

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

Direktor: Professor Dr. med. Jürgen Deckert

Bestimmung der adulten Neurogenese
im Hippocampus
von NOS-III-Knockout-Mäusen

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Colin Bartsch

aus Gütersloh

Würzburg, Mai 07

Referent: Prof. Dr. K.-P. Lesch
Korreferentin: Prof. Dr. C. Sommer
Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 07.12.2007

Der Promovend ist Zahnarzt

Meinen Eltern Monika und Jörg-Rainer Bartsch

1	Einleitung	1
1.1	Adulte Neurogenese	1
1.1.1	Überblick	1
1.1.2	Regulation der adulten Neurogenese	7
1.1.3	Ausblick: Therapie	12
1.2	Stickstoffmonoxid (NO)	14
1.2.1	Vorkommen und Wirkung von NO	14
1.2.2	NO-Synthasen (NOS)	16
1.2.3	NOS-III Knockout-Mäuse	20
1.3	Fragestellung	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Material	22
2.1.1	Versuchstiere	22
2.1.2	Antikörper und Immunreagenzien	23
2.1.3	Puffer und Lösungen	24
2.1.3.1	Lösungen für die Immunhistochemie	24
2.1.4	Standardlösungen	24
2.1.4.1	Puffer	24
2.1.4.2	Lösungen für Immunhistochemie	25
2.1.5	Lösungen zur Gewebeaufbewahrung	25
2.1.6	Geräte	26
2.1.7	Software	26
2.1.8	Sonstiges	26
2.2	Methoden	27
2.2.1	BrdU-Injektionen	27
2.2.2	Gewebepräparation	27
2.2.3	Immunhistochemischer Nachweis von BrdU	28
2.2.4	Quantifizierung BrdU exprimierender Zellen	29
2.2.5	Doppelmarkierung mit Antikörpern gegen BrdU und NeuN	30
2.2.6	Auswertung der Doppelmarkierung	31
3	Ergebnisse	32
3.1	Die Proliferation neuronaler Stammzellen ist bei NOS-III-Knockout-Mäusen reduziert	32
3.2	Survival der neu gebildeten Zellen	35
3.3	Migration der neu gebildeten Zellen	37
3.4	Morphologische Auffälligkeiten gewanderter Zellen	38
3.5	Phänotypisierung der neu gebildeten Zellen	40
3.6	Morphologischer Vergleich des Gyrus dentatus	43
4	Diskussion	44
4.1	Die Steigerung der Neurogenese durch NOS-III könnte durch VEGF vermittelt sein	44
4.2	Gefäßsystem und Neurogenese	46
4.3	Der Einfluss von NOS-III auf die adulte Neurogenese im Vergleich zu NOS-I und NOS-II	47
4.4	Adulte Neurogenese und Depression	49
5	Zusammenfassung	51
6	Literaturverzeichnis	52
7	Abkürzungsverzeichnis	62

1 Einleitung

1.1 Adulte Neurogenese

1.1.1 Überblick

Das lange Zeit in der Biologie herrschende Dogma eines beim adulten Individuum starren zentralen Nervensystems (ZNS), welches aus zahlreichen reifen Neuronen und verschiedenen Gliazellarten besteht, ist in dieser Form heute nicht mehr tragbar. Dem Satz: „Alles kann sterben, nichts regenerieren“ (Santiago Ramon y Cajal, 1911), bezogen auf das zentrale Nervensystem (ZNS), wurde lange Zeit nicht widersprochen. Eine Veränderung neuronaler Zellverbände im Bezug auf die Anzahl und Zusammensetzung der Zellen nach Abschluss des Wachstums wurde aufgrund der scheinbar nicht vorhandenen Reparaturmöglichkeiten dieses Systems ausgeschlossen. So ging man davon aus, dass die Neubildung von Neuronen (Neurogenese) bereits zum Zeitpunkt der Geburt stark reduziert und zum Erreichen des Erwachsenenalters weiter verlangsamt ist, um dann schließlich vollständig zum Erliegen zu kommen. Gleichzeitig reduziert sich bis zum Tode des Individuums stetig die Zellzahl durch Zelluntergang, welcher sowohl durch die natürlich vorkommende Apoptose, als auch durch pathologische und traumatische Schädigungen des ZNS hervorgerufen wird.

Dieser Annahme zufolge wäre die Heilung pathologischer Veränderungen im ZNS sowie die Reparatur traumatischer Verletzungen im fortgeschrittenen Alter nicht auf zellulärer Ebene zu bewerkstelligen.

Das Phänomen der axonalen Regeneration jedoch, so zeigen Heilungen nach peripheren Nervdurchtrennungen, hat dieses Dogma schon früh in Frage

gestellt und den Forschungsbemühungen in diesem Bereich neue Motivation gegeben.

Der Prozess des Paradigmenwechsels begann in den 60er Jahren mit Berichten über adulte Neurogenese (AN) bei Ratten [1], welche zunächst jedoch keine größere Beachtung fanden. Sie wurden als Einzelfälle abgetan.

Erst eine Arbeit von Nottebohm et. al. [2] über die Neubildung von Neuronen im dorsomedialen Striatum von adulten Kanarienvögeln (*Serinus canaria*) brachte die Diskussion über AN wieder in Gang. Nottebohm et. al. zeigten, dass sich während des Frühlings, der Zeit, in der die Vögel das Singen für die Partnerwerbung erlernen, bis zu 1% der Zellen in diesen Kerngebieten pro Tag neu bildeten. Auch der Hippocampus nordamerikanischer Meisen wurde als Ort adulter Neurogenese entdeckt [3, 4]. Saisonale Schwankungen dieses Phänomens korrelierten mit Jahreszeiten, in denen das Erinnerungsvermögen der Tiere mehr oder weniger gefordert wurde [5, 6].

Die damit gesicherte Existenz adulter Neurogenese bei Wirbeltieren eröffnete ein großes Gebiet für weitere Forschung. Mittlerweile wurde das Phänomen auch u.a. bei Weißbüschelaffen [7], Spitzhörnchen [7] und adulten Primaten [8] nachgewiesen.

West et al. zeigten, dass es im Gyrus dentatus des Menschen zu keinem Zellverlust im Alter kommt [9, 10]. Nachdem Kirschenbaum et al. 1994 *in vitro* Daten von proliferierenden Zellen in der Subventriculärzone erwachsener Menschen vorlegte [11], gelang es in einer Arbeit von Eriksson und Mitarbeitern 1998, das Vorkommen adulter Neurogenese auch bei Menschen nachzuweisen [12].

Hierbei wurde die Tatsache genutzt, dass in einer schwedischen Studie zur Tumorwachstumsüberwachung bestimmter Krebserkrankungen 5-Bromo-2-Deoxyuridin (BrdU) eingesetzt wurde. Dieses Nukleotidanalogen wird zum standardisierten immunhistochemischen Nachweis von Zellneubildungen benutzt. Versuchstieren wird es für diesen Nachweis systemisch injiziert.

Während der DNA-Synthesephase (S-Phase) der Mitose baut sich dieses Nukleotidanalogen anstelle von Thymidin in die DNA ein (Abb. 1). Mithilfe spezifischer BrdU-Antikörper können diese neu eingebauten Moleküle immunhistochemisch angefärbt und somit, je nach Verwendung eines bestimmten Zweitantikörpers, unter dem Licht- oder Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden [13] (Abb. 2).

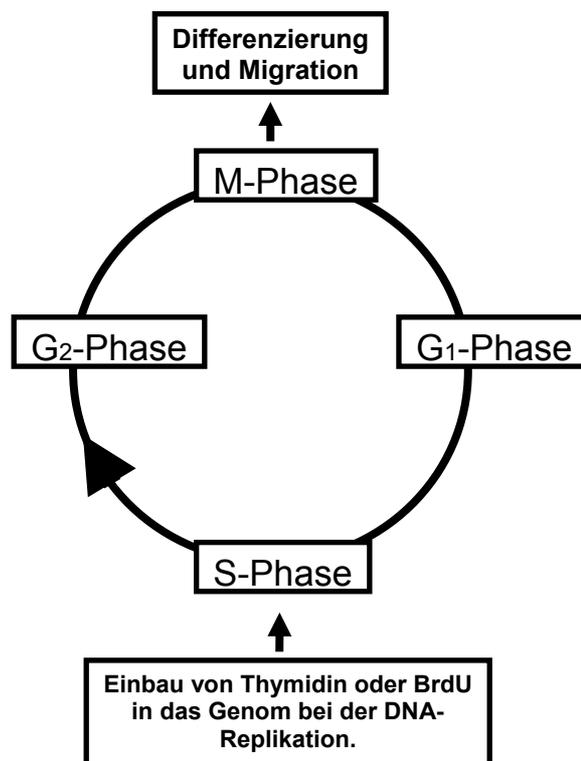


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Zellzyklus. In der S-Phase erfolgt die Replikation der Kern-DNA mit der Synthese identischer Tochterstränge aus dem Ursprungsstrang. In der M-Phase findet die Mitose (Zellteilung) statt. Die G-Phasen stellen Zwischenphasen dar.

