 4 Wochen nach den BrdU-Injektionen getötet.

Im Proliferationsversuch wurde ein signifikanter Unterschied bei der Konzentration BrdU-markierter Zellkerne in der SGZ zwischen KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren gefunden, wobei HET-Mäuse ebenfalls eine signifikant höhere Konzentration BrdU-markierter Zellkerne in der SGZ gegenüber WT-Mäusen zeigten. In diesem Experiment ist somit ein positiver Einfluss des heterozygoten und homozygoten *5-HTT-KO* auf die Entstehungsrate neuer Zellen im GD des Hippocampus im Vergleich zu den WT-Tieren feststellbar. Im Versuch zur Feststellung der Überlebensrate neu gebildeter Zellen im Hippocampus nach vier Wochen zeigten KO-Mäuse gegenüber WT- und HET-Mäusen keine signifikant höhere Zahl BrdU-markierter Zellkerne. Auch bei der Untersuchung der Migration war beinahe die Hälfte der BrdU-markierten Zellen von der SGZ in die KZS eingewandert. Ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen *5-HTT*-Genotypen zeigte sich nicht. Offenbar hat der heterozygote oder homozygote *5-HTT-KO* keinen Einfluss auf die Überlebensrate und das Migrationsverhalten neu entstandener Zellen.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur aN in *5-HTT-KO*-Mäusen konnte weder bei der Gruppe zur Untersuchung der Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen noch bei der Untersuchung der Überlebensrate oder Migration eine Abhängigkeit der ermittelten Konzentration BrdU-positiver Zellen vom Geschlecht oder Alter gefunden werden. Es zeigte sich jedoch eine signifikante negative Korrelation zwischen dem Gewicht der Tiere und dem Anteil gewanderter Zellen im Migrationsversuch, d.h. leichtere Tiere hatten tendenziell einen höheren Anteil von in die KZS eingewanderten Zellen.

Zusammengefasst zeigt die vorliegende Arbeit zum einen, dass ältere KO- oder HET-Mäuse im Vergleich zu WT-Tieren eine erhöhte Proliferationsrate von neuronalen Vorläuferzellen aufweisen. Zum anderen konnte ein indirekter

Zusammenhang zwischen dem Gewicht der Versuchstiere und der Anzahl von in die KZS eingewanderten Zellen nachgewiesen werden. Bei einer Vergleichsuntersuchung in unserem Hause mit zwei Gruppen jüngerer adulter *5-HTT-KO* Mäuse mit einem Durchschnittsalter von 7 Wochen und 3 Monaten konnte die Beobachtung einer erhöhten Proliferation nicht gemacht werden. Wir gehen deshalb davon aus, dass in diesem *5-HTT-KO* Modell nur in höherem Alter eine veränderte 5-HT-Homöostase zu einer verstärkten Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen führt.

6 Abkürzungsverzeichnis

[¹²⁵ I]RTI-55	Radioaktiv markierter 3β-(4'-iodophenyl)tropan-2β-carboxylic acid methyl ester
[³ H]5-HT	mit Tritium markiertes Serotonin
5-HIAA	5-Hydroxyindolessigsäure
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
5-HTP	5-Hydroxytryptophan
5-HTT -/-	Homozygot funktionsloses 5-HTT-Gen (Knockout)
5-HTT	5-Hydroxytryptamin-Transporter (Serotonin - Transporter)
Abb.	Abbildung
AD	Antidepressiva
BDNF	brain derived neurotrophic factor
bFGF	basic fibroblast growth factor
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate
BSA	bovine serum albumin
CA	Cornu ammonis
cDNS	copy-Desoxyribonukleinsäure
DAB	3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EGF	epidermal growth factor
EKT	Elektrokrampftherapie
g	Gramm
GD	Gyrus dentatus
GFAP	glial fibrillary acidic protein
h	Stunden
HCl	Salzsäure
HET	Heterozygot
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
IGF-1	Insulin-like growth factor 1

kB	<u>K</u> ilob <u>as</u> enpaare
kDa	<u>K</u> ilod <u>al</u> ton
KO	<u>K</u> nock <u>o</u> ut
KZS	<u>K</u> örnerz <u>el</u> ls <u>ch</u> icht
L-ASDC	<u>L</u> - <u>A</u> minos <u>ä</u> ure- <u>D</u> ecarboxylase
LSD	(+) <u>L</u> yserg <u>sä</u> ure- <u>D</u> iethylamid
M	Molar
m(h)5-HTT	<u>M</u> uriner (<u>H</u> umaner) 5- <u>H</u> ydroxy <u>t</u> ryptamin <u>t</u> ransporter
MAO	<u>M</u> ono <u>a</u> min <u>o</u> xidase
MDMA	3,4- <u>M</u> ethylend <u>i</u> oxym <u>e</u> thamphet <u>a</u> min (Ecstasy)
MF	<u>M</u> oos <u>f</u> asern
min	<u>M</u> inuten
ml	<u>M</u> illil <u>i</u> ter
mRNS	<u>m</u> essenger- <u>R</u> ibon <u>u</u> kleins <u>ä</u> ure
NA	<u>N</u> or <u>a</u> drenalin
NaCl	Natriumchlorid
NAN	1-(2-Methoxyphenyl)-4-[4-(2-phthalimido)butyl]piperazine hydrobromide
NeuN	<u>n</u> euron-specific <u>n</u> uclear protein
NHS	<u>n</u> ormal <u>h</u> orse <u>s</u> erum
NMDA	<u>N</u> - <u>M</u> ethyl- <u>D</u> - <u>A</u> spartat
NSE	<u>N</u> euronen-spezifische <u>E</u> nolase
PBS	phosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
PFA	<u>P</u> ara <u>f</u> ormaldehyd
p-MPPI	4-Iodo-N-[2-[4-(methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-(2-pyridinyl)benzamid-monohydrochlorid
r	Korrelationskoeffizient
RK	<u>R</u> aphe <u>k</u> erne
SGZ	<u>S</u> ubgranulärz <u>e</u> lls <u>ch</u> icht
SH	<u>S</u> ulcus <u>h</u> ippocampalis
Shh	<u>S</u> onic <u>h</u> edge <u>h</u> og
SK	<u>S</u> chaffer- <u>K</u> ollaterale

SM	<u>S</u> tratum <u>m</u> oleculare des GD
SSC	<u>s</u> aline <u>s</u> odium <u>c</u> itrate
SSRI	<u>s</u> elective <u>s</u> erotonin <u>r</u> euptake <u>i</u> nhibitor
TBS	<u>t</u> ris <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
TGF α	<u>t</u> ransforming <u>g</u> rowth <u>f</u> actor <u>a</u> lpha
TP-5-H	<u>T</u> ryptophan-5- <u>H</u> ydroxylase
Tris	Tris-(hydroxymethyl-) Aminomethan
VEGF	<u>v</u> ascular <u>e</u> ndothelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
VMAT	<u>V</u> esikulärer <u>M</u> ono <u>a</u> min- <u>T</u> ransporter
WAY-100635	N-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-(2-pyridyl)cyclohexan-carboxamid
WT	<u>W</u> ildtyp
ZNS	<u>Z</u> entral <u>n</u> ervens <u>s</u> ystem
μ m	Mikrometer

