

**Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und
Psychotherapie**

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. J. Deckert

Beteiligung der adulten Neurogenese bei schizophrenen Psychosen

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

David-Gerhard Olmes

aus Marloffstein

Würzburg, November 2013



Referent: Prof. Dr. Andreas Reif

Koreferentin: Prof. Dr. Claudia Sommer

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 22. September 2014

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	
1. Einleitung.....	1
1.1 Humane und murine adulte Neurogenese.....	9
1.2 Die Rolle des cholinergen Systems.....	22
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	24
2. Material und Methoden.....	25
2.1 Material.....	25
2.1.1 Menschliches Gewebe.....	25
2.1.2 Gewebe der Maus.....	30
2.1.3 Antikörper.....	31
2.1.4 Sera.....	32
2.1.5 Geräte.....	32
2.1.6 Stoffe, Substanzen und Chemikalien.....	33
2.1.7 Lösungen und Puffer.....	35
2.2 Methoden.....	41
2.2.1 Methoden mit menschlichem Gewebe.....	41
2.2.1.1 Anfertigung von Gewebeschnitten.....	41
2.2.1.2 Aufziehen von Gewebeschnitten.....	42
2.2.1.3 Deparaffinierung von Gewebeschnitten.....	44
2.2.1.4 Immunhistochemische Färbung.....	45
2.2.1.5 Histologische Gegenfärbung.....	49
2.2.1.6 Aufsteigende Alkoholreihe und Eindecken.....	51
2.2.1.7 Auszählung der Proben am Lichtmikroskop.....	52
2.2.1.8 Ausmessung der Proben am Neurolucidamikroskop.....	56
2.2.1.9 Auswertung der Proben.....	57
2.2.2 Methoden mit Gewebe der Maus.....	58
2.2.2.1 Anfertigung von Gewebeschnitten.....	58
2.2.2.2 Fixierung und immunhistochemische Färbung der Maushirnschnitte.....	59
2.2.2.3 Auszählung der Proben am Lichtmikroskop.....	61
2.2.2.3.1 „Klassische“ Auszählung.....	62
2.2.2.3.2 Auszählung von Zellnestern.....	62
2.2.2.4 Auswertung der Proben.....	63
2.2.3 Beschichtung von Objektträgern.....	64
2.2.3.1 Silanisieren von Objektträgern.....	64
2.2.3.2 Beschichtung von Objektträgern mit Chrom-Gelatine.....	64
3. Ergebnisse.....	65
3.1 Ergebnisse der Arbeiten mit menschlichem Gewebe.....	65
3.1.1 Etablierung des Verfahrens zur immunhistochemischen Färbung formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebes.....	65
3.1.1.1 Vorversuche.....	65
3.1.1.2 Optimiertes Verfahren.....	66
3.1.2 Ergebnisse der Auswertung des menschlichen Gewebes.....	68
3.2 Ergebnisse der Arbeiten mit Gewebe der Maus.....	75
3.2.1 Ergebnisse der „klassischen“ Auszählung.....	76
3.2.2 Ergebnisse der Auszählung von Zellnestern.....	78
4. Diskussion.....	84

4.1	Arbeiten mit menschlichem Gewebe	84
4.2	Arbeiten mit murinem Gewebe	97
5.	Zusammenfassung	101
6.	Literaturverzeichnis.....	104
7.	Abbildungsverzeichnis	113
8.	Abkürzungsverzeichnis	114
9.	Tabellenanhang	117
	Danksagung	
	Lebenslauf.....	

1. Einleitung

Die Schizophrenie ist eine im jungen Erwachsenenalter beginnende, chronische Erkrankung mit einer bis heute überwiegend zweifelhaften Prognose. Der Erkrankungsgipfel liegt in der dritten Lebensdekade und etwa ein Drittel der Betroffenen bleibt trotz Behandlung symptomatisch [1-3]. Klinisch besitzt die Schizophrenie den Status eines Syndroms, woraus sich verschiedene Verläufe mit unterschiedlichem Outcome ergeben und wohinter sich wahrscheinlich auch verschiedene Pathogenesen verbergen [4]. Gemäß der ICD-10 liegt eine Schizophrenie bei Erfüllung definierter Diagnosekriterien vor, wobei hierzu Ich-Störungen, wahnhaftes Erleben, bizarre Wahninhalte und akustische Halluzinationen als eindeutige Symptome gewertet werden und anhaltende Halluzinationen, Gedankenabreißen, Katatonie und eine Negativsymptomatik als weitere Symptome betrachtet werden [5]. Alternative Diagnosemanuale wie die DSM-IVR unterscheiden sich nicht wesentlich in Bezug auf den Querschnittscharakter der Diagnose.

Etwa ein Fünftel bis ein Zehntel der Betroffenen erleidet eine einmalige psychotische Episode, ein weiteres Fünftel erfährt rezidivierende Episoden mit guter Remission zwischen den Episoden, und über ein Viertel der Patienten hat rezidivierende Episoden mit Teilremissionen und nur leichtem Residuum im Sinne einer gestörten Handlungs-, Kommunikations- und Kontakt- sowie Selbstversorgungs- und Alltagsfähigkeit zwischen den akutpsychotischen Phasen. Weitere 20 Prozent der Patienten hat einen chronischen Verlauf mit wenig Verschlechterung über der Zeit, während 25-30% aller Patienten einen chronischen Verlauf mit deutlicher Verschlechterung über der Zeit erleiden [6-8]. Im Krankheitsverlauf zeigt sich eine Häufung psychotischer Episoden in den ersten Krankheitsjahren, wobei sich in der Folge eine Nivellierung der Krankheitsaktivität einstellt; im Längsschnitt wird schließlich ein relativ stabiler (Defekt-)Zustand erreicht, bei dem sich keine wesentliche Besserung oder Verschlechterung mehr zeigt [7].

Die Gruppe der Schizophrenien bildet eine heterogene Gruppe von Erkrankungen mit einer medianen Inzidenz von 15 (7 bis 43) pro 100000 Einwohner [9, 10]. Es besteht eine Prädominanz von Männern gegenüber Frauen für ungünstige Verläufe bei jedoch ausgeglichenem Geschlechterverhältnis bei Nutzung weiter gefasster Definitionen mit dann insgesamt günstigerem Outcome. Die durchschnittliche Lebenszeitprävalenz für das Erkrankungsspektrum liegt bei ca. 4 bis 7 pro 1000 Personen, wobei manche Autoren eine Lebenszeitprävalenz zwischen 0,3 und 0,7% berichten – insgesamt variieren die epidemiologischen Kennzahlen definitionsabhängig um den Faktor drei [1, 9, 11, 12]. Patienten mit einer Schizophrenie versterben 12 bis 15 Jahre früher als die Durchschnittsbevölkerung [1], die Sterblichkeit ist um das zwei- bis dreifache erhöht. Eine Zunahme der Mortalitätsrate wurde in jüngerer Zeit verzeichnet, was auch mit dem metabolischen Risikoprofil atypischer Antipsychotika in Zusammenhang gebracht wurde [11].

Der frühe Beginn von Schizophrenie-Spektrumerkrankungen verursacht neben hohem Leid bei Betroffenen und ihren Angehörigen sowie reduzierter Lebensqualität und Lebenserwartung der Erkrankten hohe Kosten für die Solidargemeinschaft – so bezifferten sich bereits in den 1990er Jahren die direkten und indirekten Kosten der Schizophrenie in England auf 2,6 Milliarden Pfund, wobei der größte Teil der direkten Kosten auf stationär-psychiatrische Behandlung zurückgeführt werden konnte und die indirekten Kosten einen gleich hohen bis viermal so hohen Kostenpunkt wie die direkten Kosten ausmachen sollen [2]. Bereits in den 1990er Jahren betragen die direkten Kosten der Schizophreniebehandlung in verschiedenen westlichen Ländern rund 2% der Gesamtausgaben des Gesundheitssystems [8]. Insgesamt gilt die Schizophrenie als die kostenintensivste psychiatrische Erkrankung [8]. Bei Umrechnung der Erkrankungskosten in Preise von 2007 ergab sich, dass die Kosten pro Patient und Jahr zwischen 1980 und 2002 in Deutschland in den meisten Studien konstant zwischen 14000 Euro und 18000 Euro betragen [13]. Der frühe Beginn von Schizophrenie-Spektrumerkrankungen führt zu oftmals fehlender oder abgebrochener Ausbildung mit Arbeitslosenquoten von bis zu

80% nach lediglich kurzer Krankheitsdauer und verfrühter Berentung [8]. Die Erwerbsunfähigkeit ihrerseits macht mehr als 95% der indirekten Kosten, die in Preisen von 2007 pro Patient und Jahr zwischen 25000 Euro und 30000 Euro lagen, aus [13].

Während anfangs die Schizophrenie vor allem über das klassische Negativsymptom des intellektuellen Abbaus definiert wurde, was auch zur Bezeichnung als *Dementia praecox* führte, traten – wie auch an der WHO-Definition nach ICD-10 erkennbar ist – im Verlauf die Positivsymptome in der Psychose in den Vordergrund der Diagnostik. Es muss jedoch beachtet werden, dass psychotisches Erleben auch außerhalb von schizophrenen Erkrankungen – zum Beispiel im Rahmen bipolarer Störungen oder schwerer Depressionen – auftreten kann. In letzter Zeit erwächst wieder neues Interesse an den kognitiven Beeinträchtigungen von an einer Schizophrenie Erkrankten [1]. Psychopathologisch lassen sich die Veränderungen bei schizophreniformen Erkrankungen auf fünf Achsen darstellen, wodurch eine Abgrenzung der Psychopathologie zu verwandten Erkrankungen wie der bipolaren Störung oder der schizoaffektiven Störung, die mit der Schizophrenie Risikogene teilen, möglich ist. Auf einer ersten Achse lässt sich psychotisches Erleben im Sinne einer Positivsymptomatik darstellen, auf einer zweiten Achse die Antriebs- und Motivationsstörung im Sinne der Negativsymptomatik, eine postulierte dritte kognitive Achse beschreibt neurokognitive Störungen des Gedächtnisses, der Aufmerksamkeit und der exekutiven Funktionen, eine vierte Achse beschreibt depressive und die fünfte Achse manische und bipolare Symptome [1]. Bezüglich der Negativsymptomatik wird teilweise zwischen einer primären Negativsymptomatik als Folge der Erkrankung und einer sekundären Negativsymptomatik als Folge anderer Ursachen unterschieden, wobei zu letzterer zum Beispiel der Interesseverlust und Antriebsmangel als Nebenwirkung sedierender Medikation oder sozialer Rückzug als Folge paranoiden Erlebens gezählt werden [14]. Die Behandlung von Negativsymptomen und kognitiver Beeinträchtigung bei Patienten mit Schizophrenie-Spektrumerkrankungen ist ein nach wie vor ungelöstes Problem

[3]. Interessant an diesem Zusammenhang ist, dass antimuskarische Substanzen – obwohl oft zur Behandlung von Nebenwirkungen antipsychotischer Medikation eingesetzt – die neurokognitive Leistungsfähigkeit verschlechtern und zur Verschlimmerung der Psychose führen können, gleichzeitig aber die Negativsymptomatik lindern können [3].

Trotz großer Fortschritte im Bereich der Erforschung der Grundlagen der Schizophrenie-Spektrumerkrankungen ist die pathophysiologische Grundlage dieser Erkrankung nach wie vor ungeklärt. Es gibt entsprechend auch bis heute keinen kurativen Behandlungsansatz [15]. Dennoch konnten verschiedene Risikofaktoren identifiziert werden, wobei eine Gen-Umwelt-Interaktion wahrscheinlich scheint.

Als Umweltfaktoren wurden diverse Einflüsse ins Feld geführt, wie dies u.a. von Brown in einer Übersichtsarbeit zusammengefasst wurde: es wurden z.B. Aufwachsen in urbanisierten Gegenden, Vitamin D-Haushaltsstörungen, mikrobielle Pathogene, Toxinexposition, verbleites Benzin, Ernährungsfaktoren, soziokulturelle Einflüsse, Geburt im Winter oder Frühjahr, pränatale Infektionen wie Röteln, Toxoplasmose und Influenza, Mikronährstoffstörungen, ein erhöhtes väterliches Alter bei Geburt, Geburtskomplikationen, Blutgruppendifferenz zwischen Mutter und Kind, Stressexposition während der Schwangerschaft, Cannabisgebrauch, Migrationshintergrund oder sozioökonomischer Status ins Feld geführt [1, 9]. In Zwillingsstudien konnte eine Konkordanzrate von 45% bis 60% für monozygote Zwillinge gegen eine Konkordanzrate von 10% bis 15% für dizygote Zwillinge dargestellt werden [9]. Die Erbllichkeit von Schizophrenie-Spektrumerkrankungen wurde in einer älteren Meta-Analyse von Zwillingsstudien mit bis zu 80% beziffert [16]. Eine neuere populationsbasierte Arbeit, die über 9 Millionen Schweden mit fast 36000 an einer Schizophrenie Erkrankten einschloss, berichtete von einer Heritabilität von 64% [17], wobei die hohe Erbllichkeit neben einem direkten Gen-Effekt auch auf epigenetische Veränderungen zurückgeführt wird [1]. Auf diesen Risikofaktoren basierend wurde als pathogenetisches Modell für schizophrene Erkrankungen eine

Hirnfunktionsstörung, die auf einer strukturellen und neurochemischen Störung basiert, postuliert. In der Folge komme es zu einer gestörten Reaktion für bestimmte Anforderungen mit Hypo- und Hyperaktivität in verschiedenen neuronalen Netzwerken, was zu einer fehlerhaften Interpretation von Wahrgenommenem führen könnte und bei entsprechender Vulnerabilität zu psychotischen Symptomen führen soll [1].

Auf dem Boden einer genetischen Veranlagung wurden verschiedene Ätiopathogenese-Modelle vorgeschlagen. Zum einen wurde eine prä- oder perinatale Schädigung postuliert, welche in der Folge zu einer fehlerhaften Konnektivität und Funktion führt. Dies korreliert mit der Tatsache, dass zahlreiche Risikogene durch Hypoxie reguliert werden [18]. Eine weitere – die so genannte Dopamin-Hypothese – postuliert eine gesteigerte dopaminerge Neurotransmission in mesolimbischen und striatalen Regionen als Ursache von Positivsymptomen bei einem gleichzeitigen prefrontalen Dopaminmangel mit der Folge einer Negativsymptomatik [18]. In diesem Zusammenhang konnte weiter gezeigt werden, dass der Clozapin-Metabolit N-Desmethylclozapin die Freisetzung von Acetylcholin und Dopamin im Hippokampus und im prefrontalen Cortex steigert [3, 19]. Gestützt wird die Dopamin-Hypothese auch durch die Tatsache, dass dopaminerge Substanzen wie Amphetamine flüchtige psychotische Symptome verursachen können [3]. Insgesamt wird einer gestörten dopaminergen Transmission vor allem eine Relevanz bei der Entstehung wahnhaften Erlebens im Rahmen der Positivsymptomatik zugesprochen. Entgegen der älteren Auffassung einer Wirklatenz antipsychotischer Medikation von drei Wochen wird entsprechend mittlerweile auch ein sofortiger Wirkbeginn dieser Substanzen – vor allem im Sinne einer Symptomdistanzierung – diskutiert [20]. Interessanterweise ist das als Risikogen identifizierte Neurotrophin BDNF an der Entwicklung des mesolimbischen Dopaminsystems beteiligt und reguliert die Expression von Dopamin D3-Rezeptoren [18]. Bereits in den 1990er Jahren konnte in der Ratte gezeigt werden, dass die hippokampale Expression von BDNF und NGF durch neuronale Aktivität moduliert wird, wobei hierbei cholinerge Afferenzen eine

Rolle spielen und NMDA-Rezeptoren involviert zu sein schienen [21]. Die Dopamin-Hypothese ist zwar wahrscheinlich v.a. für die Positivsymptomatik verantwortlich, insgesamt scheint sie – trotz des beschriebenen prefrontalen Dopaminmangels – allein nicht die gesamte Klinik der Schizophrenie ursächlich zu erklären [3, 22].

Mesopontine cholinerge Neurone – u.a. in den laterodorsalen tegmentalen Nuclei und dem Nucleus pedunculo-pontinus – projizieren als Teil einer cortico-striatal-thalamisch-corticalen Feedback-Schleife zu dopaminergen Neuronen der Substantia nigra und der ventralen tegmentalen Area [6, 22]. Entsprechend zeigten Mäuse, die defizient für den muskarinischen M1-Acetylcholinrezeptor waren, eine erhöhte striatale Dopamin-Konzentration [22]. Weiterhin konnte eine Aktivierung muskarinischer Rezeptoren bei der Pharmakotherapie von Psychose-Erkrankungen gezeigt werden [23]. Darüber hinaus führt der Muskarin-Rezeptoragonist Xanomeline, der M1- und M4- vor M2-Rezeptoren bindet, bei Alzheimer-Patienten zu einer Reduktion psychoseartigen Verhaltens (Halluzinationen, Agitation, Wahn) und konnte bei Schizophrenen Positiv- und Negativsymptome reduzieren, sowie eine Verbesserung kognitiver Symptome erzielen [23, 24]. Des Weiteren zeigte Xanomeline antipsychotikaartige Effekte im Tiermodell [25]. Darüber hinaus können hohe Dosen von Anticholinergika wie Atropin oder Scopolamin halluzinatorisches und wahnhaftes Erleben auslösen [23]. Ebenfalls können Anticholinergika Exacerbationen von Psychosen verursachen [23, 26]. Gleichzeitig haben die „atypischen“ Antipsychotika Clozapin und Olanzapin eine ausgesprochen hohe Affinität zu M1-Rezeptoren mit Ki-Werten von 1,4 nM beziehungsweise 2,5 nM [3, 23, 27, 28]. Die Datenlage, ob es sich um agonistische, partialagonistische oder antagonistische Aktivität von Clozapin an M1-Rezeptoren handelt, ist jedoch inkonsistent [23]. Die Affinität von Clozapin – und hier vor allem auch vom Verhältnis von Clozapin zu seinem Metaboliten N-Desmethylclozapin – zu muskarinischen Rezeptoren wurde dennoch mit der besonderen Wirkung dieses Antipsychotikums in Verbindung gebracht [29, 30]. Unter anderem wurde hier eine aktivierende Wirkung des Clozapin-Metaboliten N-Desmethylclozapin

auf M1-Rezeptoren, die durch eine allosterische Regulator-Site vermittelt sein soll, vorgeschlagen [22, 31].

Während alle fünf Isotypen des muskarinischen Acetylcholinrezeptors (M1-M5) im Hippokampus exprimiert werden [32] und seit langem bekannt ist, dass von allen muskarinischen Rezeptoren – zumindest bei Ratten – M1-Rezeptoren im Hippokampus weit verbreitet sind, wobei ein Schwerpunkt auf der CA1-Region liegt [33, 34], deuten neuere Daten aus einem Mausmodell darauf hin, dass der M1-Rezeptor eine zentrale Rolle bei der cholinergen Erregung von Pyramidenzellen der Regionen CA1 und CA3 spielt [32]. Gleichzeitig konnte jedoch gezeigt werden, dass die M1-Rezeptordichte – nicht aber die M4-Rezeptordichte – im (dorsolateral-prefrontalen) Cortex Schizophrener reduziert ist [35], wohingegen die M4-Rezeptordichte – nicht aber die M1-Rezeptordichte – im Hippokampus Schizophrener reduziert sein soll [25, 29]. Dieses Rezeptorungleichgewicht soll mit der Entstehung von Psychosen und kognitivem Defizit assoziiert sein [25]. Mäuse, bei denen der M1-Rezeptor ausgeschaltet wurde ($M1^{-/-}$) haben selektive Defizite in Cortex-bezogener Kognition und Gedächtnisleistung. Der M1-Rezeptor scheint vor allem für diejenigen Gedächtnisleistungen relevant zu sein, bei denen Cortex und Hippokampus interagieren müssen [22, 25, 36]. Darüber hinaus führt ein Verlust des M1-Rezeptors im Mausmodell zu einer durch Haloperidol oder Clozapin abdämpfbaren und durch vermehrte Dopamin-Freisetzung bedingten erhöhten striatalen Dopamin-Neurotransmission, erhöhter motorischer Aktivität und einer gesteigerten Stimulation durch Amphetamin [37].

Ebenfalls wurde mit der sogenannten Glutamat-Hypothese eine Hypoaktivität cortico-striataler und cortico-limbischer Projektionen postuliert, als dessen Folge es möglicherweise erst zu der Veränderung der dopaminergen Transmission kommen könnte [18, 38]. Hierbei ist interessant, dass das Schizophrenie-Risikogen Neuregulin 1 für die Internalisierung von Glutamatrezeptoren vom NMDA-Typ notwendig zu sein scheint [18]. Gleichzeitig sind NMDA-Rezeptoren mit M1-Rezeptoren in CA1-Pyramidenzellen assoziiert und können durch

Aktivierung von M1-Rezeptoren aktiviert werden [31, 39]. Auch wurden schließlich Veränderungen im GABA-Stoffwechsel postuliert [3, 18]. Interessant ist, dass Veränderungen des in der Zellreifung und Migration relevanten Proteins DISC1 und seines Interaktionspartners NUDEL (Nude-like protein) mit schizophrenen Erkrankungen assoziiert sind [18].

1.1 Humane und murine adulte Neurogenese

Während früher angenommen wurde, dass die Neurogenese – also die Bildung und Integration neuer Neurone in Netzwerke – auf die Hirnentwicklung beschränkt sei, konnte bereits in den 1960er Jahren durch Altmann und Das gezeigt werden, dass in der Subgranularzellschicht des Hippokampus von Nagetieren adulte Neurogenese vonstatten geht [40-42]. Deutlich später konnte gezeigt werden, dass adulte Neurogenese moduliert werden kann [43], bevor schließlich Eriksson et al. in ihrer bahnbrechenden Arbeit adulte Neurogenese im humanen Hippokampus nachweisen konnten [44]. Insgesamt scheint adulte Neurogenese ein im Tierreich weit verbreitetes Phänomen zu sein [45], wenngleich über Ausnahmen, z.B. bei bestimmten Fledermausarten, berichtet wurde [46]. Weiterhin wurde gezeigt, dass sich die proliferierenden Zellen zu depolarisierbaren Neuronen differenzieren, die zu synaptischer Interaktion in neuronalen Netzwerken fähig sind [47, 48]. Während bei Nagetieren eine Verminderung der adulten Neurogenese mit dem Lebensalter nachgewiesen werden konnte [49] und im Menschen eine Verminderung der adulten Neurogenese bis zur Adoleszenz nachweisbar ist, ist der Verlauf jenseits dieser Zeit bis ins Senium letztlich im Menschen unklar [50]. Sicher ist jedoch, dass der Anteil an proliferierenden Zellen im Senium dramatisch abnimmt [51]. Es scheint in Nagetieren im Verlauf zu einer Abnahme der proliferativen Aktivität ohne Reduktion der Stammzellzahl zu kommen, wobei dies möglicherweise mit Veränderungen der neurogenen Nische, die ihrerseits aus einem komplexen Wechselspiel von Stamm-/ Vorläuferzellen, Astrozyten und vaskulären Zellen gebildet wird, zusammenhängen könnte [50]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Pharmaka wie Antidepressiva einen steigernden Effekt auf die adulte Neurogenese – auch im Menschen – haben könnten [52]. Darüber hinaus existieren Daten, die adulte Neurogenese mit Medikationseffekten korrelieren. Das Antidepressivum Fluoxetin führte in einer Studie mit männlichen C75BL/6 Mäusen zu einer Verlängerung des Überlebens neu gebildeter Zellen und zu einer Verschiebung hin zu einem neuronalen Zellschicksal, jedoch nicht zu einer vermehrten Zellproliferation, wobei die Effekte bei Alttieren geringer ausgeprägt waren [53]. Wenngleich

diesbezügliche Daten teils widersprüchlich sind, scheint eine Dauerbehandlung mit klassischen Antipsychotika keinen Effekt auf die adulte Neurogenese zu haben, wobei eine akute Behandlung mit „typischen“ Antipsychotika mit vermehrter Produktion von Körnerzellen in Verbindung gebracht wurde [54, 55], wohingegen eine gesteigerte adulte Neurogenese unter der Behandlung mit „atypischen“ Antipsychotika im Tiermodell gefunden werden konnte, was möglicherweise mit einer neuroprotektiven Wirkung, vermittelt über neurotrophe Faktoren, erklärt sein könnte [56]. Neu gebildete hippocampale Neurone werden in die Granularzellschicht integriert und stärken den in das CA3-Rindenfeld des *Cornu ammonis* projizierenden Moosfasertrakt [57-60]. Nichtsdestotrotz bleibt der relative Anteil neu gebildeter Neurone zur Gesamtheit aller Körnerzellen unklar.

Während eine funktionelle Einteilung des Hippokampus längs seiner dorsoventralen Achse bekannt ist – mit einer Zuordnung von Lernen und Gedächtnisleistungen zum dorsalen und Emotion und Angst zum ventralen Hippokampus – ist unklar, ob Veränderungen der adulten Neurogenese mit dem Lebensalter spezielle Bereiche vermehrt betreffen; möglicherweise ist die Neurogenese im ventralen Teil in alten Tieren eher betroffen, wobei die Gliogenese unverändert bleiben soll [50]. Auch wurde über eine differenzierte Veränderung der adulten Neurogenese in der Maus im ventralen gegenüber dem dorsalen Hippokampus berichtet, wobei die Gliogenese möglicherweise unverändert bleibt [49].

In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass verschiedene externe Stimuli zu einer Steigerung der Zellproliferation im Hippokampus führen können. So scheint körperliche Aktivität eher die Zellproliferation als Ganzes und ein enriched environment vornehmlich das Überleben von neugebildeten Neuronen zu fördern [50]. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass auch Immunphänomene einen Einfluss auf die adulte Neurogenese haben, so scheinen proinflammatorische Zytokine mit einer reduzierten Neurogenese einherzugehen [61].

Während in vielen Regionen neuronale Vorläuferzellen nachweisbar sind, scheinen unter physiologischen Bedingungen Neurone nur in der Subventrikulärzone des Seitenventrikels und der Subgranularzellschicht des Hippokampus gebildet zu werden [50]. Nach gegenwärtigem Kenntnisstand ist die adulte hippokampale Neurogenese auf die Subgranularzellschicht (SGZ) des Gyrus dentatus beschränkt [62, 63]. Des Weiteren ist bekannt, dass es eine adulte Neurogenese in der Subventrikulärzone (SVZ) gibt. Adulte Neurogenese in weiteren Regionen wird kontrovers diskutiert [64], wobei bereits Hinweise existieren, dass es bei Säugetieren adulte Neurogenese in geringerem Ausmaß auch in anderen Hirnregionen gibt. So weisen Arbeiten auf adulte Neurogenese im prefrontalen und inferior-temporalen Neocortex [65, 66] sowie in der Amygdala und im Cortex piriformis [67] von Makakken, in der Substantia nigra [68, 69], im Striatum [70] sowie in der subcallosalen Zone [71] hin. Interessant ist in diesem Zusammenhang das Argument, dass – wahrscheinlich aus evolutionären Gründen – nicht jedes Neuron durch adulte Neurogenese ersetzt werden könne [72].

Es ist bereits seit langem bekannt, dass – neben einer generellen Hirnvolumenminderung [73] – das hippokampale Volumen bei Schizophrenen vermindert ist [9, 74]. Auch Kernspintomographieuntersuchungen (MRT) konnten zeigen, dass das Hippokampusvolumen bei Schizophrenen im Vergleich zu Gesunden beidseits reduziert ist und dass dieses Phänomen bereits bei Ersterkrankung nachweisbar ist. Dies stützt eher die Annahme einer genetischen Veranlagung und spricht gegen eine neurodegenerative Erkrankung [55, 56, 75-77]. Auch können bereits in der Prodromalphase vor Ausbruch der Ersterkrankung bestimmte neuroanatomische Veränderungen MR-tomographisch erfasst werden [78]. Ein vermindertes hippokampales Volumen wurde seinerseits mit verringerter Leistung des verbalen und räumlichen Gedächtnisses korreliert [79], woraus sich die Hypothese ergab, dass adulte Neurogenese relevant für das Hippokampus-basierte Lernen und die Abspeicherung komplexer Gedächtnisinhalte sei [80].

Obwohl letztlich nicht geklärt ist, ob Schizophrenie- Spektrumerkrankungen originär hippokampale Erkrankungen sind, deuten populationsbasierte Daten und Tiermodelle auf eine Assoziation zwischen adulter Neurogenese in der Subgranularzellschicht des Hippokampus mit schizophreietypischem Verhalten hin [57]. Auch ist bereits seit langem bekannt, dass die Neuronenzahl im Cornu ammonis und tendenziell in der Fascia dentata bei Schizophrenen im Vergleich mit Kontrollen reduziert ist [81]. Psychotisches Erleben wurde mit hippokampaler Aktivität sowie der Konnektivität zwischen Hippokampus und Cortex in Verbindung gebracht [75]. Auch scheinen Gene, die eine Funktion in der Zellproliferation haben, mit Schizophreniespektrumerkrankungen assoziiert zu sein, wie das Protein DISC1 (Disrupted in schizophrenia 1) [55], welches auf den cAMP-Signalweg Einfluss nimmt und die Funktion von Zytoskelett und Zentrosomen beeinflusst [82] und dessen Herunterregulation zu zellmorphologischen und zytoarchitektonischen Störungen im Hippokampus führt [83]. Ferner scheint DISC1 auch mit dem beta-Catenin-Signalweg zu interagieren [84]. Es konnte gezeigt werden, dass neu gebildete hippokampale Neurone in Tieren, in denen DISC1 herunterreguliert wurde, in der Granularzellschicht weiter wandern und teilweise sogar die Molekularzellschicht erreichen [58, 64]. Darüber hinaus konnte in der pränatalen Ratte gezeigt werden, dass – neben anderen Neurotransmittersystemen – die Aktivierung muskarinischer M1-Acetylcholinrezeptoren beim Aussprossen von Axonen hippokampaler Pyramidenzellen eine Rolle spielt [85].

Frühe Stadien der Neurogenese können durch Notch, Gamma-Aminobuttersäure (GABA) oder Glutamat modifiziert werden [83]. Auch steht die adulte hippokampale Neurogenese mit dem Protein Neuregulin 1 in Verbindung, bei dem es sich um einen Liganden der ErbB4-Rezeptortyrosinkinase handelt [86]. Des Weiteren scheinen Genprodukte wie NPAS3 [87], BDNF [88, 89] und Reelin [90] eine Funktion in der adulten Neurogenese zu haben, wobei der Reelin-Promotor bei Schizophrenen hypermethyliert ist [55, 91]. Störungen im Reelin-Pathway mit einer Reelin-Verminderung und einer Disabled1-Vermehrung könnten bei der

Fehlwanderung von neu gebildeten hippocampalen Neuronen beteiligt sein, die im Pilocarpin-Tiermodell der Temporallappenepilepsie in die Molekularzellschicht oder den Hilus wandern [64, 92]. Ferner wurde auch immunologischen Faktoren, wie Interleukin-6 aus Astrozyten, eine die Neurogenese modulierende Eigenschaft zugewiesen [93].

Erkenntnisse aus Tiermodellen über die Regulation der adulten Neurogenese zeigen Parallelen, aber auch Differenzen zwischen der hippocampalen Neurogenese und der Neurogenese der Subventrikulärzone auf [94]. Die frühe adulte hippocampale Neurogenese scheint im Tiermodell durch intrazelluläre Faktoren – wie die basic helix-loop-helix (bHLH) Proteine *Ascl1*, *Neuro-D* und *Neurogenine*, durch *Rb* und *E2F* sowie *DISC1*, das mit der Schizophrenie assoziiert ist – durch transzelluläre Moleküle – wie *FGF-2* [95], *VEGF*, *IGF*, *Neurotrophin-3 (NT-3)*, *Sonic Hedgehog*, *Wnt*, *Notch* und *Neurogenesin-1* – und Neurotransmitter – wie *Dopamin*, *GABA* und *Glutamat* – reguliert zu werden. Dem entgegen soll die spätere Integration der neugebildeten Zellen durch intrazelluläre Faktoren – wie *CREB*, *Cdk5*, *Neuro-D1*, *DISC1*, *Klf-9* –, transzelluläre Botenstoffe – wie *BDNF*, *FGF-2*, *NT-3* und *Notch* – und ebenfalls durch die Neurotransmitter *Glutamat* und *GABA* reguliert werden (s. Tabelle 1) [94]. Auch sind unterschiedlichste Faktoren zu verschiedenen Zeitpunkten relevant, sodass die adulte Neurogenese engmaschig reguliert wird [96]. Dies unterstreicht die Relevanz der neuronalen Stammzellnische. In diesem Kontext ist auch interessant, dass die adulte Neurogenese *in vivo* durch cholinerge Afferenzen aus dem medialen Septum gesteigert werden kann. Hierbei scheinen neu gebildete Neurone bereits sieben Tage nach ihrer Entstehung innerviert zu werden [60, 97]. Gleichzeitig gehen zahlreiche Neurone drei Wochen nach ihrer Entstehung wieder zugrunde, wobei dies mit fehlender Aktivität korreliert – dieser Effekt soll über *NMDA-Rezeptoren* vermittelt werden [60].

1. EINLEITUNG

Gruppe	Molekulares Signal	Proliferation	Zellschicksal
intrazelluläre Proteine	bHLH Protein Ascl1, Neuro-D, Neurogenine		+
	Rb/ E2F	+	
	DISC-1	+	
transzelluläre Proteine	FGF-2	+	
	VEGF		+
	IGF		+
	Neurotrophin-3		+
	Sonic Hedgehog	+	
	Wnts		+
	Notch	+	-
Neurogenesin-1		+	
Neurotransmitter	Dopamin	+	
	GABA		+
	Glutamat	+/-	

Gruppe	Molekulares Signal	Dendriten-entwicklung	Synaptische Integration	Zellüberleben
intrazelluläre Proteine	CREB	+		+
	Cdk5	+	+	+
	Neuro-D1			+
	DISC-1	-	-	
	Kif-9	+	+	
transzelluläre Proteine	BDNF	+		+
	FGF-2		+	
	NT-3		+	
	Notch	+		
Neurotransmitter	GABA	+	+	
	Glutamat		+	+

Tabelle 1: Regulation der frühen Phasen (oben) und der späteren Integration (unten) der adulten Neurogenese im Tiermodell, sortiert nach verschiedenen Gruppen molekularer Signale. Modifiziert nach: [94].