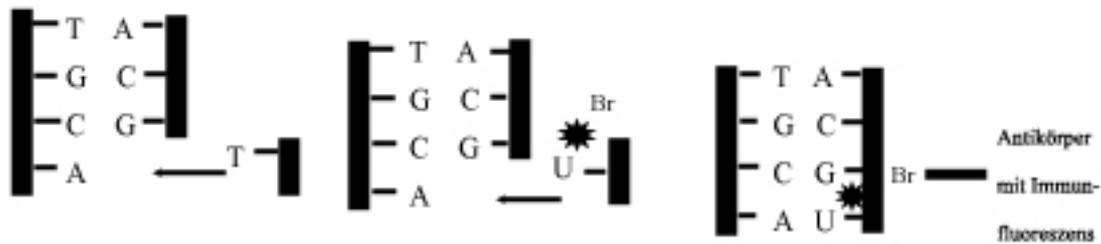
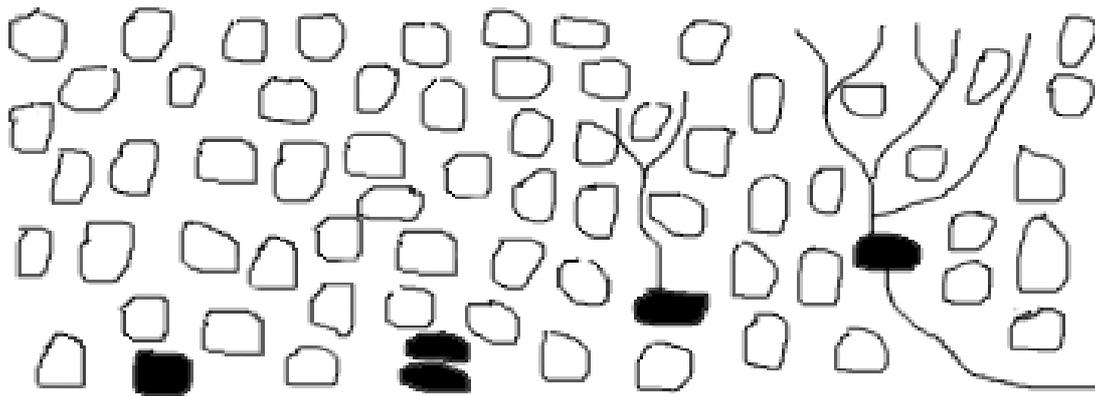


Abbildung 2: Markierung der neu gebildeten Zellen mit BrdU während der Replikationsphase der Kern-DNA. Die Zeichnung zeigt im linken Teil, wie in der normalen Synthesephase (S-Phase der Mitose) Thymidin (T,) sich mit Adenin (A) paarend, in den neu synthetisierten Tochterstrang der DNA eingebaut wird. Wird das Thymidinanalogue BrdU im Überschuss angeboten, kompetiert es mit Thymidin um den Einbau in die DNA und wird in den neuen Strang eingefügt (mittleres Bild). Zellen, die BrdU enthalten, können dann mit Antikörpern gegen BrdU sichtbar gemacht werden.

Eriksson et al. [12] untersuchten 1996 bis 1998 Gehirne einiger mit BrdU behandelter und später verstorbener Patienten. Seine Ergebnisse zeigten, dass bei diesen zwischen 57 und 72 Jahre alten Menschen ebenfalls Neurogenese im Bereich des Gyrus dentatus stattgefunden hat.

Die Neubildung von Zellen in diesem Gebiet verläuft in drei distinkten Stadien [14]. Die in der Subgranulärzellschicht (SGZ) vorhandenen Stammzellen proliferieren und bilden Vorläuferzellen (Progenitorzellen), welche dann in die Granulärzellschicht (GZ) wandern (Migrationsstadium). Währenddessen und auch danach folgt schließlich die terminale Differenzierung, bei der die noch unreifen Zellen endgültig ausdifferenzieren.



Proliferation		Migration		Differenzierung	
Stammzelle	Progenitorzelle	Unreifes Neuron		Reifes Neuron	

Abbildung 3: Modellhafte Darstellung der adulten Neurogenese in der Körnerzellschicht des Hippocampus. Die Neurogenese findet in der Subgranulärzone statt. Neuronale Stammzellen teilen sich und bilden Progenitorzellen, die dann weiter in die Körnerzellschicht migrieren und zu Neuronen differenzieren. Diese neuen Körnerzellen bilden dann ein Axon und Dendriten aus. (Zeichnung modifiziert nach Duman [14])

Nur nahezu 50% der neu gebildeten Vorläuferzellen überleben. Von diesen migrieren ca. 30% in die Körnerzellschicht. Von den gewanderten Zellen wiederum differenzieren sich etwa 50% schließlich zu Neuronen (Abb. 3). Nur 5 - 10% der neu gebildeten Zellen tragen somit netto zur AN bei [14]. 1 - 3% der Progenitorzellen differenzieren hingegen zu Astrozyten. Die verbleibenden Zellen sind bis heute keinem entsprechenden Zelltyp zugeordnet worden.

Als Orte der adulten Neurogenese bei Säugetieren wurden im Wesentlichen die Subventriculärzone (zwischen Striatum und Seitenventrikel) und die SGZ des Gyrus dentatus (Abb. 4), ein Teil des Hippocampus, identifiziert.

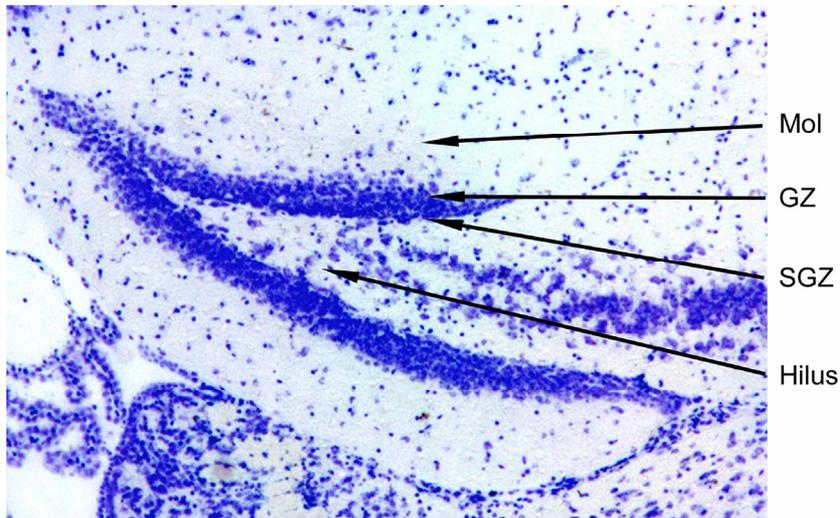


Abbildung 4: Mikrophotographie der Subgranulärzone (SGZ) des Gyrus dentatus der Maus (Koronarschnitt). Dargestellt ist auch die Molekularschicht (Mol), die Granularzellschicht (GZ, Körnerzellschicht) und der Hilus. (Nisselfärbung)

Diese Bereiche stellen ontogenetisch ein Residuum der Wand des Neuralrohrs dar. Aus dieser Proliferationszone des embryonalen Nervensystems gehen sämtliche Zellen des Gehirns hervor. Nach ihrer Bildung im Gebiet der Subventriculärzone wandern die Zellen in die Körnerzellschicht ein, wo sie sich nach ihrer Differenzierung zu Neuronen integrieren [15-17]. Diese Zellen sind in der Lage, Körnerzelleigenschaften anzunehmen [18, 19] und wie andere Körnerzellen des Gyrus dentatus ihre Fortsätze in die Region CA3 zu entsenden [20, 21]. Trotz einer steten Abnahme der adulten Neurogenese mit zunehmendem Alter, kann sie auch bei sehr alten Individuen noch nachgewiesen werden [22]. Im Umkehrschluss konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Körnerzellen im ersten Lebensjahr bei Ratten kontinuierlich ansteigt [23].

In adulten Mäusen entsteht innerhalb eines Tages eine Körnerzelle pro 2000 bis 4000 bereits existierender Körnerzellen [24]. Das entspricht im Durchschnitt 70 bis 140 neuer Zellen pro Tag im adulten Gyrus dentatus der Maus.

1.1.2 Regulation der adulten Neurogenese

Mittlerweile sind mehrere Faktoren bekannt, die auf die adulte Neurogenese Einfluss nehmen. Dazu gehören Verhalten, dauerhafte physische Aktivität, Stress, Alter, Veränderung der Umgebung, Verletzungen des ZNS, inter- und intrazelluläre Botenstoffe, Transkriptions- und Wachstumsfaktoren sowie Pharmaka (SSRI, tricyclische Antidepressiva, Lithium). Die Regulation der adulten Neurogenese findet auf verschiedenen Ebenen statt. Sie kann durch die Veränderung der Proliferationsrate von Progenitorzellen, einer veränderten Überlebensdauer bzw. Überlebenswahrscheinlichkeit der neu gebildeten Zellen und schließlich durch unterschiedliches „Differenzierungsschicksal“ der Zellen zu Neuronen oder Gliazellen beeinflusst werden [25]. Verschiedene Tierversuchsansätze konnten einige unterschiedliche Regulationsprozesse aufzeigen.

Versuche an Ratten [26] zeigten z.B., dass ein temporärer einseitiger Verschluss eines Nasenloches zum Rückgang der Neurogenese in der ipsilateralen Subventriculärzone führte. Wurde das Nasenloch wieder geöffnet, zeigte die Neurogeneserate bald wieder normale Werte, wie sie auch auf der kontralateralen Seite des Verschlusses zu finden waren.