7 Literaturverzeichnis

- Aberg, M. A., Aberg, N. D., Hedbacker, H., Oscarsson, J. and Eriksson, P. S. (2000). "*Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus.*" J Neurosci **20**(8): 2896-903.
- Abrous, D. N., Adriani, W., Montaron, M. F., Aourousseau, C., Rougon, G., Le Moal, M. and Piazza, P. V. (2002). "*Nicotine self-administration impairs hippocampal plasticity.*" J Neurosci **22**(9): 3656-62.
- Ahmed, S., Reynolds, B. A. and Weiss, S. (1995). "*BDNF enhances the differentiation but not the survival of CNS stem cell- derived neuronal precursors.*" J Neurosci **15**(8): 5765-78.
- Altemus, M., Murphy, D. L., Greenberg, B. and Lesch, K. P. (1996). "*Intact coding region of the serotonin transporter gene in obsessive- compulsive disorder.*" Am J Med Genet **67**(4): 409-11.
- Altman, J. and Das, G. D. (1965). "*Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats.*" J Comp Neurol **124**(3): 319-35.
- Alvarez-Buylla, A. and Garcia-Verdugo, J. M. (2002). "*Neurogenesis in adult subventricular zone.*" J Neurosci **22**(3): 629-34.
- Arora, R. C. and Meltzer, H. Y. (1989a). "*3H-imipramine binding in the frontal cortex of suicides.*" Psychiatry Res **30**(2): 125-35.
- Arora, R. C. and Meltzer, H. Y. (1989b). "*Serotonergic measures in the brains of suicide victims: 5-HT₂ binding sites in the frontal cortex of suicide victims and control subjects.*" Am J Psychiatry **146**(6): 730-6.
- Arsenijevic, Y. and Weiss, S. (1998). "*Insulin-like growth factor-I is a differentiation factor for postmitotic CNS stem cell-derived neuronal precursors: distinct actions from those of brain-derived neurotrophic factor.*" J Neurosci **18**(6): 2118-28.
- Asberg, M., Traskman, L. and Thoren, P. (1976). "*5-HIAA in the cerebrospinal fluid. A biochemical suicide predictor?*" Arch Gen Psychiatry **33**(10): 1193-7.
- Azmitia, E. C., Gannon, P. J., Kheck, N. M. and Whitaker-Azmitia, P. M. (1996). "*Cellular localization of the 5-HT_{1A} receptor in primate brain neurons and glial cells.*" Neuropsychopharmacology **14**(1): 35-46.

- Backhouse, B., Barochovsky, O., Malik, C., Patel, A. J. and Lewis, P. D. (1982). "Effects of haloperidol on cell proliferation in the early postnatal rat brain." *Neuropathol Appl Neurobiol* **8**(2): 109-16.
- Backstrom, I., Bergstrom, M. and Marcusson, J. (1989). "High affinity [³H]paroxetine binding to serotonin uptake sites in human brain tissue." *Brain Res* **486**(2): 261-8.
- Balkovetz, D. F., Tiruppathi, C., Leibach, F. H., Mahesh, V. B. and Ganapathy, V. (1989). "Evidence for an imipramine-sensitive serotonin transporter in human placental brush-border membranes." *J Biol Chem* **264**(4): 2195-8.
- Barker, E. L. and Blakely, R. D. (1995). Norepinephrine and serotonin transporters: molecular targets of antidepressant drugs. *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*. Bloom, F. E. New York, Raven Press.
- Barnea, A. and Nottebohm, F. (1994). "Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(23): 11217-21.
- Baumgarten, H. G. and Grozdanovic, Z. (1995). "Psychopharmacology of central serotonergic systems." *Pharmacopsychiatry* **28 Suppl 2**: 73-9.
- Benes, F. M., Kwok, E. W., Vincent, S. L. and Todtenkopf, M. S. (1998). "A reduction of nonpyramidal cells in sector CA2 of schizophrenics and manic depressives [see comments]." *Biol Psychiatry* **44**(2): 88-97.
- Bengel, D., Heils, A., Petri, S., Seemann, M., Glatz, K., Andrews, A., Murphy, D. L. and Lesch, K. P. (1997). "Gene structure and 5'-flanking regulatory region of the murine serotonin transporter." *Brain Res Mol Brain Res* **44**(2): 286-92.
- Bengel, D., Murphy, D. L., Andrews, A. M., Wichems, C. H., Feltner, D., Heils, A., Mossner, R., Westphal, H. and Lesch, K. P. (1998). "Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice." *Mol Pharmacol* **53**(4): 649-55.
- Bernier, P. J., Bedard, A., Vinet, J., Levesque, M. and Parent, A. (2002). "Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(17): 11464-9.
- Biebl, M., Cooper, C. M., Winkler, J. and Kuhn, H. G. (2000). "Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain." *Neurosci Lett* **291**(1): 17-20.

- Biegon, A., Essar, N., Israeli, M., Elizur, A., Bruch, S. and Bar-Nathan, A. A. (1990a). "Serotonin 5-HT₂ receptor binding on blood platelets as a state dependent marker in major affective disorder." *Psychopharmacology* **102**(1): 73-5.
- Biegon, A., Grinspoon, A., Blumenfeld, B., Bleich, A., Apter, A. and Mester, R. (1990b). "Increased serotonin 5-HT₂ receptor binding on blood platelets of suicidal men." *Psychopharmacology* **100**(2): 165-7.
- Blakely, R. D., Berson, H. E., Fremeau, R. T., Jr., Caron, M. G., Peek, M. M., Prince, H. K. and Bradley, C. C. (1991). "Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain." *Nature* **354**(6348): 66-70.
- Boldrini, M., Underwood, M. D., Hen, R., Rosoklija, G. B., Dwork, A. J., John Mann, J. and Arango, V. (2009). "Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus." *Neuropsychopharmacology* **34**(11): 2376-89.
- Braak, H. (1972). "[Pigmentarchitecture of the human cortex cerebri. I. Regio entorhinalis]." *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **127**(3): 407-38.
- Bremner, J. D., Narayan, M., Anderson, E. R., Staib, L. H., Miller, H. L. and Charney, D. S. (2000). "Hippocampal volume reduction in major depression." *Am J Psychiatry* **157**(1): 115-8.
- Brezun, J. M. and Daszuta, A. (1999). "Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats." *Neuroscience* **89**(4): 999-1002.
- Brezun, J. M. and Daszuta, A. (2000). "Serotonergic reinnervation reverses lesion-induced decreases in PSA- NCAM labeling and proliferation of hippocampal cells in adult rats." *Hippocampus* **10**(1): 37-46.
- Briley, M. S., Langer, S. Z., Raisman, R., Sechter, D. and Zarifian, E. (1980a). "Tritiated imipramine binding sites are decreased in platelets of untreated depressed patients." *Science* **209**(4453): 303-5.
- Briley, M. S., Raisman, R., Sechter, D., Zarifian, E. and Langer, S. Z. (1980b). "[³H]-Imipramine binding in human platelets: a new biochemical parameter in depression." *Neuropharmacology* **19**(12): 1209-10.
- Brodie, B. B., Pletscher, A. and Shore, P. A. (1956). "Possible role of serotonin in brain function and in reserpine action." *J Pharmacol Exp Ther* **116**(9).
- Brook, F. A. and Gardner, R. L. (1997). "The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(11): 5709-12.