Ebenfalls wurden der Glutamat-Hypothese entsprechend glutamaterge Signalwege mit der Schizophrenie korreliert, da durch Glutamat die Proliferation humaner neuronaler fetaler Vorläuferzellen stimuliert wird [55, 98] und u.a. der Glutamatrezeptor-Antagonist Phencyclidin (PCP) zu schizophreneartigem Verhalten führt. Gleichzeitig scheint es durch PCP zu einer Verminderung der hippokampalen adulten Neurogenese zu kommen [55, 99]. PCP wirkt über den Glutamatrezeptor vom NMDA-Typ, der somit mit der Schizophrenie in

Verbindung gebracht wird, wobei hier vor allem Stickstoffmonoxid (NO) und der kanonische Wnt-Signalweg eine Rolle haben sollen [55].

Es wird angenommen, dass neu gebildete hippocampale Neurone in die Granularzellschicht integriert werden und den Moosfaser-Trakt stärken, der in das CA3-Feld des Cornu ammonis projiziert [57-59, 81]. Die neugebildeten Neurone entsenden ihre Dendriten in die Molekularzellschicht, wo sie über den Tractus perforans aus dem Cortex entorhinalis ihre Afferenzen erhalten. Neugebildete Neurone scheinen verschiedene Überlebenssignale zu erhalten, wobei hier glutamaterge Afferenzen über Glutamatrezeptoren vom NMDA-Typ eine Rolle zu spielen scheinen [59] und auch GABAerge Afferenzen, die wegen des hohen Chloridgehalts neu gebildeter Neurone exzitatorisch wirken, für Überleben, Reifung und Differenzierung notwendig zu sein scheinen [59, 100]. Die genaue Regulation des Körnerzellumsatzes ist aber weiterhin weitgehend unverstanden [59]. Während bei Nagetieren der Anteil hippocampaler Neurogenese an der Gesamtzellzahl abgeschätzt werden kann [59] und man bei Jungtieren von 4000 bis 7000 neu gebildeten Neuronen pro Tag ausgeht, wobei hier auch Speziesunterschiede geltend gemacht werden [101], bleibt der relative Anteil adulter hippocampaler Neurogenese zur absoluten Zahl von Neuronen in der Körnerzellschicht des Menschen bislang unklar.

Eine der größten Herausforderungen bei der Untersuchung der adulten humanen hippocampalen Neurogenese besteht im Mangel selektiver stabiler Marker für neuronale Stamm- und Progenitorzellproliferation, neuronale Differenzierung und die Integration in neuronale Netzwerke. Die einzigen derzeit existenten, in humanem Gewebe etablierten Neurogenese-Marker sind Antikörper, die gegen PCNA (proliferating cell nuclear antigen), Doublecortin (DCX) und Ki-67 (Kiel-67) sowie eventuell Sox2 (Sex determining region of Y homeobox 2) gerichtet sind. Im humanen Gewebe sind vor allem der unspezifische Proliferationsmarker Ki-67 und Doublecortin (DCX) etabliert. Bei letzterem ist jedoch zu beachten, dass sich nicht alle neugebildeten Neurone gegen DCX anfärben lassen. Darüber hinaus ist DCX erst ein Marker später

Vorläufer und früher postmitotischer Neurone [62]. Ein bekanntes Problem ist auch die nur kurze Anfärbbarkeit von DCX in Abhängigkeit des post-mortal delay. Boekhoorn et al. konnten zeigen, dass bereits nach einer Stunde die DCX-Anfärbbarkeit abnimmt und diese nach 8-12 Stunden sehr artefaktanfällig wird [102]. Die Nutzung von PCNA wird dadurch eingeschränkt, dass bei diesem Antikörper über eine teilweise fehlende Spezifität für proliferierende Zellen und über eine mitunter schlechte Korrelation mit anderen Proliferationsmarkern berichtet wird [103, 104]. Am insgesamt reliabelsten scheint Ki-67 zu sein, obwohl es sich hierbei um einen unspezifischen Marker handelt, der in allen Zellzyklusphasen außer der G₀-Phase exprimiert wird und der nicht nur in Zellen mit einem neuronalen Schicksal anzutreffen ist, sondern auch in Zellen glialer Linien und in Zellen, die dem Nervengewebe nicht zugehörig sind – zum Beispiel Immunzellen [105, 106]. Bereits Anfang der 1990er Jahre wurde gezeigt, dass es bei Antikörperfärbungen in Tumorgewebe gegen Ki-67 zu einem antikörperkonzentrationsabhängigen Plateau der gegen Ki-67 anfärbbaren Zellen im Sinne einer maximal anfärbbaren Zellzahl kommt, während es bei Färbungen gegen andere Proliferationsmarker wie PCNA bei hohen Antikörperkonzentrationen zu einer Anfärbung aller Zellen kam. Dies wurde mit der kurzen Halbwertszeit von Ki-67 im Vergleich zu PCNA aufgrund zahlreicher den Abbau von Ki-67 faszilitierenden PEST-Motive (Prolin – Glutamat – Serin – Theronin) begründet [107]. Die Tatsache, dass bei Färbungen gegen Ki-67 ein Plateau anfärbbarer Zellen – auch bei hohen Antikörperkonzentrationen – erreicht wird, spricht für die Nutzung von Antikörpern gegen Ki-67, da somit bei guter Anfärbbarkeit eine Erhöhung der Falsch-Positivenrate verhindert werden kann. Ki-67 scheint bis heute der robusteste Surrogatparameter für neuronale Stamm- und Progenitorzellproliferation als erstem Schritt der Bildung, Differenzierung und Integration neu gebildeter humaner Neurone zu sein. Neuere Arbeiten konnten zwar auch *in vivo*-Messungen neuronaler Vorläuferzellen mittels MR-basierter Methoden durchführen, hierbei ist jedoch die geringe räumliche Auflösung verschiedener histologischer Schichten ein noch ungelöstes Problem [50, 108].

Von der adulten Neurogenese in der Subventrikulärzone ist bekannt, dass eine gewisse Stammzellnische oder neurogene Nische gebildet wird, bei der langsam proliferierende, astrozytenähnliche Typ B-Zellen rasch proliferierende und in Ketten angeordnete Typ A-Zellen umgeben und sich wiederholt zwischengelagerte proliferativ aktive Vorläuferzellen, Typ C-Zellen, finden, die den rostral migratory stream (RMS), eben diese Nische, bilden (s. Abbildung 1).

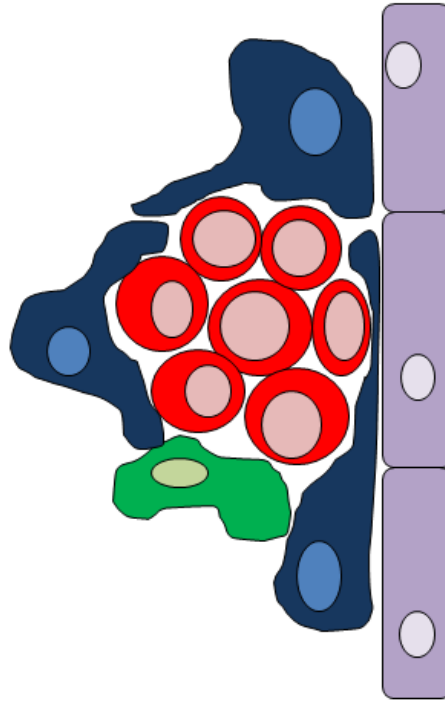


Abbildung 1: Struktur der subventrikulären Stammzellnische im RMS. Rot: rasch proliferierende A-Zellen, blau: langsam proliferierende, astrozytenähnliche B-Zellen, grün: proliferativ aktive Vorläuferzellen (C-Zellen), violett: Ependym-Zellen. Modifiziert nach [72].

Die hippokampale adulte Neurogenese kann ebenfalls in mehrere Phasen unterteilt werden, in denen verschiedene Proteine exprimiert werden [62]. Hierbei ist anzumerken, dass die Abgrenzung der einzelnen Phasen teilweise zwischen verschiedenen Autoren leicht divergiert. Vereinfacht können diese Phasen in eine Proliferations-, eine Auswanderungs- und eine Reifungsphase eingeteilt werden (s. Abbildung 2).

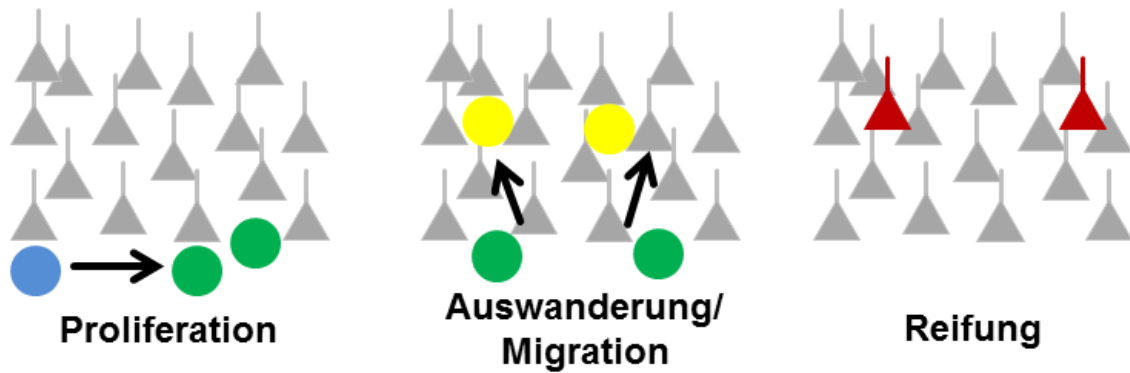


Abbildung 2: Phasen adulter hippocampaler Neurogenese in der Subgranularzellschicht. Vorläuferzellen (blau) proliferieren und differenzieren zu neu gebildeten Zellen (grün), die ihrerseits in die Granularzellschicht des Gyrus dentatus auswandern (gelb) und schließlich als ausgereifte Zellen in Netzwerke integriert werden. (modifiziert nach: [62])

Parallel zu der Beschreibung subventrikulärer Neurogenese wurde eine Klassifikation der hippocampalen Neurogenese vorgeschlagen (s. Abbildung 3), in der radialgliaartige so genannte Typ 1-Zellen als hippocampale Stammzellen angesehen werden, die in rasch proliferierende Typ 2-Zellen übergehen bevor die so gebildeten Zellen heranreifen und in neuronale Netzwerke integriert werden, wobei sich die einzelnen Zellpopulationen durch verschiedene Marker voneinander unterscheiden [83]. In der Literatur werden zur Beschreibung der hippocampalen Neurogenese allerdings teilweise verschiedene Klassifikationen genutzt.

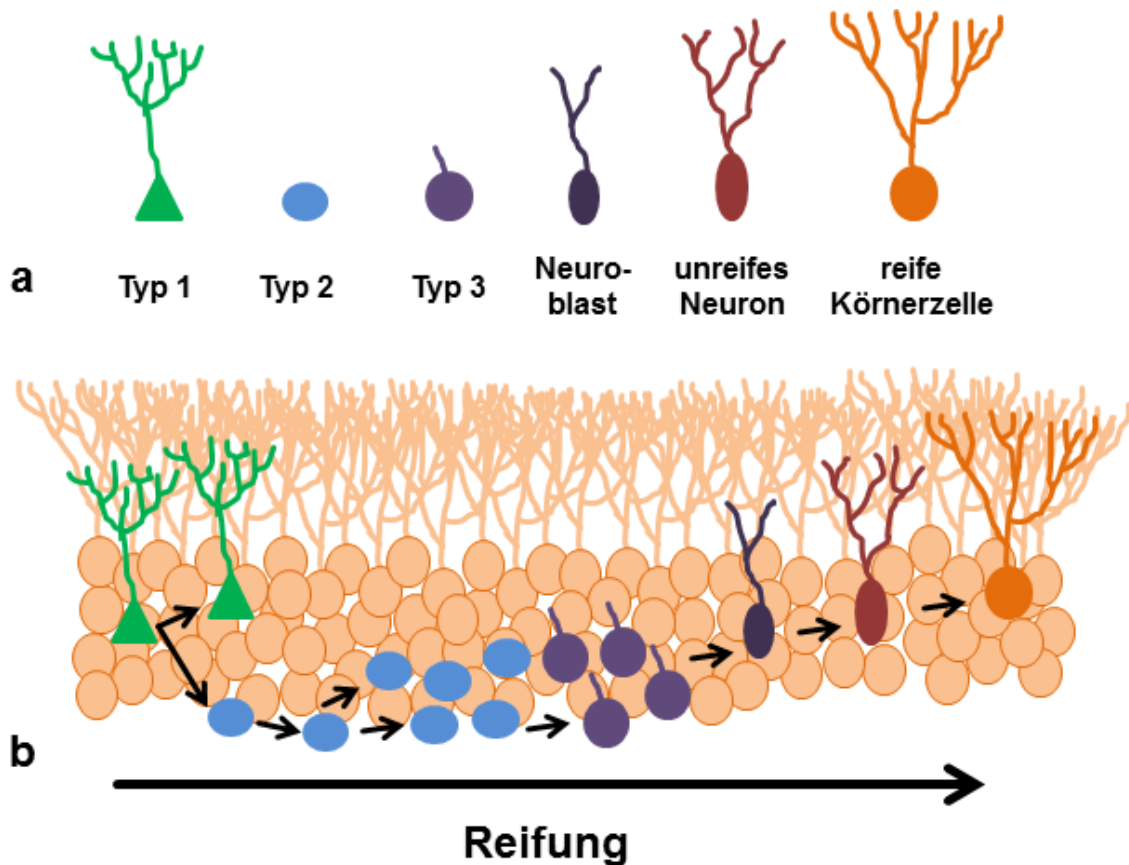


Abbildung 3: Stadieneinteilung hippocampaler Neurogenese. Typ 1-Zellen mit astroglialen Markern, die als langsam-proliferierende hippocampale Stammzellen aufgefasst werden (grün) und proliferativ hoch aktive Typ 2-Zellen (blau) bilden, die über Typ 3-Zellen und weitere Vorläuferstadien schließlich in reife in Netzwerke integrierte Körnerzellen übergehen. A: schematische Darstellung der Zellen; B: Schemazeichnung des Reifungsprozesses. Modifiziert nach: [83].

Die Zellen in den jeweiligen Phasen der Neurogenese, Migration, Integration und Reifung können mit verschiedenen Markern voneinander differenziert werden (s. Abbildung 4), wobei jedoch zu bedenken ist, dass die meisten Marker derzeit nicht an menschlichem Gewebe etabliert sind und die meisten Daten – sowohl in Bezug auf Marker als auch in Hinblick auf die postulierten Abläufe – aus Modellorganismen, v.a. Nagetieren, stammen. Die als primäre Stammzellen mit unbegrenzter Selbsterneuerung angesehenen Typ 1-Zellen exprimieren Stammzellmarker wie Nestin oder Sox2 [60]. Die schneller proliferierenden Typ 2-Zellen werden in Stammzellmarker exprimierende Typ 2a-Zellen und frühe neuronale Marker wie DCX oder PSA-NCAM exprimierende Typ 2b-Zellen unterteilt [60]. Nach neueren Befunden scheinen Typ1- und

Typ2-Zellen auch reziprok ineinander übergehen zu können [64, 109]. Sox2 scheint der Faktor zu sein, der für die Stammzellqualität der neuronalen Stammzellen notwendig ist [64, 109]. Neugeborene Neurone sprossen ihre Axone in den Hilus und ihre Dendriten in die Molekularzellschicht aus [60].

Aufgrund der verschiedenen Marker lassen sich nach anderen Autoren fünf verschiedene Phasen der adulten Neurogenese abgrenzen, die auch die zuvor beschriebenen Phasen Proliferation – Migration – Reifung umfassen. Die frühesten Zellen, die in der Regel als Stammzellen angesehen werden, zeigen Expressionsmuster, die der embryonalen Radialglia ähnelt; sie sind positiv für das saure Gliafibrillenprotein (GFAP) und Nestin. Andere Autoren argumentieren, dass diese frühen proliferativ aktive Zellen möglicherweise bereits die Fähigkeit zur Selbsterneuerung verloren haben und somit eher frühe Vorläuferzellen als Stammzellen seien (zit. nach [62]). In der Folge sollen die Zellen in eine Nestin-positive, GFAP-negative, proliferativ sehr aktive Phase – die so genannte Differenzierungsphase – übergehen, wobei im Verlauf Nestin nicht mehr exprimiert und dafür Doublecortin (DCX) exprimiert wird. Diese Phase geht in die dritte DCX-positive und PSA-NCAM-positive (Polysialinisiertes neuronales Zelladhäsionsmolekül-positive) Migrationsphase über, die von Phase vier, der Phase, in der axonale Fortsätze zur CA3 Pyramidenzellschicht und dendritische Fortsätze zum Stratum moleculare aussprossen, abgelöst wird. In dieser Phase werden die Zellen postmitotisch, exprimieren neben PSA-NCAM und DCX das Protein Calretinin und nunmehr den neuronalen Marker NeuN. Schließlich wird in der letzten Phase Calretinin herunterreguliert und dafür Calbindin neben NeuN exprimiert, während die Zellen ihre synaptischen Verbindungen zu ihren afferenten und efferenten Zellen eingehen (zit. nach [62]).

1. EINLEITUNG

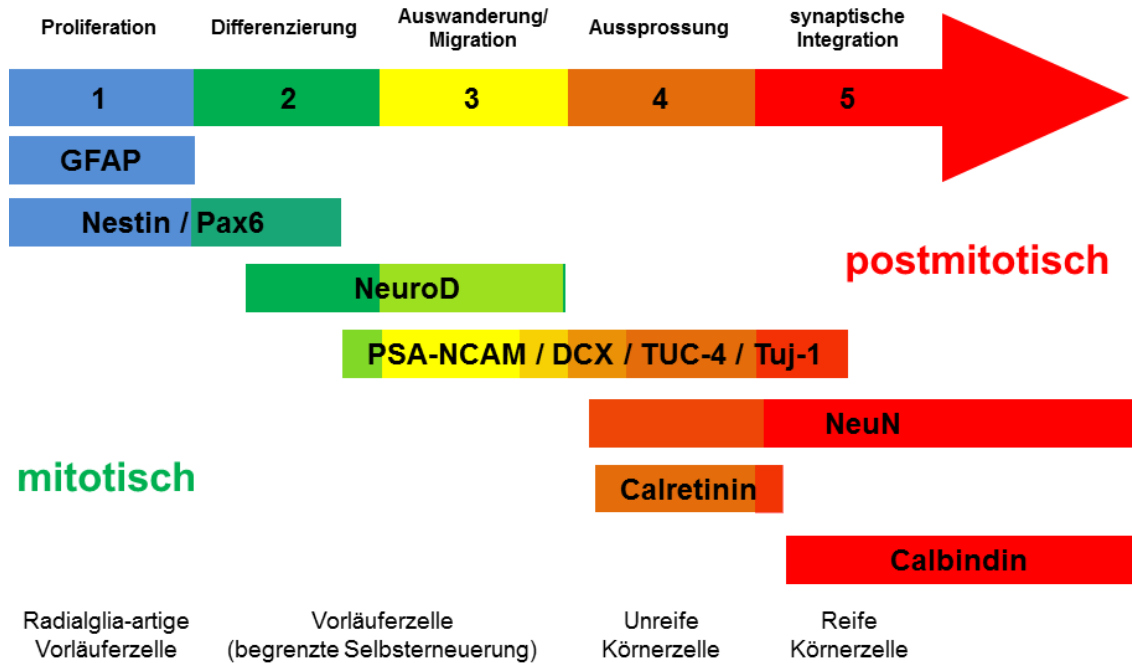


Abbildung 4: Verschiedene Proliferationsmarker werden zu verschiedenen Zeitpunkten exprimiert. Bei Doublecortin (DCX), einem der wenigen im Menschen etablierten Marker, ist zu beachten, dass DCX beginnend in der Differenzierungsphase bis in relativ späte postmitotische Zeit hinein nachgewiesen werden kann. Modifiziert nach: [62].

1.2 Die Rolle des cholinergen Systems

Acetylcholin (ACh) ist ein wichtiger Neurotransmitter im ZNS. Nach seiner presynaptischen Bildung wird es in Vesikel geladen, die abhängig von der Stimulation des Neurons in den Synaptischen Spalt freigesetzt werden [3]. Acetylcholin bindet entweder an seine pre- und postsynaptischen Rezeptoren oder wird von der Acetylcholinesterase (AChE) hydrolysiert [3]. Acetylcholin bindet an membranständige Rezeptoren zweier großer Unterfamilien: einerseits nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChR), andererseits muskarinische Acetylcholinrezeptoren (mAChR), wobei beide Rezeptorsysteme miteinander und mit anderen Transmittersystemen wechselwirken [3, 22]. Cholinerge Interneurone sind im ZNS v.a. im Nucleus accumbens und im Striatum, cholinerge Projektionsneurone v.a. im basalen Vorderhirn (besonders mediales Septum, Diagonales Band von Broca, Nucleus Basalis Meynert) und im Hirnstamm (besonders laterodorsale und pedunculopontine tegmentale Nuclei) lokalisiert [3]. Eine der wichtigsten Afferenzen des Hippokampus sind die Körnerzellneurone modulierende cholinerge Afferenzen, die aus dem Diagonalen Band von Broca und dem medialen Septum stammen [39, 60]. GABAerge Afferenzen des Hippokampus stammen ebenfalls aus dem Diagonalen Band von Broca und dem medialen septalen Nucleus. Des Weiteren erhält der Hippokampus glutamaterge Afferenzen aus der supramammillaren Area und noradrenerge Afferenzen aus dem Locus coeruleus. Die Körnerzellen werden serotonerg von den Nuclei raphe innerviert und dopaminerge Neurone der ventralen tegmentalen Area verschalten auf sie [60].

Es ist seit langem bekannt, dass es fünf Unterformen des muskarinischen Acetylcholinrezeptors (M1-M5) gibt, die zur Superfamilie der G-Proteingekoppelten 7-Transmembran-Rezeptorfamilie gehören [3, 22, 23, 110, 111]. Die postsynaptisch lokalisierten M1-, M3- und M5-Rezeptoren sind Phospholipase C β gekoppelt und führen durch Aktivierung des G-Proteins G $\alpha_{q/11}$ zu einer Hydrolyse von Phosphoinositol zu Diacylglycerol und Inositoltrisphosphat und somit Proteinkinase C-abhängig zu einer Freisetzung

intrazellulären Calciums; schließlich werden somit die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) ERK1 und ERK2 (p44 und p42) aktiviert, die ihrerseits mit neuronaler Plastizität, neuronalem Überleben, Langzeitpotenzierung sowie Langzeit-Raumgedächtnis assoziiert sind [3, 4, 22, 23, 34, 37, 85, 110, 111]. Über pre- und postsynaptische M2- und M4-Auto- und Hetero-Rezeptoren wird hingegen $G\alpha_{i/o}$ -vermittelt die Adenylatcyclase gehemmt und somit werden Kalium- und Calcium-Kanäle moduliert, wodurch die Neurotransmitter-Freisetzung reduziert wird. Teilweise erfolgt aber ebenfalls eine Aktivierung der Phospholipase C [3, 4, 22, 23, 34, 85, 110, 111]. Insgesamt scheinen die von jeweils gleichartigen mAChR aktivierten Signalwege auch zellspezifisch zu divergieren [34]. Ebenfalls wurde über heteromolekulare Interaktion verschiedener mAChR untereinander, die über die zytoplasmatische Schleife drei vermittelt sein soll, berichtet [34]. M1-Rezeptoren sind neben M4- und M5-Rezeptoren in besonders schizophrenierelevanten Hirnbereichen, wie dem Frontallappen und limbischen Areae exprimiert, wo sie mit dopaminergen Neuronen wechselwirken [23]. Auch scheint dem M1-Rezeptor in der Hirnentwicklung eine wichtige Rolle zuzukommen [112] und cholinerge Aktivierung über M1-Rezeptoren scheint die Expression von Neurotrophenen wie BDNF und NGF zu induzieren [112]. M1-Rezeptor-Agonisten scheinen des Weiteren das Überleben von Zellen zu unterstützen [112] und der M1-Rezeptor scheint in Signalwege wie den Proteinkinase $C\gamma$ - und Proteinkinase $C\epsilon$ - sowie den MAP-Kinase-Weg, die für die Synaptogenese relevant sind, involviert zu sein [112]. Die Aktivierung von M1-Rezeptoren in hippokampalen Pyramidenzellen scheint die Rezeptor-Ströme von NMDA-Rezeptoren in CA1-Pyramidenzellen zu erhöhen [22, 31, 39]. Die Funktion und klinische Rolle von astrozytären muskarinischen Rezeptoren ist weitgehend unbekannt [6].

1.3 Zielsetzung der Arbeit

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass unter Nutzung einer Ki-67-Färbung adulte humane hippocampale Neurogenese bei an Schizophrenie Erkrankten im Vergleich mit Kontrollen in frisch tiefgefrorenem Gewebe reduziert war [113]. Frisch tiefgefrorenes Gewebe steht nur spärlich zur Forschung zur Verfügung und die Gewebequalität nimmt mit der Zeit auf Grund von Wasserverlusten während der Lagerung ab. Darüber hinaus weist in Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe eine größere Stabilität über der Zeit auf. Daher sollten in einem Arm der vorliegenden Arbeit die Ergebnisse vorheriger Arbeiten reproduziert werden, wobei jedoch an Stelle von frisch tiefgefrorenem Gewebe lange Zeit gelagertes, in Formalin fixiertes, in Paraffin eingebettetes Gewebe unter Nutzung einer auf einer Ki-67-Färbung basierten Strategie genutzt werden sollte. In einem weiteren Arm der vorliegenden Arbeit sollte in einem M1-Rezeptor-Knockoutmodell, das schizophrenieartiges Verhalten zeigt, geprüft werden, ob es zu Veränderungen in Hinblick auf die adulte Neurogenese bei männlichen Mäusen kommt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Menschliches Gewebe

Es wurden formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete Proben genutzt. Die ungarisch-stämmigen Fälle (n = 18) und ein Teil der gesunden Kontrollen (n = 15) wurden freundlicherweise von Professor P. Falkai, Göttingen, mittlerweile München, zur Verfügung gestellt. Der andere Teil der Kontrollen (n = 22) stammte aus der Würzburg Brain Bank am Institut für Pathologie der Universität Würzburg. Als Positiv- und Negativkontrollen für die Etablierung der Färbung wurden Proben eines entsprechend eingebetteten Medulloblastoms aus dem Institut für Pathologie der Universität Würzburg genutzt.

Fälle mussten eine Diagnoseangabe nach ICD-9 oder ICD-10 [5] besitzen. Bei Kontrollen wurde darauf geachtet, dass keine chronische neuropsychiatrische Erkrankung als Komorbidität von der Hirnbank angegeben wurde. Es wurden die Diagnosen der Fälle auf Plausibilität geprüft, indem potentielle Fälle mit unglaubwürdigen Angaben – z.B. erst im Senium beginnende schizophrene Symptomatik – aussortiert wurden.

Die Beschreibung der menschlichen Gewebeproben ist den Tabellen 2 und 3 zu entnehmen.

2. MATERIAL UND METHODEN

Nr	Block-Nr	F/K	Wü/HU	ICD	Erkrankung	Medikation
11	HH 003/01	K	HU			
12	7471	F	HU	295.5	Schiz. par. chr.	Ø
14	S 223/00 B6	K	WÜ			
15	BN 028/01	K	HU			
16	S 19/03 B7	K	WÜ			
17	6234	F	HU	295.3	Schiz. par. chr.	
18	S 231/00 B6	K	WÜ			
19	HH 11/01	K	HU			
20	6594	F	HU	295.3	Schiz. par. chr.	Fluanxol, Mannisol, Diadreson
22	BN 024/01	K	HU			
23	S 231/00 B7	K	WÜ			
24	7012	F	HU	295.7	Schizoaff. psych.	
25	HH 14/01	K	HU			
26	7144	F	HU	295.3	Schiz. par. chr.	typische Neuroleptika
28	BN 006/00	K	HU			
30	S 004/00 B7	K	WÜ			
31	HH 8/01	K	HU			
32	7849	F	HU	F20.0	Schiz. par. chr.	Ø
34	6148	F	HU	295.3	Schiz. par. chr.	?
35	HH 2201	K	HU			
36	S 111/03 B7	K	WÜ			
37	6990	F	HU	295.6	Pfropf-Schizophrenie	Ø
38	7727	F	HU	F20.9	Schiz. chr.	Ø
40	HH 9/01	K	HU			
41	S 224/01 B6	K	WÜ			
43	7617	F	HU	295.6	Schiz. par. defekt	Ø
45	HH 24/01	K	HU			
46	S 224/01 B7	K	WÜ			
48	8305	F	HU	F20.0	Schiz. chr.	Ø
49	7282	F	HU	295.7	Schizoaff. psych.	Pipolphen, Doxycyclin, Haloperidol, Moditen
50	BN 023/01	K	HU			
51	6712	F	HU	295.2	Schiz. katatonia	Leponex
52	7450	F	HU	295.7	Schizoaff. psych.	typische Neuroleptika, nicht näher bezeichnete Antidepressiva
53	6268	F	HU	295.0	Schiz. chr.	typische Neuroleptika wie Haldol
54	HOM 4/03	K	HU			

Tabelle 2: Menschliche Fälle und Kontrollen Teil 1. Nr.: Probennummer im Rahmen der Arbeit; Block-Nr: Nummer des Paraffinblocks; F: Fall; K: Kontrolle; Wü: Probe aus der Pathologie Würzburg; HU: ungarisch-stämmige Probe aus der Hirnbank Göttingen. ICD: Diagnose nach ICD-9 oder ICD-10; Erkrankung: Schriftliche Angaben der Hirnbank zur psychischen Erkrankung (ergänzend zur ICD-Angabe); Medikation: Schriftlichen Angaben der Hirnbank zur psychiatrischen Medikation; Ø: keine; ?: unklar.

2. MATERIAL UND METHODEN

Nr	Block-Nr	F/K	Wü/HU	ICD	Erkrankung	Medikation
56	HH 15/01	K	HU			
57	7362	F	HU	295.3	Schizoaff. psych.	typische Neuroleptika
58	HH 19/01	K	HU			
59	7313	F	HU	295.7	Schizoaff. psych.	Pimozid, Cavinton, Lithium, Haloperidol
60	7134	F	HU	295.3	Schiz. par.	hochdosierte Neuroleptika oder keine Medikation
61	BN 011/01	K	HU			
62	074/02 B6	K	WÜ			
63	074/02 B7	K	WÜ			
64	148/04 B6	K	WÜ			
65	148/04 B7	K	WÜ			
66	031/01 B6	K	WÜ			
67	031/01 B7	K	WÜ			
68	067/01 B6	K	WÜ			
69	067/01 B7	K	WÜ			
70	104/02 B6	K	WÜ			
71	208/02 B6	K	WÜ			
72	208/02 B7	K	WÜ			
73	176/03 B6	K	WÜ			
74	176/03 B7	K	WÜ			
75	37/05 B6	K	WÜ			

Tabelle 2: Fortsetzung.

Nr	Block-Nr	Alter	Todesursache	Erkrankungs- dauer	Geschlecht	p.m.-delay [h]
11	HH 003/01	78			w	
12	7471	79	Lungenembolie, Colon-Tumor		w	
14	S 223/00 B6	64			m	50
15	BN 028/01	55			m	
16	S 19/03 B7	66			m	19
17	6234	80	akuter Tod, Lungenembolie	45	w	

Tabelle 3: Menschliche Fälle und Kontrollen Teil 2. Nr.: Probennummer im Rahmen der Arbeit; Block-Nr: Nummer des Paraffinblocks; Alter: Sterbealter; Erkrankungsdauer: Dauer der psychischen Erkrankung; p.m.-delay [h]: Zeit zwischen Tod und Formalinfixierung in Stunden (laut Hirnbank); w: weiblich; m: männlich.

2. MATERIAL UND METHODEN

Nr	Block-Nr	Alter	Todesursache	Erkrankungs- dauer	Geschlecht	p.m.-delay [h]
18	S 231/00 B6	71			m	6,5
19	HH 11/01	66			m	
20	6594	49	Aneurysmaruptur hämorrhag. Insult	28	m	
22	BN 024/01	72			m	
23	S 231/00 B7	71			m	6,5
24	7012	44	Bronchopneumonie, Sepsis, cardiorespiratorisch Insuffizienz, Asthma	20	w	
25	HH 14/01	85			w	
26	7144	73	rezidivierende Bronchopneumonie, cariorespiratorische Insuffizienz	17	w	
28	BN 006/00	65			w	
30	S 004/00 B7	59			w	24
31	HH 8/01	61			m	
32	7849	89	Herzinsuffizienz, Bronchopneumonie	58	w	
34	6148	84	Bronchopneumonie	40	w	
35	HH 2201	78			w	
36	S 111/03 B7	67			m	5
37	6990	51	Diabetes mellitus, akute Lungenembolie, cariorespiratorische Insuffizienz	34	w	
38	7727	85	Aspiration	61	m	
40	HH 9/01	70			m	
41	S 224/01 B6	55			m	24

Tabelle 3: Fortsetzung.

2. MATERIAL UND METHODEN

Nr	Block-Nr	Alter	Todesursache	Erkrankungs- dauer	Geschlecht	p.m.-delay [h]
43	7617	70	Herzinsuffizienz	37	m	
45	HH 24/01	100			w	
46	S 224/01 B7	55			m	24
48	8305	60	cardiorespiratorische Insuffizienz, Lungen- Tumor, Lebermetastasen, Hirnetastasen	44	m	
49	7282	57	Hypertonie, Lungen- TB rechter Oberlappen, chronische Bronchitis	4	w	
50	BN 023/01	54			m	
51	6712	52	Katatonie, malignes neuroleptisches Syndrom	?	m	
52	7450	53	Lungenembolie	4	w	
53	6268	72	Herzinsuffizienz	41	m	
54	HOM 4/03	Ø			Ø	
56	HH 15/01	61			m	
57	7362	61	Pneumonie	30	w	
58	HH 19/01	81			m	
59	7313	44	Hämatemesis	21	w	
60	7134	71	Emphysem, Hemiparese, Bronchopneumonie	40	m	
61	BN 011/01	23			m	
62	074/02 B6	79			m	24
63	074/02 B7	79			m	24
64	148/04 B6	73			w	24
65	148/04 B7	73			w	24
66	031/01 B6	74			w	10
67	031/01 B7	74			w	10
68	067/01 B6	60			w	24
69	067/01 B7	60			w	24
70	104/02 B6	65			m	12
71	208/02 B6	54			m	27
72	208/02 B7	54			m	27
73	176/03 B6	62			m	24
74	176/03 B7	62			m	24
75	37/05 B6	49			m	14

Tabelle 3: Fortsetzung.