Studien konnten zeigen, dass bei Versuchstieren, die in einer „reizreichen“ Umgebung („*enriched environment*“) gehalten wurden, in höherem Maße (60% mehr neue Körnerzellen) AN statt fand [4, 27]. Den Tieren wurden hier im Gegensatz zu den standardisierten Laborkäfigen eine abwechslungsreichere Umgebung angeboten. Die gesteigerte Zahl neu gebildeter Zellen wird in diesem Fall auf eine erhöhte Survivalrate zurückgeführt. Die Proliferation bleibt

jedoch unverändert. Wurde Mäusen allein die Gelegenheit zu körperlicher Aktivität (Laufrad) ohne „reizreiche“ Umgebung gegeben, konnten ähnlich hohe Werte erzielt werden, die jedoch durch erhöhte Proliferation der Stammzellen erreicht wurde [28].

Die saisonabhängige Veränderung der Neurogeneserate in Kanarienvögeln (*Serinus canaria*) und Zebrafinken (*Taeniopygia guttata*) scheint durch einen erhöhten Spiegel an *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) bedingt zu sein. Dieser steigt an, wenn die Vögel zu singen beginnen und am Anfang der Brutzeit der Testosteronspiegel im Blut steigt [29]. Wird ein Anstieg von BDNF induziert, überleben mehr Zellen [30, 31]. Im Fall einer Reduktion von BDNF sterben mehr der neu gebildeten Neuronen ab. Ganz ähnlich steigert ein erhöhter Östrogenspiegel die Anzahl sich teilender Zellen in der SGZ weiblicher Ratten [32].

Ebenso spielt BDNF eine wichtige Rolle bei Survival und Differenzierung während der embryonalen Entwicklung des ZNS [33]. BDNF kann *in vitro* sowohl die Survivalrate, wie auch die Proliferation von neuronalen Stammzellen, welche zuvor aus embryonalen Hippocampi isoliert wurden, signifikant steigern [34-37]. Knockout-Mäuse hingegen, denen das Gen für BDNF fehlt, zeigen in der SGZ erhöhte Apoptosewerte im frühen postnatalen Entwicklungsstadium [38]. Die intraventriculäre Infusion von BDNF in gesunden adulten Ratten hat eine Zunahme an neuen Neuronen sowohl im Bulbus olfaktorius, wie auch im Striatum, Septum, Thalamus und Hypothalamus zur Folge [31, 39].

Nach vorübergehenden ischämischen Zuständen, die mittels Ligation von Hirngefäßen chirurgisch provoziert wurden, konnte eine gesteigerte Proliferation neuronaler Stammzellen in der SGZ festgestellt werden [40-42]. Der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) scheint hier eine Rolle zu spielen. Diesem Wachstumsfaktor werden neuroprotektive Eigenschaften, sowie lang anhaltende positive Einflüsse auf die Survivalrate neu gebildeter

Neuronen und vor allem fördernde Einflüsse auf die Angiogenese zugeschrieben [43].

Stress hingegen, ein Risikofaktor psychiatrischer Erkrankungen, geht mit einer verminderten Zahl neu gebildeter Zellen einher [7]. Dabei wird die quantitative Veränderung durch die Reduktion der Proliferation und der Überlebensrate hippocampaler Körnerzellen erreicht. Bei Stress werden im Gehirn exzitatorische Neurotransmitter freigesetzt und die Glucocorticoid-Ausschüttung in den Nebennieren stimuliert. Erhöhte Adrenalin- und Kortisolspiegel im Plasma (bzw. Korticosteron bei Nagetieren) sowie ein Absinken von BDNF scheinen den Neurogenese hemmenden Effekt zu vermitteln [44]. Schon Stress in der pränatalen Phase (z. B. akustische Schreckreizexposition der Muttertiere) führte bei Nagern zu einer verminderten Neurogeneserate [45]. Untersuchungen an Rhesusaffen zeigten, dass dieser pränatale Stress auch 2 bis 3 Jahre nach Reizung noch signifikant zur Abnahme der Neurogenese führt [46].

Der Botenstoff Serotonin (5-Hydroxytryptamin; 5-HT) ist während der Entwicklung des Gehirns, speziell des Gyrus dentatus, für mehrere trophische Effekte verantwortlich [47-49]. In anderen Geweben sind mitogene Eigenschaften, wie z.B. die dosisabhängige Stimulation der DNA-Synthese in Mesangium-Zellen des interstitiellen Nierengewebes der Ratte, bereits bekannt [50]. In Zellkultur konnte ein förderlicher Einfluss von Serotonin auf die Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur nachgewiesen werden. 5-HT fördert via Aktivierung des 5-HT_{1A}-Rezeptors die Bildung von Körnerzellen und somit die Neurogenese [51]. Eine Absenkung des Serotoninspiegels hingegen bewirkt eine verminderte Bildung von Körnerzellen im Gyrus dentatus und in der SVZ bei Ratten [52, 53].

Etlche therapeutische Verfahren wurden bereits hinsichtlich eventueller Einflüsse auf das Phänomen der AN getestet. So zeigten Studien mit Antidepressiva, wie z.B. selektiven 5-HT Wiederaufnahmehemmern (SSRI, in diesem Fall Fluoxetin), eine erhöhte Neurogeneserate unter Behandlung [54].

Eine Studie von Santorelli *et al.* legt darüber hinaus nahe, dass die Verhaltensänderungen bei chronischer Gabe von Antidepressiva mit der Stimulation der AN im Hippocampus zusammen hängt [55]. Die durch Stress induzierte Herabregulierung der BDNF-Expression im Hippocampus wird durch die Behandlung mit Antidepressiva verschiedenster Wirkstoffgruppen (MAO-Hemmer, SSRI, Reboxetin) komplett geblockt [25] und fördert so das Überleben neu gebildeter Zellen. Diese Therapeutika hemmen u. a. die Wiederaufnahme oder den Abbau von Serotonin, wodurch es zu einer gesteigerten Aktivierung von G-Proteinen und somit einem erhöhten cAMP-Spiegel in der Zelle kommt. Das führt über die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) zur Stimulation des Transkriptionsfaktors CREB, welcher unter anderem die Transkription von BDNF stimuliert. Diese hypothetisierten Mechanismen sind in Abbildung 5 gezeigt. Auch für die zur Behandlung von schweren Depressionen eingesetzte Elektrokonvulsionstherapie (EKT) konnte ein stark fördernder Einfluss auf die Neurogenese im Hippocampus gezeigt werden [25]. Opiaten wie Heroin und Morphin hingegen wurde eine hemmende Wirkung auf die Neurogenese im Hippocampus nachgewiesen [56]. Einschränkend muss jedoch festgestellt werden, dass alle Therapieverfahren bislang nur am Tiermodell hinsichtlich ihrer Effekte auf AN untersucht wurden, so dass unklar ist, ob diesen Phänomenen beim Menschen eine Bedeutung zukommt.

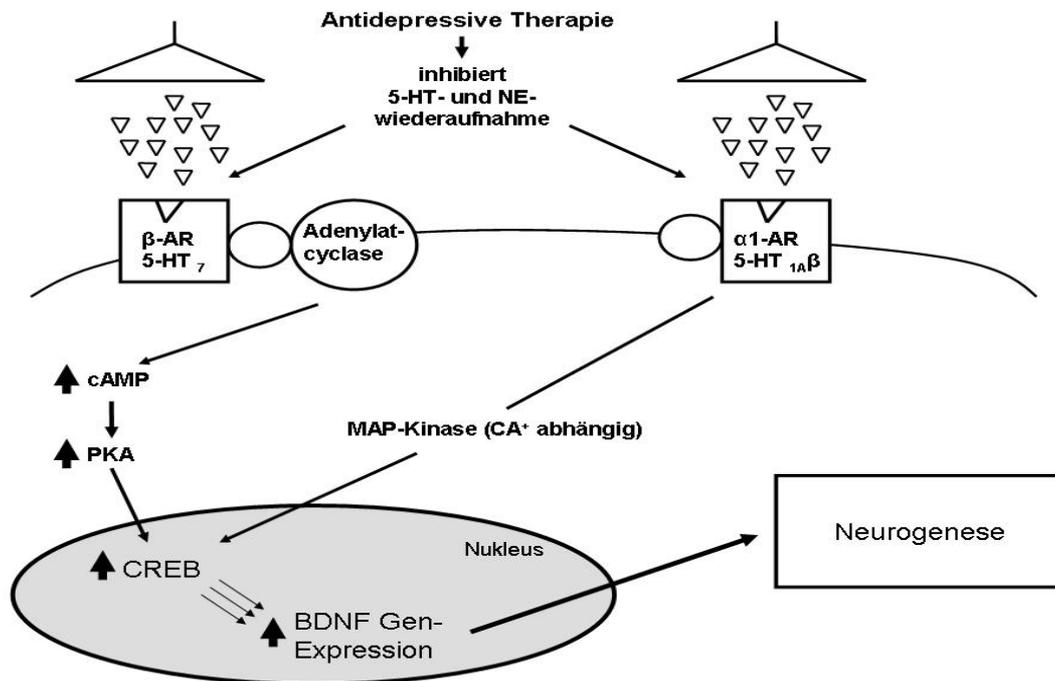


Abbildung 5: Antidepressive Therapie fördert die cAMP-Kaskade an mehreren intrazellulären Orten. Dazu gehören die vermehrte Aktivierung von G-Proteinen, das stimulierende GTP-binding protein, die Adenylatcyclase, erhöhte Spiegel an PKA und die gesteigerte Funktion und Expression von CREB. Auch über die Ca²⁺-abhängige Mikrotubuli-assoziierte Proteinkinase (MAP) kann CREB reguliert werden. Ein Ziel dieser Kaskade ist BDNF.