- Bruns, D., Engert, F. and Lux, H. D. (1993). "A fast activating presynaptic reuptake current during serotonergic transmission in identified neurons of *Hirudo*." *Neuron* **10**(4): 559-72.
- Burgess, C., O'Donohoe, A. and Gill, M. (2000). "Agony and ecstasy: a review of MDMA effects and toxicity." *Eur Psychiatry* **15**(5): 287-94.
- Cameron, H. A. and Gould, E. (1996). "Distinct populations of cells in the adult dentate gyrus undergo mitosis or apoptosis in response to adrenalectomy." *J Comp Neurol* **369**(1): 56-63.
- Chang, A. S., Chang, S. M., Starnes, D. M., Schroeter, S., Bauman, A. L. and Blakely, R. D. (1996). "Cloning and expression of the mouse serotonin transporter." *Brain Res Mol Brain Res* **43**(1-2): 185-92.
- Chen, G., Rajkowska, G., Du, F., Seraji-Bozorgzad, N. and Manji, H. K. (2000). "Enhancement of hippocampal neurogenesis by lithium." *J Neurochem* **75**(4): 1729-34.
- Chen, H. T., Clark, M. and Goldman, D. (1992). "Quantitative autoradiography of 3H-paroxetine binding sites in rat brain." *J Pharmacol Toxicol Methods* **27**(4): 209-16.
- Cheng, Y., Black, I. B. and DiCicco-Bloom, E. (2002). "Hippocampal granule neuron production and population size are regulated by levels of bFGF." *Eur J Neurosci* **15**(1): 3-12.
- Choi, S. H., Li, Y., Parada, L. F. and Sisodia, S. S. (2009). "Regulation of hippocampal progenitor cell survival, proliferation and dendritic development by BDNF." *Mol Neurodegener* **4**(1): 52.
- Cooper-Kuhn, C. M. and Kuhn, H. G. (2002). "Is it all DNA repair? Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain." *Brain Res Dev Brain Res* **134**(1-2): 13-21.
- Coppen, A. (1967). "The biochemistry of affective disorders." *Br J Psychiatry* **113**(504): 1237-64.
- Cortes, R., Soriano, E., Pazos, A., Probst, A. and Palacios, J. M. (1988). "Autoradiography of antidepressant binding sites in the human brain: localization using [3H]imipramine and [3H]paroxetine." *Neuroscience* **27**(2): 473-96.
- Cuppini, R., Ciaroni, S., Cecchini, T., Ambrogini, P., Ferri, P., Cuppini, C., Ninfali, P. and Del Grande, P. (2002). "Tocopherols enhance neurogenesis in dentate gyrus of adult rats." *Int J Vitam Nutr Res* **72**(3): 170-6.

- Czeh, B., Welt, T., Fischer, A. K., Erhardt, A., Schmitt, W., Muller, M. B., Toschi, N., Fuchs, E. and Keck, M. E. (2002). "*Chronic psychosocial stress and concomitant repetitive transcranial magnetic stimulation: effects on stress hormone levels and adult hippocampal neurogenesis.*" *Biol Psychiatry* **52**(11): 1057-65.
- Dawirs, R. R., Hildebrandt, K. and Teuchert-Noodt, G. (1998). "*Adult treatment with haloperidol increases dentate granule cell proliferation in the gerbil hippocampus.*" *J Neural Transm* **105**(2-3): 317-27.
- Di Bella, D., Catalano, M., Balling, U., Smeraldi, E. and Lesch, K. P. (1996). "*Systematic screening for mutations in the coding region of the human serotonin transporter (5-HTT) gene using PCR and DGGE.*" *Am J Med Genet* **67**(6): 541-5.
- Dugar, A., Keck, B. J., Maines, L. W., Miller, S., Njai, R. and Lakoski, J. M. (2001). "*Compensatory responses in the aging hippocampal serotonergic system following neurodegenerative injury with 5,7-dihydroxytryptamine.*" *Synapse* **39**(2): 109-21.
- Duman, R. S., Malberg, J. and Thome, J. (1999). "*Neural plasticity to stress and antidepressant treatment.*" *Biol Psychiatry* **46**(9): 1181-91.
- Duman, R. S., Nakagawa, S. and Malberg, J. (2001). "*Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment.*" *Neuropsychopharmacology* **25**(6): 836-44.
- Duvernoy, H. (1988). *The human hippocampus.* München, J.F. Bergmann Verlag.
- Eisch, A. J., Barrot, M., Schad, C. A., Self, D. W. and Nestler, E. J. (2000). "*Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus.*" *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(13): 7579-84.
- Ellis, P. M. and Salmond, C. (1994). "*Is platelet imipramine binding reduced in depression? A meta-analysis.*" *Biol Psychiatry* **36**(5): 292-9.
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A. and Gage, F. H. (1998). "*Neurogenesis in the adult human hippocampus.*" *Nat Med* **4**(11): 1313-7.
- Essmann, W. B. (1978). *Serotonin distribution in tissue and fluids. Serotonin in health and disease.* New York, Spectrum. **1**.
- Fabre, V., Beaufour, C., Evrard, A., Rioux, A., Hanoun, N., Lesch, K. P., Murphy, D. L., Lanfumey, L., Hamon, M. and Martres, M. P. (2000). "*Altered expression and functions of serotonin 5-HT1A and 5-HT1B*

- receptors in knock-out mice lacking the 5-HT transporter.*" Eur J Neurosci **12**(7): 2299-310.
- Fanburg, B. L. and Lee, S. L. (1997). "A new role for an old molecule: serotonin as a mitogen." Am J Physiol **272**(5 Pt 1): L795-806.
- Ferland, R. J., Gross, R. A. and Applegate, C. D. (2002). "Increased mitotic activity in the dentate gyrus of the hippocampus of adult C57BL/6J mice exposed to the flurothyl kindling model of epileptogenesis." Neuroscience **115**(3): 669-83.
- Fischer, A. K., von Rosenstiel, P., Fuchs, E., Goula, D., Almeida, O. F. and Czeh, B. (2002). "The prototypic mineralocorticoid receptor agonist aldosterone influences neurogenesis in the dentate gyrus of the adrenalectomized rat." Brain Res **947**(2): 290-3.
- Frishman, W. H., Huberfeld, S., Okin, S., Wang, Y. H., Kumar, A. and Shareef, B. (1995). "Serotonin and serotonin antagonism in cardiovascular and non- cardiovascular disease." J Clin Pharmacol **35**(6): 541-72.
- Fukushima, S., Shen, H., Hata, H., Ohara, A., Ohmi, K., Ikeda, K., Numachi, Y., Kobayashi, H., Hall, F. S., Uhl, G. R. and Sora, I. (2007). "Methamphetamine-induced locomotor activity and sensitization in dopamine transporter and vesicular monoamine transporter 2 double mutant mice." Psychopharmacology (Berl).
- Gaspar, P., Cases, O. and Maroteaux, L. (2003). "The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics." Nat Rev Neurosci **4**(12): 1002-12.
- Gensburger, C., Labourdette, G. and Sensenbrenner, M. (1987). "Brain basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation of rat neuronal precursor cells in vitro." FEBS Lett **217**(1): 1-5.
- Goldman, S. A. and Nottebohm, F. (1983). "Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(8): 2390-4.
- Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A. and Shors, T. J. (1999a). "Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation [see comments]." Nat Neurosci **2**(3): 260-5.
- Gould, E., Cameron, H. A., Daniels, D. C., Woolley, C. S. and McEwen, B. S. (1992). "Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus." J Neurosci **12**(9): 3642-50.