2.1.2 Gewebe der Maus

Es wurden ausschließlich männliche Mäuse verwendet. Verglichen wurden wildtypische Mäuse (wt, n = 12) mit Mäusen, bei denen der muskarinische M1-Acetylcholinrezeptor ausgeschaltet war (ko, n = 12). Der verwendete M1-knockout-Mausstamm wurde von der Arbeitsgruppe um Wess et al. entwickelt und charakterisiert [114]. Die Proben wurden vom Erstbeschreiber freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Mäuse sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 aufgelistet.

Hirn-Nr.	Block-Nr.
2	121
3	127
5	66
7	65
9	67
11	82
14	124
17	122
18	119
20	118
21	120
24	123

Tabelle 4: Kontrollen. Wildtypische Mäuse (wt).

Hirn-Nr.	Block-Nr.
1	112
4	76
6	74
8	75
10	81
12	80
13	133
15	111
16	110
19	109
22	113
23	134

Tabelle 5: Mäuse ohne funktionellen M1-Rezeptor (ko).

2.1.3 Antikörper

Es wurden die in Tabelle 6 und Tabelle 7 bezeichneten Antikörper verwendet.

Antikörper	exakte Bezeichnung	Hersteller	Tierart	Zielstruktur
DCX, polyklonal	Doublecortin (C-18) SC-8066 goat polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA (USA)	Ziege	Doublecortin
Ki 67, monoklonal	Ki67 antigen mouse monoclonal antibody IgG1, Clone MM1, VP-K452	Vector Laboratories, Burlingame (USA)	Maus	Ki-67 Antigen
Ki 67, monoklonal	NCL-L-Ki67-MM1	Novocastra, Newcastle Upon Tyne (UK)	Maus	Ki-67 Antigen
Ki 67, polyklonal	Ki67 antigen, lyophilized Rabbit Polyclonal Antibody NCL-L-Ki67p	Novocastra, Newcastle Upon Tyne (UK)	Kaninchen	Ki-67 Antigen
PCNA, monoklonal	PCNA (PC10) SC-56 mouse monoclonal IgG2a	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA (USA)	Maus	nukleäres Antigen proliferierender Zellen (PCNA)

Tabelle 6: Verwendete Erstantikörper.

Antikörper	exakte Bezeichnung	Hersteller	Tierart	Zielstruktur
anti-Kaninchen	Biotinylated anti-rabbit IgG (H+L) BA-1000	Vector Laboratories, Burlingame (USA)	Ziege	Kaninchen-Antikörper
anti-Maus	Biotinylated anti-mouse IgG (H+L) BA-9200	Vector Laboratories, Burlingame (USA)	Ziege	Maus-Antikörper
anti-Ziege	Biotinylated anti-goat IgG (H+L) BA-9500	Vector Laboratories, Burlingame (USA)	Pferd	Ziege-Antikörper

Tabelle 7: Verwendete Zweitantikörper.

2.1.4 Sera

Es wurden die in Tabelle 8 aufgeführten Sera verwendet.

Serum	Herstellernummer	Hersteller
normales Pferdeserum (NHS)	S-2000 LOT 1224	Vector, Burlingame (USA)
normales Ziegenserum (NGS)	S-1000 LOT V0505	Vector, Burlingame (USA)
Rinderserumalbumin (BSA), min. 98%	A 7906-100G Batch# 017K0725 EC 232-936-2	Sigma-Aldrich, Steinheim, (Deutschland)

Tabelle 8: verwendete Sera.

2.1.5 Geräte

Neben den üblichen Laborgeräten wurden die in Tabelle 9 aufgeführten Geräte eingesetzt.

Gerät	exakte Gerätebezeichnung	Hersteller
Dampfkochtopf	Sicomatic-D 4,5 L 0,9 bar, max. 1,5 bar Silargan	Silit, Riedlingen (Deutschland)
feuchte Kammer	Sonderanfertigung	
Mikroskop		
Lichtmikroskop	Leitz DM RBE 501006/15593F	Leica, Solms (Deutschland)
- Objektiv 2,5x - Objektiv 5x - Objektiv 10x - Objektiv 20x - Ocular 10x		
NeuroLucidamikroskop	Olympus BX 51	mbf bioscience, Williston, VT (USA)
Mikrotom	Microm HM 500 O	pfm medical, Köln (Deutschland)
Mikrowelle		
- Mikrowellengerät	MW 7823	Severin, Sundern (Deutschland)
- Mikrowellentopf		
- Deckel	669619	Simax, Bohemia Cristal, Selb (Deutschland)
- Topf	668614	Simax, Bohemia Cristal, Selb (Deutschland)

Tabelle 9: Verwendete Geräte.

2. MATERIAL UND METHODEN

Gerät	exakte Gerätebezeichnung	Hersteller
Objektträger, 76 x 26 mm		
- unbeschichtet	02 1102 ISO 8037/1	Menzel-Gläser R. Langenbrinck, Emmendingen (Deutschland)
- SuperFrost	SuperFrost®plus Objektträger 03-0060	R. Langenbrinck, Emmendingen (Deutschland)
Proprietäre Software		
Tetrander		
- Tetrander	Fabrik-Nr. 26792	R. Jung AG, Heidelberg (Deutschland)
- Messer	14066	Diatec, Hallstadt (Deutschland)
kleiner Tetrander	Hn 40 Fabrik-Nr. 020898	Richert-Jung, Cambridge- Instruments GmbH, Nussloch (Deutschland)
Wärmeplatte/ Strecktisch	SP 14, 1000 W max 90 °C Fabrik-Nr. 8321	Hartenstein/ Medax- Nagel KG, Kiel (Deutschland)
Wärmeschrank	Typ B6; 50042301	Heraeus Instruments, Hanau (Deutschland)
Wasserstopp-Stift	Liquid Blocker Super PAP Pen mini	Dadio Sangyo Co Ltd., Tokyo (Japan)

Tabelle 9: Fortsetzung.

2.1.6 Stoffe, Substanzen und Chemikalien

Es wurden die in Tabelle 10 aufgeführten Stoffe, Substanzen und Chemikalien eingesetzt.

2. MATERIAL UND METHODEN

Stoff	Herstellernummer/ Herstellername	Hersteller
Aceton	0 0570 32201	Fluka/ Sigma-Aldrich, Seelze (Deutschland)
Ameisensäure z.A., 98-100%ig	A 0748, 1000	AppliChem, Darmstadt (Deutschland)
Avidin	aus Vectastain ABC Kit PK-4000	Vector Laboratories Inc., Burlingame (USA)
Biotin	aus Vectastain ABC Kit PK-4000	Vector Laboratories Inc., Burlingame (USA)
Citronensäure-Monohydrat z.A.	A2337,1000	AppliChem, Darmstadt (Deutschland)
Cresylviolett Acetat	K20725535826	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Chloralhydrat	K318.1	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
DAB-Puffer	DAB Substrate 2 Peroxide buffer 11718096001	Roche Diagnostics, Mannheim (Deutschland)
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	DAB Substrate 1 10x conc. 11718096001	Roche Diagnostics, Mannheim (Deutschland)
destilliertes Wasser, Entnahme aus Millipore- Anlage	Milli-Q WaterSystem, 7FMQ23004	Millipore, Molsheim (Frankreich)
Eisessig	A6404-200ML	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Eiweiß-Glycerin	3T 012 Eiweiß-Glycerin	Chroma-Gesellschaft mbH &Co KG, Münster (Deutschland)
Eosin BNX		VK Labor
Ethanol absolut	32205	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Gelatine (aus Schweinehaut)	ECNo 2325546 LOT 1259386	Fluka Bio Chemika/ Sigma- Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Hämatoxylin-Monohydrat	K23747938; 738	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Kalialaun (Aluminium-Kaliumsulfat- Dodecahydrat) z.A.	1.01047.1000	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Kalium-Chrom-III-Sulfat		
Löffler's Methylenblau (Schnellfärbung)	A2515	AppliChem, Darmstadt (Deutschland)

Tabelle 10: Verwendete Stoffe, Chemikalien und Substanzen.

2. MATERIAL UND METHODEN

Stoff	Herstellernummer/ Herstellername	Hersteller
Natriumchlorid	31434	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Natriumjodat	6525.0025 237B384525	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Natronlauge, 5 M	A25 17,1000	AppliChem, Darmstadt (Deutschland)
Natronlauge, 1 M	1.09137.1000	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Paraformaldehyd (PFA)	4005.1000	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Phosphat-gepufferte Salzlösung (zehnfach konzentriert), ohne Calcium und Magnesium	BE17-517Q	Bio Whittaker/ Lonza, Verviers (Belgien)
Poly-L-Lysin 0,1g (w/v) in Wasser, 0,01% Thiomersal-Zusatz	P8920 LOT 088K4357	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Pritt Bastelkleber		Henkel, KGaA, Düsseldorf (Deutschland)
Pritt Gel		Henkel, KGaA, Düsseldorf (Deutschland)
Salzsäure, 5 M	A2668,1000	AppliChem, Darmstadt (Deutschland)
Salzsäure, 0,1 M	A1305,1000	AppliChem, Darmstadt (Deutschland)
Silan (3-Aminopropyl)triethoxysilane, 98%ig	A3648-100ML	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
TissueTek O.C.T. Compound	4583	Miles Inc., Elkhart (USA)
Tris	A1086,0500	AppliChem, Darmstadt (Deutschland)
Tris Pufferan ³ 99,3%	AE15.2	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe (Deutschland)
Triton X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol)	T-9284	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Vitro Clud Medium	BAM 9698-AL	R. Langenbrinck, Teningen (Deutschland)
Wasserstoffperoxid 30%ig	A1134,0500	AppliChem, Darmstadt (Deutschland)
Xylol Isomerengemisch	16446	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)

Tabelle 10: Fortsetzung.

2.1.7 Lösungen und Puffer

Es wurden Lösungen und Puffer gemäß den folgenden Mischungsverhältnissen verwendet. Die jeweiligen Mengen wurden mithilfe einer im Programm Microsoft Excel erstellten Schablone bestimmt. Bei Lösungen, die je Objektträger angegeben wurden, wurde bei einer kalkulierten Menge von 300 µl je

Objektträger stets 10% mehr Lösung hergestellt, um Verluste ausgleichen zu können (Wert in Klammern).

Avidin-Biotin-Complex (ABC), je Objektträger:

294 μ l (323,4 μ l) Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)
3 μ l (3,3 μ l) Avidin aus dem aus Vectastain ABC Kit von Vector
3 μ l (3,3 μ l) Biotin aus dem aus Vectastain ABC Kit von Vector

Citratpuffer 0,01 M:

2,1 g Citronensäure-Monohydrat in
800 ml destilliertem Wasser lösen
unter Rühren und pH-Kontrolle mit elektrischem pH-Meter pH auf
pH 6,0 mit 0,1 M - 5 M Salzsäure oder 1 M - 5 M Natronlauge
einstellen
mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen

Cresylviolettlösung, 0,1%ig:

999 ml destilliertes Wasser
1 mg Cresylviolett
83 ml Essigsäure 10%ig

3,3'-Diaminobenzidinlösung (DAB), $1/10$ -konzentriert, je Objektträger:

270 μ l (297 μ l) Puffer (DAB Substrate 2 Peroxide buffer aus dem
Satz 1718096001 von Roche)
30 μ L (33 μ l) 3,3'-Diaminobenzidin (DAB Substrate 1 10x conc.
aus dem Satz 11718096001 von Roche)

Eosinlösung, alkoholisch, 1%ig:

1 g Eosin BNX in
100 ml 96%igem Ethanol lösen

Essigsäure 10%:

900 ml destilliertes Wasser

100 ml Eisessig

Ethanol 96%:

40 ml destilliertes Wasser

960 ml Ethanol absolut

Ethanol 70%:

300 ml destilliertes Wasser

700 ml Ethanol absolut

Hämalaun nach P. Mayer:

1 g Hämatoxylin in

1000 ml destilliertem Wasser lösen, gegebenenfalls leicht erhitzen, dann

0,2 g Natriumjodat

0,5 g Kalialaun zusetzen und

unter Schütteln lösen. Die blau-violette Lösung mit

50 g Chloralhydrat

1 g Citronensäure versetzen. Die Lösung wird rot-violett.

Die Lösung ist gut verschlossen zu lagern.

Kaliumchrom-III-Sulfat-Lösung, 2,5 g/L:

0,25 g Kaliumchrom-III-Sulfat

100 ml destilliertes Wasser

Klebstoffmischung 1:1 (w/w):

0,5 g Pritt Bastelkleber abwiegen

0,5 g Poly-L-Lysin zusetzen

Klebstoffmischung mit Pritt Gel 1:1 (^w/_w):

- 0,5 g Pritt Gel abwiegen
- 0,5 g Poly-L-Lysin zusetzen

Normales Serum (Ziege/ Pferd), 3%ig (NGS/ NHS):

- 97 ml Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)
- 3 ml unverdünntes Normales Serum (NGS oder NHS)

Normales Serum (Ziege/ Pferd), 5%ig (NGS/ NHS) mit Rinderserumalbumin (BSA), 2%ig (sogenannte „Blocklösung“):

- 95 ml Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)
- 2 g Rinderserumalbumin (BSA) unter Rühren lösen
- 5 ml unverdünntes Normales Serum (NGS oder NHS) zusetzen

Normales Serum (Ziege/ Pferd), 5%ig (NGS/ NHS) mit Rinderserumalbumin (BSA), 2%ig mit Triton X-100, 0,5%ig (^w/_v):

- 95 ml Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)
- 0,5 g Triton X-100 darin lösen
- 2 g Rinderserumalbumin (BSA) unter Rühren lösen
- 5 ml unverdünntes Normales Serum (NGS oder NHS) zusetzen

Normales Serum (Ziege/ Pferd), 5%ig (NGS/ NHS) mit Triton X-100, 0,5%ig (^w/_v):

- 95 ml Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)
- 0,5 g Triton X-100 darin lösen
- 5 ml unverdünntes Normales Serum (NGS oder NHS) zusetzen

Paraformaldehyd in PBS (PFA) 4%ig:

- 192 ml Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), gebrauchsfertig
- 8 g Paraformaldehyd
- unter Rühren auf Heizplatte bei 58 °C bis 60 °C (Temperatur nicht überschreiten) vorsichtig lösen

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), gebrauchsfertig:

900 ml destilliertes Wasser
100 ml Phosphat-gepufferte Salzlösung (zehnfach konzentriert;
1,3 M Natriumchlorid, 70 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 30 mM
Natriumdihydrogenphosphat)

Salzsäure 0,1 M, pH 1,0:

980 ml destilliertes Wasser
20 ml Salzsäure 5 M
unter Rühren und pH-Kontrolle mit elektrischem pH-Meter pH auf
1,0 erst mit 5 M, dann 0,1 M Salzsäure einstellen
mit destilliertem Wasser auf 2000 ml auffüllen

Silan-Aceton-Gemisch:

200 ml Aceton
4 ml Silan

Tris-gepufferte Salzlösung (TBS):

12,1 g Tris-HCl
8,8 g Natriumchlorid in
800 ml destilliertem Wasser lösen
unter Rühren und pH-Kontrolle mit elektrischem pH-Meter pH auf
pH 7,5 mit 0,1 M - 5 M Salzsäure oder 1 M - 5 M Natronlauge
einstellen
auf 1000 ml mit destilliertem Wasser auffüllen

Tris-gepufferte Salzlösung mit Triton X-100, 0,025%ig (^w/_v) (TBS-Triton):

12,1 g Tris-HCl
8,8 g Natriumchlorid in
800 ml destilliertem Wasser, dem zuvor
0,25 g Triton X-100 zugesetzt wurden, lösen
unter Rühren und pH-Kontrolle mit elektrischem pH-Meter pH auf
pH 7,5 mit 0,1 M - 5 M Salzsäure oder 1 M - 5 M Natronlauge
einstellen
auf 1000 ml mit destilliertem Wasser auffüllen

Wasserstoffperoxid in TBS (H₂O₂-TBS) 0,6%ig:

490,2 ml Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)
9,8 ml Wasserstoffperoxid 30%

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden mit menschlichem Gewebe

2.2.1.1 Anfertigung von Gewebeschnitten

Alle menschlichen in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurden mittels eines Tetraders oder eines kleinen Tetraders mit einem Diatec-Messer Typ C in 8 μm dicke Schnitte geschnitten.

Die Gewebelöcke wurden in den Tetrader eingespannt. Der Tetrader wurde auf eine Schnittdicke von 8 μm eingestellt und nach Erreichen einer zur Schnittebene parallelen Abschnittebene in 8 μm starke Schnitte zugeschnitten. Die Schnitte wurden mittels eines Pinsels in destilliertes Wasser von Raumtemperatur, das zur Entfernung von Gasblasen erst abgekocht und dann unter Raumlufabschluss abgekühlt worden war, überführt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass alle Schnitte im Wasser mit gleicher Orientierung zum Liegen kamen, das heißt, dass die Seite des Schnittes, die nach dem Scheiden obenauf lag, auch im Wasserbad obenauf lag (s. Abbildung 5).

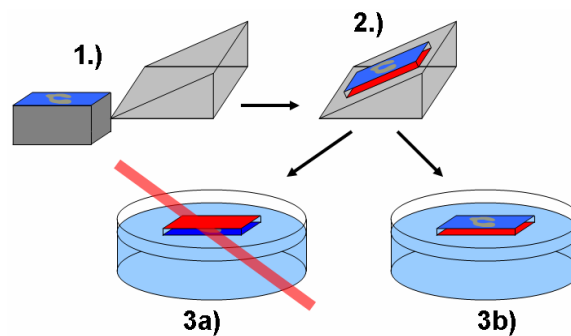


Abbildung 5: Schema der Schnittüberführung ins Wasserbad. Der Gewebelöckchen wird mit dem Messer geschnitten 1.), danach befindet sich der Schnitt auf dem Messer 2.). Der Schnitt wird nun so in ein Wasserbad überführt, dass die zuvor oben liegende Seite (blau) weiterhin oben liegt 3b), nicht jedoch unten 3a).

Im kalten (Raumtemperatur) Wasserbad wurden nun mit Hilfe eines Pinsels Luftbläschen, die unter dem Schnitt befindlich waren, entfernt. Da die Schnitte zu diesem Zeitpunkt noch recht uneben waren, wurden sie zum Strecken mittels eines unbeschichteten Objektträgers in ein ebenfalls durch Abkochen

entgastes, etwa 30 °C warmes Warmwasserbad überführt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Schnitte nicht zu lange im Warmwasserbad verblieben, damit sie nicht auseinanderrissen. Die so geglätteten Schnitte wurden im nächsten Schritt auf Objektträger aufgezogen.

2.2.1.2 Aufziehen von Gewebeschnitten

Die angefertigten Gewebeschnitte wurden auf verschiedene Weise auf beschriftete Objektträger überführt. In der Etablierungsphase der Methode wurden zuerst Schnitte auf verschiedenartig beschichtete Objektträger mittels einer konventionellen Methode aufgezogen. Für die später in der Auswertung genutzten Proben wurde zunächst eine spezielle Klebemethode zum Aufziehen der Objektträger etabliert. Diese Methode wurde dann in der Etablierung des Färbeprotocoll genutzt.

Konventionelle Methode. Verschiedenartig beschichtete Objektträger (vgl. Tabelle 11) wurden unter die im Warmwasserbad schwimmenden Gewebeschnitte geführt. Durch Anheben wurden die Schnitte unter Zuhilfenahme eines Pinsels auf die Objektträger gezogen. Bei der Eiweiß-Glycerin-Methode wurde ein Tropfen einer Eiweiß-Glycerin-Mischung auf den Objektträger aufgetragen und dann verstrichen bevor der Schnitt aufgezogen wurde.

Objektträger	Beschichtung
Eiweiß-Glycerin	Eiweiß-Glycerin
gelatiniert	Chrom-Gelatine
silanisiert	Silan ((3-Aminopropyl)triethoxysilane)
Poly-L-Lysin	Poly-L-Lysin
SuperFrost	patentierte Beschichtung der Firma R. Langenbrinck
unbeschichtet	keine

Tabelle 11: Verschiedene Beschichtungen von Objektträgern, die eingesetzt wurden.

Klebemethode. [115] Auf silanisierte Objektträger, die wie unter 2.2.3.1 beschrieben hergestellt wurden, wurde ein Tropfen (ca. 100 μL) einer Klebermischung (1:1 nach Gewicht) gegeben. In der Etablierungsphase wurde noch mit einem Pritt Gel-Poly-L-Lysin-Gemisch experimentiert, bei den später verwendeten Proben wurde nur noch ein Pritt Bastelkleber-Poly-L-Lysin-Gemisch verwendet. Der Tropfen Klebermischung wurde mit dem behandschuhten Finger gleichmäßig auf dem Objektträger verstrichen. Anschließend wurde mithilfe des so vorbehandelten Objektträgers der Schnitt wie bei der konventionellen Methode aufgezogen. Es wurde darauf geachtet, dass die Klebermischung auf dem Objektträger bis zum Aufziehen des jeweiligen Schnittes nicht antrocknete. Da das Klebergemisch das Wasserbad verunreinigte, wurden im jeweiligen Wasserbad nur Schnitte mit Klebemethode aufgezogen und das Wasserbad regelmäßig bei der Arbeit erneuert.

Mit den aufgezogenen Schnitten wurde sowohl bei der konventionellen Methode als auch bei der Klebemethode gleichartig weiterverfahren.

Die aufgezogenen Schnitte wurden auf einer Wärmeplatte bei etwa 30 °C so angetrocknet, dass sie zwar noch feucht waren, jedoch ein Großteil des aus dem Wasserbad mitgeführten Wassers verdunstet war. Es wurde darauf geachtet, dass die Schnitte nicht austrockneten. Dann wurde noch überstehendes Wasser von den Objektträgern abgegossen, um im folgenden Schritt Verdünnungseffekte zu minimieren. Durch das vorherige Antrocknen rutschten die Schnitte nun nicht mehr vom Objektträger. Danach wurden die Objektträger mit der Gewebeprobe nach oben einzeln auf eine harte Unterlage gelegt und durch ein Filterpapier mit 70%igem Ethanol übergossen. Mit dem behandschuhten Finger wurde nun über das auf dem Schnitt liegende ethanolbenetzte Filterpapier mit mittelfestem Druck zehnmal in eine Richtung gestrichen, um einerseits das Anliegen des Schnitts auf dem Objektträger sicherzustellen, andererseits um kleine Luftbläschen unter dem Schnitt zu entfernen. Daraufhin wurden die Objektträger mit dem Schnitt nach oben auf die Wärmeplatte von etwa 30 °C gelegt. Es wurde nun mehrere Stunden

gewartet, bis alle Flüssigkeit unter den Schnitten verdunstet war und die Schnitte vollständig trocken waren. Die trockenen Objektträger wurden in eine Glasschaukel ziehharmonikaartig überführt und mindestens über Nacht im Wärmeschrank bei 45 °C vollständig ausgetrocknet.

Die so aufgezogenen Schnitte wurden bis zu ihrer Verwendung in Holzkästen bei Raumtemperatur trocken gelagert.

2.2.1.3 Deparaffinierung von Gewebeschnitten

Zu deparaffinierende Schnitte wurden ziehharmonikaartig in Glasschaukeln eingestellt. Die Glasschaukeln mit Objektträgern wurden anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe deparaffiniert. Hierzu wurden die Objektträger erst zweimal für jeweils 15 Minuten in Xylol eingestellt, dann kurz in 100%igem Ethanol gewaschen und dann in frisches 100%iges Ethanol für fünf Minuten eingestellt. Danach wurden die Proben kurz in 96%igem Ethanol gewaschen und in frisches 96%iges Ethanol für fünf Minuten überführt. Anschließend wurden die Schnitte kurz in 70%igem Ethanol gewaschen und danach für fünf Minuten in frischem 70%igem Ethanol inkubiert. Abschließend wurden die Objektträger erst kurz in destilliertem Wasser gewaschen und dann in diesem für fünf Minuten inkubiert. Zuletzt wurden die Schnitte erneut für fünf Minuten in frischem destilliertem Wasser inkubiert.

Für histologische Färbungen wurde mit den so deparaffinierten Schnitten weitergearbeitet. Für immunhistochemische Färbungen wurden die Schnitte anschließend in mit Tris gepufferte Kochsalzlösung (TBS) überführt und dreimal für fünf Minuten in TBS gewaschen. Im Prozedere der später in die Analyse eingeschlossenen Proben wurden die Schnitte im dritten TBS über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und am nächsten Tag weiterverarbeitet.

2.2.1.4 Immunhistochemische Färbung

Deparaffinierte Gewebeproben, die über Nacht im dritten TBS bei 4 °C gelagert worden waren, wurden 30 Minuten in 0,6%iger Wasserstoffperoxidlösung in TBS (H₂O₂-TBS) bei Raumtemperatur inkubiert, um endogene Peroxidaseaktivität zu eliminieren. Anschließend wurde dreimal für jeweils fünf Minuten in TBS mit 0,025% (^{w/v}) Triton X-100 (TBS-Triton) gewaschen. Triton X-100 wurde zugesetzt, um eine geringere Artefaktrate durch effektiveres Waschen zu erreichen.

Danach wurden die Proben durch Kochen einem Antigen *retrieval* (Antigen-Aufdeckung) unterworfen [116]. Hierzu wurden stets zwei Glasschaukeln mit jeweils 19 Objektträgern in eine mikrowellengeeignete Glasform (Mikrowellentopf) eingestellt. Eventuell freie Plätze in den Glasschaukeln wurden, um eine stets gleiche Energieaufnahme zu gewährleisten, mit leeren Objektträgern besetzt. Die Objektträger in den Glasschaukeln wurden mit 800 ml 0,1 M Salzsäure (pH 1,0) von Raumtemperatur überschichtet und in die Mikrowelle eingestellt [102]. Die Schnitte wurden bei 800 W erhitzt. Nach zehn bis zwölf Minuten kochte die Salzsäure. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Schnitte bei 800 W gekocht und bis zur etwa elften Minute bei dieser Einstellung gekocht. Dann wurde die Leistung in etwa eineinhalb-Minutenschritten graduell über 650 W und 465 W reduziert, bis sie 290 W betrug. Insgesamt betrug die Kochzeit ohne Aufwärmzeit 15 Minuten. Nach Ende der Kochzeit wurde das Mikrowellengefäß aus der Mikrowelle entnommen. Die Schnitte wurden bei leicht geöffnetem Deckel 20 Minuten in der noch warmen Salzsäure abgekühlt. Daraufhin wurden die Schnitte in TBS-Triton überführt und dreimal für fünf Minuten in TBS-Triton gewaschen.

Nach erfolgter Antigenaufdeckung und vorsichtigem Abtrocknen der Objektträgerränder wurden überschüssige Bindungen in den Proben durch einstündige Inkubation der Objektträger bei Raumtemperatur in einer durch TBS befeuchteten feuchten Kammer (vgl. Abbildung 6) mit jeweils 300 µl

Blocklösung (5% normales Ziegenserum (NGS) und 2% Rinderserumalbumin (BSA) in TBS) abgebunden.



Abbildung 6: Feuchte Kammer. Links: offen. Oben erkennt man einen in TBS getränkten Zellstoffstreifen. Unten die Objektträger. Rechts: geschlossen. Die Kammer wird verschlossen, indem eine weitere Bodenplatte darauf gelegt wird. Das System ist somit beliebig stapelbar.

In der Etablierungsphase wurde versucht, das Abtrocknen durch Nutzung eines Wasserstopp-Stiftes zu umgehen, was jedoch wegen der Kleberbeschichtung der Objektträger nicht möglich war. Anschließend wurden die Proben mit 300 μ l in Blocklösung entsprechend verdünntem Erstantikörper in einer durch TBS befeuchteten feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Objektträger wieder in Glasschaukeln eingestellt und dreimal in TBS-Triton gewaschen. Anschließend wurden nach vorsichtigem Abtrocknen der Objektträgerränder auf jeden Objektträger 300 μ l in Blocklösung entsprechend verdünnter und zum Erstantikörper passender biotinylierter Zweitantikörper gegeben. Der Ansatz wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer mit TBS befeuchteten feuchten Kammer inkubiert. Daraufhin wurde dreimal für fünf Minuten mit TBS-Triton gewaschen. Danach wurden die Proben nach vorsichtigem Abtrocknen der Objektträgerränder für 90 Minuten mit 300 μ l je Objektträger frischem AB-Komplex (je Objektträger 3 μ l Avidin, 3 μ l Biotin in 294 μ l TBS) in einer mit TBS befeuchteten feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde dreimal für jeweils fünf Minuten in TBS-Triton gewaschen. In einem letzten Schritt wurden die Objektträger mit je 300 μ l 1:10 verdünntem DAB (30 μ l 3,3'-Diaminobenzidin mit 270 μ l Puffer aus einem Satz) zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbereaktion wurde durch

Abspülen der Objektträger mit jeweils etwa 1 ml destilliertem Wasser abgestoppt. Restliches DAB wurde durch dreimaliges Waschen der Objektträger für je fünf Minuten in TBS-Triton entfernt. Zuletzt wurden die Objektträger kurz in destilliertes Wasser überführt, bevor eine Gegenfärbung mit Eosin durchgeführt wurde.

In der Etablierungsphase wurde die immunhistochemische Färbung in verschiedenen anderen Varianten durchgeführt, bis sich das beschriebene Prozedere als das geeignete herausstellte. So wurden verschiedene Modifikationen in Hinblick auf das Kochprozedere (mit den Dimensionen Kochpuffer, Kochdauer und Kochmethode), den verwendeten Waschpuffer und verwendeten Blockpuffer, den Zeitpunkt der Schritte der Blockierung endogener Peroxidasen und die eingesetzte Gegenfärbung durchgeführt. Der Antikörper-Verdünnungspuffer entsprach in seiner Zusammensetzung – sofern nichts anderes angegeben ist – dem Blockpuffer. Auch die Konzentrationen, Arten und Zielstrukturen der eingesetzten Antikörper wurden variiert. Da das Grundgerüst der immunhistochemischen Färbung immer dem oben genannten entsprach, werden im Folgenden nur die einzelnen Modifikationen, die jedoch auch in Kombination miteinander ausgetestet wurden, aufgeführt.

Kochprozedere-Kochpuffer. Neben der genannten 0,1 M Salzsäure (pH 1,0) fand auch 0,01 M Citratpuffer (pH 6,0) Verwendung

Kochprozedere-Kochdauer. Es wurde auch im Citratpuffer im Becherglas auf einer Heizplatte für fünf Minuten gekocht, wobei 20 Minuten abgekühlt wurde. Auch wurde in 1,5 l Citratpuffer im Dampfkochtopf auf der Heizplatte für zehn, 20, beziehungsweise 25 Minuten nach Erreichen der Kochtemperatur gekocht, wonach 20 Minuten im Citratpuffer nach Ablassen des Überdrucks abgekühlt wurde.

Kochprozedere-Kochmethode. Es wurde ein Kochprozedere ausgetestet, bei dem im Becherglas auf einer Heizplatte die Proben aufgeköcht wurden. Bei

vielen Versuchen in der Etablierungsphase wurde mit einem Dampfkochtopf (Stufe 2, entsprechend einer Kochtemperatur von 121 °C) auf einer Heizplatte gearbeitet. In diesem wurde ab Erreichen des Zieldruckes für zehn, wahlweise 20 oder 25 Minuten gekocht. Nach dem Kochen wurden die Schnitte wie beim Salzsäure-Prozedere 20 min im Kochpuffer abgekühlt. Der Dampfkochtopf wurde aus Sicherheitsgründen, da der Topf für starke Säuren nicht zugelassen war, nicht für Arbeiten mit Salzsäure verwendet.

Antikörper. Es wurden verschiedene Antikörper getestet. So wurde in der Etablierungsphase nicht nur mit Antikörpern gegen das Ki-67 Antigen (monoklonal wie polyklonal), sondern auch mit Antikörpern gegen PCNA und Antikörpern gegen Doublecortin (DCX) gearbeitet. In den Versuchen, die in die Datenanalyse eingingen, wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen das Ki-67 Antigen gearbeitet, der 1:1000 in NGS-basiertem Puffer verdünnt wurde. Während für PCNA vor allem mit einer Verdünnung von 1:400 in NGS-basiertem Puffer gearbeitet wurde, wurde der DCX-Antikörper meist 1:100 in NHS-basiertem Puffer verdünnt. Der monoklonale Ki-67-Antikörper wurde in Verdünnungen zwischen 1:50 und 1:100 in NGS-basiertem Puffer genutzt. Während der Etablierungsphase wurde der polyklonale Ki-67-Antikörper in Verdünnungen zwischen 1:100 und 1:2000 in NGS-basiertem Puffer ausgetestet.

Waschpuffer. Bei vielen Versuchen in der Etablierungsphase wurde statt TBS-Triton normales TBS verwendet.

Blockpuffer. Als Blockpuffer fand auch 3%iges normales Pferdeserum (NHS) Verwendung, wenn NHS für die Verdünnung des Erstantikörpers genutzt wurde. Ebenfalls wurde eine Zusammensetzung des Blockpuffers aus 5% normalem Ziegenserum (NGS) und 0,5% Triton X-100 in TBS ausgetestet, wobei die Antikörper in diesem Fall mit 5% normalem Ziegenserum (NGS), 2% Rinderserumalbumin (BSA) und 0,5% Triton X-100 in TBS verdünnt wurde. Auch eine Verwendung von 5% normalem Ziegenserum (NGS), 2%

Rinderserumalbumin (BSA) und 0,5% Triton X-100 in TBS für Blockierung und Antikörperverdünnung wurde ausgetestet. Für Färbungen mit einem Erstantikörper gegen Doublecortin (DCX) wurde sowohl normales Ziegenserum (NGS), als auch normales Pferdeserum (NHS) als Blockpuffer und Antikörperverdünnungspuffer verwendet.

Peroxidaseblockierung. Es wurde versucht, ob eine nur 15minütige Blockierung endogener Peroxidasen mittels 0,6% H₂O₂-TBS im Anschluss an die Antigenaufdeckung mittels Salzsäure und Abkühlenlassen der Proben im Kochpuffer über 30 Minuten ein positives Ergebnis brächte.

Gegenfärbung. Als Gegenfärbung wurden auch die Färbung nach Nissl und die Hämalaun-Färbung ausgetestet.