Über die Funktion der adulten Neurogenese im Hippocampus ist bis heute wenig bekannt. Diese Hirnregion wird als „Tor zur Erinnerung“ bezeichnet. Informationen werden im Hippocampus nicht direkt gespeichert, sondern vielmehr auf dem Weg zu übergeordneten Großhirnzentren „sortiert und durchgeleitet“ (sog. Encodierung). Der ständige Ersatz bzw. Zuwachs von Neuronen und Astrozyten in diesen Gebieten des ZNS kann daher nicht das alleinige anatomische Korrelat zur Speicherung von Lernprozessen und Informationen darstellen, zumal die relativ geringe Zellzahl von ca. 250000 Körnerzellen (in der Maus) dafür auch als deutlich zu klein erscheint. Zudem

erscheint es wenig sinnvoll, Zellen auszutauschen, die gerade zum Abspeichern von Informationen herangezogen wurden. Eventuell stellen die neuen Zellen eine Art Stellwerk für den Informationsfluss dar. Dieses könnte zu einer Optimierung des Datentransportes beitragen. Die Frage nach dem Grund für die Neubildung von Neuronen im Hippocampus ist, ebenso wie die Frage nach der genauen Funktion des Hippocampus, zum jetzigen Zeitpunkt unbeantwortet [57]. Einen neuen Ansatz liefert eine aktuelle Arbeit von Aimone *et al.* [58], in der vorgeschlagen wird, dass die ständig durch die AN verändernde hippocampale Struktur für die zeitliche Einordnung von Erinnerungen verantwortlich ist.

Über die Einflüsse von Erkrankungen auf die AN ist nur wenig bekannt. So wird insbesondere für depressive Erkrankungen immer wieder die Beteiligung einer veränderten adulten Neurogenese postuliert [57]. Bei zwei neurodegenerativen Erkrankungen (Morbus Alzheimer und Chorea Huntington) [59, 60] fand sich eine vermutlich kompensatorische Steigerung der adulten Neurogenese in menschlichem Postmortem-Gewebe [61, 62].

Alkoholabusus, eine der häufigsten psychiatrischen Erkrankungen, führt bei Nagetieren v. a. im Hippocampus zur verminderten Proliferation neuronaler Progenitorzellen und vermindert das Überleben der neu entstandenen Nervenzellen [63, 64]. Diese reduzierte Neurogenese könnte ein relevanter Faktor bei der Entstehung alkoholinduzierter kognitiver Funktionsstörungen beim Menschen sein. Neben Alkohol verändert auch Nikotin, zumindest in hohen Dosen, die neuronale Plastizität im Hippocampus, indem es die Neurogenese im Gyrus dentatus vermindert und möglicherweise den Zelluntergang verstärkt [65].

1.1.3 Ausblick: Therapie

Eine detaillierte Kenntnis über die Steuerung der adulten Neurogenese könnte in Zukunft genutzt werden, um z.B. an erkrankten Stellen des ZNS die gezielte Produktion gesunder neuronaler Ersatzzellen zu induzieren. Insbesondere für

Demenzen, Suchterkrankungen sowie schizophrene und affektive Psychosen [66] könnte als neurobiologisches Korrelat eine gestörte Neurogenese einen wesentlichen pathogenetischen Faktor darstellen.

Postmortem-Untersuchungen an Gehirnen von Patienten, die zu Lebzeiten unter Depressionen und Angstzuständen litten, zeigten im Bereich des präfrontalen Kortex und des Hippocampus eine Atrophie neuronaler Zellverbände [67, 68]. Wie oben beschrieben, wird (zumindest im Tiermodell) schon mit heutigen Antidepressiva eine Kompensation dieses Zellverlustes erreicht. Bessere Kenntnis über diese Vorgänge könnte diese Medikamente sicher noch optimieren und eine noch gezieltere und effizientere Behandlung ermöglichen, sollte denn eine Störung der Neurogenese bei psychiatrischen Erkrankungen eine Rolle spielen.

Bei Parkinsonpatienten wird aufgrund einer selektiven Degeneration dopaminergener Neurone in der Substantia nigra der Neurotransmitter Dopamin nicht in genügendem Maße hergestellt. Diesem Mangel könnte durch Nachwachsen der Dopamin produzierenden Zellen entgegengewirkt werden, zumal gezeigt wurde, dass AN in der Substantia nigra adulter Nager vorkommt [69]. Therapieansätze mit Spenderzellen sind bereits getestet worden; eine Steigerung der endogenen AN würde sicherlich viele Probleme umgehen. Inwieweit eine Steigerung der AN therapeutisch eingesetzt werden kann, ist also von herausragendem Interesse.

Die Behandlung von Gewebstraumata im ZNS nach Unfällen, ischämischen Gewebsdegenerationen nach cerebralen Ischämien und neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Morbus Alzheimer und Parkinson sowie das Verständnis der komplexen Zusammenhänge neurophysiologischer Mechanismen sind das Ziel der Forschung auf diesem Gebiet.

1.2 Stickstoffmonoxid (NO)

1.2.1 Vorkommen und Wirkung von NO

NO ist ein gasförmiges, freies Radikal, dessen Halbwertszeit wegen seiner starken Reaktionsfreudigkeit in biologischen Systemen ca. 5 sec. beträgt. Längere Distanzen als 200 – 300 µm vermag dieses Molekül in Gewebe daher nicht zu überwinden. Damit ist sein Signalübertragungspotential auf nahe gelegene Zielmoleküle begrenzt. Gerade diese Kurzlebigkeit macht es aber zu einem geeigneten Signalüberträger innerhalb der Zelle oder zwischen benachbarten Zellen [70], wobei es im Gegensatz zu klassischen Transmittern nicht in distinkten Quantitäten und lokal, sondern diffus und variabel ausgeschüttet wird. Es besitzt spezifische (z.B. der Rezeptor von NO, die lösliche G-Cyclase) und unspezifische Ziele und weist somit pleiotrope Effekte auf [71].

NO kommt in nahezu allen Organsystemen vor und ist an der Vermittlung zahlreicher physiologischer wie auch pathologischer Funktionen beteiligt. Es hat neben seinen physiologischen Eigenschaften auch eine toxische Wirkung. Bei vielen Krankheitsbildern finden sich denn auch erhöhte NO-Spiegel. Ein „Mangel“ an NO hingegen kann jedoch ebenso zu Krankheiten führen. Beispiele für diese gegensätzlichen Effekte von NO finden sich zahlreich: Das Molekül ist im Endothel, und damit im Kreislaufsystem, an der physiologischen Dilatation von Gefäßen beteiligt. Bei Hypotension, Reperfusionsschäden und septischem Schock sind veränderte NO-Spiegel zu messen. NO ist an der Parasitenabwehr (insb. in Makrophagen) beteiligt. Pathophysiologisch spielt es aber auch bei entzündlicher Gewebsschädigung und Transplantatabstoßung eine Rolle. Hohe NO-Spiegel in der Immunabwehr tragen zum Zelltod, zur Entzündungsreaktion und zum Versagen der Mikrozirkulation im septischen Schock bei [72]. Einer Steigerung der Gefäß-/Koronardurchblutung sowie einem vermutlich protektiven Effekt bei der Entstehung der Atherosklerose steht die Beteiligung an der Entstehung von Gefäßkrankheiten wie der

endothelialen Dysfunktion, der koronaren Herzkrankheit und der Angina Pectoris, sowie dem septischen Schock gegenüber [73]. Pharmakologisch werden diese bekannten Zusammenhänge schon seit längerem genutzt. Zu nennen sind hier die Nitrate, die seit langem in der Behandlung der koronaren Herzkrankheit, der Angina Pectoris, des Herzinfarkts, des Lungenödems und bei Gallengangkoliken Anwendung finden. Bei der Behandlung der hypertensiven Krise kommt in der Intensivmedizin als ultima ratio der NO-Donor Nitroprussidnatrium zum Einsatz. Bei der Behandlung von Atemproblemen Neugeborener in der Neonatologie ist es sogar lebensrettend. Ein weiteres modernes Medikament, welches ebenfalls in die NO-Signalkette eingreift, ist Sildenafil (Viagra®), das durch die Hemmung einer spezifischen, penilen Phosphodiesterase die cGMP-Konzentration erhöht und damit die penile Erektion aufrechterhält. Anti-Pterine, als Hemmstoffe der NO Synthasen eingesetzt, befinden sich derzeit in Phase III-Studien der Behandlung schwerer Hirntraumen zur Reduktion erhöhten intracerebralen Druckes.

Die Rolle von NO als wichtiger Botenstoff bei Signalübertragungsprozessen beim Menschen ist jedoch noch wenig erforscht. Als retrograder und *second messenger* der Glutamataktivierung des NMDA-Rezeptors kommt es auch im Hippocampus vor.