- Gould, E., Cameron, H. A. and McEwen, B. S. (1994). "*Blockade of NMDA receptors increases cell death and birth in the developing rat dentate gyrus.*" J Comp Neurol **340**(4): 551-65.
- Gould, E., McEwen, B. S., Tanapat, P., Galea, L. A. and Fuchs, E. (1997). "*Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation.*" J Neurosci **17**(7): 2492-8.
- Gould, E., Reeves, A. J., Fallah, M., Tanapat, P., Gross, C. G. and Fuchs, E. (1999b). "*Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates.*" Proc Natl Acad Sci U S A **96**(9): 5263-7.
- Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B. S., Flugge, G. and Fuchs, E. (1998). "*Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress.*" Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 3168-71.
- Grassi Zucconi, G. and Giuditta, A. (2002). "*Is it only neurogenesis?*" Rev Neurosci **13**(4): 375-82.
- Gregor, P., Patel, A., Shimada, S., Lin, C. L., Rochelle, J. M., Kitayama, S., Seldin, M. F. and Uhl, G. R. (1993). "*Murine serotonin transporter: sequence and localization to chromosome 11.*" Mamm Genome **4**(5): 283-4.
- Haddjeri, N., Blier, P. and de Montigny, C. (1998). "*Long-term antidepressant treatments result in a tonic activation of forebrain 5-HT_{1A} receptors.*" J Neurosci **18**(23): 10150-6.
- Hensler, J. G., Ferry, R. C., Labow, D. M., Kovachich, G. B. and Frazer, A. (1994). "*Quantitative autoradiography of the serotonin transporter to assess the distribution of serotonergic projections from the dorsal raphe nucleus.*" Synapse **17**(1): 1-15.
- Hoffman, B. J. (1994). "*Expression cloning of a serotonin transporter: a new way to study antidepressant drugs.*" Pharmacopsychiatry **27**(1): 16-22.
- Hoffman, B. J., Mezey, E. and Brownstein, M. J. (1991). "*Cloning of a serotonin transporter affected by antidepressants.*" Science **254**(5031): 579-80.
- Holmes, A., Lit, Q., Murphy, D. L., Gold, E. and Crawley, J. N. (2003). "*Abnormal anxiety-related behavior in serotonin transporter null mutant mice: the influence of genetic background.*" Genes Brain Behav **2**(6): 365-80.

- Holmes, A., Murphy, D. L. and Crawley, J. N. (2002a). "*Reduced aggression in mice lacking the serotonin transporter.*" *Psychopharmacology (Berl)* **161**(2): 160-7.
- Holmes, A., Yang, R. J. and Crawley, J. N. (2002b). "*Evaluation of an anxiety-related phenotype in galanin overexpressing transgenic mice.*" *J Mol Neurosci* **18**(1-2): 151-65.
- Holmes, A., Yang, R. J., Murphy, D. L. and Crawley, J. N. (2002c). "*Evaluation of antidepressant-related behavioral responses in mice lacking the serotonin transporter.*" *Neuropsychopharmacology* **27**(6): 914-23.
- Hviid, L. B., Ravnkilde, B., Ahdidan, J., Rosenberg, R., Stodkilde-Jorgensen, H. and Videbech, P. "*Hippocampal visuospatial function and volume in remitted depressed patients: An 8-year follow-up study.*" *J Affect Disord*.
- Jacobs, B. L. and Fornal, C. A. (1999). "*Chronic fluoxetine treatment increases hippocampal neurogenesis in rats: a novel theory of depression.*" *Soc. Neurosci. Abs.* **25**: 714.
- Jacobs, B. L., Praag, H. and Gage, F. H. (2000). "*Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression.*" *Mol Psychiatry* **5**(3): 262-9.
- Jacobs, B. L., Tanapat, P., Reeves, A. and Gould, E. (1998a). "*Serotonin stimulates the production of new hippocampal granule neurons via the 5-HT1A receptor in the adult rat.*" *Soc. Neurosci. Abs.* **24**: 1992.
- Jacobs, B. L., Tanapat, P., Reeves, A. J. and Gould, E. (1998b). "*Serotonin stimulates the production of new hippocampal granule neurons via the 5HT1A receptor in the adult rat.*" *Soc. Neurosci. Abs.* **24**: 1992.
- Janowsky, D. S., el-Yousef, M. K., Davis, J. M. and Sekerke, H. J. (1972). "*A cholinergic-adrenergic hypothesis of mania and depression.*" *Lancet* **2**(7778): 632-5.
- Jin, K., Xie, L., Childs, J., Sun, Y., Mao, X. O., Logvinova, A. and Greenberg, D. A. (2003). "*Cerebral neurogenesis is induced by intranasal administration of growth factors.*" *Ann Neurol* **53**(3): 405-9.
- Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X. O., Xie, L. and Greenberg, D. A. (2002). "*Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo.*" *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(18): 11946-50.
- Joels, M., Heslen, W. and de Kloet, E. R. (1991). "*Mineralocorticoid hormones suppress serotonin-induced hyperpolarization of rat hippocampal CA1 neurons.*" *J Neurosci* **11**(8): 2288-94.

- Juckel, G., Mendlin, A. and Jacobs, B. L. (1999). "*Electrical stimulation of rat medial prefrontal cortex enhances forebrain serotonin output: implications for electroconvulsive therapy and transcranial magnetic stimulation in depression.*" *Neuropsychopharmacology* **21**(3): 391-8.
- Kee, N., Sivalingam, S., Boonstra, R. and Wojtowicz, J. M. (2002). "*The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis.*" *J Neurosci Methods* **115**(1): 97-105.
- Kempermann, G. (2001). *Aktivitätsabhängige Regulation von Neurogenese im erwachsenen Hippocampus.* Humboldt-Universität zu Berlin.
- Kempermann, G. and Gage, F. H. (1999). "*Experience-dependent regulation of adult hippocampal neurogenesis: effects of long-term stimulation and stimulus withdrawal.*" *Hippocampus* **9**(3): 321-32.
- Kempermann, G. and Gage, F. H. (2002). "*Genetic influence on phenotypic differentiation in adult hippocampal neurogenesis.*" *Brain Res Dev Brain Res* **134**(1-2): 1-12.
- Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M. and Gage, F. H. (2003). "*Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice.*" *Development* **130**(2): 391-9.
- Kempermann, G., Kuhn, H. G. and Gage, F. H. (1997a). "*Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice.*" *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(19): 10409-14.
- Kempermann, G., Kuhn, H. G. and Gage, F. H. (1997b). "*More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment.*" *Nature* **386**(6624): 493-5.
- Kempermann, G., Kuhn, H. G. and Gage, F. H. (1998). "*Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus.*" *J Neurosci* **18**(9): 3206-12.
- Kia, H. K., Miquel, M. C., Brisorgueil, M. J., Daval, G., Riad, M., El Mestikawy, S., Hamon, M. and Verge, D. (1996). "*Immunocytochemical localization of serotonin_{1A} receptors in the rat central nervous system.*" *J Comp Neurol* **365**(2): 289-305.
- Kim, E. H., Kim, Y. J., Lee, H. J., Huh, Y., Chung, J. H., Seo, J. C., Kang, J. E., Yim, S. V. and Kim, C. J. (2001). "*Acupuncture increases cell proliferation in dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils.*" *Neurosci Lett* **297**(1): 21-4.