2.2.1.5 Histologische Gegenfärbung

Nachdem die Objektträger in destilliertes Wasser überführt worden waren, erfolgte die Gegenfärbung der Proben mittels einer konventionellen Eosin-Färbung. In der Etablierungsphase wurde auch mit den Färbungen nach Nissl und der Hämalaun-Färbung als Gegenfärbung gearbeitet. Anschließend wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und eingedeckt.

Eosin-Gegenfärbung. Die in destilliertes Wasser eingestellten Schnitte wurden für drei Minuten in 1%ige alkoholische Eosin-Lösung eingestellt. Anschließend wurden die Schnitte direkt in die aufsteigende Alkoholreihe in 96%iges Ethanol eingestellt. Die sonst vorgeschalteten Schritte der aufsteigenden Alkoholreihe entfielen entsprechend. Bei der Eosin-Gegenfärbung wurde darauf geachtet, dass die Schnitte – wegen der schlechten Gewebeadhärenz von Eosin – in den ethanolischen Lösungen nicht zu stark geschwenkt wurden, um ein Auswaschen des Eosin aus den Schnitten zu vermeiden. Aus gleichem Grund wurden kürzere Zeiten für die Entwässerungsschritte in ethanolischen Lösungen gewählt. So betrug die Inkubationszeit im 96%igen Ethanol nur

zweieinhalb Minuten, der erste Waschschrift in absolutem Ethanol nur drei Minuten, der zweite Waschschrift in absolutem Ethanol nur dreieinhalb Minuten.

Hämalaun-Gegenfärbung. Nach Einstellen der Schnitte in destilliertes Wasser wurden diese für eine Minute in Hämalaun-Lösung überführt. Danach wurden die Proben durch Leitungswasser, das das die Glasschaukel umfassende Gefäß langsam durchspülte, gebläut. Dabei wurde zum Schutz der Gewebeproben darauf geachtet, dass das Leitungswasser nur von der Seite der Objektträger zugeführt wurde, auf der keine Schnitte befestigt waren (vgl. Abbildung 7)

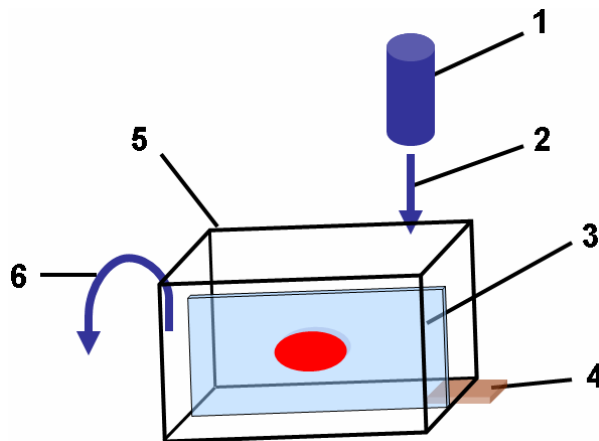


Abbildung 7: Schema der Leitungswasserzufuhr beim Bläuen in der Hämalaun-Färbung. Das Leitungswasser wird in einer Ecke des Glasgefäßes auf der Seite der Objektträger – der „Rückseite“ –, auf der kein Schnitt haftet, eingeleitet und fließt an der diagonal gegenüber gelegenen Ecke ab. Das Glasgefäß wird zur Bestimmung der Flussrichtung durch etwas untergelegtes Papier leicht schrägestellt. 1: Wasserzufuhr; 2: Einströmrichtung der Wassers; 3: Objektträger, dessen Probe auf der Seite, die dem Betrachter zugewendet ist, haftet (jenseits der Wasserzufuhr); 4: unter das Glasgefäß untergelegtes Papier; 5: Glasgefäß; 6: Abflussrichtung des Wassers.

Die Dauer des Bläuens unter Leitungswasser war von der verwendeten Wassertemperatur abhängig. Bei Verwendung von handwarmem Leitungswasser wurde 15 Minuten gebläut. Wenn kaltes Leitungswasser verwendet wurde, musste 30 Minuten gebläut werden. Es wurde angestrebt, in der Regel mit warmem Wasser zu bläuen. Aus gebäudetechnischen Gründen

war jedoch teilweise ein Bläuen mit Kaltwasser unumgänglich. Nach Ende des Bläuens wurden die Proben kurz in destilliertem Wasser gespült, bevor die Proben in eine aufsteigende Alkoholreihe eingestellt wurden.

Hämalaun-Eosin (HE)-Färbung. Für Schnitte, die der histologischen Orientierung dienten, wurde eine Hämalaun-Eosin (HE)-Färbung durchgeführt. Hierzu wurden die entsprechenden Schnitte zunächst wie beschrieben deparaffiniert. Anschließend wurde eine Eosin-Färbung wie beschrieben durchgeführt. An diese Färbung schloss sich eine Hämalaun-Färbung an, die wie beschrieben durchgeführt wurde. Beim sich anschließenden Eindeckungs-Schritt wurde auf ein schonendes Vorgehen in der aufsteigenden Alkoholreihe wie beim Eosin durchgeführt, um ein Entfärben vom Eosin zu vermeiden. Es schloss sich das Eindecken der Schnitte wie angegeben an.

Nissl-Gegenfärbung. In destilliertem Wasser eingestellte Proben wurden für fünf Minuten mit Cresylviolett-Lösung überfärbt und danach mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte in 70%iges Ethanol, dem einige Tropfen Eisessig zugesetzt waren, entfärbt. Wenn in einer mikroskopischen Kontrolle eines Schnittes die Färbung zu schwach war, wurden die Proben erneut in die Cresylviolett-Lösung eingestellt. War die Überfärbung noch zu stark, wurde weiter in der Mischung aus Ethanol und Eisessig gewaschen. War die Färbung zufriedenstellend, wurden die Schnitte in die aufsteigende Alkoholreihe eingestellt. Hierbei wurde direkt beim Schritt mit 96%igem Ethanol begonnen. Um eine weitere Entfärbung der Schnitte zu verhindern, wurde nur je zwei Minuten in den alkoholischen Lösungen entwässert und auf den zweiten Waschschrift in absolutem Ethanol verzichtet. Ferner wurden aus demselben Grund starke Schwenkbewegungen vermieden.

2.2.1.6 Aufsteigende Alkoholreihe und Eindecken

Zum Abschluss der histologischen Gegenfärbung der Proben wurden die Schnitte entwässert und unter Deckgläschen mithilfe eines Spezialmediums

eingedeckt. Zur Entwässerung der Proben wurde eine aufsteigende Alkoholreihe verwendet, die im Fall der Eosin-Gegenfärbung und der wenig genutzten Nissl-Gegenfärbung wegen der leichten Auswaschbarkeit der Farbstoffe abgekürzt werden musste.

Zu Beginn der Entwässerung wurden die Proben nach kurzem Einstellen in destilliertes Wasser für vier Minuten in 70%iges Ethanol eingestellt. Anschließend wurde vier Minuten in 96%igem Ethanol, danach vier Minuten in 100%igem Ethanol gewaschen. Daraufhin wurden die Proben für fünf Minuten in frisches 100%iges Ethanol überführt, um danach fünf Minuten in Xylol inkubiert zu werden. Abschließend wurden die Proben in ein weiteres Xylolbad für fünf Minuten eingestellt, bevor sie unter Deckgläschen mit Vitro Clud Medium eingedeckt wurden. Zwischen dem Wechseln der einzelnen Bäder wurden die Glasschaukeln stets etwas geschüttelt, um ein gutes Herauswaschen der jeweils vorherigen Lösung zu erzielen. Bevor eine Auswertung der Schnitte möglich war, wurden die Objektträger unter dem Abzug gründlich über etwa eine Woche bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in Holzkästen bei Raumtemperatur verwahrt.

2.2.1.7 Auszählung der Proben am Lichtmikroskop

Zur Auszählung der Proben wurde ein Leitz DM RBE-Lichtmikroskop der Firma Leica verwendet. Da der Gewebekontrast bei den Eosin-gefärbten Proben recht gering war, wurden unmittelbar vor der eigentlichen Auszählung zwei Hämalaun-Eosin (HE) gefärbte Schnitte des jeweiligen Gewebeblockes, die ursprünglich möglichst vor und nach dem eigentlich auszuwertenden Gewebe lagen, aufgelegt. Mithilfe dieser Schnitte war eine grobe Orientierung im Gewebe möglich, sodass die mit Eosin-angefärbten Strukturen in den Proben definierten Gewebestrukturen zuordenbar wurden. Es wurde angestrebt, möglichst einen HE-gefärbten Schnitt vor, und einen nach den Proben zu nutzen, um eventuelle Veränderungen im Verlauf von Granularzellschicht (GZS,

als Korrelat des Verlaufs der Subgranularzellschicht) und Hilus (H) zu erkennen.

Von den HE-Färbungen, die jeweils vor der zugehörigen Probe aufgelegt wurden, wurden unter den zwei kleinsten Vergrößerungen (2,5x, 5x) grob orientierende Skizzen angefertigt, die Verlauf und Größe der Granularzellschicht, die schnittbedingte Anzahl an Granularzellschichten und Hili, die Beziehung von Granularzellschicht und Hilus zur Hirnoberfläche, prominente Gefäße und sonstige auffällige Strukturen (z.B. Plexus choroideus) berücksichtigten. Unter Zuhilfenahme der Skizzen wurden dann die eosingefärbten Proben in der zweitkleinsten Vergrößerung (5x) nach den markantesten der genannten Strukturen abgesucht, bis die Granularzellschicht eindeutig identifiziert werden konnte.

Nachdem die Granularzellschicht zur Orientierung einmal vollständig abgefahren worden war, wurde zuerst die Granularzellschicht samt zugehöriger Subgranularzellschicht in 10-facher Vergrößerung ausgezählt. Hierzu wurde diese systematisch abgefahren und positive, das heißt braun gefärbte, Zellen mittels einer Strichliste gezählt. Anschließend wurde der zugehörige Hilus systematisch abgefahren und in 10-facher Vergrößerung ausgezählt, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Zellen doppelt gezählt wurden (vgl. Abbildung 8). Im Zweifel wurden ausgewählte Strukturen in 20-facher Vergrößerung untersucht.

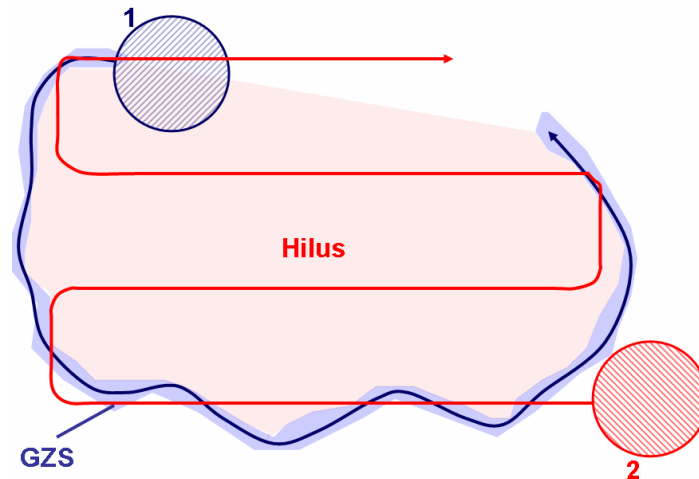


Abbildung 8: Vorgehen beim Auszählen der Subgranularzellschicht und der Granularzellschicht (GZS, blau) sowie des Hilus (rot). Zuerst wird die Granularzellschicht eingestellt. Dann (1) wird mit dem Gesichtsfeld (blaugestreifter Kreis) die Granularzellschicht systematisch abgefahren (blauer Pfeil). Danach (2) wird der Hilus mit dem Gesichtsfeld (rotgestreifter Kreis) systematisch abgefahren. Dabei wird darauf geachtet, dass immer nur in einer Achse die Bewegung des Gesichtsfeldes stattfindet, damit keine Bereiche übersehen werden. Für die Rückbewegung wird das Gesichtsfeld so versetzt, dass die beiden Bewegungsachsen des Gesichtsfeldes sich tangieren, jedoch nicht überschneiden, um ein mehrfaches Zählen von Zellen zu vermeiden.

Bei oben genanntem Vorgehen zur Auszählung der Schnitte fanden zuvor festgelegte Kriterien zur Definition und Zuordnung positiver Zellen Anwendung. Als positive Zellen, das heißt mit Antikörper markierte und durch DAB angefärbte Zellen, wurden die Zellen definiert, die eine eindeutig braune Farbe aufwiesen. Eine eventuelle Rotstichigkeit von Strukturen galt als Ausschlusskriterium. Rotstichige Zellen wurden als stärker Eosin-angefärbte Zellen betrachtet, die a priori ausgeschlossen wurden, da eine eindeutige Differenzierung zwischen tief roten und mäßig braunen Zellen nicht möglich war. Darüber hinaus galt als Definitionskriterium, dass die positiven Zellen in der Größe mit den sie umgebenden Zellen (erkennbar als vom Eosin angefärbte „Zellschatten“) in etwa (bis Faktor 3) übereinstimmten. Deutlich größere Strukturen wurden als Artefakte angesehen. Ein in der Literatur beschriebenes [103] feingranuliertes Muster wurde ebenfalls als positiv betrachtet, auch wenn der angefärbte Bereich kleiner als ein Drittel der üblichen Zellschatten betrug, sofern mehrere Granula vorlagen, und eine eindeutig als

Artefakt zu wertende Anordnung (z.B. in „Straßen“ oder eine großflächige Anordnung eines feingranulierten Musters) nicht vorlag. Des Weiteren wurden unrunde, eckige oder streifige Strukturen als Artefakt betrachtet. Diesem lag die Annahme zugrunde, dass Zellstrukturen, im besonderen Zellkerne, die von Antikörpern gegen Ki-67 angefärbt werden, in der Regel abgerundete Form besitzen, nachträglich eingedockte Fasern oder Kristalle hingegen streifig oder eckig sind. Strukturen, die eindeutig schwarze Farbe besaßen, wurden ebenfalls nicht als positiv betrachtet, da der Nachweis mit DAB eine Braunfärbung, aber keine Schwarzfärbung verursacht. Schwarze Strukturen wurden am ehesten Fasern oder kristallinen Strukturen zugeordnet. Ebenfalls nicht als positiv wurden Strukturen mit nur sehr schwacher Braunfärbung oder homogen braun angefärbte Zellkörper (teilweise mit Zellfortsätzen) betrachtet. Strukturen, die vorgenannte Bedingungen erfüllten, wurden als positive Zellen gezählt, sofern sie nicht in einem Blutgefäß oder der Wand eines Blutgefäßes lagen. Auch die reihige („wie an einer Perlenschnur“) Anordnung von mehreren (mindestens drei) positiven Strukturen wurde – auch in Abwesenheit eines eindeutig erkennbaren Gefäßendothels – als Zellen in einem Blutgefäß definiert, die Strukturen wurden in dem Fall nicht mitgezählt. Auch wurden positiv gefärbte Strukturen ausgeschlossen, die an der Ventrikelwand lagen oder in den Liquorraum hineinreichten. Diese Strukturen wurden als Ependym, beziehungsweise Plexus chorioideus erachtet. Der Ausschluss von solchen gefäßassoziierten oder Ependym- und Plexus chorioideus-assoziierten Zellen und Strukturen erfolgte, da durch die Behandlung mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2 -TBS) zwar endogene Peroxidasen blockiert wurden, jedoch die Konzentration oftmals nicht ausreichte, um die Katalaseaktivität der Häm-Gruppen in Erythrozyten oder die Katalasen im Plexus chorioideus zu blockieren. Die Gefäßwand wurde – auch wenn hier eigentlich positiv gefärbte Zellen anzutreffen waren – nicht mitgezählt, obwohl neuronale Vorläuferzellen in Umgebung von Blutgefäßen [63] anzutreffen sind. Dies erfolgte vor dem Hintergrund, dass neuronale Vorläufer zwar in der Nähe von Gefäßen, aber nicht in ihrer Wand nachweisbar seien dürften. Ferner ist es nicht möglich, mit einem unselektiven Proliferationsmarker wie Ki-67, der in allen Zellen außerhalb

der G₀-Phase zwischen neuronalen Vorläuferzellen und nichtneuronalen proliferierenden Zellen (z.B. sich teilenden Endothel-Zellen) zu unterscheiden. Um hier den Fehler zu minimieren, wurden solche Strukturen ausgeschlossen.

Als auszählende Fläche wurde die erkennbare Subgranularzellschicht ausgezählt. Da vorherige Arbeiten gezeigt hatten, dass Proliferation vor allem in der Subgranularzellschicht stattfindet [44, 63, 113], wurden positive Zellen, die sich bis zu drei Zelldurchmesser innerhalb der Granularzellschicht befanden, mit zur Subgranularzellschicht gezählt, um ein schnittbedingtes Nicht-Erfassen dieser Zellen zu vermeiden. Da in der Eosin-Gegenfärbung die histologische Schichtung des Hippokampus nicht so exakt wie in einer Hämalaunfärbung dargestellt werden kann und aufgrund sehr geringer Zahlen positiver Zellen in der Granularzellschicht und extrem geringer Zahlen positiver Zellen in der Subgranularzellschicht wurden beide Bereiche zusammen erfasst und nicht weiter aufgetrennt. Als Hilus wurde der gesamte Bereich innerhalb der Granularzellschicht abzüglich der Subgranularzellschicht betrachtet. Die „offenen“ Enden der Granularzellschicht wurden mit einer gedachten Gerade verbunden und der so eingeschlossene Bereich als „Hilus“ deklariert. Eventuell eingeschlossene (sehr kurze) Abschnitte des Cornu ammonis wurden hierbei mitgezählt, da in der Eosin-Gegenfärbung eine exakte Differenzierung der einzelnen histologischen Strukturen des Hippokampus nicht möglich war. Sofern sich Teile des Seitenventrikels, Ependyms oder plexus choroideus im so umrissenen Gebiet befanden, wurden diese als definitionsgemäß nicht im Hilus gelegen betrachtet.

2.2.1.8 Ausmessung der Proben am Neurolucidamikroskop

Die Flächenbestimmung der Proben erfolgte an einem Olympus BX 51-Mikroskop der Firma bmf bioscience. Zur Bestimmung der jeweils ausgezählten Flächen wurde die Fläche zweier HE-gefärbter Schnitte vermessen. Hierbei wurde versucht, möglichst eine HE-Färbung vor und eine nach Zuschneiden des immunhistologisch gefärbten Materials auszuwerten. Es wurde so

vorgegangen, um einen Mittelwert der jeweiligen Flächen zu erhalten und somit die gezählten Zellzahlen normieren zu können. Aufgrund des geringen Farbkontrastes der mit Eosin gegengefärbten Immunfärbungen war es nicht möglich, diese direkt zu vermessen, ohne dabei am Neurolucida-Mikroskop in größeren Vergrößerungen Granularzellschicht und Hilus nicht mehr differenzieren zu können. Der gute Kontrast einer HE-Färbung war das Argument für die Nutzung von HE-gefärbten Schnitten zur Flächenvermessung.

Zur Flächenvermessung wurden HE-gefärbte Schnitte auf das Neurolucida-Mikroskop aufgelegt. Es wurde der Hippokampus in vierfacher Vergrößerung eingestellt. Zuerst wurde die Granularzellschicht am Bildschirm umfahren. Anschließend wurde der Hilus umfahren. Hierbei wurde die innere Grenze der Granularzellschicht und des Hilus angeglichen. Als Begrenzung an der „offenen“ Seite wurde eine gerade Linie gezogen. Bereiche, die von der Granularzellschicht allseitig umfasst waren und eindeutig nicht Granularzellschicht waren, wurden ebenfalls als Hilus erfasst. Sehr große Gefäße oder Anteile des Ventrikelsystems wurden nicht mitvermessen. Die vermessene Fläche wurde vom Neurolucida-Programm automatisch angegeben.

2.2.1.9 Auswertung der Proben

Die statistische Auswertung der Proben erfolgte mittels einer Microsoft Office Excel Tabellenkalkulation sowie mithilfe des Statistik-Programms Prism, GraphPad Software Inc., La Jolla, USA. Die Proben wurden den Gruppen erkrankt oder gesund zugeordnet. Es wurde die durchschnittliche Fläche der vermessenen Hippocampi (in Hämalaun-Eosin) bestimmt. Es wurde geprüft, ob es einen Unterschied zwischen beiden Gruppen in Bezug auf die gemessene Hippokampusfläche oder das Verhältnis der gemessenen Teile zueinander gab. Es wurde die Zelldichte proliferierender Zellen bestimmt, indem die Anzahl der positiv angefärbten Zellen pro Schnitt durch die durchschnittliche Fläche dividiert wurde. Es wurde sowohl der Bereich des Hilus, als auch der Bereich

der Subgranularzellschicht untersucht, wobei bei letzterer aus praktischen Gründen die Fläche der Granularzellschicht genutzt wurde. Die Werte der jeweiligen Gruppen wurden miteinander verglichen. Zunächst wurde ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Im Falle sich hierin ergebender Signifikanz schloss sich ein non-parametrischer Mann-Whitney U-Test an. Unterschiede wurden als signifikant erachtet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5% betrug.

2.2.2 Methoden mit Gewebe der Maus

2.2.2.1 Anfertigung von Gewebeschnitten

Es wurde mit Gehirnen bereits zuvor präparierter Mäuse gearbeitet. Von den tiefgefrorenen Hirnen wurden das makroskopisch erkennbare Cerebellum und der Bulbus olfactorius mit einem Skalpell abgetrennt. Anschließend wurden die Maushirne mit TissueTek in einem Mikrotom befestigt. Die Kammertemperatur im Mikrotom betrug $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, die Objektträgertemperatur $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$. Es wurde solange Gewebe vom Hirn abgeschnitten, bis Strukturen des rostralen Hippokampus sichtbar wurden. Die Schnittlokalisation wurde durch wiederholt angefertigte histologische Schnellfärbungen mit Löffler's Methyleneblau kontrolliert. Sobald der Hippokampus erreicht war, wurden Schnitte von $30\text{ }\mu\text{m}$ Schnittdicke angefertigt. Die Schnitte wurden auf Superfrost Objektträger aufgezogen und von der Rückseite mit der Hand angewärmt, um die Schnitte an den Objektträgern haften zu lassen. Je Objektträger wurden drei bis sechs Schnitte aufgebracht. Die Schnitte wurden als Bänderschnittserie auf zwölf Objektträger je Gehirn aufgezogen, sodass auf jedem Objektträger Bereiche aus dem gesamten Hippokampus der Maus zu finden waren (vgl. Abbildung 9). Somit waren die Proben unanfälliger für eventuelle Materialverluste, da – anders als bei klassischen Serienschnitten – bei Verlust eines Objektträgers gleichmäßig Material aus allen Bereichen des Hippokampus verloren gegangen wäre und nicht nur aus einem einzigen bestimmten Bereich. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Schnitte bei $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

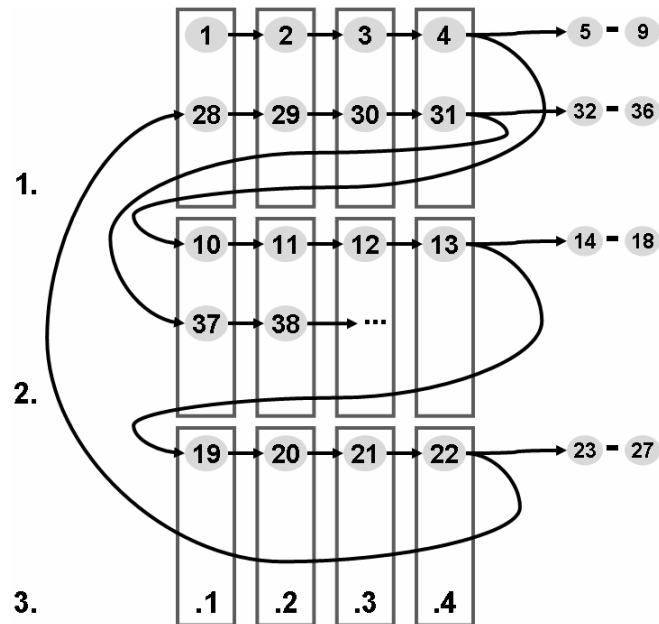


Abbildung 9: Anfertigung der Bänderschnitte. Die Objektträger wurden durchnummeriert. Die erste Zahl vor dem Punkt bezeichnet die Reihe, die zweite nach dem Punkt die Nummer des Objektträgers in der Reihe. Der erste Schnitt (1) wird auf Objektträger 1.1, der zweite auf 1.2 und so weiter aufgetragen. Die Schnitte fünf (5) bis neun (9) werden verworfen, die Schnitte zehn (10) bis dreizehn (13) in der zweiten Reihe aufgetragen. Dann werden wieder fünf Schnitte verworfen und die nächsten vier in der dritten Reihe (3.) aufgetragen. Nach Verwerfen von fünf Schnitten werden die nächsten vier Schnitte wieder in Reihe eins (1.) aufgetragen. Nach Verwerfen von fünf Schnitten wird Reihe zwei (2.) weiter aufgefüllt. So wird weiterhin aufgetragen, bis der gesamte Hippokampus aufgeschnitten ist. Eine Orientierung im Gewebe ist durch histologische Schnellfärbung aus einem der verworfenen Schnitte möglich.

2.2.2.2 Fixierung und immunhistochemische Färbung der Maushirnschnitte

Bevor die Maushirnschnitte immunhistochemisch gefärbt werden konnten, mussten die Proteine in ihnen fixiert werden. Hierzu wurde ein Schnellfixierungsverfahren genutzt.

Die Objektträger wurden zuerst fünf Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und angetrocknet. Anschließend erfolgte die Fixierung der Proben in eiskalter 4%iger Paraformaldehyd (PFA)-Lösung über fünfeinhalb Minuten auf Eis.

Anschließend wurden die Proben dreimal für fünf Minuten in TBS von Raumtemperatur gewaschen, woraufhin für 30 Minuten in 0,6%iger Wasserstoffperoxidlösung (H₂O₂-TBS) endogene Peroxidasen blockiert wurden. Es schloss sich ein fünfminütiger Waschschrift mit TBS an, der noch zweimal wiederholt wurde. Da die immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen Ki-67 durchgeführt werden sollte, war es notwendig, die Epitope mittels eines Kochschrittes aufzudecken [117-119]. Hierzu wurden die Proben in ein Becherglas aus einer Heizplatte überführt und die Objektträger in ihren Glasschaukeln mit 0,01 M Citratpuffer überschichtet. Der Citratpuffer wurde auf einer Heizplatte erhitzt. Ab Siedebeginn des Puffers wurden die Proben für fünf Minuten gekocht. Danach wurden die Proben 20 Minuten im noch warmen Citratpuffer abgekühlt. Daraufhin wurden die Proben in TBS überführt und dreimal fünf Minuten in TBS gewaschen. Um überschüssige Valenzen zu blockieren, wurden die Schnitte danach mit 300 µL je Objektträger 3% NHS für eine Stunde in einer TBS-feuchten Kammer bei Raumtemperatur blockiert. Es schloss sich die Inkubation mit dem ersten Antikörper (monoklonaler Antikörper gegen Ki-67 aus der Maus, NCL-L-Ki67-MM1), der gegen das Ki-67 Antigen gerichtet war, an. Der erste Antikörper wurde 1:200 verdünnt. Hierzu wurden die Antikörper entsprechend verdünnt und 300 µl Antikörper-Lösung je Objektträger zugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank in einer TBS-feuchten Kammer.

Am Folgetag wurden die Proben in TBS überführt und für fünf Minuten gewaschen. Der Schritt wurde noch zweimal wiederholt. Anschließend wurden 300 µl je Objektträger des 1:400 in NHS verdünnten Zweitantikörpers (anti-Maus-Antikörper) zugesetzt. Die Proben wurden für zwei Stunden in einer TBS-feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal fünf Minuten in TBS gewaschen. Es schloss sich der Nachweis mittels Avidin-Biotin-

Komplex und Peroxidase an. Hierzu wurden die Proben zunächst für zwei Stunden mit 300 µl je Objektträger frisch angesetztem AB-Komplex bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen zu je fünf Minuten mit TBS wurden je Objektträger 300 µl frisch angesetztes 0,1x DAB für zehn Minuten zu den Proben zugefügt. Es folgte ein fünfminütiger Waschschrift mit TBS, der zweimal wiederholt wurde. Abschließend wurden die Proben kurz in destilliertes Wasser überführt, bevor sie dehydriert wurden.

Nach Abschluss der immunhistochemischen Färbung wurden die Proben dehydriert und eingedeckt, um sie haltbar zu machen. Wegen der guten Kontrastverhältnisse der verschiedenen histologischen Strukturen im Hirn der Maus war keine Gegenfärbung notwendig. Die Entwässerung der Proben erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe, wobei in jeder Stufe fünf Minuten inkubiert wurde und beim Überführen von einer Stufe zur nächsten die Schnitte in ihren Glasschaukeln kräftig gewaschen wurden. Die einzelnen Stufen der Alkoholreihe bestanden aus einer ersten Stufe mit 70%igem Ethanol, der sich eine zweite Stufe mit 96%igem Ethanol anschloss. Es folgte die zweimalige Inkubation in absolutem Ethanol. Abschließend wurde zweimal in Xylol inkubiert, bevor die Proben mit VitroClud-Medium eingedeckt wurden.

2.2.2.3 Auszählung der Proben am Lichtmikroskop

Es wurden am Lichtmikroskop der Firma Leica die einzelnen Schnitte ausgezählt. Hierzu wurden nacheinander alle Hippokampi in allen Anschnitten gezählt. Es wurden nur eindeutig positive Zellen gezählt. Als positiv wurden Zellen beziehungsweise Zellkerne definiert, die die Größe von Zellkernen hatten, rundlich waren und braun – nicht schwarz – erschienen. Es erfolgte eine Zählung der positiven Zellen auf zwei verschiedene Arten. Es wurde zum einen „klassisch“ ausgezählt, zum anderen wurden Zellnester ausgezählt.

2.2.2.3.1 „Klassische“ Auszählung

Bei der „klassischen“ Auszählung wurden nur Zellen, die in der Subgranularzellschicht oder – um Anschnittfehler und die Dicke der Schnitte zu berücksichtigen – in den direkt angrenzenden Zellschichten von Körnerzellschicht und Hilus lagen, gezählt. Als Subgranularzellschicht wurde der hilusseitige Bereich, der an die Granularzellschicht anschloss und bis zu drei Zelldurchmesser umfasste, betrachtet. Es wurden nur Zellen in diesem Bereich in zehnfacher Vergrößerung betrachtet. Eine Zählung von Zellen im Hilus erfolgte nicht. Bei in Nestern angeordneten Zellgruppen wurde versucht, die exakte Zellzahl in einer stärkeren Vergrößerung (20-fach) zu bestimmen. Im Zweifelsfall wurde die kleinste, sicher abgrenzbare Zellzahl gewählt. Die Zählung erfolgte verblindet.

2.2.2.3.2 Auszählung von Zellnestern

Da sich beim „klassischen“ Vorgehen zur Auszählung zeigte, dass scheinbar sehr viele Zellen in Zellnestern gruppiert waren – was auch in der Literatur beschrieben wird [63, 120] – und teilweise eine exakte Zellzahlbestimmung in den Nestern nicht möglich war und ferner die Nester bisweilen weit über die genannten Grenzen hinausgingen, wurden die Proben erneut – unter Wahrung entsprechender Verblindung des Auszählers – ausgezählt. Hierbei wurden die Zellen nicht einzeln gezählt, sondern ihre Zellnester. Alle Zellen, deren mit DAB angefärbte Strukturen weniger weit als das doppelte des maximalen Durchmessers der größten angefärbten, klar abgrenzbaren, eindeutig zellulären Struktur des jeweiligen Zellnests von der ansonsten äußersten nächsten zellulären Struktur des Zellnests entfernt war, wurde als dem Zellnest zugehörig erachtet. Dies wurde so gehandhabt, um den Abstand zweier Zellkerne (Ki-67 ist ein nukleär lokalisiertes Protein) zu berücksichtigen. Es wurden nur Zellnester berücksichtigt, die mindestens eine Zelle in der Subgranularzellschicht hatten. Zellen, die außerhalb der Grenzen der Subgranularzellschicht zum Hilus oder zur Körnerzellschicht hin lagen, jedoch zu einem Zellnest, das die oben genannten Kriterien eines Zellnests, das auch

Zellen in der Subgranularzellschicht hatte, erfüllten, wurde diesem Zellnest zugeschlagen. Es wurden die Zellnester ferner nach ihrer Größe differenziert. Palmer et al. konnten zeigen, dass ein Zellnest in der Ratte bei großer Varianz im Mittel fünf Zellen enthält [63]. Zum einen wurden Zellnester mit mindestens drei eindeutig abgrenzbaren Zellen ausgezählt (fortan: alle Zellnester), zum anderen Zellnester betrachtet, die mindestens fünf eindeutig abgrenzbare Zellen enthielten (fortan: große Zellnester). Schließlich wurden auch Zellnester mit drei oder vier Zellen erfasst (fortan: kleine Zellnester). Fanden sich bloß zwei benachbarte Zellen, wurden diese nicht als Zellnest aufgefasst. Eine Übersicht über die Definitionskriterien eines Zellnests gibt Tabelle 12.

Kriterium	Eigenschaften
I. Zellkern-Beschaffenheit	1. braun 2. rundlich 3. Größe anderer sichtbaren zellulären Strukturen (Zellkerne, Zellkörper) vergleichbar
II. Abstand Zellkern-Zellkern	kleiner als der doppelte Durchmesser des größten gefärbten, klar von anderen Zellkernen abgrenzbaren, Zellkerns des gesamten Zellnests
III. Zellkern-Lokalisation	1. Lokalisation des Zellkerns in der Subgranularzellschicht oder dieser direkt anliegenden Zellschichten 2. weitere Zellkerne können außerhalb der Subgranularzellschicht liegen, wenn mindestens ein Zellkern III.1. erfüllt
Begriff	Definition
Zellnest	Alle Zellkerne, die die Kriterien I., II. und III. erfüllen
kleines Zellnest	Zellnester mit drei oder vier abgrenzbaren Zellen der Kriterien I., II. und III.
großes Zellnest	Zellnester mit fünf oder mehr abgrenzbaren Zellen der Kriterien I., II. und III.
alle Zellnester	Zellnester mit drei oder mehr abgrenzbaren Zellen der Kriterien I., II. und III.; entspricht der Summe kleiner und großer Zellnester

Tabelle 12: Definitionskriterien eines Zellnests.