NO vermittelt u. a. Morpho- und Synaptogenese [74-77]. Damit trägt dieses Molekül neben der Steuerung vieler weiterer Funktionen des zentralen Nervensystems auch zur Regulation des Lernens und Erinnerns durch hippocampale Langzeitpotenzierung bei [78]. Erkenntnisse beim Menschen liegen hier allerdings nicht vor. Darüber hinaus bestehen enge funktionelle Beziehungen zum dopaminergen und serotonergen System: NO vermag sowohl den Dopamintransporter DAT mittels S-Nitrosylierung direkt zu hemmen [79], als auch indirekt den Serotonintransporter 5-HTT in seiner Aktivität zu steigern [80]. Zahlreiche andere Einzelbefunde in diesem Zusammenhang zeigen noch kein konsistentes Bild der Effekte von NO auf die menschliche Hirnfunktion.

NO hat sowohl aktivierende als auch hemmende Funktionen. So aktiviert es z.B. die Guanylat-Cyclase, wodurch es zu einem Anstieg an cGMP in den Zielzellen kommt. Inhibierend wirkt es hingegen z.B. auf die Funktion von P₄₅₀-Enzymen [81].

Die Verwendung des NO-Donors DETA/NONOat bei gleichzeitigem Verschluss von Hirnarterien steigert die Neurogeneserate [82]. *Upstream* spielt für den NO-Effekt wohl der NMDA-Rezeptor eine wichtige Rolle [83], der NO als *second messenger* im Hippocampus verwendet. Des Weiteren steigert eine selektive Inhibition von NOS-I (s. u.) den Zelluntergang im Gyrus dentatus nach Adrenalectomie, was eine neuroprotektive Wirkung von NO wahrscheinlich macht [84]. Moreno-Lopez et al. [85] zeigten, dass NO-produzierende Neuronen in der Umgebung neuronaler Progenitorzellen der Subventrikulärzone vorhanden sind und dass somit stickstoffvermittelte Neurotransmission zu diesen Neuronen stattfinden kann. Einen weiteren Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen NO und AN liefert eine neuere Studie von Zhu et al. [86]. Hier wurde ein Anstieg der adulten Neurogenese nach fokaler Ischämie nachgewiesen. Dieser Zuwachs ist abhängig von NO, welches von einer bestimmten Isoform der NO-Synthase (NOS-II, s.u.) gebildet wird.

1.2.2 NO-Synthasen (NOS)

Die endogene Synthese von NO wird durch NO-Synthasen (NOS) katalysiert. Es handelt sich dabei um ein Tetramer, bestehend aus zwei NOS-Monomeren und zwei Calmodulin-Monomeren (CaM). Dieser Komplex beinhaltet die fest gebundenen Kofaktoren (6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH₄), FAD, FMN und eisenbindendes Protoporphyrin IX (Häm). Die Reaktion benötigt als Substrat L-Arginin (Abb. 6). Bei der komplexen Reaktion entsteht aus dieser Aminosäure und O₂ über einen Zwischenschritt L-Citrullin und NO, wobei NADPH zu NADP⁺ oxidiert wird [87].

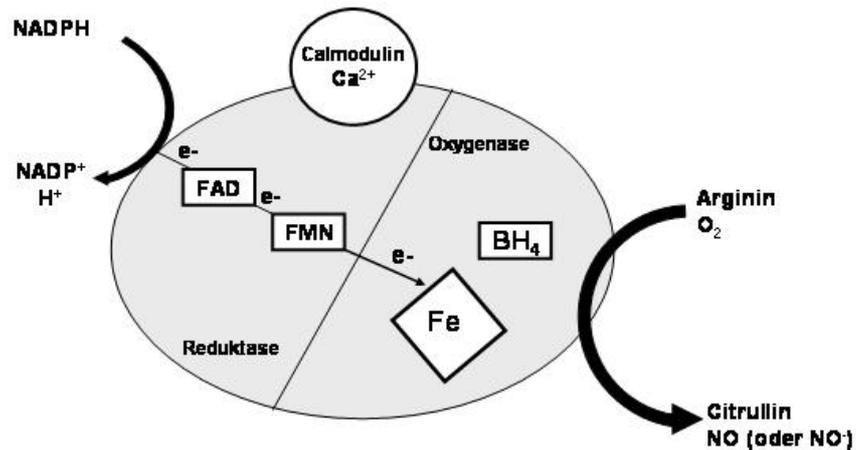


Abbildung 6: Reaktion von L-Arginin zu Citrullin und NO mit Kofaktoren, katalysiert durch NOS. NADPH fungiert als Elektronendonator (e⁻). FAD und FMN übertragen diese Elektronen von der Reduktasedomäne auf die Oxygenasedomäne. Hier wird im Zusammenspiel mit dem Häm-gebundenen Eisen (Fe) und BH₄ die Reaktion von L-Arginin und Sauerstoff (O₂) zu Citrullin und schließlich NO katalysiert. Der Elektronenfluss durch die Reduktasedomäne benötigt die Anwesenheit von Calmodulin mit gebundenem Ca²⁺. Zeichnung nach Alderton [87]

FAD und FMN fungieren hier als Elektronenakzeptoren. Durch die beiden Flavin-Kofaktoren können unter Bildung stabiler Intermediatprodukte die Elektronen einzeln vom Zwei-Elektronen-Donor NADPH auf den Ein-Elektronen-Akzeptor Häm übertragen werden.

Die Familie der NO Synthasen setzt sich aus NOS-I (nNOS, neuronale NOS), NOS-II (iNOS, induzierbare NOS) und NOS-III (eNOS, endotheliale NOS) zusammen [87]. NOS-III und NOS-I sind im Gegensatz zu NOS-II in hohem Maße von Calcium abhängig, da durch die Bindung von Ca^{2+} an CaM der Elektronenfluss zwischen NADPH und den Flavin-Kofaktoren ermöglicht wird. Jede Isoform wird von einem eigenen Gen codiert und wurde nach den jeweiligen Gewebearten benannt, in denen sie zum ersten Mal entdeckt wurden. Mittlerweile ist bekannt, dass die einzelnen Isoformen auch in zahlreichen anderen Geweben vorkommen [89]: viele Gewebe sind in der Lage, sowohl NOS-III, als auch NOS-I zu exprimieren [89]. In Muskelzellen kommen z.B. alle drei NOS-Isoformen vor. Endothelzellen exprimieren NOS-III, eine Expression von NOS-II kann jedoch induziert werden [90].

NOS-II hingegen wird gewöhnlich nicht in Zellen des ZNS gebildet. Eine Ausnahme stellen hier entzündliche Zustände dar, wie sie nach Traumata oder ischämischen Insulten auftreten. Hierbei kommt es zu einer Zunahme der Expression von NOS-II in den entsprechenden Regionen [87], was auch bei Mäusen im Bereich ischämischer Insulte beobachtet wurde [91]. NO könnte hier die Rolle eines zentralen Faktors bei der Induktion und Vermittlung von Reparaturstrategien/-mechanismen zukommen, wobei die Veränderung der Neurogeneserate ein mögliches Ziel der Beeinflussung durch NO sein könnte. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass ab dem dritten Tag nach einem operativ herbeigeführten zentralen ischämischen Insult bei Ratten ein Anstieg der Neurogenese zu verzeichnen war, der am siebten Tag *post operationem* sein Maximum hat, um dann bis zum 28. Tag wieder auf den physiologischen Wert zu sinken [86]. Weitere Experimente mit NOS-II-Knockout-Mäusen legten nahe, dass eine Aktivierung von NOS-II für die Steigerung der Neurogeneserate von großer Bedeutung ist [86].

NOS-III wird Calcium/Calmodulin-reguliert und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Gefäßtonus [92]. Welche Rolle die endotheliale Isoform NOS-III im ZNS spielt, ist jedoch noch nicht vollständig klar. Gesichert gilt eine Expression im zentralnervösen Endothel, was einige Studien [93-95] bereits

gezeigt haben. Eine mögliche Expression von NOS-III in neuralem Gewebe wird kontrovers diskutiert [96], da zu diesem Thema widersprüchliche Befunde vorliegen. Während in einigen Untersuchungen NOS-III in murinen CA-1 Pyramidenzellen [94, 97-99] und Astrocyten [100, 101] gefunden wurde, konnten andere Untersuchungen diese Befunde nicht bestätigen [95, 102]. Mittels In-Situ-Hybridisierung wurde in einer Arbeit keine NOS-III mRNA in neuronalen Zellen detektiert [93]. In einer Arbeit von Teichert et al. fand sich die Expression eines NOS-III-Reportergens in neuronalen Zellen [94]. Ein Vergleich aller vorliegenden Studien zu diesem Thema ist jedoch schwierig, da bei verschiedenen Spezies unterschiedliche Hirnregionen untersucht wurden. Für humanes Gewebe liegen nur wenige Untersuchungen vor. Diese zeigen ebenfalls kein eindeutiges Bild.