- Kokaia, Z. and Lindvall, O. (2003). "*Neurogenesis after ischaemic brain insults.*" *Curr Opin Neurobiol* **13**(1): 127-32.
- Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H. and Gage, F. H. (1996). "*Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation.*" *J Neurosci* **16**(6): 2027-33.
- Kuhn, H. G., Winkler, J., Kempermann, G., Thal, L. J. and Gage, F. H. (1997). "*Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain.*" *J Neurosci* **17**(15): 5820-9.
- Kuroda, Y., Watanabe, Y. and McEwen, B. S. (1994). "*Tianeptine decreases both serotonin transporter mRNA and binding sites in rat brain.*" *Eur J Pharmacol* **268**(1): R3-5.
- Küttler, T. (1996). *Pharmakologie und Toxikologie*. Lübeck Stuttgart Jena Ulm, G. Fischer.
- Lagace, D. C., Fischer, S. J. and Eisch, A. J. (2007). "*Gender and endogenous levels of estradiol do not influence adult hippocampal neurogenesis in mice.*" *Hippocampus* **17**(3): 175-80.
- Lai, K., Kaspar, B. K., Gage, F. H. and Schaffer, D. V. (2003). "*Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo.*" *Nat Neurosci* **6**(1): 21-7.
- Langer, S. Z. and Schoemaker, H. (1988). "*Effects of antidepressants on monoamine transporters.*" *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **12**(2-3): 193-216.
- Langer, S. Z., Zarifian, E., Briley, M., Raisman, R. and Sechter, D. (1981). "*High-affinity binding of 3H-imipramine in brain and platelets and its relevance to the biochemistry of affective disorders.*" *Life Sci* **29**(3): 211-20.
- Lauder, J. M., Wallace, J. A. and Krebs, H. (1981). "*Roles for serotonin in neuroembryogenesis.*" *Adv Exp Med Biol* **133**: 477-506.
- Lee, T., Jarome, T., Li, S. J., Kim, J. J. and Helmstetter, F. J. (2009). "*Chronic stress selectively reduces hippocampal volume in rats: a longitudinal magnetic resonance imaging study.*" *Neuroreport* **20**(17): 1554-8.
- Lemaire, V., Aourousseau, C., Le Moal, M. and Abrous, D. N. (1999). "*Behavioural trait of reactivity to novelty is related to hippocampal neurogenesis.*" *Eur J Neurosci* **11**(11): 4006-14.

- Lesch, K. P. (1991). "[Psychobiology of compulsive disease]." *Fortschr Neurol Psychiatr* **59**(10): 404-12.
- Lesch, K. P. (2001a). "Serotonergic gene expression and depression: implications for developing novel antidepressants." *J Affect Disord* **62**(1-2): 57-76.
- Lesch, K. P. (2001b). "Variation of serotonergic gene expression: neurodevelopment and the complexity of response to psychopharmacologic drugs." *Eur Neuropsychopharmacol* **11**(6): 457-74.
- Lesch, K. P., Aulakh, C. S., Wolozin, B. L., Tolliver, T. J., Hill, J. L. and Murphy, D. L. (1993a). "Regional brain expression of serotonin transporter mRNA and its regulation by reuptake inhibiting antidepressants." *Brain Res Mol Brain Res* **17**(1-2): 31-5.
- Lesch, K. P., Balling, U., Gross, J., Strauss, K., Wolozin, B. L., Murphy, D. L. and Riederer, P. (1994). "Organization of the human serotonin transporter gene." *J Neural Transm Gen Sect* **95**(2): 157-62.
- Lesch, K. P. and Beckmann, H. (1990). "[The serotonin hypothesis of depression]." *Fortschr Neurol Psychiatr* **58**(11): 427-38.
- Lesch, K. P. and Bengel, D. (1995a). "Neurotransmitter reuptake mechanisms: targets for drugs to study and treat psychiatric, neurological and neurodegenerative disorders." *CNS Drugs* **4**: 302-322.
- Lesch, K. P., Bengel, D., Heils, A., Sabol, S. Z., Greenberg, B. D., Petri, S., Benjamin, J., Muller, C. R., Hamer, D. H. and Murphy, D. L. (1996). "Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region [see comments]." *Science* **274**(5292): 1527-31.
- Lesch, K. P., Gross, J., Franzek, E., Wolozin, B. L., Riederer, P. and Murphy, D. L. (1995b). "Primary structure of the serotonin transporter in unipolar depression and bipolar disorder." *Biol Psychiatry* **37**(4): 215-23.
- Lesch, K. P. and Moessner, R. (1999). "Knockout corner: 5-HT_{1A} receptor inactivation: anxiety or depression as a murine experience." *International J. of Neuropsychopharmacology* **2**: 327-331.
- Lesch, K. P. and Moessner, R. (1998). "Genetically driven variation in serotonin uptake: is there a link to affective spectrum, neurodevelopmental, and neurodegenerative disorders?" *Biol Psychiatry* **44**(3): 179-92.
- Lesch, K. P., Wolozin, B. L., Estler, H. C., Murphy, D. L. and Riederer, P. (1993b). "Isolation of a cDNA encoding the human brain serotonin transporter." *J Neural Transm Gen Sect* **91**(1): 67-72.

- Lesch, K. P., Wolozin, B. L., Murphy, D. L. and Riederer, P. (1993c). "*Primary structure of the human platelet serotonin uptake site: identity with the brain serotonin transporter.*" *J Neurochem* **60**(6): 2319-22.
- Levine, S., Deo, R. and Mahadevan, K. (1987). "*A comparative trial of a new antidepressant, fluoxetine.*" *Br J Psychiatry* **150**: 653-5.
- Li, Q., Wichems, C., Heils, A., Lesch, K. P. and Murphy, D. L. (2000). "*Reduction in the density and expression, but not G-protein coupling, of serotonin receptors (5-HT_{1A}) in 5-HT transporter knock-out mice: gender and brain region differences.*" *J Neurosci* **20**(21): 7888-95.
- Lie, D. C., Song, H., Colamarino, S. A., Ming, G. L. and Gage, F. H. (2004). "*Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases.*" *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**: 399-421.
- Lira, A., Zhou, M., Castanon, N., Ansorge, M. S., Gordon, J. A., Francis, J. H., Bradley-Moore, M., Lira, J., Underwood, M. D., Arango, V., Kung, H. F., Hofer, M. A., Hen, R. and Gingrich, J. A. (2003). "*Altered depression-related behaviors and functional changes in the dorsal raphe nucleus of serotonin transporter-deficient mice.*" *Biol Psychiatry* **54**(10): 960-71.
- Lois, C., Garcia-Verdugo, J. M. and Alvarez-Buylla, A. (1996). "*Chain migration of neuronal precursors.*" *Science* **271**(5251): 978-81.
- Lopez, J. F., Chalmers, D. T., Vazquez, D. M., Watson, S. J. and Akil, H. (1994). "*Serotonin transporter mRNA in rat brain is regulated by classical antidepressants.*" *Biol Psychiatry* **35**(4): 287-90.
- Lupien, S. J., de Leon, M., de Santi, S., Convit, A., Tarshish, C., Nair, N. P., Thakur, M., McEwen, B. S., Hauger, R. L. and Meaney, M. J. (1998). "*Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits [see comments] [published erratum appears in Nat Neurosci 1998 Aug;1(4):329].*" *Nat Neurosci* **1**(1): 69-73.
- Luskin, M. B. (1993). "*Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone.*" *Neuron* **11**(1): 173-89.
- Malberg, J. E., Eisch, A. J., Nestler, E. J. and Duman, R. S. (2000). "*Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus.*" *J Neurosci* **20**(24): 9104-10.
- Malison, R. T., Price, L. H., Berman, R., van Dyck, C. H., Pelton, G. H., Carpenter, L., Sanacora, G., Owens, M. J., Nemeroff, C. B., Rajeevan, N., Baldwin, R. M., Seibyl, J. P., Innis, R. B. and Charney, D. S. (1998). "*Reduced brain serotonin transporter availability in major depression as*