2.2.2.4 Auswertung der Proben

Die statistische Auswertung der Proben erfolgte mittels einer Microsoft Office Excel Tabellenkalkulation. Es wurden die einzelnen Proben den Gruppen *Wildtyp* und *Knockout* zugeordnet. Es wurde zum einen die Gesamtzahl der jeweils im Hippocampus proliferierenden Zellen bestimmt, zum anderen wurde die Anzahl aller kleinen Zellnester, aller großen Zellnester und aller Zellnester

bestimmt. Unterschiede wurden als signifikant erachtet, wenn im t-Test die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5% betrug.

2.2.3 Beschichtung von Objektträgern

2.2.3.1 Silanisieren von Objektträgern

Zur Silanisierung von Objektträgern [115] wurden saubere unbeschichtete Objektträger in Glasschaukeln eingestellt und für zwei Minuten bei Raumtemperatur in 200 mL Silan-Aceton-Gemisch inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger dreimal für jeweils zwei Minuten in reinem Aceton gewaschen. Die gewaschenen Objektträger wurden über Nacht bei 40 °C im Wärmeschrank getrocknet und bis zu ihrer Verwendung im Pappschachteln gelagert. Das Silan-Aceton-Gemisch wurde für maximal 300 Objektträger in Folge genutzt.

2.2.3.2 Beschichtung von Objektträgern mit Chrom-Gelatine

Zum Beschichten von Objektträgern mit Chrom-Gelatine wurden 200 mL destilliertes Wasser auf 60 °C erwärmt und 0,75 g Gelatine darin gelöst. Zu dieser Lösung wurden 50 ml einer wässrigen Kaliumchrom-III-Sulfat-Lösung (2,5 %/l) von Raumtemperatur zugesetzt. Die Mischung hat dann eine Temperatur von etwa 50 °C. Saubere, unbeschichtete Objektträger wurden für 30 Sekunden in der 40 °C – 50 °C warmen Lösung inkubiert. Danach wurden die Objektträger über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank getrocknet und anschließend trocken und staubfrei bis zur Verwendung gelagert.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Arbeiten mit menschlichem Gewebe

3.1.1 Etablierung des Verfahrens zur immunhistochemischen Färbung formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebes

3.1.1.1 Vorversuche

In Vorversuchen zur eigentlichen Arbeit wurden verschiedene Methoden der Materialvorbereitung und Probenbehandlung sowie Gegenfärbung untersucht. Zur Erhöhung der Adhärenz der Schnitte an die Objektträger wurden verschiedene Objektträgerbeschichtungen genutzt. Von den unter 2.2.1.2 beschriebenen Objektträgerbeschichtungen mit Testung von unbeschichteten Objektträgern, adhärenzsteigernden Beschichtungen mit Eiweiß-Glycerin, Chrom-Gelatine, Poly-L-Lysin, Silan oder einer patentierten Beschichtung erwies sich lediglich die beschriebene Klebemethode auf zuvor silanisierten Objektträgern als eine zufriedenstellende Adhärenz sicherstellende Methode. Bei anderen Verfahren lösten sich in der Regel große Mengen Material beim Aufdecken und im weiteren Verlauf ab, wobei das spärlich erhaltene Material oft schwer beschädigt war.

Versuche, die Aufdeckung des Antigens mittels Kochen in 0,01 M Citratpuffer (pH 6,0) – sowohl im Becherglas, als auch im Dampfkochtopf mit verschiedenen Kochdauern – darzustellen, führten zu einer mangelhaften bis fehlenden Antigen-Aufdeckung. Mit 0,1 M Salzsäure im beschriebenen Procedere mit einer Mikrowelle zeigte sich ein zufriedenstellendes Ergebnis mit erfolgreicher Antigen-Aufdeckung. Des Weiteren wurden verschiedene Antikörper ausgetestet. Die Ergebnisse mit Antikörpern gegen Doublecortin (DCX), gegen PCNA und mit einem monoklonalen Antikörper gegen Ki-67 zeigten im Vergleich mit einem polyklonalen Antikörper gegen Ki-67 schlechtere Ergebnisse. Da sich beim alleinigen Waschen mit TBS teils erhöhte Hintergrundaktivität zeigte, wurden die Waschschrte mit TBS-Triton durchgeführt, was eine deutliche Verminderung des Hintergrunds zur Folge hatte, wobei bestimmte Inkubationsschritte weiterhin mit üblichem TBS

erfolgten, um Interferenzen zu vermeiden. Auch bei der Testung verschiedener Blockpuffer zeigte die beschriebene Verfahrensweise das beste Ergebnis. Der Versuch einer kürzeren Peroxidaseblockierung nach dem Aufdeckungsschritt ergab keine Verminderung des Hintergrunds, anders als das Nutzen eines anderen Waschpuffers. Zur Gegenfärbung wurden verschiedene Färbeverfahren getestet, da die übliche Gegenfärbung mit Hämalaun keine Gewebsadhärenz zeigte. Hier waren sowohl Färbungen mit Eosin als auch nach Nissl erfolgreich.

3.1.1.2 Optimiertes Verfahren

Zur Untersuchung der adulten humanen Neurogenese wurden formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeblöcke wie unter 2.2.1 beschrieben geschnitten, gegen das Ki-67 Antigen gefärbt und die positiven Zellen ausgezählt. Ki-67 positive Zellen in der Subgranularzellschicht und im Hilus waren bezüglich des Färbeverhaltens und ihrer Morphe vergleichbar mit Ki-67 positiven Zellen in Schnitten eines menschlichen Medulloblastoms, das als Positivkontrolle diente (s. Abbildung 10 und Abbildung 11). Die zu analysierenden Regionen – also Hilus bzw. Subgranularzellschicht – wurden wie beschrieben definiert. Zusätzlich zu angefärbten Zellen in der Subgranularzellschicht fanden sich gegen Ki-67 angefärbte Zellen im Bereich des Hilus, die sich bezüglich ihres Färbeverhaltens, Größe oder Morphe nicht von denen in der Subgranularzellschicht unterschieden. Ki-67 eignet sich somit zur Färbung proliferativ aktiver Zellen in Subgranularzellschicht wie Hilus in formalinfixiertem und in Paraffin eingebetteten menschlichem hippocampalen Gewebe.

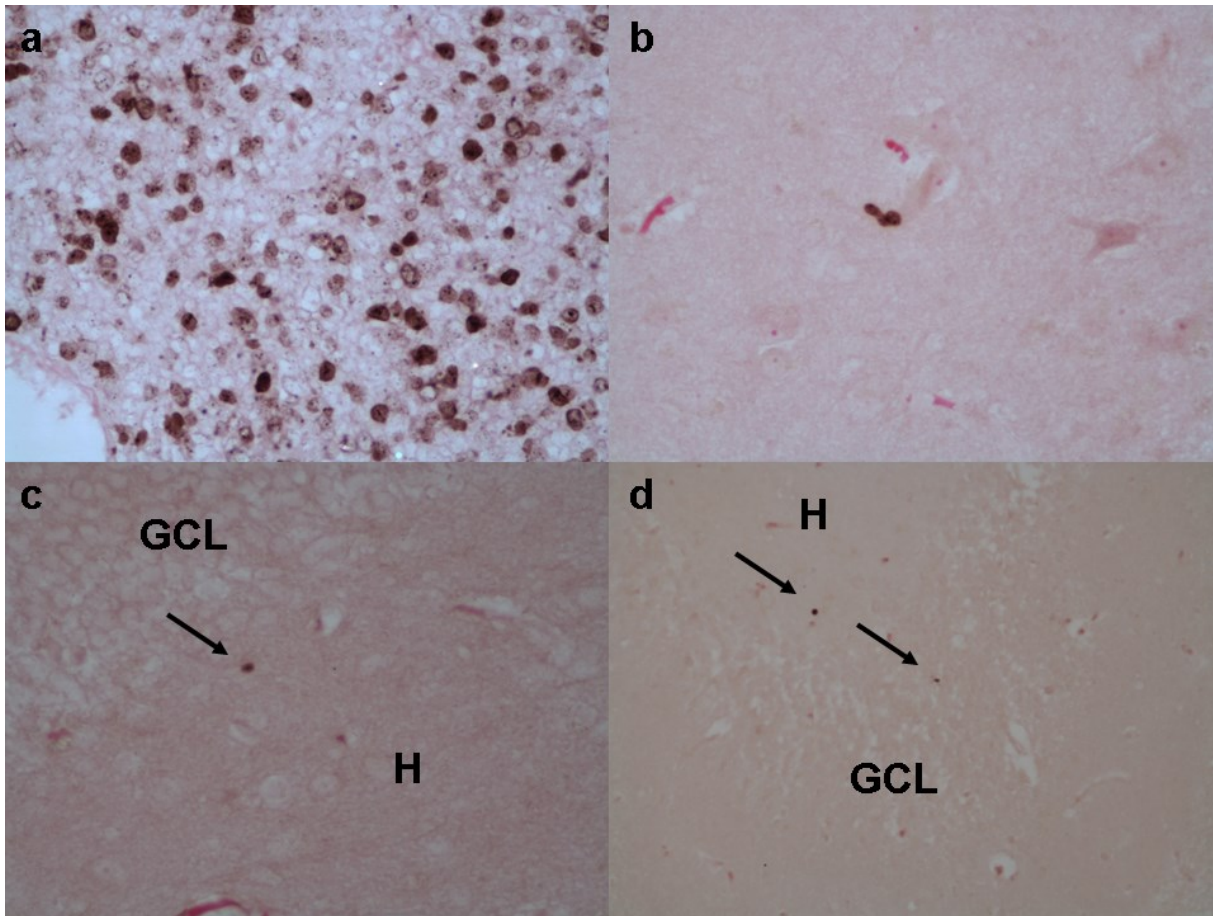


Abbildung 10: Ki-67-Färbung im humanen Hippokampus und im Medulloblastom. (a) Medulloblastom mit heterogenem Färbeverhalten der Zellen. (b) Vergrößerte Abbildung geklusterter positiver Zellen im Hilus. (c, d) Übersichtsbild Ki-67 positiver Zellen (Pfeile) in der Subgranularzone (c) sowie in der Subgranularzone und im Hilus (d). Ki-67 Färbung mit DAB, Gegenfärbung mit Eosin. H Hilus; GCL Granularzellschicht.

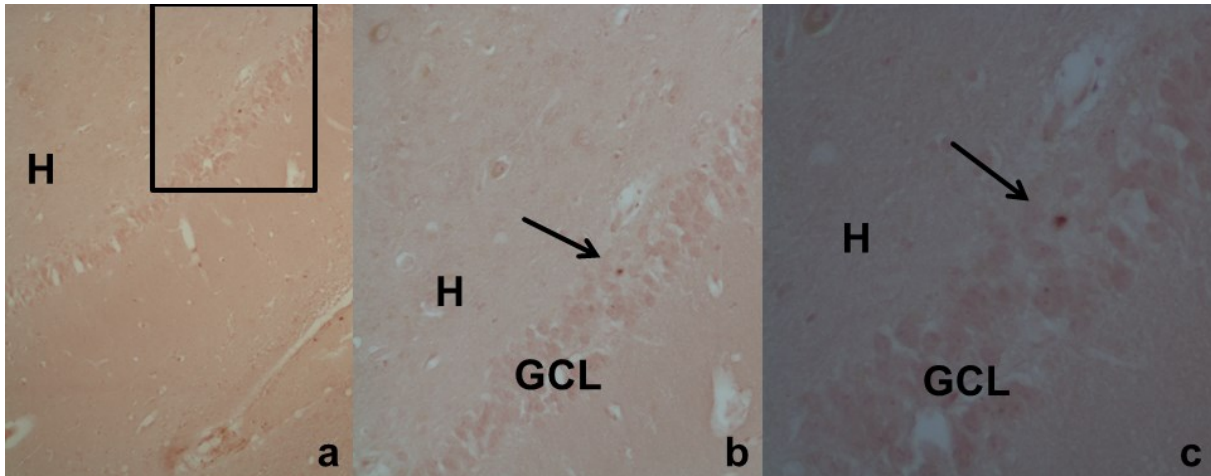


Abbildung 11: Ki-67-Färbung im humanen Hippokampus. Man erkennt eine Ki-67-positive Zelle, die sich schnittbedingt scheinbar in der Granularzellschicht befindet. H: Hilus, GCL: Granularzellschicht. (a) Übersicht, 10-fach, (b) Ausschnitt aus a, 20-fach, (c) dieselbe Zelle wie in b, nur noch stärker vergrößert, 40-fach.

3.1.2 Ergebnisse der Auswertung des menschlichen Gewebes

Die Dichte positiv angefarbter Zellen im Bereich der Subgranularzellschicht und der Hilusregion wurde wie beschrieben ermittelt und verglichen. Alle weiteren Analysen basieren auf den so ermittelten Zelldichten. Der Flächenmittelwert wurde jeweils bestimmt. In einem Fall war das Gewebe für die immunhistochemischen Färbungen vollständig aufgebraucht worden, weshalb in diesem Fall nur eine HE-Färbung angefertigt werden konnte, auf der in diesem Fall die Berechnungen alleine basierten. Das Flächenverhältnis von Granularzellschicht zu Hilus wurde jeweils ermittelt. Die Flächenverhältnisse der Fälle wurden mit denen der Kontrollen aus Würzburg und Göttingen zusammen und einzeln verglichen; ebenfalls wurden die Würzburger Kontrollen mit den Göttinger Kontrollen verglichen sowie mit allen Fällen und Kontrollen aus Göttingen. Die Statistik erfolgte mittels eines zweiseitigen t-Tests. Die Flächenverhältnisse der Granularzellschicht zum Hilus wichen weder zwischen Fällen und Kontrollen noch zwischen verschiedenen Hirnbanken signifikant voneinander ab (s. Tabelle 13).

3. ERGEBNISSE

	Kontrollen		Fälle und Kontrollen (Göttingen)	Alle Kontrollen
	Göttingen	Würzburg		
Fälle	0,42	0,75		0,51
Kontrollen	Göttingen	0,44		
	Würzburg		0,91	

Tabelle 13: Vergleich der Flächenverhältnisse von Granularzellschicht zu Hilus. Werte sind p-Werte im zweiseitigen t-Test. Fälle n = 18, Kontrollen Göttingen n = 15, Kontrollen Würzburg n = 22, Alle Kontrollen n = 37.

Die statistische Auswertung erfolgte wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben. Für die Angabe der Messfehler s. Tabelle 14. Zunächst erfolgte für alle Analysen ein Kruskal-Wallis Test, bei hierin bestehendem Anhalt für signifikante Ergebnisse schloss sich ein Mann-Whitney U Test an. Die Kruskal-Wallis Analyse der Hilusregionen ergab keine signifikanten Ergebnisse (s. Tabelle 15, Abbildung 12). Auf eine weitergehende Analyse mittels Mann-Whitney U Test wurde somit verzichtet. Die Kruskal-Wallis Analyse der Subgranularzellschicht ergab Hinweise auf signifikante Unterschiede (s. Tabelle 16), sodass sich ein Mann-Whitney U Test anschloss (s. Tabelle 17, Tabelle 18, Tabelle 19, Tabelle 20, Abbildung 13, Abbildung 14, Abbildung 15). Es ergab sich ein Trend ($p = 0,0762$) für eine verminderte Anzahl proliferativ aktiver Zellen in der Subgranularzellschicht schizophrener erkrankter Fälle im Vergleich zu allen Kontrollen. In der Subgruppenanalyse mit Vergleich der Fälle gegen die Kontrollen aus Würzburg bzw. gegen die Kontrollen aus Göttingen ergab sich, dass die Zahl proliferativ aktiver Zellen in der Subgranularzellschicht der Fälle signifikant ($p = 0,0108$) verringert war, wenn der Vergleich mit Kontrollen aus Würzburg erfolgte, jedoch kein Signifikanzniveau erreicht wurde, wenn mit den Kontrollen aus Göttingen – aus der Quelle, aus der auch die Fälle stammten – verglichen wurde ($p = 0,8895$). Beide Kontrollgruppen zeigten jedoch im Vergleich miteinander einen hoch-signifikanten Unterschied ($p = 0,0061$).

Des Weiteren wurde der Quotient Ki-67 positiver Zellen im Hilus im Verhältnis zur Subgranularzellschicht gebildet (s. Abbildung 16). Aufgrund der komplexen

3. ERGEBNISSE

deutenden Ergebnisse in dieser Subgruppenanalyse wurde hierbei auf eine formale Signifikanztestung verzichtet. Die Abbildung ist somit rein deskriptiv.

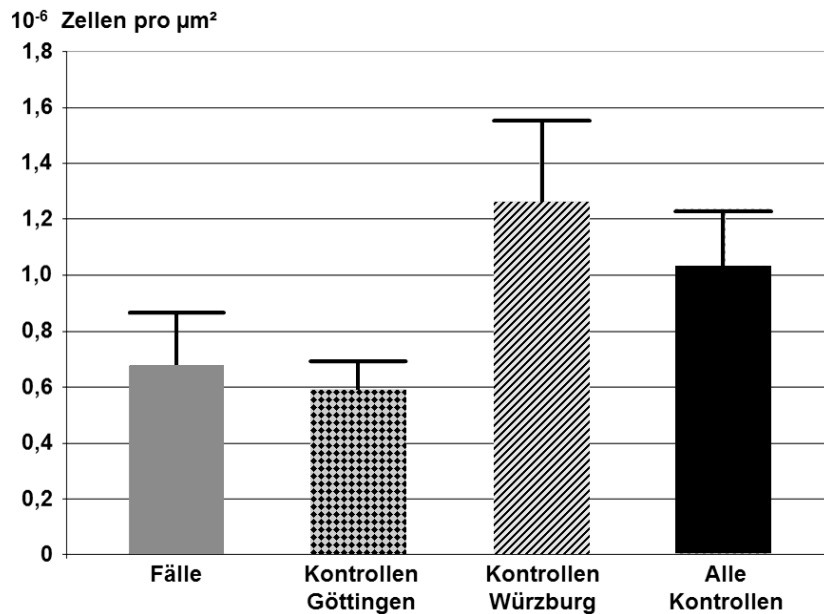


Abbildung 12: Vergleich Ki-67 positiver Zellen im Hilus. Fälle n = 18, Kontrollen Göttingen n = 15, Kontrollen Würzburg n = 22, Alle Kontrollen n = 37. Fehlerbalken ist SEM.

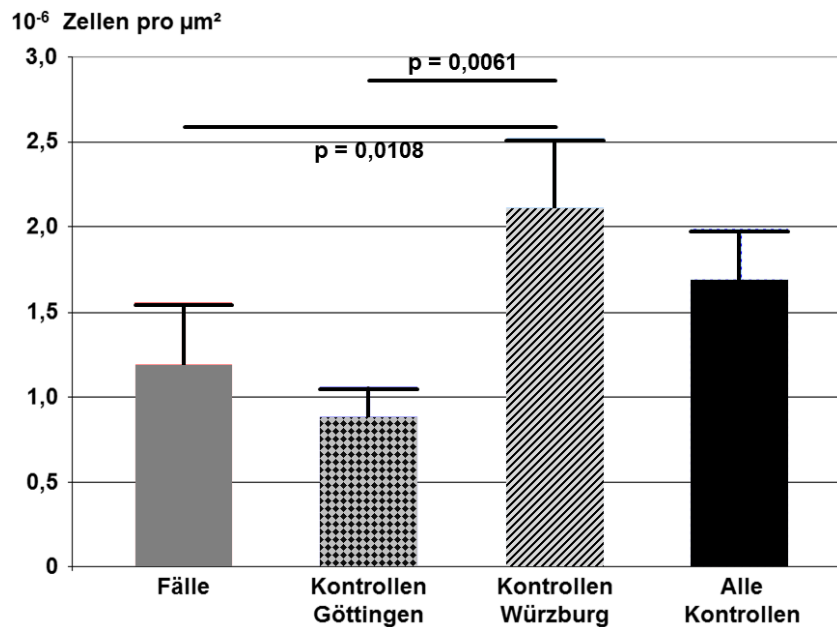


Abbildung 13: Vergleich Ki-67 positiver Zellen in der Subgranularzellschicht. Fälle n = 18, Kontrollen Göttingen n = 15, Kontrollen Würzburg n = 22, Alle Kontrollen n = 37. Fehlerbalken ist SEM. p < 0,05 ist signifikant, p < 0,01 ist hoch signifikant.

3. ERGEBNISSE

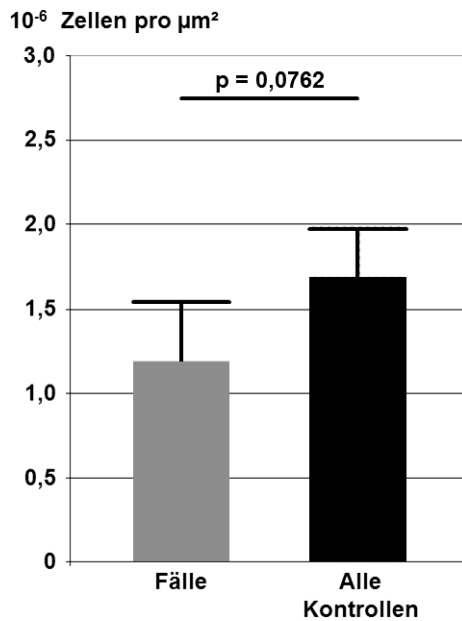


Abbildung 14: Vergleich Ki-67 positiver Zellen in der Subgranularzellschicht der Fälle und aller Kontrollen (Ausschnitt aus Abbildung 13). Fälle n = 18, Alle Kontrollen n = 37. Fehlerbalken ist SEM. $p < 0,1$ zeigt einen Trend an.

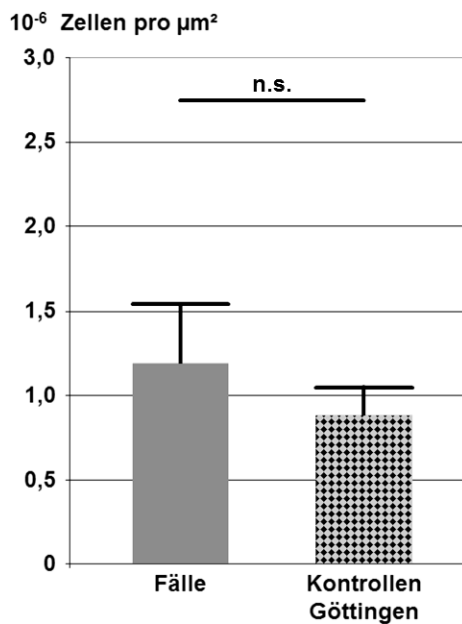


Abbildung 15: Vergleich der Ki-67 positiven Zellen in der Subgranularzellschicht bei den aus der gleichen Hirnbank stammenden Proben (Fälle und Kontrollen aus Göttingen). Ausschnitt aus Abbildung 13. Fälle n = 18, Kontrollen Göttingen n = 15. Fehlerbalken ist SEM.

3. ERGEBNISSE

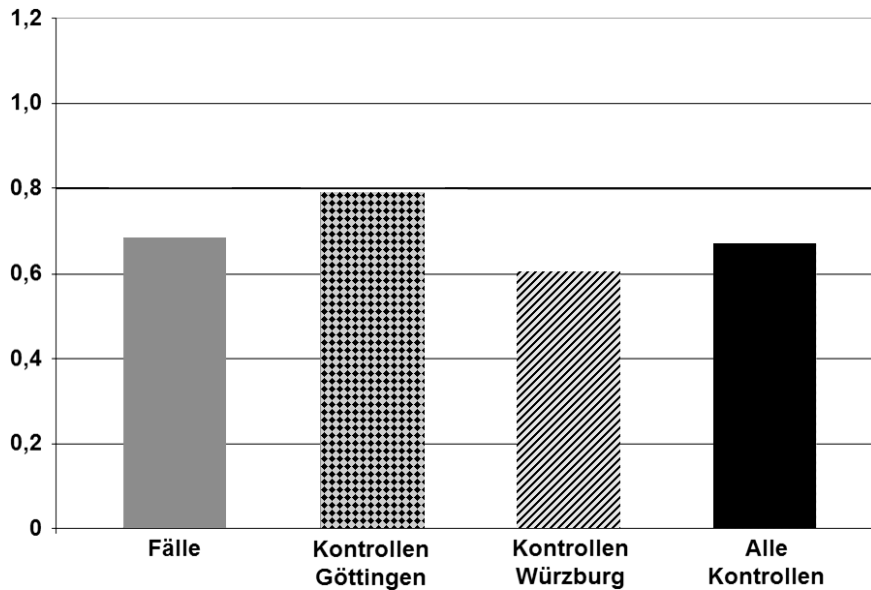


Abbildung 16: Darstellung der Quotienten Ki-67 positiver Zellen im Hilus zu Ki-67 positiven Zellen in der Subgranularzellschicht. Fälle n = 18, Kontrollen Göttingen n = 15, Kontrollen Würzburg n = 22, Alle Kontrollen n = 37.

	Fälle		Kontrollen Göttingen		Kontrollen Würzburg		Alle Kontrollen	
	Hilus	SGZ	Hilus	SGZ	Hilus	SGZ	Hilus	SGZ
Anzahl	17	17	8	8	15	15	23	23
Mittelwert	6,75E-07	1,19E-06	5,91E-07	8,82E-07	1,27E-06	2,12E-06	1,03E-06	1,69E-06
SD	7,73E-07	1,47E-06	2,87E-07	4,63E-07	1,13E-06	1,55E-06	9,71E-07	1,40E-06
SEM	1,87E-07	3,57E-07	1,02E-07	1,64E-07	2,91E-07	3,99E-07	2,02E-07	2,91E-07

Tabelle 14: Anzahl, Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler (SEM) Ki-67 positiver Zellen pro μm^2 im Hilus und pro μm^2 in der Subgranularzellschicht (SGZ). Fälle n = 18, Kontrollen Göttingen n = 15, Kontrollen Würzburg n = 22, Alle Kontrollen n = 37.

Kruskal-Wallis Test	Hilus
P value	0.2053
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No
Number of groups	4
Kruskal-Wallis statistic	4.579

Tabelle 15: Kruskal-Wallis Test für Ki-67 positive Zellen im Hilus.

3. ERGEBNISSE

Kruskal-Wallis Test	SGZ
P value	0.0110
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
Number of groups	4
Kruskal-Wallis statistic	11.15

Tabelle 16: Kruskal-Wallis Test für Ki-67 positive Zellen in der Subgranularzellschicht (SGZ).

Mann-Whitney U Test	SGZ Zelldichte
Column A vs Column B	Fälle vs Kontrollen Göttingen
P value	0.8895
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Are medians signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	246 , 105
Mann-Whitney U	69.00

Tabelle 17: Mann-Whitney U Test für Ki-67 positive Zellen in der Subgranularzellschicht; Vergleich Fälle gegen Kontrollen Göttingen.

Mann-Whitney U Test	SGZ Zelldichte
Column A vs Column C	Fälle vs Kontrollen Würzburg
P value	0.0108
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	*
Are medians signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	235 , 326
Mann-Whitney U	64.00

Tabelle 18: Mann-Whitney U Test für Ki-67 positive Zellen in der Subgranularzellschicht; Vergleich Fälle gegen Kontrollen Würzburg.

3. ERGEBNISSE

Mann-Whitney U Test	SGZ Zelldichte
Column A vs Column D	Fälle vs alle Kontrollen
P value	0.0762
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Are medians signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,D	310 , 551
Mann-Whitney U	139.0

Tabelle 19: Mann-Whitney U Test für Ki-67 positive Zellen in der Subgranularzellschicht; Vergleich Fälle gegen alle Kontrollen.

Mann-Whitney U Test	SGZ Zelldichte
Column B vs Column C	Kontrollen Göttingen vs Kontrollen Würzburg
P value	0.0061
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	**
Are medians signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column B,C	53 , 223
Mann-Whitney U	17.00

Tabelle 20: Mann-Whitney U Test für Ki-67 positive Zellen in der Subgranularzellschicht; Vergleich der Kontrollen untereinander (Göttingen gegen Würzburg)

3.2 Ergebnisse der Arbeiten mit Gewebe der Maus

Es wurden – wie im Methodenteil beschrieben – immunhistochemische Färbungen gegen das Ki-67-Antigen von Gehirnen wildtypischer Mäuse und von Gehirnen von Mäusen mit einer Mutation des M1-Rezeptors durchgeführt (s. Abbildung 17 und Abbildung 18). Die Zellen wurden auf zwei verschiedene Arten ausgezählt. Zunächst werden die Ergebnisse der „klassischen“ Auszählung dargestellt, danach die Auszählung von Zellnestern.

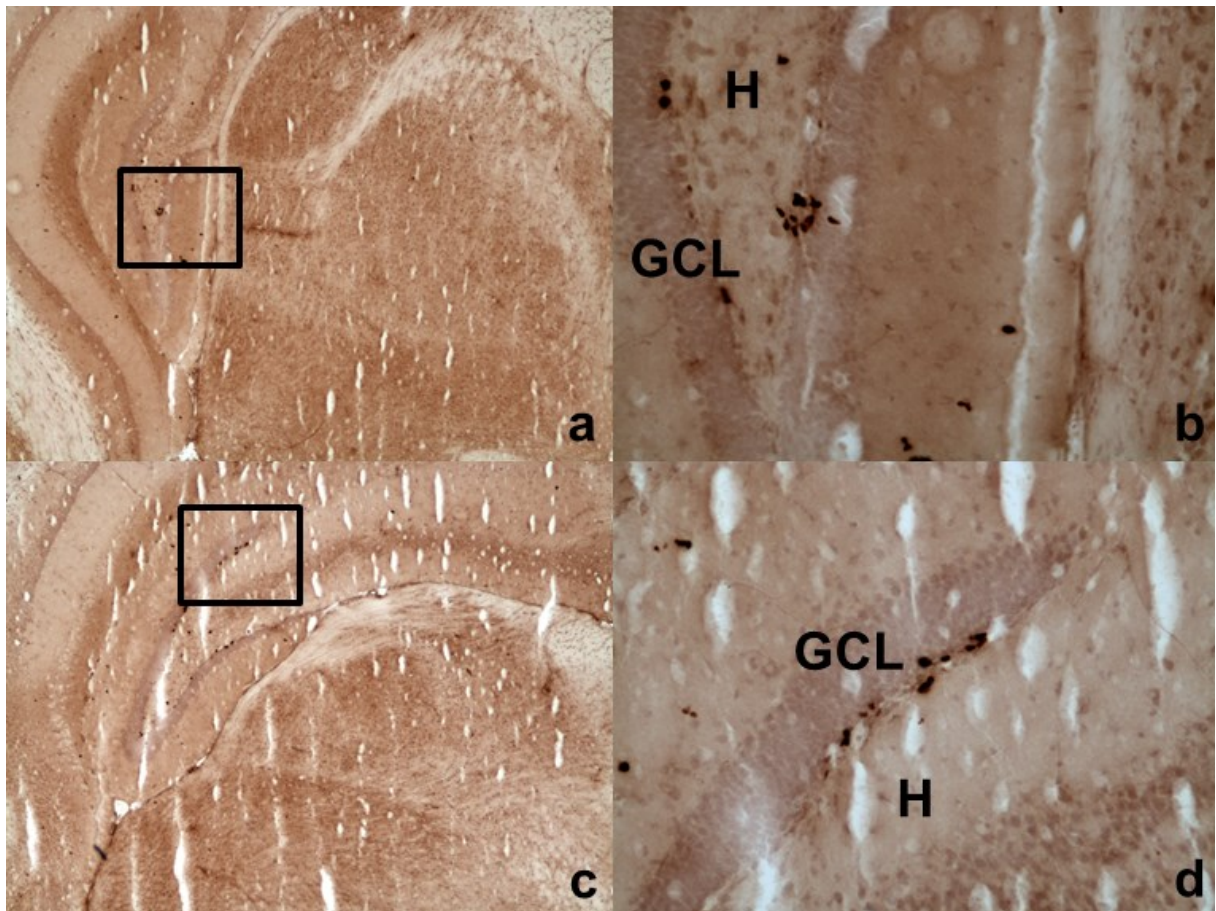


Abbildung 17: Ki-67-Färbung im Hippokampus der Maus. Man erkennt gut die sich in der Subgranularzellschicht an der Grenze zwischen Hilus und Granularzellschicht des Gyrus dentatus befindenden Ki-67 positiven Zellen. (a) Übersicht, 4-fach, (b) Ausschnitt aus (a), 20-fach; (c) Übersicht, 4-fach, (d), Ausschnitt aus (c), 20-fach. H: Hilus, GCL: Granularzellschicht.

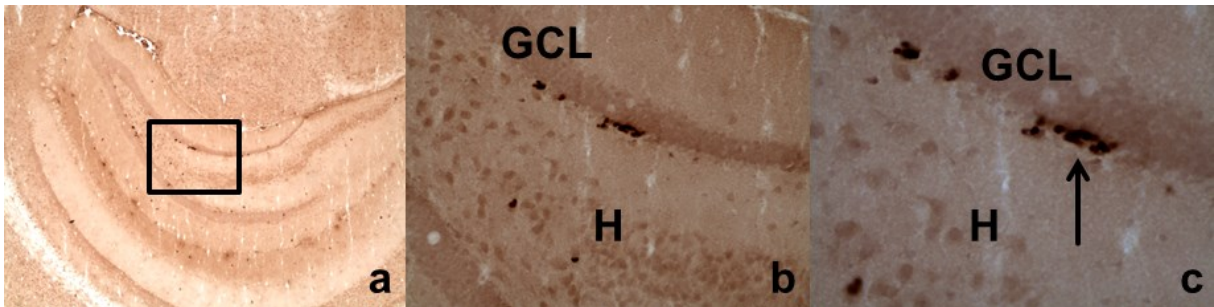


Abbildung 18: Ki-67-Färbung im Hippokampus der Maus. Man erkennt die Ausbildung von Zellnestern (Pfeil), in denen einzelne Zellen auch bei starker Vergrößerung nur schwer abzugrenzen sind. (a) Übersicht, 4-fach, (b) Ausschnitt aus (a), 20-fach, (c) noch stärkere Vergrößerung (40-fach) aus (b). H: Hilus, GCL: Granularzellschicht.