Der Gyrus dentatus ist neben der SVZ der Ort, an dem am meisten neue Zellen gebildet werden. Dort kann sowohl beim Menschen wie auch bei Ratten NOS-I und möglicherweise NOS-III gefunden werden. Neben der Expression in Endothelzellen ist NOS-III eventuell in CA-1 Pyramidenzellen präsent [97-99]. NOS-III wird möglicherweise auch in Astrocyten exprimiert [100, 101, 103], die eine wichtige Rolle bei der Regulation der Neurogenese spielen. Die neuronalen Stammzellen liegen jedoch in der Nähe von Gefäßen [104], deren Endothel NOS-III stark exprimiert (s.o.), so dass NOS-III in jedem Fall das Potential besitzt, die AN zu beeinflussen. Darüber hinaus zeigten einige pharmakologische Studien, dass die Modulation des nitriergen Systems zu einer Veränderung der Neurogenese führt. Um einen möglichen Einfluss von NOS-III auf die AN zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die Proliferation und Survivalrate neuraler Stammzellen an NOS-III-Knockout-Mäusen bestimmt. Studien mit Knockout-Mäusen ermöglichen die gezielte Betrachtung nur einer Isoform der NOS-Enzymfamilie, da bis heute kein NOS-III-spezifischer Inhibitor zur Verfügung steht.

1.2.3 NOS-III Knockout-Mäuse

Strukturell-anatomisch weisen NOS-III-Knockout-Mäuse einige Besonderheiten im Vergleich zu Wildtyp-Tieren auf. So sind angeborene Herzdefekte und häufigere Herzfehlfunktionen bei diesen Tieren bekannt [105]. NOS-III-Knockout-Zuchtpaare haben signifikant weniger Nachkommen pro Wurf als heterozygote oder Wildtypzuchtpaare [81], ihr Blutdruck liegt etwa 20 bis 30% über dem der Wildtyp-Tiere [106] und ist stärkeren Schwankungen unterlegen [107].

NOS-III-Knockout-Mäuse weisen daneben auch neurophysiologische und neurobiologische Besonderheiten auf. Genetische Inaktivierung von NOS-III führt zu einer starken Reduktion der NMDA-gesteuerten GABA-Ausschüttung in einigen Hirnregionen, wie z.B. dem Hippocampus [108]. Im frontalen Cortex von NOS-III-Knockout-Mäusen wurde ein gesteigerter Serotonin-Turnover festgestellt, während im ventralen Striatum ein erhöhter Dopamin-Umsatz zu verzeichnen ist [109], so dass von einer engen Verzahnung monoaminergere und nitriniergere Signaltransduktionskaskaden auszugehen ist. Die Hypofunktionalität des NMDA-Rezeptors steht neben der Glutamat-Hypothese im Zentrum der theoretischen Überlegungen zur Beteiligung von NO bzw. NO-Synthasen an der Pathogenese psychischer Erkrankungen wie affektiven und schizophrenen Psychosen [110].

NOS-III-defiziente Mäuse weisen interessanterweise einige Verhaltensauffälligkeiten auf [111]: Die Tiere zeigen eine erhöhte Angstbereitschaft, aber auch ein besseres Lernvermögen [109]. Daneben zeigen sie ein weniger stark ausgeprägtes aggressives Verhalten als Wildtypvarianten.

1.3 Fragestellung

Die oben gezeigten Zusammenhänge lassen eine Verbindung zwischen von NOS-III synthetisiertem NO und der Regulation der AN postulieren.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, einen möglichen Einfluss von NOS-III bzw. des von dieser Isoform des Enzyms synthetisierten NO auf die AN im Gyrus dentatus der Maus zu erforschen. Dafür wurden NOS-III-Knockout-Mäuse mithilfe immunhistochemischer BrdU-Markierung auf Proliferation und Survival neuronaler Stammzellen untersucht und mit Wildtypvarianten und für dieses Gen heterozygoten Tieren verglichen. Für die Phänotypisierung der neu gebildeten Zellen wurden an den gleichen Präparaten Doppelmarkierungen mit BrdU/NeuN (als neuronaler Marker) und BrdU/GFAP (als Astrozyten-Marker) vorgenommen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Die Versuchstiere stammten aus einer NOS-III-Knockout-Zuchtlinie der Tierhaltungseinrichtung der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg, die direkt von der Zuchtlinie des Erstbeschreibers auf dem genetischen Hintergrund eines C57/BL6 Mäusestammes abstammt [112]. Die Tierhaltungsbedingungen umfassten einen Hell-Dunkel-Cyclus von jeweils 12 Stunden bei Wasser und Futter ad libitum.

Tierhaltung und Versuchsprotokolle wurden durch die Regierung Unterfranken und die zuständige Stelle der Universität Würzburg geprüft und genehmigt und entsprechen den internationalen Richtlinien für Tierversuche.

Für immunhistochemische Färbungen wurden die Gehirne von insgesamt 39 Mäusen verwendet. Es wurden Geschwistertiere herangezogen, die entweder heterozygot (HET; n=15) oder homozygot (KO; n=14) für das deletierte NOS-III-Gen sind. Zum Vergleich dienten Kontrolltiere, die ebenfalls aus dem entsprechenden Wurf stammten (Wildtyp, WT, n=10). Die Verteilungen auf die Survival- und Proliferationsversuche sind im Einzelnen in der Tabelle 1 dargestellt. Die Tiere waren zum Zeitpunkt des Versuchsanfangs durchschnittlich 136 ± 27 d alt.

Tabelle 1: Anzahl und Genotyp der einzelnen Versuchstiere

	Survival	Proliferation
	Total (männlich; weiblich)	Total (männlich; weiblich)
NOS-III-WT	4 (2;2)	6 (4;2)
NOS-III-HET	8 (5;3)	7 (5;2)
NOS-III-KO	7 (3;4)	7 (6;1)

2.1.2 Antikörper und Immunreagenzien

Erstantikörper:

Anti-BrdU (Bromodeoxyuridine), Maus IgG (monoklonal), Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim

Anti-GFAP (Glial fibrillar acidic proteine)

Anti-BrdU (Bromodeoxyuridine), Ratte (polyklonal)

Anti-NeuN (Neuronal nucleus), Maus IgG (monoklonal), Chemicon International, Inc., USA

Zweitantikörper:

Avidin-Biotin Enzymkomplex: Vectastain[®] ABC KIT (Vector Laboratories, Inc. USA)

Biotinylierter Anti-Maus-IgG (H+L) aus der Ziege (Vector Laboratories, Inc. USA)

CyTM2-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L), (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.)

CyTM3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rat IgG (H+L), (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.)

2.1.3 Puffer und Lösungen

2.1.3.1 Lösungen für die Immunhistochemie

0,6% H₂O₂ in TBS

Blocklösung I: 0,25% Triton-X 100

5% Normal Horse Serum (Vector Laboratories, Inc. USA)

2% Albumin, bovine (Sigma[®] Chemical Co., USA) in TBS

Blocklösung II: 0,25% Triton-X 100

2% Normal Horse Serum (Vector Laboratories, Inc. USA)

2% Albumin, bovine (Sigma[®] Chemical Co., USA) in TBS

Diaminobenzidin: DAB Substrate (Roche Diagnostics, GmbH, Deutschland)

Formamide deionized ultra pure grade (Amresco[®], USA)

2.1.4 Standardlösungen

2.1.4.1 Puffer

TBS (Tris buffered saline): 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5

0,15 M NaCl

PBS (Phosphat buffered saline): 0,137 M NaCl

2,7 mM KCl

8,1 mM Na₂HPO₄

1,5 mM KH₂PO₄

Phosphat buffered saline (10x) without Ca
und Mg (BIO WHITTAKER EUROPE,
Belgien) 1/10 in H₂O

2.1.4.2 Lösungen für Immunhistochemie

4xSSC: 0,6 M Sodium Chloride

0,06 M Sodium Citrat

20x SSC (Amresco[®], USA) 1/5 in H₂O

2 N HCl

0,1 M Borsäure (pH 8,5)

2.1.5 Lösungen zur Gewebeaufbewahrung

0,02% Natrium-Azid in TBS

Kryoprotektanslösung:

30 ml Ethylenglykol

30 ml Glycerin

40 ml 0,1 M Na-Phosphat-Puffer pH 7,4

4% Paraformaldehyd in 1x PBS, pH 7,5

10% Sucrose in PBS

20% Sucrose in PBS

2.1.6 Geräte

Leica-Lichtmikroskop Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar

Konfokales Mikroskop Leica DMRE und Leica TCS SP3

Leica Microsystems Heidelberg GmbH

Fluoreszenzmikroskop Olympus 340 mit Fluoreszenzaufsatz

Mikrotom Kryostat HM500 OM MICROM Laborgeräte GmbH

CCD-Kamera Hitachi CCD KP-C551 Color Camera

Digitalkamera Nikon Coolpix Nikon Corporation Tokyo, Japan

2.1.7 Software

DigiTrace Von Fa. Borland International Inc., IMATEC Bildanalyzesysteme,
Neufahrn, Deutschland

StatView 4.02 Data Analysis and Presentation System, Abacus Concepts,
London, Großbritannien

Microsoft® Word 97 und 2000 Microsoft, Unterschleißheim

Microsoft® Excel 2000 Microsoft, Unterschleißheim

2.1.8 Sonstiges

Eindeckmittel:

Aquatex® Merck, Darmstadt

Vitro-Clud® Langenbrinck, Deutschland

Objektträger Superfrost® Plus	MENZEL-GLÄSER®, Deutschland
Deckgläser 24x50 mm	Marienfeld GmbH, Deutschland
2-Methylbutan \geq 99%	Carl Roth GmbH & Co., Deutschland
Ethanol	dto.
Xylol	dto.