- measured by [123I]-2 beta-carbomethoxy-3 beta-(4-iodophenyl)tropane and single photon emission computed tomography [see comments]." *Biol Psychiatry* **44**(11): 1090-8.
- Mann, J. J., Arango, V., Marzuk, P. M., Theccanat, S. and Reis, D. J. (1989). "Evidence for the 5-HT hypothesis of suicide. A review of post-mortem studies." *Br J Psychiatry Suppl*(8): 7-14.
- Mann, J. J., Stanley, M., McBride, P. A. and McEwen, B. S. (1986). "Increased serotonin2 and beta-adrenergic receptor binding in the frontal cortices of suicide victims." *Arch Gen Psychiatry* **43**(10): 954-9.
- Markakis, E. A. and Gage, F. H. (1999). "Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles." *J Comp Neurol* **406**(4): 449-60.
- Mathews, T. A., Fedele, D. E., Unger, E. L., Coppelli, F. A., Lesch, K. P., Murphy, D. L. and Andrews, A. M. (2002). "3,4-Methylenedioxymethamphetamine-induced dopamine release does not stimulate locomotor activity in serotonin transporter knockout mice: role of serotonin and the 5-HT1B-receptor." Manuscript in preparation.
- Mathews, T. A., Fedele, D. E., Unger, E. L., Lesch, K. P., Murphy, D. L. and Andrews, A. M. (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. Abs.* **30**: 624.3.
- McLaughlin, D. P., Little, K. Y., Lopez, J. F. and Watson, S. J. (1996). "Expression of serotonin transporter mRNA in human brainstem raphe nuclei." *Neuropsychopharmacology* **15**(5): 523-9.
- Mellerup, E. T. and Plenge, P. (1988). "Imipramine binding in depression and other psychiatric conditions." *Acta Psychiatr Scand Suppl* **345**: 61-8.
- Meltzer, H. Y., Arora, R. C., Baber, R. and Tricou, B. J. (1981). "Serotonin uptake in blood platelets of psychiatric patients." *Arch Gen Psychiatry* **38**(12): 1322-6.
- Meltzer, H. Y., Lowy, M. T. and Koenig, J. I. (1987). "The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in depression." *Adv Biochem Psychopharmacol* **43**: 165-82.
- Moiseiwitsch, J. R. and Lauder, J. M. (1995). "Serotonin regulates mouse cranial neural crest migration." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(16): 7182-6.
- Mossner, R., Schmitt, A., Hennig, T., Benninghoff, J., Gerlach, M., Riederer, P., Deckert, J. and Lesch, K. P. (2004). "Quantitation of 5HT3 receptors in

- forebrain of serotonin transporter deficient mice.*" J Neural Transm **111**(1): 27-35.
- Murphy, D. L., Andrews, A., Wichems, C., Li, Q., Tohda, M. and Greenberg, B. (1998). "*Brain serotonin transmission: an overview and update with emphasis on serotonin subsystem heterogeneity, multiple receptors, interactions with other neurotransmitter systems, and consequent implications for understanding the actions of serotonergic drugs.*" J Clin Psychiatry **59**(Suppl 15): 4-12.
- Murphy, D. L., Greenberg, B. and Altemus, M. (1996). The neuropharmacology and neurobiology of obsessive-compulsive disorder: an update on the serotonin hypothesis. Advances in the neurobiology of anxiety disorders. Westernberg, H. G. M. New York, Wiley Publications.
- Murphy, D. L. and Lesch, K. P. (2008). "*Targeting the murine serotonin transporter: insights into human neurobiology.*" Nat Rev Neurosci **9**(2): 85-96.
- Nacher, J., Alonso-Llosa, G., Rosell, D. R. and McEwen, B. S. (2003). "*NMDA receptor antagonist treatment increases the production of new neurons in the aged rat hippocampus.*" Neurobiol Aging **24**(2): 273-84.
- Nemeroff, C. B. (1992). "*The presynaptic serotonin uptake site in depression.*" Clin Neuropharmacol **15**(Suppl 1 Pt A): 347A-348A.
- Nibuya, M., Morinobu, S. and Duman, R. S. (1995). "*Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments.*" J Neurosci **15**(11): 7539-47.
- Nieuwenhuys, R. (1985). Chemoarchitecture of the brain. Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag.
- Nieuwenhuys, R., Voogd, J. and Van Huijzen, C. (1988). The human central nervous system. Heidelberg, Springer-Verlag.
- Nilsson, M., Perfilieva, E., Johansson, U., Orwar, O. and Eriksson, P. S. (1999). "*Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory.*" J Neurobiol **39**(4): 569-78.
- Nixon, K. and Crews, F. T. (2002). "*Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus.*" J Neurochem **83**(5): 1087-93.
- Owens, M. J. and Nemeroff, C. B. (1994). "*Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter.*" Clin Chem **40**(2): 288-95.

- Packard, D. S., Jr., Menzies, R. A. and Skalko, R. G. (1973). "*Incorporation of thymidine and its analogue, bromodeoxyuridine, into embryos and maternal tissues of the mouse.*" *Differentiation* **1**(6): 397-404.
- Pagano, S. F., Impagnatiello, F., Girelli, M., Cova, L., Grioni, E., Onofri, M., Cavallaro, M., Etteri, S., Vitello, F., Giombini, S., Solero, C. L. and Parati, E. A. (2000). "*Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb.*" *Stem Cells* **18**(4): 295-300.
- Palmer, T. D., Willhoite, A. R. and Gage, F. H. (2000). "*Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis.*" *J Comp Neurol* **425**(4): 479-94.
- Pandey, G. N., Pandey, S. C., Janicak, P. G., Marks, R. C. and Davis, J. M. (1990). "*Platelet serotonin-2 receptor binding sites in depression and suicide.*" *Biol Psychiatry* **28**(3): 215-22.
- Pare, C. M., Yeung, D. P., Price, K. and Stacey, R. S. (1969). "*5-hydroxytryptamine, noradrenaline, and dopamine in brainstem, hypothalamus, and caudate nucleus of controls and of patients committing suicide by coal-gas poisoning.*" *Lancet* **2**(7612): 133-5.
- Parent, J. M., Tada, E., Fike, J. R. and Lowenstein, D. H. (1999). "*Inhibition of dentate granule cell neurogenesis with brain irradiation does not prevent seizure-induced mossy fiber synaptic reorganization in the rat.*" *J Neurosci* **19**(11): 4508-19.
- Parihar, V. K., Hattiangady, B., Kuruba, R., Shuai, B. and Shetty, A. K. (2009). "*Predictable chronic mild stress improves mood, hippocampal neurogenesis and memory.*" *Mol Psychiatry*.
- Park, H. J., Lim, S., Lee, H. S., Lee, H. J., Yoo, Y. M., Kim, S. A., Yin, C. S., Seo, J. C. and Chung, J. H. (2002). "*Acupuncture enhances cell proliferation in dentate gyrus of maternally-separated rats.*" *Neurosci Lett* **319**(3): 153-6.
- Paul, S. M., Rehavi, M., Skolnick, P., Ballenger, J. C. and Goodwin, F. K. (1981). "*Depressed patients have decreased binding of tritiated imipramine to platelet serotonin "transporter".*" *Arch Gen Psychiatry* **38**(12): 1315-7.
- Pawlak, R., Skrzypiec, A., Sulkowski, S. and Buczko, W. (2002). "*Ethanol-induced neurotoxicity is counterbalanced by increased cell proliferation in mouse dentate gyrus.*" *Neurosci Lett* **327**(2): 83-6.
- Perry, E. K., Marshall, E. F., Blessed, G., Tomlinson, B. E. and Perry, R. H. (1983). "*Decreased imipramine binding in the brains of patients with depressive illness.*" *Br J Psychiatry* **142**: 188-92.