3.2.1 Ergebnisse der „klassischen“ Auszählung

Es wurden die Hippokampi von zwölf männlichen Mäusen mit einer Mutation des M1-Rezeptors (ko) und von zwölf männlichen Mäusen ohne diese Mutation (wt) wie beschrieben ausgezählt. Jede positive Zelle, die im Bereich der Subgranularzellschicht gemäß der Definition lag, wurde vermerkt. Da die Maushirnschnitte immer gleichartig auf die Objektträger aufgezogen wurden und die Objektträger immer in gleicher Orientierung auf das Mikroskop aufgelegt wurden, konnte bei der Auszählung zwischen im Blickfeld oben befindlichen Hippokampus und im Blickfeld unten befindlichen Hippokampus – und somit zwischen linkem und rechtem Hippokampus – unterschieden werden. Es wurde die Summe der positiven Zellen im linken, bzw. rechten Hippokampus gebildet sowie die Summe aller positiven Zellen in den Hippokampi einer Maus (unabhängig von der Lateralität). Bei fehlenden Unterschieden zwischen linkem und rechtem Hippokampus (Daten nicht gezeigt) wurden in der Folge alle Berechnungen nur für ganze Maushirne (d.h. beide Hippokampi zusammen) durchgeführt. Nach Ermittlung der Hirnschnitte, in denen ein auswertbarer Hippokampus sichtbar war, wurden die durchschnittlichen Werte positiver Zellen je auswertbarem Schnitt im Hippokampus als arithmetisches Mittel bestimmt. Die Daten für die Wildtyp-Mäuse (wt) zeigt Tabelle 26, die Daten für die Knockout-Mäuse (ko) zeigt Tabelle 27 im Tabellenanhang.

3. ERGEBNISSE

Es wurden die beiden Gruppen wildtypischer Mäuse gegen M1-Knockout-Mäuse verglichen. Hierbei wurde – da je nach Maus unterschiedlich viele Schnitte auswertbar und nicht in jedem Schnitt beidseitig Hippokampi sichtbar waren – nur die auf zwei Dezimalen gerundete durchschnittliche Zahl Ki-67 positiver Zellen in der Subgranularzellschicht je Hippokampus je auswertbarem Schnitt in der jeweiligen Maus (in Tabelle 26 und Tabelle 27 $\Sigma(\text{Zellen/Schnitt})$) zum Vergleich herangezogen. Zum Vergleich wurde ein zweiseitiger t-Test genutzt. Als signifikant galten Ergebnisse mit einem p-Wert < 0,05. Die Ergebnisse der Testung gibt Tabelle 21 wieder, eine graphische Darstellung zeigt Abbildung 19. Man erkennt, dass sich wildtypische und M1-Rezeptor knockout-Mäuse nicht signifikant unterscheiden; der p-Wert beträgt 0,139.

Gruppe	Mittelwert	Standard-abweichung	SEM	t-Test
wildtypische Mäuse	24,68	3,52	1,02	0,139
M1-Rezeptor ko-Mäuse	22,30	4,04	1,17	

Tabelle 21: Signifikanztestung der klassisch ausgezählten Maus-Hippokampi. Die Daten beziehen sich auf Tabelle 26 und Tabelle 27 (im Tabellenanhang). Mittelwert: mittlere Zahl Ki-67 positiver Zellen in der SGZ pro Schnitt pro Hippokampus – d.h. z.B.: 24,68 bedeutet bei wildtypischen Mäusen, dass in jedem Hippokampus pro Seite im Mittel 24,68 Ki-67 positive Zellen nachweisbar waren, entsprechend das Doppelte (49,36) pro Schnitt; SEM: Standardfehler des Mittelwertes, wildtypische Mäuse n = 12, M1-Rezeptor ko-Mäuse n = 12.

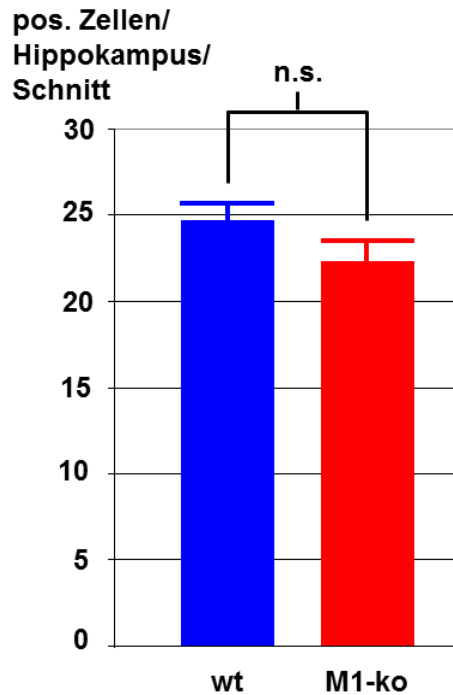


Abbildung 19: Graphische Darstellung der durchschnittlichen Zellzahlen je Hippokampus je Schnitt. wt: wildtypische Mäuse, n = 12, M1-ko: M1-Rezeptor-knockout-Mäuse, n = 12.

3.2.2 Ergebnisse der Auszählung von Zellnestern

Es wurden die Hippokampi der bereits zuvor klassisch ausgezählten zwölf männlichen Mäuse mit einer Mutation des M1-Rezeptors (ko) und zwölf männlichen Mäuse ohne diese Mutation (wt) wie beschrieben in Hinblick auf Zellnester ausgezählt. Jedes Zellnest entsprechend der Definition wurde vermerkt. Wie auch bereits bei der „klassischen“ Auszählung erfolgte zunächst eine getrennte Auswertung nach Aspekten der Lateralität. Bei fehlenden Unterschieden (Daten nicht gezeigt) wurde im weiteren nur die Zahl an Zellnestern je Hippokampus je Schnitt betrachtet. Darüber hinaus wurde zwischen kleinen Zellnestern mit drei oder vier Zellen (3er Nester), großen Zellnestern mit mindestens fünf Zellen (5er Nester) und allen Zellnestern mit mindestens drei Zellen (3+5er Nester) differenziert. Nach Ermittlung der Hirnschnitte, in denen ein auswertbarer Hippokampus sichtbar war, wurden die

durchschnittlichen Werte positiver Zellnester je auswertbarem Schnitt im Hippokampus je Seite als arithmetisches Mittel bestimmt. Eine Zusammenfassung der Daten ist in Tabelle 28 im Anhang wiedergegeben.

Es wurden die wildtypischen Mäuse gegen Mäuse mit einer Mutation für den M1-Rezeptor verglichen. Hierbei wurde – da je nach Maus unterschiedlich viele Schnitte auswertbar waren – nur die auf zwei Dezimalen gerundete durchschnittliche Zahl positiver Zellnester je auswertbarem Schnitt je Hippokampus in der jeweiligen Maus zum Vergleich herangezogen. Es wurden die Zellnester mit drei oder vier Zellen („kleine Zellnester“), die Zellnester mit mindestens fünf Zellen („große Zellnester“) und die Zellnester mit mindestens drei (die Summe der beiden vorgenannten, „alle Zellnester“) gegeneinander verglichen. Zum Vergleich wurde ein zweiseitiger t-Test genutzt. Als signifikant galten Ergebnisse mit einem p-Wert < 0,05. Die Ergebnisse der Testung für Zellnester mit drei oder vier Zellen gibt Tabelle 22 wieder, für mindestens fünf Zellen Tabelle 23, für alle Zellnester Tabelle 24; eine graphische Darstellung zeigen entsprechend Abbildung 20, Abbildung 21 und Abbildung 22.

Gruppe	Mittelwert	Standard-abweichung	SEM	t-Test
wt-Mäuse 3+4 Zellen	2,145	0,240	0,069	0,299
M1-ko-Mäuse 3+4 Zellen	2,011	0,364	0,105	

Tabelle 22: Signifikanz-Testung für Zellnester mit drei oder vier Zellen („kleine Zellnester“). Der Mittelwert gibt die durchschnittliche Zahl an kleinen Zellnestern je Hippokampus je Schnitt an. SEM: Standardfehler des Mittelwerts.

Gruppe	Mittelwert	Standard-abweichung	SEM	t-Test
wt-Mäuse mind. 5 Zellen	0,742	0,159	0,046	0,015
M1-ko-Mäuse mind. 5 Zellen	0,537	0,217	0,063	

Tabelle 23: Signifikanz-Testung für Zellnester mit mindestens fünf Zellen („große Zellnester“). Der Mittelwert gibt die durchschnittliche Zahl an großen Zellnestern je Hippokampus je Schnitt an. SEM: Standardfehler des Mittelwerts.

3. ERGEBNISSE

Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung	SEM	t-Test
wt-Mäuse mind. 3 Zellen	2,887	0,295	0,085	0,048
M1-ko-Mäuse mind. 3 Zellen	2,464	0,633	0,183	

Tabelle 24: Signifikanz-Testung für Zellnester mit mindestens drei Zellen („alle Zellnester“). Der Mittelwert gibt die durchschnittliche Zahl an Zellnestern je Hippokampus je Schnitt an. SEM: Standardfehler des Mittelwerts.

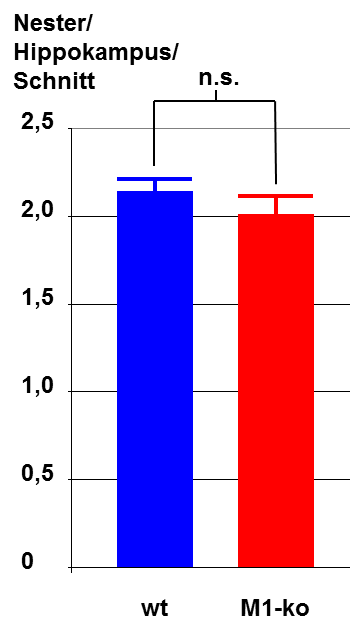


Abbildung 20: Graphische Darstellung der durchschnittlichen Zellnesterzahlen mit drei oder vier Zellen („kleine Zellnester“) je Hippokampus je Schnitt. wt: wildtypische Mäuse, n = 12, M1-ko: M1-Rezeptor knockout-Mäuse, n = 12. n.s. = nicht signifikant. Fehlerbalken sind SEM.

3. ERGEBNISSE

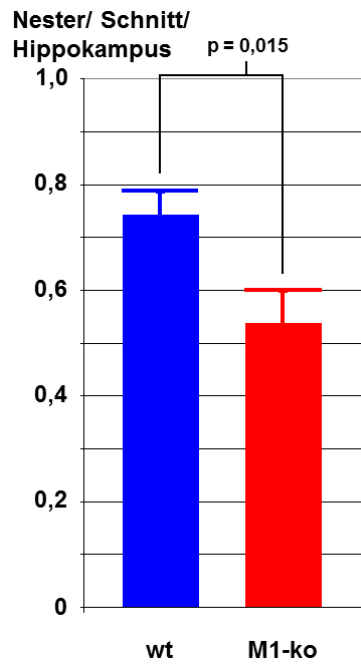


Abbildung 21: Graphische Darstellung der durchschnittlichen Zellnesterzahlen mit mindestens fünf Zellen („große Zellnester“) je Hippokampus je Schnitt. wt: wildtypische Mäuse, n = 12, M1-ko: M1-Rezeptor knockout-Mäuse, n = 12. Fehlerbalken sind SEM. $p < 0,05$ ist signifikant.

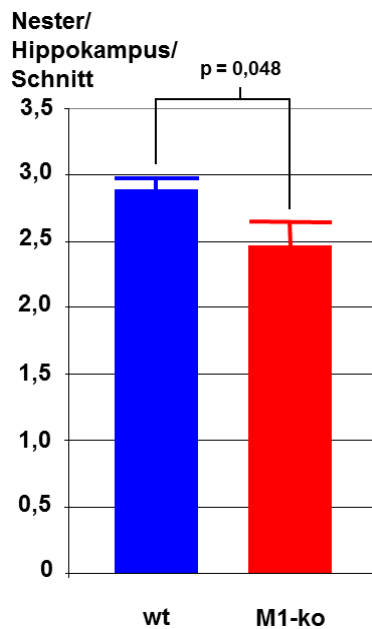


Abbildung 22: Graphische Darstellung der durchschnittlichen Zellnesterzahlen mit mindestens drei Zellen („alle Zellnester“) je Hippokampus je Schnitt. wt: wildtypische Mäuse, n = 12, M1-ko: M1-Rezeptor knockout-Mäuse, n = 12. Fehlerbalken sind SEM. $p < 0,05$ ist signifikant.

3. ERGEBNISSE

Man erkennt, dass die wildtypischen Mäuse signifikant mehr große Zellnester proliferativ aktiver Zellen aufweisen als die M1-Rezeptor Mutanten. Dieser Effekt für große Zellnester mit mindestens fünf Zellen bleibt auch bei allen Zellnestern (mit mindestens drei positiven Zellen) bestehen, wenngleich in abgeschwächter Form. Betrachtet man nur die kleinen Zellnester mit drei oder vier positiven Zellen, ist kein signifikanter Unterschied mehr zu erkennen.

Des Weiteren wurden die Quotienten aus großen und kleinen, großen und allen sowie kleinen und allen Zellnestern gebildet. Die Quotienten sind in Tabelle 25 wiedergegeben. Auf eine formale statistische Testung wurde in diesem Zusammenhang aufgrund der hierbei zu berücksichtigenden verschiedenen Standardabweichungen in den Ausgangsdaten verzichtet. Die Darstellung in Abbildung 23 ist somit rein deskriptiv. Die exakten Werte sind Tabelle 25 zu entnehmen.

Gruppe	Verhältnis	Mittelwert	Standardabweichung	SEM
wt	5 / 3	0,350	0,084	0,024
ko	5 / 3	0,264	0,079	0,023

Gruppe	Verhältnis	Mittelwert	Standardabweichung	SEM
wt	5 / 3+5	0,256	0,046	0,013
ko	5 / 3+5	0,215	0,046	0,013

Gruppe	Verhältnis	Mittelwert	Standardabweichung	SEM
wt	3 / 3+5	0,744	0,046	0,013
ko	3 / 3+5	0,847	0,197	0,057

Tabelle 25: Signifikanztestung der Quotienten verschiedener Zellnester gegeneinander. In der Spalte Verhältnis ist zu erkennen, welche Nestgrößen jeweils gegeneinander verglichen wurden 5: Zellnester mit mind. 5 Zellen, 3: Zellnester mit 3 oder 4 Zellen, 3+5: alle Zellnester. SEM: Standardfehler des Mittelwerts. wt: wildtypische Mäuse, n = 12, ko: M1-Rezeptor knockout-Mäuse, n = 12.

3. ERGEBNISSE

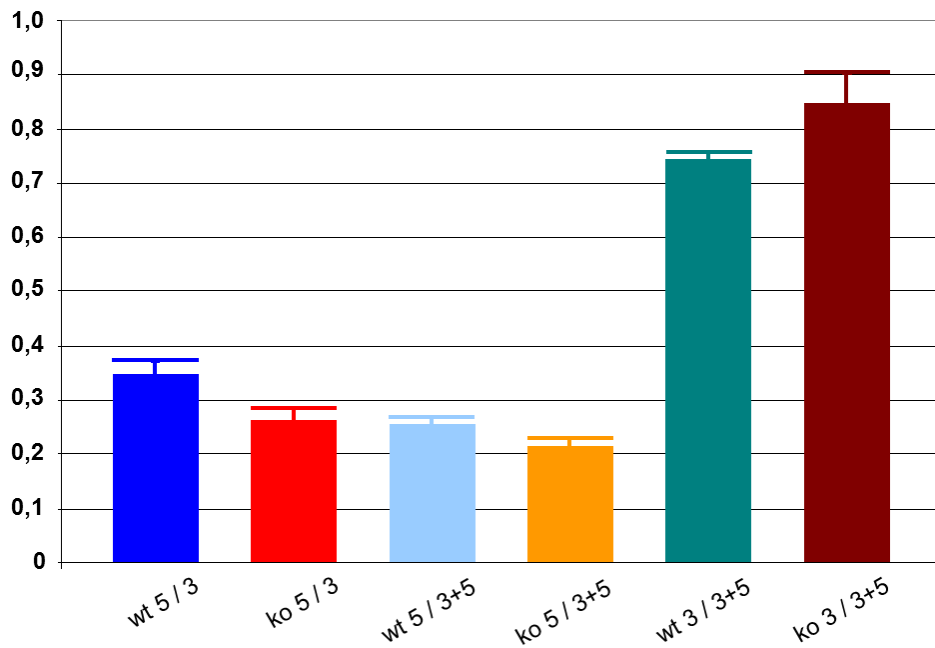


Abbildung 23: Verhältnis der Quotienten verschiedener Zellnester zueinander. wt: wildtypische Mäuse, n = 12, ko: M1-Rezeptor-knockout-Mäuse, n = 12, 5: Zellnester mit mindestens 5 Zellen, 3: Zellnester mit 3 oder 4 Zellen, 3+5: alle Zellnester. Fehlerbalken sind SEM.

4. Diskussion

4.1 Arbeiten mit menschlichem Gewebe

Die Hauptresultate der Arbeit mit menschlichem Gewebe sind, dass (1) formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes humanes Hippokampusgewebe gegen Ki-67 angefärbt werden kann, dass (2) Ki-67 positive Zellen zusätzlich zu den bislang beschriebenen Ki-67 positiven Zellen der Subgranularzone im Hilus gefunden werden konnten und dass (3) die Unterschiede zwischen Fällen und Kontrollen – von einigen Subgruppenanalysen abgesehen – nicht signifikant waren. Zunächst soll jedoch auf einige methodische Aspekte eingegangen werden.

Im Rahmen der Vorversuche zeigte sich, dass formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes humanes Hippokampusgewebe eine sehr schlechte Adhärenz an Objektträger hatte. Gewebsverlust durch mangelhafte Adhärenz ist – vor allem bei Mikrowellen-basierten Antigenaufdeckungsverfahren – ein bekanntes Problem [117]. Gleichzeitig ist ein Aufdeckungsverfahren – gerade bei Färbungen gegen Ki-67 – zwingend notwendig, um cross-linking zwischen dem Epitop und anderen Strukturen einerseits und der sterischen Verdeckung des Epitops durch vorhandenes Fremdprotein andererseits aufzulösen [121] und weitere Störfaktoren zu beseitigen [116]. Zur Steigerung der Gewebeadhärenz sind verschiedene Methoden seit langem bekannt [122-125]. Weder die Nutzung von Eiweiß-Glycerin, Chrom-Gelatine, Poly-L-Lysin, Silan oder einer patentierten Beschichtung unbekannter Zusammensetzung (auf SuperFrost-Objektträgern) führte zu zufriedenstellender Gewebeadhärenz. Erst die Nutzung der beschriebenen Klebemethode eines Klebstoffs aus Poly-L-Lysin und Pritt Bastelkleber unter Verwendung silanisierter Objektträger hatte Erfolg [115]. Es ist bekannt, dass für histochemische und immunhistochemische Färbungen von in Paraffin eingebetteten Schnitten oftmals Spezialbeschichtungen notwendig sind. Die besonders schlechte Gewebeadhärenz ist im vorliegenden Fall wahrscheinlich auf verschiedene Faktoren zurückzuführen. So scheint das genutzte Material einen gewissen Einfluss zu haben, da in Arbeiten mit Material

aus anderen Hirnbanken das Adhärenzproblem weniger stark ausgeprägt zu sein schien. Ein weiterer wesentlicher Faktor, der zur mangelhaften Adhärenz beigetragen haben dürfte, ist die Nutzung eines Salzsäurepuffers, auch in Verbindung mit einer Mikrowelle [102]. Während bei anderen Kochmethoden zur Antigen-Aufdeckung, zum Beispiel für frisch tiefgefrorenes Gewebe der Maus, relativ kurze Kochzeiten in einem Becherglas beschrieben werden, wobei es zu einem langsamen Erwärmen und kurzem Kochen kommt, zeichnet sich die Mikrowelle durch eine relativ schnelle Erwärmung aus. Darüberhinaus wurde in der vorliegenden Arbeit eine verhältnismäßig lange Kochdauer gewählt, um Antigene aufzudecken. In diesen Situationen hat sich die Nutzung von Adhäsiva wie Eiweiß-Glycerin, Chrom-Gelatine, Poly-L-Lysin, Silan oder einer patentierten Beschichtung unbekannter Zusammensetzung (SuperFrost-Objektträger) bewährt, die allesamt zwischen den ionischen Bindekräften des Objektträgers aus Glas, also einem Silikat, und den hydrophoben van-der-Waals-Bindekräften organischer Moleküle – wie den verschiedensten Gewebebestandteilen – vermitteln. In dieser Arbeit wurde jedoch Salzsäure im Kochschritt genutzt, die durch ihre stark protonierende Eigenschaft in der Lage sein könnte, entweder die Wechselwirkung zwischen Adhäsivum und Objektträger oder zwischen Adhäsivum und Gewebe zu stören. Vor allem solche Beschichtungen, die auf organischen Molekülen basieren, wie Eiweiß-Glycerin oder Chrom-Gelatine, könnten hier besonders anfällig sein. Die Kombination einer – auch säurestabilen – Silanisierung, die zwischen der ionischen Komponente des Glasobjektträgers und der Hydrophobizität des Gewebes vermittelt, schien alleine ebenfalls nicht auszureichen. Auch die alleinige Nutzung der eher hydrophoben Polyaminosäure Poly-L-Lysin schien hier nicht zu genügen. Die Kombination der Silanisierung mit einem Klebstoff aus Poly-L-Lysin und Pritt Bastelkleber konnte dieses Problem überwinden. Für dieses Klebeverfahren ist beschrieben, dass es besonders bei stark fetthaltigen, also hydrophoben, Geweben – in der immunhistologischen Routine zum Beispiel Knochenmark oder Mamma – geeignet ist, Adhärenz herzustellen und dabei nur sehr wenig Hintergrund zu erzeugen [115]. Da letztlich auch Hirngewebe aufgrund der guten Myelinisierung ein stark lipidhaltiges Gewebe

ist, wurde dieses Adhäsivum getestet und konnte mit sehr gutem Erfolg eingesetzt werden. Offenbar schien die Kombination verschiedener Adhäsiva bei einem auf fetthaltige Gewebe spezialisierten Verfahren den notwendigen Schritt darzustellen.

Zur Zuordnung einzelner positiver Zellen und zur histologischen Orientierung ist die Verwendung einer Gegenfärbung notwendig. Diverse Methoden der histologischen (Gegen-)Färbung sind bekannt [126, 127]. Aufgrund der Gegenfärbung mit 3,3'-Diaminobenzidin, was ein braun-schwarzes Färbeprodukt hervorruft, schieden Farbstoffe mit braunem oder schwarzem Färbeverhalten zur Gegenfärbung aus. Gut etablierte Färbeverfahren sind die Gegenfärbung mit Hämatoxylin oder die Färbung nach Nissl. Zwar war die Färbung nach Nissl geeignet, mit Salzsäure aufgedecktes Gewebe anzufärben, jedoch handelt es sich bei dieser Färbung um ein in der Durchführung sehr aufwendiges Verfahren, da es sich um eine Überfärbung handelt, bei der jeder einzelne Objektträger einzeln bis zur richtigen Kontraststärke gefärbt werden muss. Bei hohen Schnitt- und Objektträgerzahlen war ein solches Verfahren jedoch zu aufwendig, um angewandt zu werden. Mit Hämalaun ließ sich jedoch mit Salzsäure vorbehandeltes Gewebe nicht anfärben, obwohl Hämalaun einen üblicherweise in der histologischen Praxis gut geeigneter Farbstoff zur Gegenfärbung darstellt. Möglicherweise liegt eine Ursache der fehlenden Hämalaun-Anfärbbarkeit von mit Salzsäure behandeltem Gewebe darin, dass Hämalaun als basophiler Farbstoff eine Präferenz für negativ geladene Reste besitzt. Hämalaun muss demnach an negative Ladungen, am ehesten der im Zellkern befindlichen DNA, binden. Durch die Behandlung mit einem stark protonierenden Agens wie 0,1 M Salzsäure könnten möglicherweise negative Ladungen protoniert werden und somit kein Bindungspartner für den kationischen Farbstoff Hämalaun mehr bestehen. Da Hämalaun üblicherweise in saurerer Lösung vorliegt, wäre alternativ auch möglich, dass durch Säurereste im Gewebe das kationische Hämalaun protoniert wird und dann nicht mehr an DNA-Reste binden kann [127]. Unter dieser Annahme wurde ein nicht Zellkerne anfärbender, saurer Zytoplasmafarbstoff gesucht. Hier wurde, da braune und

schwarze Farbstoffe wegen der 3,3'-Dianminobenzidin-Gegenfärbung a priori ausschieden, Eosin [126, 127] zur Gegenfärbung getestet. Mithilfe von Eosin ließ sich das Gewebe erfolgreich anfärben. Da jedoch Eosin als Zytoplasmafarbstoff auch das gesamte Neuropil anfärbt, was zu einem verminderten Kontrast des Gewebes führte, war es notwendig, zur sicheren histologischen Orientierung und zum Auffinden der entsprechenden Strukturen auch histologische Färbungen in einer standardisierten HE-Färbung durchzuführen, in der einerseits die Orientierung wesentlich schneller gelang, andererseits aufgrund des deutlich besseren Kontrasts auch die Flächenmessungen gut möglich waren.

Während es zahlreiche Marker zum Nachweis adulter Neurogenese in verschiedenen Tieren gibt, ist die Anzahl der bei der Arbeit mit menschlichem Gewebe zur Verfügung stehenden Proliferationsmarker sehr begrenzt. Derzeit stehen lediglich Doublecortin (DCX) als früher Differenzierungsmarker [46, 62], Antikörper gegen das Ki-67-Antigen und gegen PCNA [103, 104] sowie möglicherweise noch Antikörper gegen Sox2 [60] zur Verfügung, um Zellproliferation nachzuweisen. In Vorversuchen zeigte sich bezüglich DCX ein sehr zurückhaltendes Anfärbeverhalten. Dies ist wahrscheinlich auf ein verlängertes post-mortal delay zurückzuführen, da bereits frühere Arbeiten zeigen konnten, dass die Anfärbbarkeit gegen DCX bereits nach 1 h nachlässt und nach 8-12 h deutlich artefaktanfällig wird [102]. Sox2 stand zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht zur Verfügung, sodass lediglich PCNA und Ki-67-Antikörper genutzt werden konnten. Hierbei wurde aufgrund der größeren Vorerfahrung und der bestehenden Literatur Ki-67 als Zielstruktur genutzt. Ki-67 ist ein Antigen, das in allen Phasen des Zellzyklus außer der G0-Phase [113] exprimiert wird, wobei das Expressionsniveau schwankt. Insgesamt ist Ki-67 ein gut etablierter Marker zur Darstellung von Proliferation, was durch die routinemäßige Nutzung dieses Marker zum Beispiel in der Neuropathologie [128] unterstrichen wird. Eine Limitation von Ki-67 ist allerdings seine mangelnde Spezifität. Ki-67 wird in allen proliferativ aktiven Zellen exprimiert, ohne für bestimmte Zelllinien spezifisch zu sein. Somit kann mithilfe von Ki-67

nicht unterschieden werden, ob angefärbte Zellen eine neuronale oder gliale Entwicklungslinie einschlagen werden. Auch kann nicht zwischen hirneigenen proliferierenden Zellen – wie neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen – und solchen Zellen, die hirnfremd sind und zufällig einen Proliferationsmarker tragen – wie z.B. Zellen des Immunsystems [105, 106, 129], die durch Hirngewebe patrouillieren, oder endotheliale Zellen [130] – unterschieden werden. Das Problem vaskulärer, Ki-67 positiver Zellen wird noch durch die Arbeit von Palmer et al. verkompliziert, die in Nagetieren beschreiben konnten, dass ein Ort der adulten Neurogenese in räumlicher Beziehung zu Gefäßen liegt, allerdings ein hoher Anteil der proliferativ aktiven Zellen in diesen Regionen auch vaskuläre Marker exprimierte [63], weshalb in dieser Arbeit im humanen Gewebe Ki-67 positive Zellen in und an Gefäßen zur Vermeidung einer Überschätzung der adulten Neurogenese ausgeschlossen wurden. Gleichzeitig gibt es bislang keine reliablen etablierten Zweitmarker für proliferierende Zellen im menschlichen Gehirn, sodass auch eine Doppelmarkierung zur Sicherung der neuronalen Herkunft oder gar des Schicksals als Gliazelle oder als Neuron im Menschen bislang nicht adäquat möglich ist. Um proliferierende Endothelzellen nicht mitzuerfassen, wurden positive Zellen in eindeutiger Lagebeziehung zu Gefäßen nicht mitgezählt. Gleichzeitig ist hier aber zu berücksichtigen, dass somit möglicherweise neuronale Stamm- und Vorläuferzellen in der unmittelbaren Nachbarschaft solcher Gefäße nicht miterfasst werden, was ebenfalls zu einer Verzerrung der Daten führen kann – dies auch angesichts der Tatsache, dass – im Nagetier – Zellnester aktiver adulter Neurogenese in Nähe von Gefäßen gefunden werden konnten. Gleichzeitig exprimierten allerdings 37% der proliferativ aktiven Zellen in solchen Zellnestern endotheliale Marker [63]. Des Weiteren folgt aus der Unspezifität von Ki-67 bezüglich zellulärer Proliferation, dass Ki-67 positive Zellen nicht automatisch mit neu gebildeten Neuronen gleichgesetzt werden können, da auch ein Block in der terminalen Differenzierung proliferierender Zellen zu einer verminderten Zahl neuronal vernetzter neuer Neurone bei gleichzeitig erhöhter Proliferationszahl führen könnte. Trotz aller Limitationen, die mit Ki-67 als einem Marker für adulte humane Neurogenese

vergesellschaftet sind, scheint es sich hierbei um eine robusten und reliablen Marker der adulten humanen Neurogenese zu handeln.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein polyklonaler Antikörper gegen das Ki-67-Antigen verwendet, da mit diesem eine Anfärbung möglich wurde, was mit der Nutzung eines monoklonalen Antikörpers gegen dasselbe Antigen nicht gelang. Dieses Phänomen lässt sich möglicherweise damit erklären, dass im Rahmen des relativ aggressiven Aufdeckprozederes mit Salzsäure und einer langen Wärmebehandlung Epitope, die vom monoklonalen Antikörper erkannt werden, zerstört oder denaturiert werden, sodass der monoklonale Antikörper nicht mehr binden kann. Bei Nutzung des polyklonalen Antikörpers werden ebendiese Epitope zwar auch denaturiert, andere – eventuell stabilere – Epitope könnten jedoch erhalten bleiben, die dann von anderen Linien im polyklonalen Antikörper – die im monoklonalen nicht enthalten sind – erkannt werden, sodass eine Anfärbung weiterhin möglich ist. Gleichzeitig ist jedoch zu bedenken, dass durch die Verwendung eines polyklonalen Antikörpers das Risiko falsch positiver Anfärbungen steigt. Bei einer Anfärbung anderer Epitope wäre jedoch eine eventuell deutlich höhere Anfärberate und auch die Anfärbung anderer Strukturen wahrscheinlich, sodass dies in der Zusammenschau unwahrscheinlich erscheint. Des Weiteren zeigte sich in den Positivkontrollen, für die menschliches Medulloblastomgewebe genutzt wurde, eine auf das Tumorgewebe beschränkte hohe Anfärberate. Dieses Ergebnis fügt sich in das bekannte Färbeverhalten von Medulloblastomen ein, bei denen sehr hohe Proliferationsindizes von mindestens 40 – 50% bekannt sind [131]. Bei fehlender Anfärbung außerhalb des Tumorgewebes und hoher Anfärberate des Tumorgewebes selbst spricht dies für die Selektivität des Verfahrens. Des Weiteren spricht das vergleichbare Anfärbemuster der hippokampalen Zellen mit den Zellen der Positivkontrolle für die Robustheit der etablierten Färbung. Verkompliziert worden sein dürfte die Auswertung allerdings durch die in der Literatur bekannte Eigenschaft von Antikörpern gegen Ki-67, teilweise ein feingranuläres Muster zu zeigen, was die eindeutige Zuordnung teils erschwert [103]. Zwar soll der Effekt des feingranulären Musters bei Nutzung von

monoklonalen Antikörpern der Reihe MIB-1 minimierbar sein [103], jedoch war bei vorliegendem Material die Nutzung eines polyklonalen Antikörpers der Reihe NCL-Ki-67p notwendig, um Signal zu erhalten.

Verkompliziert wurde die Anfärbung des Gewebes durch die mutmaßlich lange Fixierungszeit, da hierdurch der Umfang aufdeckbarer Epitope bekanntermaßen reduziert wird und auch eine Verlängerung der Aufdeckprozederes nur begrenzt Nutzen bringt [132]. Wenn angenommen werden kann, dass Ki-67 positive Zellen den ersten Schritt in der adulten Neurogenese – die Proliferation von Stamm- und Vorläuferzellen – repräsentieren, war es in der vorliegenden Arbeit möglich, das entsprechende Zielantigen Ki-67 in lange Zeit gelagertem, in Paraffin eingebettetem, humanem hippokampalem Gewebe reproduzierbar aufzudecken und mit einem polyklonalen Antikörper anzufärben.

In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die adulte Neurogenese im humanen Hippokampus in der Subgranularzellschicht lokalisiert ist [44, 113]. Aufgrund der Schnittdicke und der daraus resultierenden Anschnittartefakte fanden sich auch immer wieder Ki-67 positive Zellen, die scheinbar in der Granularzellschicht lokalisiert waren. Da der Anteil der in der Granularzellschicht scheinbar lokalisierten proliferativ aktiven Zellen klein im Vergleich zu den in der Subgranularzellschicht lokalisierten Zellen war, wurden die Zellen in der Granularzellschicht mit den in der Subgranularzellschicht befindlichen Zellen miterfasst, um ein Unterschätzen der Proliferation auf Grund von Anschnittartefakten zu verhindern. Im besonderen scheint dieses Vorgehen gerechtfertigt, da in der Subgranularzellschicht neu gebildete Neurone in die Granularzellschicht auswandern [62]. Es handelt sich somit selbst im Fall von tatsächlich in der Granularzellschicht befindlichen noch Ki-67 exprimierenden Zellen um Zellen, die in der Subgranularzellschicht gebildet wurden. Eine deutliche Verzerrung der Ergebnisse durch Miterfassung solcher Zellen scheint angesichts der nur kleinen Zahlen Ki-67 positiver Zellen in der Granularzellschicht unwahrscheinlich.