2.2 Methoden

2.2.1 BrdU-Injektionen

Die Mäuse erhielten vier intraperitoneale BrdU-Injektionen im Abstand von jeweils zwei Stunden. Vor der ersten Injektion wurden die Tiere gewogen, um die individuelle Dosis für jedes Tier zu ermitteln. Jeder Maus wurde pro Injektionszyklus 75 μ g BrdU/g Körpergewicht, in einer auf Körpertemperatur vorgewärmten isotonischen Kochsalzlösung (0,9% NaCl) gelöst, injiziert. Die Konzentration der Injektionslösung betrug 10 mg/ml BrdU. Eine Maus mit einem Körpergewicht von 25 g bekam somit z.B. eine Injektion von knapp 200 μ l Injektionslösung. Der Eingriff erfolgte ohne Anästhesie, da die Äthernarkose für die Tiere belastender als die Injektion selbst ist. Somit wurde den Tieren unnötiger Stress erspart. Die Körperseite, auf der die Injektion erfolgte, wurde nach jedem Eingriff gewechselt.

2.2.2 Gewebepräparation

Um die Proliferation adulter Stammzellen analysieren zu können, wurden die Mäuse sechs Tage nach BrdU-Gabe unter Äthernästhesie durch Dekapitierung getötet, die Gehirne sofort entnommen und für 48-72 Stunden in frisch hergestelltem Paraformaldehyd 4 % in PBS immersionsfixiert.

Zur Untersuchung der Überlebensrate sowie Differenzierung und Migration der neu gebildeten Zellen (= Survivalrate) wurden Mäuse 28 d nach der letzten BrdU-Injektion auf dieselbe Weise getötet.

Nach viermaligem Waschen der immersionsfixierten Gehirne in PBS für jeweils 15 min wurde das Gewebe zum Gefrierschutz sukzessive in 10 und 20% Sucrose in PBS überführt und daraufhin mit Trockeneis in 2-Methylbutan auf -60°C heruntergekühlt. Die Gehirne wurden bei -20°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

Mit Hilfe des Gefriermikrotoms wurden serielle koronare Schnitte der Hippocampusregion mit einer Dicke von $40\ \mu\text{m}$ hergestellt und frei flottierend in 0,02% Natrium-Acid in TBS gesammelt. Jeder sechste Schnitt wurde einer immunhistochemischen Färbung zum Nachweis von BrdU unterzogen. Die verbleibenden Schnitte wurden zum Teil für die Doppelmarkierungen und die HE-Färbungen verwendet. Das übrige Gewebe wurde in Kryoprotektans-Lösung überführt und bei -20°C gelagert.

2.2.3 Immunhistochemischer Nachweis von BrdU

Die Schnitte wurden zunächst zweimal für 10 min in TBS gewaschen. Zum Blockieren der endogenen Peroxidase folgte nun eine Inkubation in 0,6% H_2O_2 in TBS für 30 min. Nach erneutem Waschen (2x10 min) wurde die DNA denaturiert, wodurch die Detektion von BrdU durch den entsprechenden Antikörper möglich wurde. Dazu wurden die Gehirnschnitte zunächst in einer Lösung bestehend aus 50% Formamid und 2xSSC Lösung bei 65°C für 2 h inkubiert, danach zweimal 5 min gewaschen, für 30 min bei 37°C in 2 N HCl inkubiert und in 0,1 M Borsäure (pH8,5) für 10 min gespült. Nach erneutem Waschen in TBS (3x10 min) folgte eine Blockierung der unspezifischen Antikörper-Bindungsstellen im Gewebe durch Inkubation der Schnitte für 1 h bei RT in Blocklösung I. Anschließend wurden die Schnitte mit dem monoklonalen Anti-BrdU Erstantikörper (1/400 in Blocklösung I verdünnt) bei 4°C über Nacht inkubiert und erneut in TBS gewaschen (3x10 min). Zur

Detektion des Erstantikörpers wurden die Schnitte im Folgenden mit dem biotinylierten Anti-Maus-IgG (1/400 verdünnt in Blocklösung II) für 2 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min in TBS folgte eine Inkubation der Schnitte für 1,5 h bei RT im Avidin-Biotin-Komplex. Dieser Komplex wurde jeweils 0,5 h vor Gebrauch frisch angesetzt. Dem wiederholten Waschen (3x5 min) in TBS schloss sich der Peroxidase-Nachweis mit DAB als Substratlösung für 5 bis 10 min an.

Abschließend wurden die Schnitte in TBS gewaschen und auf Objektträger aufgezogen. Sie wurden über Nacht getrocknet und nach Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe (75% Ethanol, 95% Ethanol, 100% Ethanol, 100% Xylol) mit Vitro-Clud® und Deckgläschen eingedeckt.

2.2.4 Quantifizierung BrdU exprimierender Zellen

Die gefärbten Gehirnschnitte wurden unter dem Lichtmikroskop analysiert. Mittels einer Digitalkamera und dem Programm DigiTrace wurde die Hippocampusregion digitalisiert und die Flächen von Hilus und Körnerzellschicht des Gyrus dentatus vermessen. Zur genauen Skalierung der einzelnen Vergrößerungen am Computer wurden zuvor definierte Maßstäbe verwendet, um die Skalierungsfaktoren für jede Vergrößerung bestimmen zu können.

Mit den so gewonnenen Flächendaten konnte das Volumen der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus eines jeden Gehirns berechnet werden. Folgende Volumenformel (Abb. 7) kam hier zur Anwendung:

$$\begin{aligned}
\text{VGZ} &= V_1 + V_2 + \dots + V_{16} \\
&= \frac{F_1 + F_2}{2} \cdot 6h + \frac{F_2 + F_3}{2} \cdot 6h + \dots + \frac{F_{15} + F_{16}}{2} \cdot 6h + F_{16} \cdot h \\
&= (6(F_1 + F_2 + F_3 + \dots + F_{16}) - 3F_1 - 2F_{16}) \cdot h
\end{aligned}$$

Abbildung 7: Formel zur Berechnung des Volumens der Körnerzellschicht im Gyrus dentatus.

VGZ: Gesamtes Volumen der Körnerzellschicht beider Hippocampi eines Mäusegehirns

V: Volumen (V1 ist das Volumen der Körnerzellschicht vom ersten bis zum zweiten Schnitt usw.)

F: Fläche (F1 ist die gemessene Fläche der Körnerzellschicht vom ersten Schnitt u.s.w.)

h: Schnittdicke (40 µm)

Die im Gyrus dentatus lokalisierten BrdU-positiven Zellkerne wurden gezählt. Unterschieden wurde hier zwischen Zellen in der Körnerzellschicht (GZ), die als „gewandert“, und Zellen in der SGZ, welche als „stationär“ bezeichnet wurden. Weiterhin wurden BrdU-positive Zellen mit einem homogen angefärbt erscheinenden Zellkern („normal“) von solchen mit nicht homogen angefärbt erscheinenden Zellkern („gesprenkelt“) differenziert.

2.2.5 Doppelmarkierung mit Antikörpern gegen BrdU und NeuN

Die Schnitte wurden zunächst 2x5 min in TBS gewaschen. Die DNA wurde daraufhin wie in 2.2.3 beschrieben denaturiert. Dem anschließenden dreimaligen (3x5 min) Waschen in TBS folgte eine Blockierung der

unspezifischen Bindungsstellen im Gewebe durch einstündige Inkubation der Schnitte in Blocklösung I bei RT. Über Nacht wurden die Schnitte dann bei 4°C gleichzeitig mit den folgenden Antikörpern behandelt:

AK1: Polyklonaler Anti-BrdU aus der Ratte (1:400 verdünnt in Blocklösung I)

AK2: Monoklonaler Anti-NeuN aus der Maus (1:4000 verdünnt in Blocklösung I)

Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBS folgte die Inkubation mit den jeweiligen Zweitantikörpern für 1,5 h bei RT (Cy2-konjugierter Anti-Maus aus der Ziege 1:200 in TBS; Cy3-Konjugiertem Anti-Ratte aus der Ziege 1:200 in TBS). Um eine zu schnelle Abnahme der Fluoreszenz zu verhindern, wurde darauf geachtet, dass die Schnitte möglichst im Dunkeln gehalten wurden. Die Schnitte wurden ein letztes Mal in TBS gewaschen und auf Objektträger aufgezogen, über Nacht getrocknet und mit Aquatex und Deckgläschen eingedeckt.

2.2.6 Auswertung der Doppelmarkierung

Die doppelmarkierten Gehirnpräparate wurden mit Hilfe eines Konfokal-Mikroskops untersucht. Die Schnitte können somit schichtweise gescannt werden. Dabei wurden die jeweiligen an die Zweitantikörper gekoppelten Fluorochrome mit Licht spezifischer Wellenlängen zur Fluoreszenz angeregt und stellten sich im digitalen Bild in verschiedenen Farben dar. Die mit CyTM3 markierten, also BrdU-positiven Zellkerne erschienen rot und die mit CyTM2 dargestellten NeuN-positiven Neurone wurden grün abgebildet. Eine Zelle, die sowohl für BrdU als auch für NeuN positiv und somit durch beide Antikörper markiert ist, stellt sich durch Überlagerung von rot und grün in gelber Farbe dar.