- Pichot, P. (1991). Historische Betrachtung des Serotonins bei Angstzuständen und Depression. Serotonin. Heinrich, K., Hippus, H. and Pödingler, W. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. **2**.
- Pineyro, G., Blier, P., Dennis, T. and de Montigny, C. (1994). "*Desensitization of the neuronal 5-HT carrier following its long-term blockade.*" J Neurosci **14**(5 Pt 2): 3036-47.
- Quintana, J. (1992). "*Platelet serotonin and plasma tryptophan decreases in endogenous depression. Clinical, therapeutic, and biological correlations.*" J Affect Disord **24**(2): 55-62.
- Radley, J. J. and Jacobs, B. L. (2002). "*5-HT_{1A} receptor antagonist administration decreases cell proliferation in the dentate gyrus.*" Brain Res **955**(1-2): 264-7.
- Ramamoorthy, S., Bauman, A. L., Moore, K. R., Han, H., Yang-Feng, T., Chang, A. S., Ganapathy, V. and Blakely, R. D. (1993). "*Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization.*" Proc Natl Acad Sci U S A **90**(6): 2542-6.
- Ramón y Cajal, S. (1928). Degeneration and regeneration of the nervous system. New York, Hafner.
- Ratray, M., Wotherspoon, G., Savery, D., Baldessari, S., Marden, C., Priestley, J. V. and Bendotti, C. (1994). "*Chronic D-fenfluramine decreases serotonin transporter messenger RNA expression in dorsal raphe nucleus.*" Eur J Pharmacol **268**(3): 439-42.
- Ray, J., Peterson, D. A., Schinstine, M. and Gage, F. H. (1993). "*Proliferation, differentiation, and long-term culture of primary hippocampal neurons.*" Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3602-6.
- Reif, A., Fritzen, S., Finger, M., Strobel, A., Lauer, M., Schmitt, A. and Lesch, K. P. (2006). "*Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression.*" Mol Psychiatry **11**(5): 514-22.
- Reynolds, B. A., Tetzlaff, W. and Weiss, S. (1992). "*A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes.*" J Neurosci **12**(11): 4565-74.
- Ricourte, G., Bryan, G., Strauss, L., Seiden, L. and Schuster, C. (1985). "*Hallucinogenic amphetamine selectively destroys brain serotonin nerve terminals.*" Science **229**(4717): 986-8.

- Ritz, M. C. and Kuhar, M. J. (1989). "*Relationship between self-administration of amphetamine and monoamine receptors in brain: comparison with cocaine.*" *J Pharmacol Exp Ther* **248**(3): 1010-7.
- Roy, A., De Jong, J. and Linnoila, M. (1989). "*Cerebrospinal fluid monoamine metabolites and suicidal behavior in depressed patients. A 5-year follow-up study.*" *Arch Gen Psychiatry* **46**(7): 609-12.
- Rudnick, G. (1977). "*Active transport of 5-hydroxytryptamine by plasma membrane vesicles isolated from human blood platelets.*" *J Biol Chem* **252**(7): 2170-4.
- Rudnick, G. and Clark, J. (1993). "*From synapse to vesicle: the reuptake and storage of biogenic amine neurotransmitters.*" *Biochim Biophys Acta* **1144**(3): 249-63.
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C. and Hen, R. (2003). "*Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants.*" *Science* **301**(5634): 805-9.
- Scharfman, H. E., Goodman, J. H. and Sollas, A. L. (2000). "*Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis.*" *J Neurosci* **20**(16): 6144-58.
- Schildkraut, J. J. (1965). "*The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence.*" *Am J Psychiatry* **122**(5): 509-22.
- Schmidt, R. F. (1990). *Endogene und exogene Schmerzhemmung. Physiologie des Menschen.* Schmidt, R. F. and Thews, G. Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag.
- 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, D. L., Vescovi, A. and Lesch, K. P. (2007). "*Adult neurogenesis in serotonin transporter deficient mice.*" *J Neural Transm* **114**(9): 1107-19.
- Schmitt, A., Moessner, R., Gossmann, A., Fischer, I. G., Gorboulev, V., Murphy, D. L., Koepsell, H. and Lesch, K. P. (2003). "*Organic cation transporter capable of transporting serotonin is up-regulated in serotonin transporter-deficient mice.*" *J Neurosci Res* **71**(5): 701-9.
- Scott, B. W., Wojtowicz, J. M. and Burnham, W. M. (2000). "*Neurogenesis in the dentate gyrus of the rat following electroconvulsive shock seizures.*" *Exp Neurol* **165**(2): 231-6.

- Seki, T. and Arai, Y. (1995). "Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus." *Neuroreport* **6**(18): 2479-82.
- Shankaran, M., Yamamoto, B. K. and Gudelsky, G. A. (1999). "Involvement of the serotonin transporter in the formation of hydroxyl radicals induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine." *Eur J Pharmacol* **185**(2-3): 103-10.
- Shaw, D. M., Camps, F. E. and Eccleston, E. G. (1967). "5-Hydroxytryptamine in the hind-brain of depressive suicides." *Br J Psychiatry* **113**(505): 1407-11.
- Sheline, Y. I., Wang, P. W., Gado, M. H., Csernansky, J. G. and Vannier, M. W. (1996). "Hippocampal atrophy in recurrent major depression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(9): 3908-13.
- Shuey, D. L., Sadler, T. W., Tamir, H. and Lauder, J. M. (1993). "Serotonin and morphogenesis. Transient expression of serotonin uptake and binding protein during craniofacial morphogenesis in the mouse." *Anat Embryol (Berl)* **187**(1): 75-85.
- Snyder, S. H. (1990). *Chemie der Psyche: Drogenwirkungen im Gehirn, Spektrum-der-Wissenschaft-Verlagsgesellschaft.*
- Song, H. J., Stevens, C. F. and Gage, F. H. (2002). "Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons." *Nat Neurosci* **5**(5): 438-45.
- Stain-Malmgren, R., Tham, A. and Aberg-Wistedt, A. (1998). "Increased platelet 5-HT₂ receptor binding after electroconvulsive therapy in depression." *J Ect* **14**(1): 15-24.
- Stanfield, B. B. and Trice, J. E. (1988). "Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections." *Exp Brain Res* **72**(2): 399-406.
- Starke, K. and Palm, D. (1992). *Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystems. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* Forth, W., Henschler, D., Rummel, W. and Starke, K., BI-Wissenschaftsverlag.
- Takahashi, J., Takagi, Y. and Saiki, H. (2009). "Transplantation of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons in MPTP-treated monkeys." *Methods Mol Biol* **482**: 199-212.
- Takahashi, T., Nowakowski, R. S. and Caviness, V. S., Jr. (1992). "BUdR as an S-phase marker for quantitative studies of cytokinetic behaviour in the murine cerebral ventricular zone." *J Neurocytol* **21**(3): 185-97.