Unerwarteterweise zeigten sich Ki-67 positive Zellen nicht nur in der Subgranularzellschicht, sondern auch im Hilus. Dieses Zufallsergebnis ist überraschend, da bei Menschen und Nagetieren die neurogene Nische als auf die Subgranularzellschicht beschränkt beschrieben wird [133]. Eine mögliche Interpretation dieses Ergebnisses ist, dass Zellen, die sich von neuronalen Vorläuferzellen unterscheiden – zum Beispiel gliale Zellen oder Abwehrzellen –, im Hilus proliferieren, um eine bislang nicht näher bestimmte Funktion zu erfüllen. Eine andere Erklärung wäre, dass es sich hierbei tatsächlich um neuronale Vorläuferzellen handeln könnte. In diesem Fall wäre zu klären, ob es sich um Zellen, die aus der Subgranularzellschicht auswandern, handelt, wobei in diesem Fall zu klären wäre, ob es sich hierbei um sozusagen fehlgeleitete Zellen handelt, die eigentlich in die Körnerzellschicht hätten auswandern sollen oder ob es sich um eine distinkte Subpopulation von Zellen handelt, die ebenfalls der Subgranularzellschicht entspringen. Alternativ wäre auch eine weitere Stammzellnische im humanen Hippokampus zu diskutieren, wobei diese noch näher zu charakterisieren wäre. Ob hilare Ki-67 positive Zellen eine spezielle Funktion in der Verschaltung und Funktion des humanen Hippokampus haben oder ob es sich um ein Phänomen handelt, das im gesamten Hirn in einer zufälligen Art und Weise in gleichmäßiger Dichte anzutreffen ist und das in vorliegender Arbeit lediglich zufällig im hippokampalen Hilus beobachtet wurde, ist eine Fragestellung, die den Rahmen dieser Arbeit überschreitet und in weiteren Untersuchungen näher beleuchtet werden sollte. Letztlich bleibt die Natur und Funktion dieser Ki-67 positiven hilaren Zellen unklar. Soweit bekannt, wurden Ki-67 positive Zellen im humanen Hilus bislang in der Literatur nicht erwähnt.

Es wird oft postuliert, dass die Bestimmung von Zelldichten in Bezug auf Phänomene des Alterns, Stresses, Entwicklung und dergleichen wenig sinnvoll sei, da Zelldichten durch atrophische Prozesse, die entsprechende Hirnstrukturen einbeziehen, ebenfalls verändert werden, sodass die absolute Zellzahl berechnet werden sollte [49]; Hierbei ist jedoch zu beachten, dass im vorliegenden Sample nur Teile des Hippokampus zur Verfügung standen und

weder repräsentative Schnitte aus verschiedenen Hippokampusabschnitten noch Angaben zum gesamten Hippokampusvolumen, was eine Hochrechnung erlaubt hätte, vorlagen. Somit blieb als einzige sinnvolle Möglichkeit, einen möglichst ungebiasteten Vergleich der Zellzahlen zu ermöglichen, die Berechnung von Zelldichten. Dies könnte jedoch auch dazu geführt haben, dass eine eventuelle Veränderung der adulten Neurogenese durch eine gleichsinnige Veränderung des entsprechenden Hippokampusvolumens oder des Volumens der jeweils gemessenen Hippokampusbereiche rechnerisch aufgehoben wurde.

Neben den bisher beschriebenen Faktoren können die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit jedoch auch durch verschiedene dem Gewebe immanente Faktoren beeinflusst werden. Im besonderen sind hierbei das Sterbealter von Fällen und Kontrollen, die Dauer und Bedingungen der Lagerung, das post-mortal-delay sowie die Vorbehandlung der Proben zu beachten. Zum Beispiel erfordert eine längere Fixierung ein aggressiveres Antigen-Retrieval [102].

Leider liegen keine Informationen über die Lagerungsbedingungen und nur sehr wenige Informationen über die Lagerungsdauer der verwendeten Proben vor. Da einige Fälle noch nach der Internationalen Krankheitsklassifikation der Weltgesundheitsorganisation in der neunten Auflage (ICD-9) kodiert worden sind, müssen die entsprechenden Patienten diagnostiziert und verstorben sein, bevor die Internationale Krankheitsklassifikation der Weltgesundheitsorganisation in der zehnten Auflage (ICD-10) veröffentlicht worden ist; somit lassen sich einige Proben auf die Zeit vor 1989 rückdatieren. Insgesamt gibt es wenige Daten zum Verhalten Paraffin-eingebetteten Hirngewebes in Bezug auf immunhistochemische Färbeverfahren – vor allem wenn die Einbettung teilweise mehr als 15 Jahre zurückliegt. Insgesamt stellten sich einige Herausforderungen bezüglich der Antigenaufdeckung bei den genutzten Proben.

Leider fanden sich in den mitgegebenen Aufzeichnungen ebenfalls keine Angaben zum post-mortal-delay (Nachsterbeverzögerung). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass diesem Faktor in den 1980er und 1990er Jahren nur wenig Beachtung geschenkt worden ist. Somit lässt sich leider weder das Ausmaß der Lagerungsbedingungen und langen Lagerungszeiten noch der Effekt des post-mortal-delay auf die Ergebnisse im Sinne einer Verfälschung der Daten abschätzen.

Ebenfalls fanden sich keine Angaben über Aspekte der Vorbehandlung, wie die Dauer der Immersion in Formalin, die ebenfalls Einfluss auf den Anteil nachweisbarer Zellen – zum Beispiel durch die Notwendigkeit verstärkter Antigenaufdeckung – haben könnte. Somit kann auch über diesen Faktor leider nur spekuliert werden.

Auch relevant ist, dass nicht angegeben wurde, aus welchem Bereich des Hippokampus das Gewebe entstammte, da eine unterschiedliche Funktion verschiedener Hippokampusbereiche – mit dem dorsalen Hippokampus für Lernen und Gedächtnis und dem ventralen Hippokampus für affektives Verhalten – beschrieben ist [64, 134]. Verschiedene Effekte auf Phänomene wie die adulte Neurogenese sind beschrieben [135].

Zusammenfassend dürften das Patientenalter, die Vorbehandlung, die Nachsterbeverzögerung und die Lagerungsdauer der Proben starke Störfaktoren der Arbeit gewesen sein.

Ein Aspekt, der bei vorliegender Arbeit aus Mangel an geeigneten Markern nicht berücksichtigt werden konnte, ergibt sich aus der Unklarheit über das Schicksal der nachgewiesenen Zellen. Während es gute und reliable Marker für die Zelliniendetermination proliferierender Zellen im murinen Hippokampus gibt, gibt es solche Marker bislang fast nicht für humanes hippokampales Gewebe [136]. Daher ist letztlich eine Zelliniendifferenzierung von mit Ki-67 anfärbbaren Zellen nicht möglich. Somit ist letztlich auch nicht geklärt, ob es sich um Zellen

handelt, die eine neuronale Differenzierung einschlagen oder ob es sich um Zellen mit einem glialen Schicksal handelt. Folglich ist auch wenig über die funktionelle Konsequenz von Ki-67 positiven Zellen im humanen Hippokampus aussagbar. Letztlich könnte auch eine Veränderung des Zellschicksals bei unveränderter Proliferation große Auswirkungen auf funktionelle Kreisläufe haben. Die Etablierung geeigneter Marker für die Liniendifferenzierung humaner, proliferativ aktiver, neuronaler und glialer Vorläuferzellen bleibt somit ein ungelöstes Problem.

Leider gelang es nicht, frühere Arbeiten, die eine Verminderung der adulten Neurogenese bei Schizophrenen im Vergleich mit Kontrollen zeigten [113], durchgehend zu reproduzieren, da sich in den meisten Analysen nicht-signifikante Unterschiede zeigten. Dieses Negativergebnis kann auf verschiedene Aspekte zurückgeführt werden. Zunächst ist zu berücksichtigen, dass die Arbeit von Reif et al. in frisch gefrorenem Gewebe durchgeführt wurde, wohingegen vorliegende Arbeit in langgelagertem, Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe durchgeführt wurde. Die Dauer der Fixierung, die in vielen Fällen unbekannt war, aber als lang anzunehmen ist, hat einen bekannten, sehr nachteiligen Effekt auf die Möglichkeit der Aufdeckung von Epitopen und der immunhistochemischen Anfärbarkeit [137]. Proteindenaturierungsvorgänge, ungünstige Gewebepreparation und vor allem eine lange – teils undefinierte – Nachsterbeverzögerung können einen nachhaltig negativen Einfluss auf die Anfärbarkeit der Proben gehabt haben. Angesichts einer niedrigen Anzahl positiver Zellen könnten, trotz bester Bemühungen, den Anteil positiver Zellen durch Nutzung eines Salzsäurebasierten Antigenaufdeckungsverfahrens, für das optimale Anfärbarkeit berichtet wurde [102], zu maximieren und gleichzeitig Hintergrundfärbung zu minimieren, bereits schwache Artefakte und ein geringer Hintergrund die Messwerte merklich verfälscht haben.

Bei Betrachtung der anfärbbaren Zellen im Hilus zeigte sich in einer Subgruppenanalyse ein signifikantes Ergebnis, wenn schizophrene Fälle mit

einer Subgruppe von Kontrollen verglichen wurden. Auch zeigte sich ein signifikantes Ergebnis im Vergleich der schizophrenen Fälle mit den Kontrollen aus besagter Quelle sowie beider Kontrollgruppen untereinander bei Betrachtung der positiven Zellen in der Subgranularzellschicht. Die Ergebnisse waren aber nicht im Vergleich der Fälle mit allen Kontrollen signifikant. Dieses Resultat ist komplex zu deuten, da die Subgruppe von Kontrollen aus einer anderen Hirnbank stammte als die Fälle; verkompliziert wird dieses Ergebnis noch durch den signifikanten Unterschied der Kontrollen aus verschiedenen Hirnbanken. Möglicherweise spiegelt dieser Unterschied die verschiedenen Gewebefaktoren hinsichtlich Vorbehandlung, Lagerung und post-mortal-delay wieder, möglicherweise liegt diesem aber auch ein Unterschied in der Herkunft der Probanden zugrunde, der trotz Nutzung von Hippokampi kaukasischer Probanden nicht ausgeglichen werden konnte.

Des Weiteren ist in Rechnung zu stellen, dass es sich bei der Schizophrenie nicht um eine Entität, sondern vielmehr um eine Gruppe verschiedener Erkrankungen [1] handelt, wobei bei Anwendung eines Diagnosemanuals – wie es in der ICD-9 und ICD-10 Verwendung findet – Querschnittsdiagnosen gestellt werden, die in der Momentaufnahme eine vergleichbare Klinik zeigen können, im Zeitverlauf sich aber als verschiedene Erkrankungen mit unterschiedlichem Outcome entpuppen. Durch Nutzung der ICD-9 und ICD-10 als Diagnosegrundlage kann es zu deutlicher Inhomogenität der Stichproben kommen, was falsch-negative Ergebnisse im Sinne eines Typ-2-Fehlers begünstigen kann und die Replizierung von Daten erschwert [14].

Angesichts der teils unvollständigen Daten zu den Probanden der vorliegenden Arbeit sowie der Problematik starker Störfaktoren bezüglich des Materials, ist ein hohes Maß an Qualität für die Nutzung von Hirngewebe für Untersuchungen zur adulten humanen Neurogenese zu fordern. Im besonderen sollte der Aspekt des post-mortal-delay hier dezidiert berücksichtigt werden. Aufgrund nur kleiner Fallzahlen aus einer Hirnbank mussten Fälle und Kontrollen aus verschiedenen Standorten miteinander verglichen werden. Der Vergleich verschiedenartig

behandelter Proben aus verschiedenen Hirnbanken mit entsprechend großer Heterogenität der Proben hat zur Folge, dass fehlende Unterschiede möglicherweise auch auf die unterschiedliche Herkunft und Behandlung der Proben zurückzuführen sein können. Somit können mit der vorliegenden Arbeit vorherige Untersuchungen, die zur Grundannahme einer Verminderung adulter Neurogenese bei Schizophrenen geführt hatten, [113] – auch wenn sie diese nicht bestätigen – letztlich nicht widerlegen, sodass hier weitere Untersuchungen notwendig erscheinen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen erneut die Notwendigkeit gut geführter, großer Hirnbanken, die bekannte und noch unbekannt, eventuell zukünftig bedeutsame Störfaktoren minutiös erfassen.

4.2 Arbeiten mit murinem Gewebe

Die Hauptresultate der Arbeit mit Gewebe der Maus sind, dass (1) Ki-67 positive Zellen in der Subgranularzellschicht in typischer Weise anfärbbar waren; dass (2) sich bei einer „klassischen“ Auszählung keine signifikanten Unterschiede zwischen wildtypischen (wt) Mäusen und Mäusen, die defizient für den M1-Acetylcholinrezeptor (ko) waren, fanden und dass (3) sich bei Untersuchung großer Zellnester und aller Zellnester signifikante Unterschiede zwischen wildtypischen und M1-Rezeptor defizienten Mäusen im Sinne der Ausgangshypothese fanden.

Während sich im Rahmen der Etablierung und Auswertung des menschlichen Gewebes eine schlechte Anfärbbarkeit des Gewebes gegen Ki-67 bei einem sehr niedrigen Ki-67-Anfärbequotienten (labelling index) bei teilweise inhomogenem Anfärbeverhalten der Zellen ergab, ließ sich typischerweise aufbereitetes Gewebe der Maus mit einem konventionellen Aufdeckungsprocedere und einer klassischen Anfärbungsvorschrift gut anfärben. Hierbei zeigte sich ein Färbeverhalten Ki-67 positiver Zellen, das aus verschiedenen anderen Arbeiten bekannte typische Verteilungs- und Anfärbemuster [43, 113, 138] zeigte. Bei gutem Kontrast der einzelnen histologischen Strukturen konnte auf eine Gegenfärbung verzichtet werden. Dieses Ergebnis fügt sich ein in die Reihe zahlreicher Vorbefunde, was für die Robustizität der Methode einerseits und für die Anfärbung proliferativ aktiver Zellen durch die Methode andererseits spricht.

Bei der „klassischen“ Auszählung, bei der jede Zelle einzeln gezählt wird, ergaben sich lediglich nicht signifikante Unterschiede. Die Gruppen waren in sich homogen, auch zeigten sich keine Unterschiede im Sinne einer rechts-links-Asymmetrie, da die Schnitte in immer gleicher Art und Weise aufgezogen wurden und somit ein Seitenvergleich möglich war. Die Homogenität der Gruppen im Seitenvergleich spricht gegen ein relevantes Anfärbeartefakt. Zwar waren in allen Vergleichen bei wildtypischen Mäusen (wt) im Mittel mehr Zellen gegen Ki-67 anfärbbar als bei den M1-Rezeptor defizienten Tieren (ko), jedoch

waren diese Ergebnisse jeweils im zweiseitigen t-Test nicht signifikant, sieht man von einer Subgruppenanalyse ab. Darüber hinaus ist bei der Zählung aller Zellen – obgleich in der Literatur oft praktiziert – zu bedenken, dass es sich hierbei um ein relativ unphysiologisches Zählmuster handelt, da zu bedenken ist, dass es sich gemäß dem Konzept von Stammzellen um wenig proliferativ aktive Zellen handelt, die sich in rasch proliferierende Vorläuferzellen und eine wieder zur proliferativen Ruhe zurückkehrende Stammzelle handelt. Die Vorläuferzellen teilen sich anschließend wiederholt, bevor es nach mehreren Zellteilungen zur Ausdifferenzierung dieser Zellen, zum Migration und neuronalen Integration kommt [138]. Dieses Konzept ist für diverse Stammzellpopulationen, klassischerweise den hämatopoetischen Stammzellen, aber auch epidermalen Stammzellen und inzwischen auch neuronalen, inklusive adulten, Stammzellen, gut belegt. Unter der Annahme einer wenig proliferativ aktiven Stammzelle, die sich in eine ruhende Stammzelle und eine proliferativ hochaktive Vorläuferzelle, deren Tochterzellen erneut mehrfache Zellteilungen durchlaufen, teilt, bevor nach mehreren Teilungen die Zellen auswandern und ausreifen, ist davon auszugehen, dass sich mehrere teilungsaktive Zellen auf nur geringem Raum aufhalten. Entsprechend konnte bereits dargelegt werden, dass Zellnester – zumindest im Nagetier – wahrscheinlich der Ort der adulten Neurogenese sind und die neurogene Nische in diesen Zellnestern u.a. aufgrund von Zell-Zell-Interaktionen zustande kommt [63, 120, 138]. Das Phänomen der Zellnestbildung zeigte sich auch in den murinen Hippokampi in der vorliegenden Arbeit. Im besonderen ist hierbei zu bedenken, dass teilweise einzelne Ki-67 positive Zellen in solchen proliferativ aktiven Nestern mitunter nicht voneinander sicher abgegrenzt werden können. Des Weiteren kann spekuliert werden, dass Ki-67 positive Zellen, die sich außerhalb solcher Zellnester befinden, entweder noch Ki-67 positiven, aber bereits auswandernden Zellen, entsprechen oder es sich hierbei um Zellen handelt, die einer Art „Hintergrundaktivität“ der Proliferation entsprechen. In jedem Fall dürfte aber der Hauptteil neu gebildeter Zellen und somit auch der Hauptteil von funktionell integrierten Nervenzellen in proliferativ hoch aktiven Zentren – in solchen Zellnestern – entstammen. Daher ist es

sinnvoll, auch solche Zellnester zu zählen und zu vergleichen. In der vorliegenden Arbeit wurden zum einen große Zellnester mit hoher Aktivität verglichen. Darüber hinaus wurden auch kleine Zellnester mit berücksichtigt. Diese Analyse zeigte, dass sich bei Vergleich großer Zellnester mit mindestens fünf voneinander abgrenzbaren Zellen ein signifikanter Unterschied zwischen wildtypischen und M1-Rezeptor defizienten Tieren ergab, wobei gemäß der Annahme einer verminderten adulten Neurogenese in einem Schizophreniemodell die Proliferation bei den M1-Rezeptor knockout-Tieren signifikant reduziert war. Im Seitenvergleich in den jeweiligen Gruppen zeigten sich diese homogen. Bei der Betrachtung kleiner Zellnester mit lediglich drei oder vier positiven Zellen zeigte sich hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen oder innerhalb einzelner Gruppen, wengleich der Effekt der großen Zellnester so stark war, dass sich noch signifikante Ergebnisse auch bei Betrachtung aller Zellnester zeigten. Dies passt sich in die Arbeit von Seki et al. ein, die Zellnester mit mindestens drei Zellen beschrieben und teils sehr große Zellnester mit bis zu 20 Zellen in der Ratte berichteten [138]. Es ist plausibel, dass größere Zellnester mit einer aktiveren Neurogenese korrelieren, kleinere Zellnester – so wie vereinzelte Ki-67 positive Zellen – eher einer Hintergrundaktivität entsprechen. Daher sind Effekte eher bei großen Zellnestern zu erwarten und fügen sich in die Ausgangshypothese verminderter Neurogenese in einem Schizophrenie-Modell gut ein.

Die Reduktion proliferativ hochaktiver großer Zellnester dürfte einen relevanten Einfluss auf die Bildung neuer Neurone haben und somit funktionell relevant sein. Dies passt auch zu *in vitro*-Daten, wonach die Aktivierung cholinerg M1-Rezeptoren die Proliferation neuronaler Stammzellen hin zu Neuronen fazitätieren soll [139]. Alternativ wäre zu erwägen, dass die proliferative Aktivität unverändert bleibt, lediglich die Differenzierung der Zellen beschleunigt abläuft und sich somit weniger Zellen anfärben lassen. Dies ist jedoch eher unwahrscheinlich, da zu erwarten wäre, dass bei einer beschleunigten Differenzierung bei konstanter Proliferation sich der Anteil kleiner Zellnester reaktiv erhöhen würde, da aus diesen die Zellen schneller ausdifferenzieren

würden oder große Zellnester stetig vermehrt Zellen verlieren würden. Da jedoch in allen Proben der Anteil der kleinen Zellnester konstant war, ist davon auszugehen, dass es sich um eine Veränderung der Proliferationsaktivität und nicht um eine Veränderung der Differenzierungsgeschwindigkeit handelt. Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass die adulte Neurogenese bei Mäusen ohne funktionablen M1-Rezeptor im Vergleich zu wildtypischen Mäusen (wt) reduziert ist.

Interessant wäre die genauere Untersuchung der Faktoren, die zur Proliferationssteigerung in den großen Zellnestern beitragen, um somit die neurogene Nische und das micro-environment neuronaler Stamm- und Vorläuferzellen näher zu charakterisieren und modulieren zu können. Somit scheint eine Veränderung der adulten Neurogenese sich vor allem auf der Ebene der Vorläuferzellen und ihrer Aktivität darzustellen, da sich kein Unterschied in der absoluten Zahl Ki-67 positiver Zellen zeigte. Weitere Untersuchungen sollten diesen Bereich näher untersuchen und zum Beispiel die Expression von Rezeptoren oder potenzielle Angriffspunkte von Antipsychotika aufzeigen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in einem Mausmodell für schizophrene Erkrankungen eine verminderte adulte Neurogenese im Sinne der Grundannahme bestätigt werden konnte. Der Versuch einer Datenübertragung auf den Menschen gelang aufgrund inhomogener Proben und materialimmanenter Faktoren nicht, wenngleich eine Färbung gegen Ki-67 für langgelagertes, in Formalin-fixiertes und in Paraffin eingebettetes humanes Hippokampusgewebe etabliert werden konnte. Weitere Untersuchungen zu diesem Thema erscheinen somit notwendig.

5. Zusammenfassung

Hintergrund: Schizophrenie-Spektrumerkrankungen sind häufige, schwerwiegende psychische Erkrankungen, die ein hohes Leid bei Betroffenen und ihren Angehörigen verursachen. Trotz intensiver Bemühungen ist die Ätiopathogenese dieser Erkrankungen bislang nur unzureichend verstanden, die Behandlung bislang nur symptomatisch möglich, wenngleich eine Wechselwirkung zwischen genetischen und umweltbezogenen Faktoren als ursächlich erscheint. Vorherige Arbeiten an frisch gefrorenem Hippokampusgewebe konnten zeigen, dass die adulte Neurogenese in der Subgranularzellschicht des Hippokampus bei an Schizophrenie Erkrankten vermindert ist. Weiterhin gibt es Hinweise für eine Beteiligung des cholinergen Systems und von M1-Acetylcholinrezeptoren bei der Entstehung der psychotischen Symptomatik. Ebenfalls konnte bereits in der Vergangenheit ein Mausmodell generiert werden, das schizophrenieartiges Verhalten zeigt und bei dem der M1-Acetylcholinrezeptor ausgeschaltet ist.

Material und Methoden: Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst eine Färbung gegen das Ki-67 Antigen als Marker für proliferative Aktivität in lange Zeit gelagertem Formalin-fixiertem und paraffiniertem Hirngewebe etabliert. Anschließend wurde eine postmortale Fall-Kontroll-Studie in lange Zeit gelagertem, in Formalin fixiertem und paraffiniertem Hippokampusgewebe durchgeführt, bei der die Zahl proliferativ aktiver Zellen, die gegen Ki-67 anfärbbar waren, untersucht wurde. Hierbei wurden sowohl gegen Ki-67 anfärbbare Zellen in der Subgranularzellschicht, als auch im Hilus ausgewertet. Es standen Hippokampi von 18 schizophren Erkrankten sowie 37 Hippokampi gesunder Kontrollen, die aus zwei verschiedenen Hirnbanken rekrutiert werden mussten, zur Verfügung. Die statistische Analyse erfolgte mithilfe eines Kruskal-Wallis Tests sowie bei signifikanten Ergebnissen in diesem mit einem Mann-Whitney U Test.

Des Weiteren wurde eine Färbung gegen das Ki-67 Antigen in frisch gefrorenen Gehirnen von männlichen Mäusen durchgeführt; hierbei wurden zwölf

wildtypische Mäuse mit zwölf Mäusen mit einer Ausschaltung des M1-Acetylcholinrezeptors vergleichen, wobei letztere schizophrenieartiges Verhalten zeigen. Die Auswertung erfolgte mittels eines zweiseitigen t-Tests.

Ergebnisse: Eine Färbung gegen Ki-67 in lange Zeit gelagertem, Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe konnte etabliert werden. Bei Analyse der humanen Fall-Kontroll-Studie konnte ein Trend zu einer verminderten adulten Neurogenese in der hippocampalen Subgranularzone bei schizophrenen Patienten gefunden werden. Ein signifikanter Unterschied konnte im Vergleich der Fälle und einer Subgruppe von Kontrollen gefunden werden, die jedoch aus einer anderen Hirnbank als die Fälle stammten. Keine Signifikanz konnte bei Vergleich der Fälle mit den Kontrollen aus der gleichen Hirnbank oder bei Vergleich der Ki-67 positiven Zellen in der Hilusregion gefunden werden.

Im Mausmodell konnte im Sinne der Hypothese einer verminderten adulten Neurogenese in den M1-Rezeptor knockout-Tieren eine signifikante Reduktion Ki-67 positiver Zellen im Vergleich zu wildtypischen Tieren gezeigt werden, wenn Zellnester anstatt einzelner Zellen gezählt wurden.

Diskussion: Es konnte ein Trend hin zu einer verminderten hippocampalen adulten Neurogenese in der Subgranularzellschicht bei an Schizophrenie Erkrankten aufgezeigt werden. Aufgrund der Heterogenität der Proben sind die Ergebnisse jedoch vorsichtig zu bewerten, da Unterschiede in der Vorbehandlung der Proben unter Umständen auch die Ergebnisse erklären könnten, sodass die Ausgangshypothese einer verminderten hippocampalen adulten Neurogenese nicht sicher widerlegt, aber auch nicht gestützt werden kann; weitere Forschung scheint hier notwendig zu sein.

Im Mausmodell konnte eine verminderte hippocampale Neurogenese bei M1-Rezeptor knockout-Mäusen nachgewiesen werden. Dieser Effekt ließ sich

nachweisen, wenn große Zellnester betrachtet wurden, was für eine Modulation der Aktivität der neurogenen Nische bei den M1-defizienten Tieren spricht.

6. Literaturverzeichnis

1. van Os, J. and S. Kapur, *Schizophrenia*. Lancet, 2009. **374**(9690): p. 635-45.
2. Knapp, M., *Costs of schizophrenia*. Br J Psychiatry, 1997. **171**: p. 509-18.
3. Raedler, T.J., et al., *Towards a muscarinic hypothesis of schizophrenia*. Mol Psychiatry, 2007. **12**(3): p. 232-46.
4. Brown, A.S. and J.J. McGrath, *The prevention of schizophrenia*. Schizophr Bull, 2011. **37**(2): p. 257-61.
5. Dilling, H.H., *Internationale Klassifikation psychischer Störungen : ICD-10, Kapitel V (F) ; klinisch-diagnostische Leitlinien / Weltgesundheitsorganisation. Übers. und hrsg. von H. Dilling ...*, in *Internationale Klassifikation psychischer Störungen : ICD-10, Kapitel V (F) ; klinisch-diagnostische Leitlinien / Weltgesundheitsorganisation. Übers. und hrsg. von H. Dilling ...*, W.H. Organization, Editor. 2010, Huber: Bern. p. 109-136.
6. Scarr, E. and B. Dean, *Muscarinic receptors: do they have a role in the pathology and treatment of schizophrenia?* J Neurochem, 2008. **107**(5): p. 1188-95.
7. Mason, P., et al., *The course of schizophrenia over 13 years. A report from the International Study on Schizophrenia (ISoS) coordinated by the World Health Organization*. Br J Psychiatry, 1996. **169**(5): p. 580-6.
8. Rössler, W., J. Salize, and M. Knapp, *[The costs of schizophrenia]*. Fortschr Neurol Psychiatr, 1998. **66**(11): p. 496-504.
9. Brown, A.S., *The environment and susceptibility to schizophrenia*. Prog Neurobiol, 2011. **93**(1): p. 23-58.
10. McGrath, J., et al., *A systematic review of the incidence of schizophrenia: the distribution of rates and the influence of sex, urbanicity, migrant status and methodology*. BMC Med, 2004. **2**: p. 13.
11. McGrath, J., et al., *Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality*. Epidemiol Rev, 2008. **30**: p. 67-76.
12. Saha, S., et al., *A systematic review of the prevalence of schizophrenia*. PLoS Med, 2005. **2**(5): p. e141.
13. Konnopka, A., et al., *[The cost of schizophrenia in Germany: a systematic review of the literature]*. Psychiatr Prax, 2009. **36**(5): p. 211-8.
14. Carpenter, W.T., *A few methodologic issues of note*. Schizophr Bull, 2008. **34**(6): p. 1003-5.
15. Jablensky, A., *Subtyping schizophrenia: implications for genetic research*. Mol Psychiatry, 2006. **11**(9): p. 815-36.
16. Sullivan, P.F., K.S. Kendler, and M.C. Neale, *Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies*. Arch Gen Psychiatry, 2003. **60**(12): p. 1187-92.
17. Lichtenstein, P., et al., *Common genetic determinants of schizophrenia and bipolar disorder in Swedish families: a population-based study*. Lancet, 2009. **373**(9659): p. 234-9.
18. Lang, U.E., et al., *Molecular mechanisms of schizophrenia*. Cell Physiol Biochem, 2007. **20**(6): p. 687-702.

19. Li, Z., et al., *N-desmethylozapine, a major metabolite of clozapine, increases cortical acetylcholine and dopamine release in vivo via stimulation of M1 muscarinic receptors*. *Neuropsychopharmacology*, 2005. **30**(11): p. 1986-95.
20. Kapur, S., R. Mizrahi, and M. Li, *From dopamine to salience to psychosis--linking biology, pharmacology and phenomenology of psychosis*. *Schizophr Res*, 2005. **79**(1): p. 59-68.
21. da Penha Berzaghi, M., et al., *Cholinergic regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) but not neurotrophin-3 (NT-3) mRNA levels in the developing rat hippocampus*. *J Neurosci*, 1993. **13**(9): p. 3818-26.
22. Wess, J., R.M. Eglén, and D. Gautam, *Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development*. *Nat Rev Drug Discov*, 2007. **6**(9): p. 721-33.
23. Bymaster, F.P., et al., *Muscarinic mechanisms of antipsychotic atypicality*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2003. **27**(7): p. 1125-43.
24. Bodick, N.C., et al., *Effects of xanomeline, a selective muscarinic receptor agonist, on cognitive function and behavioral symptoms in Alzheimer disease*. *Arch Neurol*, 1997. **54**(4): p. 465-73.
25. Barak, S. and I. Weiner, *The M/M preferring agonist xanomeline reverses amphetamine-, MK801- and scopolamine-induced abnormalities of latent inhibition: putative efficacy against positive, negative and cognitive symptoms in schizophrenia*. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2011. **14**(9): p. 1233-46.
26. Felder, C.C., et al., *Elucidating the role of muscarinic receptors in psychosis*. *Life Sci*, 2001. **68**(22-23): p. 2605-13.
27. Correll, C.U., *From receptor pharmacology to improved outcomes: individualising the selection, dosing, and switching of antipsychotics*. *Eur Psychiatry*, 2010. **25 Suppl 2**: p. S12-21.
28. Ashby, C.R., Jr. and R.Y. Wang, *Pharmacological actions of the atypical antipsychotic drug clozapine: a review*. *Synapse*, 1996. **24**(4): p. 349-94.
29. Scarr, E., et al., *Altered hippocampal muscarinic M4, but not M1, receptor expression from subjects with schizophrenia*. *Biol Psychiatry*, 2007. **61**(10): p. 1161-70.
30. Weiner, D.M., et al., *The role of M1 muscarinic receptor agonism of N-desmethylozapine in the unique clinical effects of clozapine*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2004. **177**(1-2): p. 207-16.
31. Sur, C., et al., *N-desmethylozapine, an allosteric agonist at muscarinic 1 receptor, potentiates N-methyl-D-aspartate receptor activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(23): p. 13674-9.
32. Dasari, S. and A.T. Gullledge, *M1 and M4 receptors modulate hippocampal pyramidal neurons*. *J Neurophysiol*, 2011. **105**(2): p. 779-92.
33. Levey, A.I., et al., *Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation*. *J Neurosci*, 1995. **15**(5 Pt 2): p. 4077-92.

34. Hamilton, S.E. and N.M. Nathanson, *The M1 receptor is required for muscarinic activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in murine cerebral cortical neurons*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 15850-3.
35. Dean, B., et al., *Decreased muscarinic1 receptors in the dorsolateral prefrontal cortex of subjects with schizophrenia*. Mol Psychiatry, 2002. **7**(10): p. 1083-91.
36. Anagnostaras, S.G., et al., *Selective cognitive dysfunction in acetylcholine M1 muscarinic receptor mutant mice*. Nat Neurosci, 2003. **6**(1): p. 51-8.
37. Gerber, D.J., et al., *Hyperactivity, elevated dopaminergic transmission, and response to amphetamine in M1 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(26): p. 15312-7.
38. Langmead, C.J., J. Watson, and C. Reavill, *Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets*. Pharmacol Ther, 2008. **117**(2): p. 232-43.
39. Marino, M.J., et al., *Activation of the genetically defined m1 muscarinic receptor potentiates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor currents in hippocampal pyramidal cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(19): p. 11465-70.
40. Altman, J. and G.D. Das, *Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats*. J Comp Neurol, 1965. **124**(3): p. 319-35.
41. Altman, J. and G.D. Das, *Post-natal origin of microneurons in the rat brain*. Nature, 1965. **207**(5000): p. 953-6.
42. Altman, J. and G.D. Das, *Postnatal neurogenesis in the guinea-pig*. Nature, 1967. **214**(5093): p. 1098-101.
43. Kempermann, G., H.G. Kuhn, and F.H. Gage, *More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment*. Nature, 1997. **386**(6624): p. 493-5.
44. Eriksson, P.S., et al., *Neurogenesis in the adult human hippocampus*. Nat Med, 1998. **4**(11): p. 1313-7.
45. da Silva, P.G., et al., *Adult neurogenesis: ultrastructure of a neurogenic niche and neurovascular relationships*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e39267.
46. Amrein, I., et al., *Absent or low rate of adult neurogenesis in the hippocampus of bats (Chiroptera)*. PLoS One, 2007. **2**(5): p. e455.
47. Song, H.J., C.F. Stevens, and F.H. Gage, *Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons*. Nat Neurosci, 2002. **5**(5): p. 438-45.
48. Toni, N., et al., *Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells*. Nat Neurosci, 2008. **11**(8): p. 901-7.
49. Jinno, S., *Decline in adult neurogenesis during aging follows a topographic pattern in the mouse hippocampus*. J Comp Neurol, 2011. **519**(3): p. 451-66.
50. Lee, S.W., G.D. Clemenson, and F.H. Gage, *New neurons in an aged brain*. Behav Brain Res, 2012. **227**(2): p. 497-507.