- Takuwa, N., Ganz, M., Takuwa, Y., Sterzel, R. B. and Rasmussen, H. (1989). "*Studies of the mitogenic effect of serotonin in rat renal mesangial cells.*" *Am J Physiol* **257**(3 Pt 2): F431-9.
- Tanapat, P., Hastings, N. B., Reeves, A. J. and 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**(14): 5792-801.
- Tatebayashi, Y., Lee, M. H., Li, L., Iqbal, K. and Grundke-Iqbal, I. (2003). "*The dentate gyrus neurogenesis: a therapeutic target for Alzheimer's disease.*" *Acta Neuropathol (Berl)* **105**(3): 225-32.
- Traskman, L., Asberg, M., Bertilsson, L. and Sjostrand, L. (1981). "*Monoamine metabolites in CSF and suicidal behavior.*" *Arch Gen Psychiatry* **38**(6): 631-6.
- Tucker, G. T., Lennard, M. S., Ellis, S. W., Woods, H. F., K., C. A., Lin, L. Y., Hiratsuka, A., Schmitz, D. A. and Chu, T. Y. (1994). "*The demethylation of methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") by debrisoquine hydroxylase (CYP2D6).*" *Biochem Pharmacol* **47**(7): 1151-6.
- Tuomisto, J. and Tukiainen, E. (1976). "*Decreased uptake of 5-hydroxytryptamine in blood platelets from depressed patients.*" *Nature* **262**(5569): 596-8.
- Uchida, K., Kumihashi, K., Kurosawa, S., Kobayashi, T., Itoi, K. and Machida, T. (2002). "*Stimulatory effects of prostaglandin e2 on neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat.*" *Zoolog Sci* **19**(11): 1211-6.
- Unger, E. L., Luellen, B. A., Lee, O., Lyons, W. E., Blue, M. E., Mamounas, L. A. and Andrews, A. M. (2002). Decreased serotonin transporter expression prevents age-related serotonergic fiber loss in the forebrain. Society for Neuroscience. Orlando.
- van der Kooy, D. and Weiss, S. (2000). "*Why stem cells?*" *Science* **287**(5457): 1439-41.
- van Praag, H., Kempermann, G. and Gage, F. H. (1999). "*Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus [see comments].*" *Nat Neurosci* **2**(3): 266-70.
- van Praag, H., Schinder, A. F., Christie, B. R., Toni, N., Palmer, T. D. and Gage, F. H. (2002). "*Functional neurogenesis in the adult hippocampus.*" *Nature* **415**(6875): 1030-4.

- Vandermaelen, C. P. (1985). Serotonin. Neurotransmitter Actions in the Vertebrate Nervous System. Rogawski, M. A. and Barker, J. L. New York, Plenum Press: 201-240.
- Verge, D., Daval, G., Marcinkiewicz, M., Patey, A., el Mestikawy, S., Gozlan, H. and Hamon, M. (1986). "*Quantitative autoradiography of multiple 5-HT1 receptor subtypes in the brain of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats.*" J Neurosci **6**(12): 3474-82.
- Vincent, S. L., Todtenkopf, M. S. and Benes, F. M. (1997). "*A comparison of the density of pyramidal and non-pyramidal neurons in the anterior cingulate cortex of schizophrenics and maniac depressives.*" Soc. Neurosci. Abs. **23**: 2199.
- Walter, J., Keiner, S., Witte, O. W. and Redecker, C. (2009). "*Age-related effects on hippocampal precursor cell subpopulations and neurogenesis.*" Neurobiol Aging.
- Westernberg, H. G. M., Den Boer, J. A. and Murphy, D. L. (1996). Advances in the Neurobiology of Anxiety Disorders. New York, Wiley Publications.
- Whitaker-Azmitia, P. M. (1991). "*Role of serotonin and other neurotransmitter receptors in brain development: basis for developmental pharmacology.*" Pharmacol Rev **43**(4): 553-61.
- Whitaker-Azmitia, P. M. (2001). "*Serotonin and brain development: role in human developmental diseases.*" Brain Res Bull **56**(5): 479-85.
- Wichems, C. H., Li, Q., Holmes, A., Crawley, J. N., Tjurmina, O., Goldstein, D., Andrews, A. M., Lesch, K. P. and Murphy, D. L. (2000). "*Mechanisms mediating the increased anxiety-like behavior and excessive responses to stress in mice lacking the serotonin transporter.*" Soc. Neurosci. Abs. **26**: 400.
- Wolff, M., Costet, P., Gross, C., Hen, R., Segu, L. and Buhot, M. C. (2004). "*Age-dependent effects of serotonin-1A receptor gene deletion in spatial learning abilities in mice.*" Brain Res Mol Brain Res **130**(1-2): 39-48.
- Yamamoto, M., Suhara, T., Okubo, Y., Ichimiya, T., Sudo, Y., Inoue, M., Takano, A., Yasuno, F., Yoshikawa, K. and Tanada, S. (2002). "*Age-related decline of serotonin transporters in living human brain of healthy males.*" Life Sci **71**(7): 751-7.
- Young, E. A., Haskett, R. F., Murphy-Weinberg, V., Watson, S. J. and Akil, H. (1991). "*Loss of glucocorticoid fast feedback in depression [see comments].*" Arch Gen Psychiatry **48**(8): 693-9.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. K.-P. Lesch für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung und Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Deckert danke ich für die Möglichkeit, an seiner Klinik dissertieren zu können.

Wärmstens danke ich Frau Dr. rer. nat. Angelika Schmitt für Ihre ausgezeichnete wissenschaftliche und menschliche Betreuung. Sie stand mir stets mit fundiertem Rat und engagierter Tat zur Seite. Ihre unermüdliche Unterstützung war eine große Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Peter Kugler danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Prof. Dr. P. Riederer und Herrn Dr. med. Senitz danke ich für den Arbeitsplatz und die Unterstützung im Labor.

Dank allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, insbesondere Frau I. Fischer, Frau G. Ortega, Frau S. Jatzke und Herrn Dr. med. J. Benninghoff, für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Atmosphäre im Labor.

Besonders danke ich meiner Frau Anna, die mir in all der Zeit den Rücken frei hielt. Ihrem eisernen Beistand und unermüdlichen Unterstützung ist es zu verdanken, dass ich diese Arbeit fertig stellen konnte.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern, die mir Studium und Promotion erst ermöglicht haben und durch ihre beharrlichen Ermunterungen für Ansporn sorgten.