51. Marrone, D.F., V. Ramirez-Amaya, and C.A. Barnes, *Neurons generated in senescence maintain capacity for functional integration*. Hippocampus, 2011.
52. Boldrini, M., et al., *Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus*. Neuropsychopharmacology, 2009. **34**(11): p. 2376-89.
53. Couillard-Despres, S., et al., *Ageing abolishes the effects of fluoxetine on neurogenesis*. Mol Psychiatry, 2009. **14**(9): p. 856-64.
54. Dawirs, R.R., K. Hildebrandt, and G. Teuchert-Noodt, *Adult treatment with haloperidol increases dentate granule cell proliferation in the gerbil hippocampus*. J Neural Transm, 1998. **105**(2-3): p. 317-27.
55. Reif, A., et al., *Neurogenesis and schizophrenia: dividing neurons in a divided mind?* Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci, 2007. **257**(5): p. 290-9.
56. Newton, S.S. and R.S. Duman, *Neurogenic actions of atypical antipsychotic drugs and therapeutic implications*. CNS Drugs, 2007. **21**(9): p. 715-25.
57. DeCarolis, N.A. and A.J. Eisch, *Hippocampal neurogenesis as a target for the treatment of mental illness: a critical evaluation*. Neuropharmacology, 2010. **58**(6): p. 884-93.
58. Duan, X., et al., *Disrupted-In-Schizophrenia 1 regulates integration of newly generated neurons in the adult brain*. Cell, 2007. **130**(6): p. 1146-58.
59. Kaneko, N. and K. Sawamoto, *Adult neurogenesis and its alteration under pathological conditions*. Neurosci Res, 2009. **63**(3): p. 155-64.
60. Toni, N. and S. Sultan, *Synapse formation on adult-born hippocampal neurons*. Eur J Neurosci, 2011. **33**(6): p. 1062-8.
61. Carpentier, P.A. and T.D. Palmer, *Immune influence on adult neural stem cell regulation and function*. Neuron, 2009. **64**(1): p. 79-92.
62. von Bohlen Und Halbach, O., *Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus*. Cell Tissue Res, 2007. **329**(3): p. 409-20.
63. Palmer, T.D., A.R. Willhoite, and F.H. Gage, *Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis*. J Comp Neurol, 2000. **425**(4): p. 479-94.
64. Zhao, C., W. Deng, and F.H. Gage, *Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis*. Cell, 2008. **132**(4): p. 645-60.
65. Gould, E., et al., *Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10910-7.
66. Takemura, N.U., *Evidence for neurogenesis within the white matter beneath the temporal neocortex of the adult rat brain*. Neuroscience, 2005. **134**(1): p. 121-32.
67. Bernier, P.J., et al., *Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(17): p. 11464-9.
68. Yoshimi, K., et al., *Possibility for neurogenesis in substantia nigra of parkinsonian brain*. Ann Neurol, 2005. **58**(1): p. 31-40.
69. Zhao, M., et al., *Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(13): p. 7925-30.

70. Bedard, A., C. Gravel, and A. Parent, *Chemical characterization of newly generated neurons in the striatum of adult primates*. Exp Brain Res, 2006. **170**(4): p. 501-12.
71. Seri, B., et al., *Composition and organization of the SCZ: a large germinal layer containing neural stem cells in the adult mammalian brain*. Cereb Cortex, 2006. **16 Suppl 1**: p. i103-11.
72. Alvarez-Buylla, A., J.M. Garcia-Verdugo, and A.D. Tramontin, *A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(4): p. 287-93.
73. Ward, K.E., et al., *Meta-analysis of brain and cranial size in schizophrenia*. Schizophr Res, 1996. **22**(3): p. 197-213.
74. Bogerts, B., et al., *Reduced temporal limbic structure volumes on magnetic resonance images in first episode schizophrenia*. Psychiatry Res, 1990. **35**(1): p. 1-13.
75. Geuze, E., E. Vermetten, and J.D. Bremner, *MR-based in vivo hippocampal volumetrics: 2. Findings in neuropsychiatric disorders*. Mol Psychiatry, 2005. **10**(2): p. 160-84.
76. Steen, R.G., et al., *Brain volume in first-episode schizophrenia: systematic review and meta-analysis of magnetic resonance imaging studies*. Br J Psychiatry, 2006. **188**: p. 510-8.
77. Nelson, M.D., et al., *Hippocampal volume reduction in schizophrenia as assessed by magnetic resonance imaging: a meta-analytic study*. Arch Gen Psychiatry, 1998. **55**(5): p. 433-40.
78. Pantelis, C., et al., *Neuroanatomical abnormalities before and after onset of psychosis: a cross-sectional and longitudinal MRI comparison*. Lancet, 2003. **361**(9354): p. 281-8.
79. Antonova, E., et al., *The relationship between brain structure and neurocognition in schizophrenia: a selective review*. Schizophr Res, 2004. **70**(2-3): p. 117-45.
80. Koehl, M. and D.N. Abrous, *A new chapter in the field of memory: adult hippocampal neurogenesis*. Eur J Neurosci, 2011. **33**(6): p. 1101-14.
81. Falkai, P. and B. Bogerts, *Cell loss in the hippocampus of schizophrenics*. Eur Arch Psychiatry Neurol Sci, 1986. **236**(3): p. 154-61.
82. Dranovsky, A. and R. Hen, *DISC1 puts the brakes on neurogenesis*. Cell, 2007. **130**(6): p. 981-3.
83. Eisch, A.J., et al., *Adult neurogenesis, mental health, and mental illness: hope or hype?* J Neurosci, 2008. **28**(46): p. 11785-91.
84. Mao, Y., et al., *Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3beta/beta-catenin signaling*. Cell, 2009. **136**(6): p. 1017-31.
85. VanDeMark, K.L., et al., *The activation of M1 muscarinic receptor signaling induces neuronal differentiation in pyramidal hippocampal neurons*. J Pharmacol Exp Ther, 2009. **329**(2): p. 532-42.
86. Rico, B. and O. Marin, *Neuregulin signaling, cortical circuitry development and schizophrenia*. Curr Opin Genet Dev, 2011. **21**(3): p. 262-70.
87. Macintyre, G., et al., *Association of NPAS3 exonic variation with schizophrenia*. Schizophr Res, 2010. **120**(1-3): p. 143-9.

88. Pillai, A., *Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in the pathogenesis and novel pharmacotherapy of schizophrenia*. Neurosignals, 2008. **16**(2-3): p. 183-93.
89. Buckley, P.F., A. Pillai, and K.R. Howell, *Brain-derived neurotrophic factor: findings in schizophrenia*. Curr Opin Psychiatry, 2011. **24**(2): p. 122-7.
90. Knuesel, I., *Reelin-mediated signaling in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases*. Prog Neurobiol, 2010. **91**(4): p. 257-74.
91. Grayson, D.R., et al., *Reelin promoter hypermethylation in schizophrenia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(26): p. 9341-6.
92. Gong, C., et al., *Reelin regulates neuronal progenitor migration in intact and epileptic hippocampus*. J Neurosci, 2007. **27**(8): p. 1803-11.
93. Oh, J., et al., *Astrocyte-derived interleukin-6 promotes specific neuronal differentiation of neural progenitor cells from adult hippocampus*. J Neurosci Res, 2010. **88**(13): p. 2798-809.
94. Pathania, M., L.D. Yan, and A. Bordey, *A symphony of signals conducts early and late stages of adult neurogenesis*. Neuropharmacology, 2010. **58**(6): p. 865-76.
95. Palmer, T.D., et al., *Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS*. J Neurosci, 1999. **19**(19): p. 8487-97.
96. Mu, Y., S.W. Lee, and F.H. Gage, *Signaling in adult neurogenesis*. Curr Opin Neurobiol, 2010. **20**(4): p. 416-23.
97. Ide, Y., et al., *Rapid integration of young newborn dentate gyrus granule cells in the adult hippocampal circuitry*. Eur J Neurosci, 2008. **28**(12): p. 2381-92.
98. Suzuki, M., et al., *Glutamate enhances proliferation and neurogenesis in human neural progenitor cell cultures derived from the fetal cortex*. Eur J Neurosci, 2006. **24**(3): p. 645-53.
99. Liu, J., et al., *Effects of repeated phencyclidine administration on adult hippocampal neurogenesis in the rat*. Synapse, 2006. **60**(1): p. 56-68.
100. Ge, S., et al., *GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis*. Trends Neurosci, 2007. **30**(1): p. 1-8.
101. Kim, W.R., et al., *Time-dependent involvement of adult-born dentate granule cells in behavior*. Behav Brain Res, 2012. **227**(2): p. 470-9.
102. Boekhoorn, K., M. Joels, and P.J. Lucassen, *Increased proliferation reflects glial and vascular-associated changes, but not neurogenesis in the presenile Alzheimer hippocampus*. Neurobiol Dis, 2006. **24**(1): p. 1-14.
103. Lindboe, C.F. and S.H. Torp, *Comparison of Ki-67 equivalent antibodies*. J Clin Pathol, 2002. **55**(6): p. 467-71.
104. Louis, D.N., et al., *Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 immunohistochemistry in brain tumors: a comparative study*. Acta Neuropathol, 1991. **81**(6): p. 675-9.
105. Rosenwald, A. and G. Ott, *Burkitt lymphoma versus diffuse large B-cell lymphoma*. Ann Oncol, 2008. **19 Suppl 4**: p. iv67-9.
106. Brizova, H., et al., *Quantitative molecular analysis in mantle cell lymphoma*. Cesk Patol, 2011. **47**(3): p. 101-5.

107. McCormick, D., et al., *The relevance of antibody concentration to the immunohistological quantification of cell proliferation-associated antigens*. *Histopathology*, 1993. **22**(6): p. 543-7.
108. Manganas, L.N., et al., *Magnetic resonance spectroscopy identifies neural progenitor cells in the live human brain*. *Science*, 2007. **318**(5852): p. 980-5.
109. Suh, H., et al., *In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus*. *Cell Stem Cell*, 2007. **1**(5): p. 515-28.
110. Wess, J., *Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function*. *Trends Pharmacol Sci*, 1993. **14**(8): p. 308-13.
111. Bymaster, F.P., et al., *Use of M1-M5 muscarinic receptor knockout mice as novel tools to delineate the physiological roles of the muscarinic cholinergic system*. *Neurochem Res*, 2003. **28**(3-4): p. 437-42.
112. Shideler, K.K. and J. Yan, *M1 muscarinic receptor for the development of auditory cortical function*. *Mol Brain*, 2010. **3**: p. 29.
113. Reif, A., et al., *Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression*. *Mol Psychiatry*, 2006. **11**(5): p. 514-22.
114. Miyakawa, T., et al., *Hyperactivity and intact hippocampus-dependent learning in mice lacking the M1 muscarinic acetylcholine receptor*. *J Neurosci*, 2001. **21**(14): p. 5239-50.
115. Noll, S.S.-K., S., *Herstellung von Schnittpräparaten*, in *Praxis der Immunhistochemie*, H.M. Höfler, K.-M., Editor. 2000, Urban & Fischer Verlag: München, Jena. p. 26-32.
116. D'Amico, F., E. Skarmoutsou, and F. Stivala, *State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry*. *J Immunol Methods*, 2009. **341**(1-2): p. 1-18.
117. Frost, A.R., D. Sparks, and W.E. Grizzle, *Methods of antigen recovery vary in their usefulness in unmasking specific antigens in immunohistochemistry*. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2000. **8**(3): p. 236-43.
118. Shi, S.R., et al., *Antigen retrieval using pH 3.5 glycine-HCl buffer or urea solution for immunohistochemical localization of Ki-67*. *Biotech Histochem*, 1994. **69**(4): p. 213-5.
119. McKee, P.H., C. Hobbs, and P.A. Hall, *Antigen retrieval by microwave irradiation lowers immunohistological detection thresholds*. *Histopathology*, 1993. **23**(4): p. 377-9.
120. Seki, T., *Hippocampal adult neurogenesis occurs in a microenvironment provided by PSA-NCAM-expressing immature neurons*. *J Neurosci Res*, 2002. **69**(6): p. 772-83.
121. Sompuram, S.R., K. Vani, and S.A. Bogen, *A molecular model of antigen retrieval using a peptide array*. *Am J Clin Pathol*, 2006. **125**(1): p. 91-8.
122. Maddox, P.H. and D. Jenkins, *3-Aminopropyltriethoxysilane (APES): a new advance in section adhesion*. *J Clin Pathol*, 1987. **40**(10): p. 1256-7.
123. Cook, H.C., *A comparative survey of section adhesives and of factors affecting adhesion*. *Stain Technol*, 1965. **40**(6): p. 321-8.

124. Huang, W.M., et al., *Improved section adhesion for immunocytochemistry using high molecular weight polymers of L-lysine as a slide coating*. Histochemistry, 1983. **77**(2): p. 275-9.
125. Potsch, L. and A. Jauch, *Improved section bonding using silanated glass slides--application protocol*. Int J Legal Med, 1992. **104**(6): p. 357-8.
126. Burck, H.-C., *Histologische Technik - Leitfaden für die Herstellung mikroskopischer Präparate in Unterricht und Praxis*, in *Histologische Technik - Leitfaden für die Herstellung mikroskopischer Präparate in Unterricht und Praxis*, H.-C. Burck, Editor. 1973, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 104-141.
127. Böck, P.H., *Mikroskopische Technik / Romeis*, in *Mikroskopische Technik / Romeis*, P. Böck, Editor. 1989, Urban und Schwarzenberg: München, Wien, Baltimore. p. 179-249.
128. Torp, S.H., *Proliferative activity in human glioblastomas: evaluation of different Ki67 equivalent antibodies*. Mol Pathol, 1997. **50**(4): p. 198-200.
129. Malmhall, C., et al., *Immunophenotyping of circulating T helper cells argues for multiple functions and plasticity of T cells in vivo in humans--possible role in asthma*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e40012.
130. Lu, L., et al., *Increased endothelial progenitor cells and vasculogenic factors in higher-staged arteriovenous malformations*. Plast Reconstr Surg, 2011. **128**(4): p. 260e-269e.
131. Giangaspero, F., et al., *Growth fraction in human brain tumors defined by the monoclonal antibody Ki-67*. Acta Neuropathol, 1987. **74**(2): p. 179-82.
132. Munakata, S. and J.B. Hendricks, *Effect of fixation time and microwave oven heating time on retrieval of the Ki-67 antigen from paraffin-embedded tissue*. J Histochem Cytochem, 1993. **41**(8): p. 1241-6.
133. Ming, G.L. and H. Song, *Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions*. Neuron, 2011. **70**(4): p. 687-702.
134. Fanselow, M.S. and H.W. Dong, *Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures?* Neuron, 2010. **65**(1): p. 7-19.
135. Felice, D., et al., *Blockade of the GABA(B) receptor increases neurogenesis in the ventral but not dorsal adult hippocampus: Relevance to antidepressant action*. Neuropharmacology, 2012. **63**(8): p. 1380-8.
136. von Bohlen und Halbach, O., *Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus*. Cell Tissue Res, 2011. **345**(1): p. 1-19.
137. Taylor, C.R., et al., *Strategies for improving the immunohistochemical staining of various intranuclear prognostic markers in formalin-paraffin sections: androgen receptor, estrogen receptor, progesterone receptor, p53 protein, proliferating cell nuclear antigen, and Ki-67 antigen revealed by antigen retrieval techniques*. Hum Pathol, 1994. **25**(3): p. 263-70.
138. Seki, T., et al., *Clustering, migration, and neurite formation of neural precursor cells in the adult rat hippocampus*. J Comp Neurol, 2007. **502**(2): p. 275-90.

6. LITERATURVERZEICHNIS

139. Benninghoff, J., et al., *Cholinergic impact on neuroplasticity drives muscarinic M1 receptor mediated differentiation into neurons*. World J Biol Psychiatry, 2013. **14**(3): p. 241-6.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	17
Abbildung 2	18
Abbildung 3	19
Abbildung 4	21
Abbildung 5	41
Abbildung 6	46
Abbildung 7	50
Abbildung 8	54
Abbildung 9	59
Abbildung 10	67
Abbildung 11	68
Abbildung 12	70
Abbildung 13	70
Abbildung 14	71
Abbildung 15	71
Abbildung 16	72
Abbildung 17	75
Abbildung 18	76
Abbildung 19	78
Abbildung 20	80
Abbildung 21	81
Abbildung 22	81
Abbildung 23	83

8. Abkürzungsverzeichnis

*	signifikant
**	hoch signifikant
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AB-Komplex	Avidin-Biotin-Komplex
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
Ascl1	Achaete-scute complex homolog 1
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
bHLH	Basic helix-loop-helix-Motiv
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CA1	<i>Cornu ammonis</i> , Feld 1
CA3	<i>Cornu ammonis</i> , Feld 3
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
Cdk5	Cyclin dependent kinase 5
CREB	cAMP responsive element binding Protein
DAB	Diaminobenzidin
DCX	Doublecortin
DISC1	Disrupted in Schizophrenia 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM-IVR	Diagnostisches und Statistisches Manual, 4. revidierte Fassung
E2F	E2F-Transkriptionsfaktor
ErbB4	Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4
ERK1	Mitogen-activated protein kinase 3
ERK2	Mitogen-activated protein kinase 1
et al.	und andere
FGF-2	Fibroblast growth factor 2
g	Gramm
GABA	Gammaaminobuttersäure
G $\alpha_{q/11}$	Alpha-Untereinheit des G-Proteins q/11
GFAP	saures Gliafibrillenprotein
GCL	Granularzellschicht
GZS	Granularzellschicht
H	Hilus
h	Stunde(n)
HE	Hämalaun-Eosin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ICD-9	Internationale Klassifikation der Krankheiten, 9. Auflage
ICD-10	Internationale Klassifikation der Krankheiten, 10. Auflage
IGF	Insulin-like growth factor
Ki-67	Kiel-67-Antigen
Klf-9	Kruppel-like factor 9
ko	knockout
l	Liter
ml	Milliliter

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µl	Mikroliter
M	Molar
mM	Millimolar
nM	Nanomolar
µm	Mikrometer
µm ²	Quadratmikrometer
M1 ^{-/-}	M1-knockout
mAChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAP-Kinase	MAPK
MR-	Magnetresonanz-
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NeuN	Neuronal nucleus -Protein
Neuro-D	Neuronal differentiation -Protein
NGF	Nerve growth factor
NGS	Normales Ziegenserum
NHS	Normales Pferdeserum
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NPAS3	Neuronal PAS domain Protein 3
n.s.	nicht signifikant
NT-3	Neurotrophin-3
NUDEL	Nude-like Protein
p	Signifikanzniveau
p42	ERK2
p44	ERK1
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCP	Phencyclidin
PEST-Motiv	Prolin-Glutamat-Serin-Threonin-Motiv
PFA	Paraformaldehyd
pH	pH-Wert
PSA-NCAM	Polysialinsäures neuronales Zelladhäsionsmolekül
Rb	Retinoblastoma-Protein
RMS	Rostral Migratory Stream
s.	siehe
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SGZ	Subgranularzellschicht
Sox2	Sex-determining Region of Y homeobox 2
SVZ	Subventrikulärzone
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
VEGF	Vascular endothelial growth factor
W	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation
x	-fach
Wnt	Wingless Type

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

wt	wildtyp
w/w	Gewicht pro Gewicht
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

9. Tabellenanhang

Probe	2 _{wt}	oben	unten	3 _{wt}	oben	unten	5 _{wt}	oben	unten	7 _{wt}	oben	unten	
	2.1	0	2	3.1	x	x	1.1	x	x	3.1	x	x	
		4	17		2	6		7	6		19	6	
		10	20		13	14		19	12		38	18	
		11	24		26	15		35	24		29	33	
		16	27		28	25		44	29		16	14	
	2.2	21	19	3.2	14	20	1.2	20	26	3.2	30	34	
		19	9		21	11		18	26		32	20	
		15	9		17	17		21	22		29	35	
		6	21		26	31		32	39		40	37	
	2.3	29	12	3.3	39	35	1.3	40	47	3.3	60	34	
		46	43		13	47		33	42		27	39	
		40	x		x	32					27	28	
		x	x		x	x					x	x	
	Σ		217	201		199	253		269	273		347	298
	$\Sigma\Sigma$		418			452			542			645	
	n(Schnitte)		12	11		10	11		10	10		11	11
Σ (n(Schnitte))		23			21			20			22		
Zellen/Schnitt		18,08	18,27		19,90	23,00		26,90	27,30		31,55	27,09	
Σ (Zellen/Schnitt)		18,17			21,52			27,10			29,32		

Tabelle 26: Ergebnis der „klassischen“ Auszählung für Mäuse ohne Mutation (wt). Jedes beschriebene Kästchen steht für einen Schnitt. Leere Kästchen zeigen an, dass keine weiteren Schnitte aufgezo-gen wurden. Probe: Nummer der Probe mit Angabe wt für wildtypisch, oben/ unten für Angabe, ob die betreffliche Subgranularzellschicht oben oder unten im Blickfeld sichtbar war; unter den Probennummern folgen die Nummern der jeweiligen Objekträger. x: Schnitt aufgezo-gen, aber kein Hippokampus angeschnitten; 0: Hippokampus angeschnitten, aber keine positiven Zellen in der Subgranularzellschicht auffindbar. Σ : Summe aller positiven Zellen in der zugehörigen Spalte; $\Sigma\Sigma$: Summe aller positiven Zellen der jeweiligen Maus; n(Schnitte): Anzahl der in der jeweiligen Spalte auswertbaren Schnitte (nur Schnitte, die einen Hippokampus mit Subgranularzellschicht enthielten); Σ (n(Schnitte)): Anzahl aller auswertbaren Schnitte in der jeweiligen Maus; Zellen/Schnitt: auf zwei Dezimalen gerundete durchschnittliche Zahl positiver Zellen je auswertbarem Schnitt in der jeweiligen Spalte, also der Quotient aus Σ und n(Schnitte); Σ (Zellen/Schnitt): auf zwei Dezimalen gerundete durchschnittliche Zahl positiver Zellen je Hippokampus je auswertbarem Schnitt in der jeweiligen Maus, also der Quotient aus $\Sigma\Sigma$ und Σ (n(Schnitte)).

9. TABELLENANHANG

Probe	9 _{wt}	oben	unten	11 _{wt}	oben	unten	14 _{wt}	oben	unten	17 _{wt}	oben	unten		
	1.1	x	x	3.1	1	0	2.1	x	x	1.1	x	x		
		16	0		10	8		1	8		5	7		
		20	22		19	32		12	20		40	32		
		52	31		22	32		42	23		22	32		
		30	30		51	25		16	24		26	31		
	1.2	29	17	3.2	19	15	2.2	18	17	1.2	23	16		
		10	10		8	30		32	27		23	30		
		30	14		24	32		12	31		21	30		
		28	17		47	48		23	30		31	33		
	1.3	32	26	3.3	40	54	2.3	36	48	1.3	51	55		
		31	36		30	50		34	x		61	46		
		10	60		2	x		x	x		x	x	x	
		x	31		x	x		x	x		x	x	x	
	Σ		288	294		272	326		226	228		303	312	
	$\Sigma\Sigma$		582			598			454			615		
	n(Schnitte)		11	12		12	11		10	9		10	10	
	Σ (n(Schnitte))		23			23			19			20		
	Zellen/Schnitt		26,18	24,50		22,67	29,64		22,60	25,33		30,30	31,20	
Σ (Zellen/Schnitt)		25,30			26,00			23,89			30,75			

Tabelle 26: Fortsetzung.

9. TABELLENANHANG

Probe	18 _{wt}	oben	unten	20 _{wt}	oben	unten	21 _{wt}	oben	unten	24 _{wt}	oben	unten	
	2.1	7	x	4.1	0	0	1.1	0	x	4.1	2	1	
		24	19		4	16		13	6		2	22	
		27	12		20	15		22	16		24	27	
		41	16		12	21		15	26		27	44	
		21	21		19	37		25	29		17	11	
	2.2	18	11	4.1	16	4	1.2	20	42	4.2	27	26	
		19	22		21	41		24	32		25	22	
		36	16		23	49		30	32		26	24	
		x	28		37	41		50	25		53	21	
	2.3	x	19	4.3	46	0	1.3	35	45	4.3	32	28	
		x	61		36	x		16	52		17	22	
		x	26		x	x		x	25		29	x	
		x	x		x	x		x	x		x	x	
	Σ		186	251		234	224		250	330		279	247
	$\Sigma\Sigma$		437			458			580			526	
	n(Schnitte)		8	11		11	10		11	11		12	11
	Σ (n(Schnitte))		19			21			22			23	
Zellen/Schnitt		23,25	22,82		21,27	22,40		22,73	30,00		23,25	22,45	
Σ (Zellen/Schnitt)		23,00			21,81			26,36			22,87		

Tabelle 26: Fortsetzung.

9. TABELLENANHANG

Probe	1 _{ko}	oben	unten	4 _{ko}	oben	unten	6 _{ko}	oben	unten	8 _{ko}	oben	unten	
	1.1	x	x	4.1	x	4	2.1	x	x	4.1	x	x	
		6	8		3	9		1	10		3	7	
		10	8		13	14		9	22		28	11	
		18	16		27	34		20	38		27	44	
		16	13		24	15		11	25		21	47	
	1.2	19	16	4.2	14	23	2.2	31	24	4.2	24	24	
		22	16		12	34		9	15		14	22	
		17	25		13	16		26	32		5	20	
		26	27		22	37		16	31		33	14	
	1.3	12	16	4.3	44	37	2.3	22	31	4.3	x	x	
		7	31		30	25		21	12		33	29	
		x	1		32	18		15	10		29	17	
		x	x		x	x		6	x		11	30	
					x	x		1	x		3	25	
											x	31	
	Σ		153	177		234	262		188	250		231	321
	$\Sigma\Sigma$		330			496			438			552	
	n(Schnitte)		10	11		11	12		13	11		12	13
	Σ (n(Schnitte))		21			23			24			25	
	Zellen/Schnitt		15,30	16,09		21,27	21,83		14,46	22,73		19,25	24,69
	Σ (Zellen/Schnitt)		15,71			21,57			18,25			22,08	

Tabelle 27: Ergebnis der „klassischen“ Auszählung für Mäuse mit Mutation (ko). Jedes beschriebene Kästchen steht für einen Schnitt. Leere Kästchen zeigen an, dass keine weiteren Schnitte aufgezo-gen wurden. Probe: Nummer der Probe mit Angabe ko für knockout, oben/ unten für Angabe, ob die betreffliche Subgranularzellschicht oben oder unten im Blickfeld sichtbar war; unter den Probennummern folgen die Nummern der jeweiligen Objektträger. x: Schnitt aufgezo-gen, aber kein Hippokampus angeschnitten; 0: Hippokampus angeschnitten, aber keine positiven Zellen in der Subgranularzellschicht auffindbar. Σ : Summe aller positiven Zellen in der zugehörigen Spalte; $\Sigma\Sigma$: Summe aller positiven Zellen der jeweiligen Maus; n(Schnitte): Anzahl der in der jeweiligen Spalte auswertbaren Schnitte (nur Schnitte, die einen Hippokampus mit Subgranularzellschicht enthielten); Σ (n(Schnitte)): Anzahl aller auswertbaren Schnitte in der jeweiligen Maus; Zellen/Schnitt: auf zwei Dezimalen gerundete durchschnittliche Zahl positiver Zellen je auswertbarem Schnitt in der jeweiligen Spalte, also der Quotient aus Σ und n(Schnitte); Σ (Zellen/Schnitt): auf zwei Dezimalen gerundete durchschnittliche Zahl positiver Zellen je auswertbarem Schnitt je Hippokampus in der jeweiligen Maus, also der Quotient aus $\Sigma\Sigma$ und Σ (n(Schnitte)).

9. TABELLENANHANG

Probe	10 _{ko}	oben	unten	12 _{ko}	oben	unten	13 _{ko}	oben	unten	15 _{ko}	oben	unten	
	2.1	x	x	4.1	x	x	1.1	x	x	3.1	0	0	
		10	10		8	10		10	9		17	15	
		30	6		14	29		8	17		21	14	
		20	38		15	34		17	28		28	13	
		29	29		25	7		38	19		25	21	
	2.2	30	26	4.2	11	18	1.2	25	23	3.2	14	15	
		23	10		17	17		19	23		21	16	
		24	11		29	30		35	31		20	19	
		45	18		18	40		60	30		18	21	
	2.3	41	38	4.3	41	43	1.3	44	62	3.3	30	34	
		35	43		22	x		x	19		43	26	
		36	x		x	x		x	x		7	x	
		x	x		x	x		x	x		x	x	
												x	x
	Σ		323	229		200	228		256	261		244	194
	$\Sigma\Sigma$	552		428		517		438					
	n(Schnitte)		11	10		10	9		9	10		12	11
	Σ (n(Schnitte))	21		19		19		23					
	Zellen/Schnitt		29,36	22,90		20,00	25,33		28,44	26,10		20,33	17,64
	Σ (Zellen/Schnitt)	26,29		22,53		27,21		19,04					

Tabelle 27: Fortsetzung.

9. TABELLENANHANG

Probe	16 _{ko}	oben	unten	19 _{ko}	oben	unten	22 _{ko}	oben	unten	23 _{ko}	oben	unten	
	4.1	6	0	3.1	x	x	2.1	x	x	3.1	x	x	
		22	3		8	3		6	2		12	4	
		45	23		9	17		21	20		29	8	
		19	24		34	25		19	10		28	16	
		14	18		21	24		13	13		22	19	
	4.2	21	40	3.2	16	28	2.2	20	7	3.2	27	32	
		9	32		25	18		15	18		24	18	
		34	27		37	17		13	16		32	42	
		39	50		30	42		35	23		51	40	
	4.3	25	38	3.3	57	33	2.3	29	27	3.3	56	35	
		x	x		3	43		x	30		23	53	
		x	x		x	x		x	x		x	x	
		x	x		x	x		x	x		x	x	
	Σ		228	255		240	250		171	166		304	267
	$\Sigma\Sigma$	483		490		337		571					
	n(Schnitte)		10	10		10	10		9	10		10	10
	Σ (n(Schnitte))	20		20		19		20					
	Zellen/Schnitt		22,80	25,50		24,00	25,00		19,00	16,60		30,40	26,70
Σ (Zellen/Schnitt)	24,15		24,50		17,74		28,55						

Tabelle 27: Fortsetzung.

Maus	Nestgröße	Nester/Schnitt
2 wt	3	1,83
3 wt	3	1,86
5 wt	3	1,95
7 wt	3	2,41
9 wt	3	1,96
11 wt	3	1,91
14 wt	3	2,42
17 wt	3	2,45
18 wt	3	2,37
20 wt	3	2,19
21 wt	3	2,09
24 wt	3	2,30
1 ko	3	1,38
4 ko	3	2,30
6 ko	3	2,13
8 ko	3	1,88
10 ko	3	2,14
12 ko	3	2,11
13 ko	3	2,53
15 ko	3	1,43
16 ko	3	2,00
19 ko	3	2,25
22 ko	3	1,63
23 ko	3	2,35

Tabelle 28: Ergebnis der Auszählung von Zellnestern. wt: wildtypische Mäuse; ko: M1-Rezeptor-Mutanten. 3/ 5/ 3+5: Nestgröße; Nester/ Schnitt: Nestzahl je Schnitt je Hippokampus.

Maus	Nestgröße	Nester/Schnitt
2 wt	5	0,57
3 wt	5	0,86
5 wt	5	0,95
7 wt	5	0,91
9 wt	5	0,52
11 wt	5	0,83
14 wt	5	0,63
17 wt	5	0,90
18 wt	5	0,53
20 wt	5	0,62
21 wt	5	0,77
24 wt	5	0,83
1 ko	5	0,33
4 ko	5	0,33
6 ko	5	0,43
8 ko	5	0,33
10 ko	5	0,57
12 ko	5	0,53
13 ko	5	0,68
15 ko	5	0,39
16 ko	5	0,62
19 ko	5	0,95
22 ko	5	0,37
23 ko	5	0,90

Tabelle 28: Fortsetzung.

Maus	Nestgröße	Nester/Schnitt
2 wt	3+5	2,39
3 wt	3+5	2,71
5 wt	3+5	2,90
7 wt	3+5	3,32
9 wt	3+5	2,48
11 wt	3+5	2,74
14 wt	3+5	3,05
17 wt	3+5	3,35
18 wt	3+5	2,89
20 wt	3+5	2,81
21 wt	3+5	2,86
24 wt	3+5	3,13
1 ko	3+5	1,71
4 ko	3+5	2,54
6 ko	3+5	2,57
8 ko	3+5	1,29
10 ko	3+5	2,71
12 ko	3+5	2,63
13 ko	3+5	3,21
15 ko	3+5	1,83
16 ko	3+5	2,62
19 ko	3+5	3,20
22 ko	3+5	2,00
23 ko	3+5	3,25

Tabelle 28: Fortsetzung.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. An erster Stelle danke ich Herrn Professor A. Reif und Frau Privatdozentin A. Schmitt für die gute und konstruktive Begleitung und Betreuung der vorliegenden Arbeit sowie ungezählte Ratschläge und der produktiven wissenschaftlichen Diskussion. Herrn Professor J. Deckert gilt mein Dank für die Möglichkeit, meine Promotion an der Psychiatrischen Klinik abzufassen sowie für die Gelegenheit zur prägenden klinischen Arbeit in der Klinik für Psychiatrie. Herrn Professor P. Falkai, Göttingen, mittlerweile München, sowie der Würzburg Brain Bank am Institut für Pathologie der Universität Würzburg danke ich für das zur Verfügung stellen von menschlichen Gewebeproben. Weiterhin danke ich der Arbeitsgruppe um Professor J. Wess, Bethesda, Maryland, USA, dass mir von ihr die murinen Proben zugänglich gemacht wurden. Ohne diese Proben wäre die Arbeit nicht möglich gewesen. Besonders möchte ich mich bei der neurobiologischen Arbeitsgruppe in der Klinik für Psychiatrie für die gute Unterstützung und die zahlreichen Tipps bedanken – hier sind vor allem Frau M. Winnig und Frau M. Lee zu nennen, die mich bei der Anfertigung von Präparaten und der statistischen Auswertung unterstützt haben. Danke auch an Caroline, die mich nicht zuletzt in der Phase des Niederschreibens der Arbeit ertragen hat. Ein besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, die mir nicht nur das Studium ermöglicht haben, sondern mich auch jederzeit unterstützt haben.