3 Ergebnisse

3.1 Die Proliferation neuronaler Stammzellen ist bei NOS-III-Knockout-Mäusen reduziert

Die Proliferation der Progenitorzellen in der SGZ des Hippocampus von NOS-III-Knockout-Mäusen und entsprechenden Kontrollen wurde durch den immunhistochemischen Nachweis von BrdU ermittelt (Abb. 8), wie unter Methoden beschrieben.

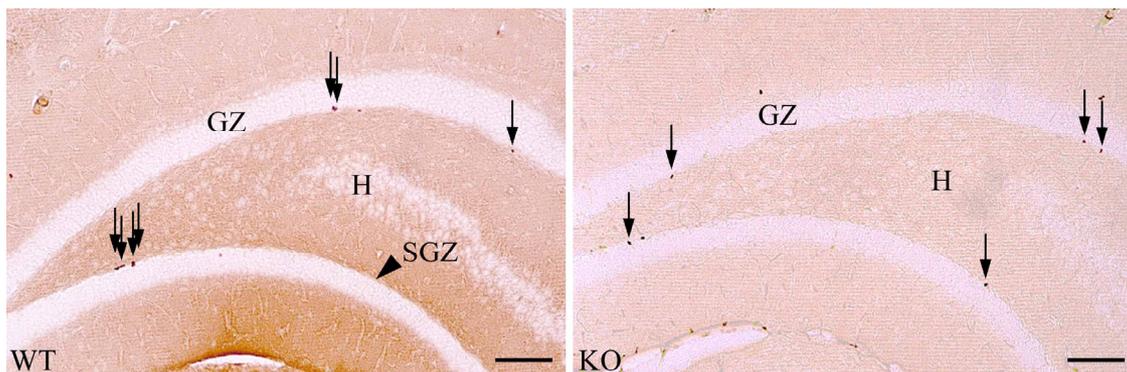


Abbildung 8: Proliferation adulter Stammzellen im Hippocampus von NOS-III-Knockout-Mäusen (schwarzer Maßstab entspricht 200 µm). Im Gyrus dentatus NOS-III-defizienter Mäuse (KO) konnten weniger BrdU-positive Zellen nachgewiesen werden als im Gyrus dentatus entsprechender Kontrolltiere (WT; NOS-III-WT-Mäuse). Zu diesem Zeitpunkt (6 d nach BrdU-Injektion) sind die gefärbten Zellen fast ausschließlich in der SGZ zu finden und ordnen sich in der Regel zu Gruppen, so genannten Clustern an.

Vergleicht man die Anzahl BrdU-positiver Zellen pro Volumen Körnerzellschicht von NOS-III-Knockout-Mäusen (NOS-III $-/-$) mit NOS-III-

Wildtyp-Mäusen (NOS-III +/+), so zeigt sich eine signifikant ($p < 0,05$, Students t-test, $n=6$ pro Genotyp) geringere Proliferationsrate bei NOS-III-defizienten Tieren (Abb. 9). Exemplarisch ist dies in Abb. 8 (KO) dargestellt. Während in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus von NOS-III-WT 306 ± 37 BrdU-positive Zellen/ mm^3 zu finden waren, hatten NOS-III-KO 236 ± 49 BrdU-positive Zellen/ mm^3 . Dies entspricht, verglichen mit den Wildtypen, einer Reduktion der Proliferation adulter Stammzellen um 23 %. Die Proliferationsrate von NOS-III heterozygoten Mäusen (NOS-III +/-, $n=6$) zeigte im Gegensatz dazu nahezu identische Werte wie NOS-III-KO (226 ± 46 BrdU-positiven Zellen/ mm^3).

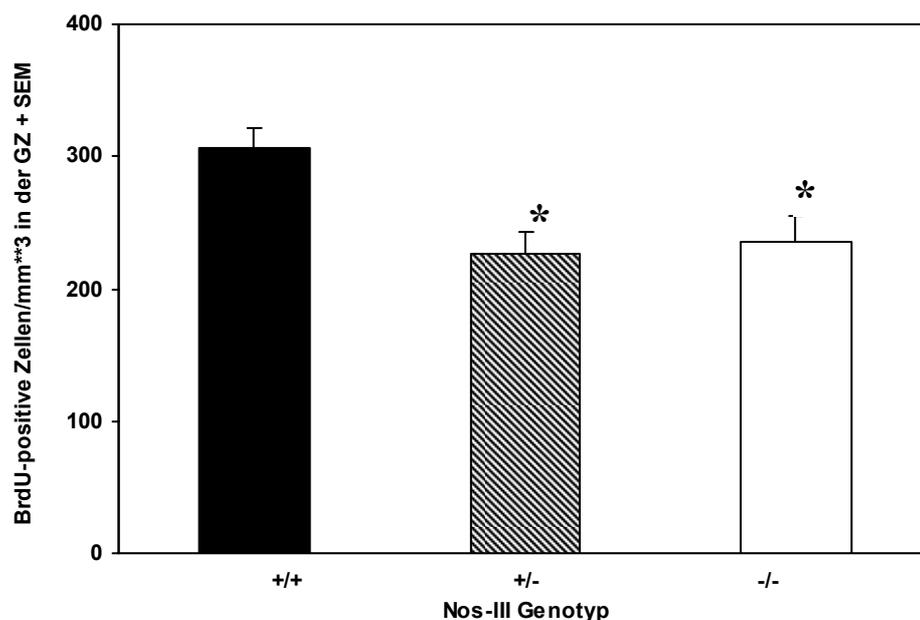


Abbildung 9: Die Proliferation der Progenitorzellen ist bei NOS-III-Knockout-Mäusen (-/-) reduziert. Die adulte Neurogenese, gemessen als Anzahl BrdU-positiver Zellen pro Volumen der Granularzellschicht des Gyrus dentatus (mm^3), ist im Vergleich zu den Kontrolltieren (+/+; schwarzer Balken) bei heterozygoten (+/-; gestrichelter Balken) und homozygoten (-/-; weißer Balken) NOS-III-Knockout-Mäusen signifikant (* $P < 0,05$, Students t-Test) reduziert.

Signifikante geschlechtsspezifische Unterschiede konnten weder bei NOS-III +/+, noch bei NOS-III +/- und bei NOS-III -/- Mäusen gefunden werden (Abb. 10).

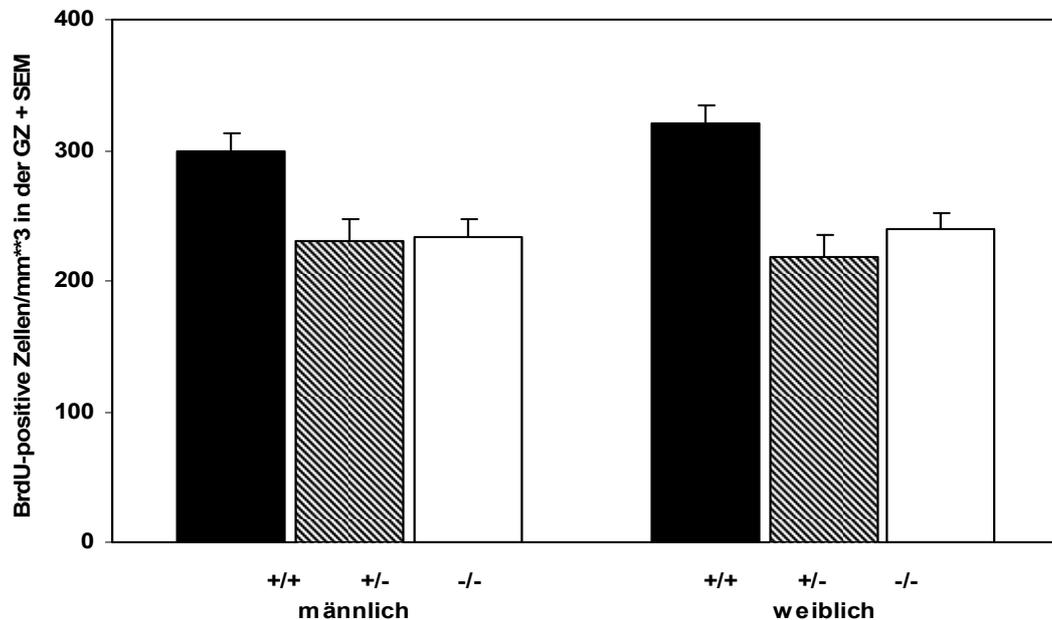


Abbildung 10: Geschlechtsspezifischer Vergleich der Proliferation von Progenitorzellen bei NOS-III-Knockout-Mäusen (-/-; weißer Balken). Hier sind keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede von jeweils heterozygoten (+/-; gestrichelter Balken) und Wildtypen (+/+; schwarzer Balken) in der Proliferation zu verzeichnen $P > 0,05$ ♀(+/+) vers. ♂(+/+), ♀(+/-) vers. ♂(+/-), ♀(-/-) vers. ♂(-/-) (Students t-test).

Bei den Untersuchungen zur Messung der Proliferation waren fast sämtliche BrdU-positiven Zellen entlang der Grenze zwischen Körnerzellschicht und Hilus - der so genannten SGZ des Gyrus dentatus - zu finden. Manche Zellen waren in Clustern angeordnet. Ein geringer Teil der BrdU-positiven Zellen begann bereits, in die Körnerzellschicht zu wandern (Abb. 11).

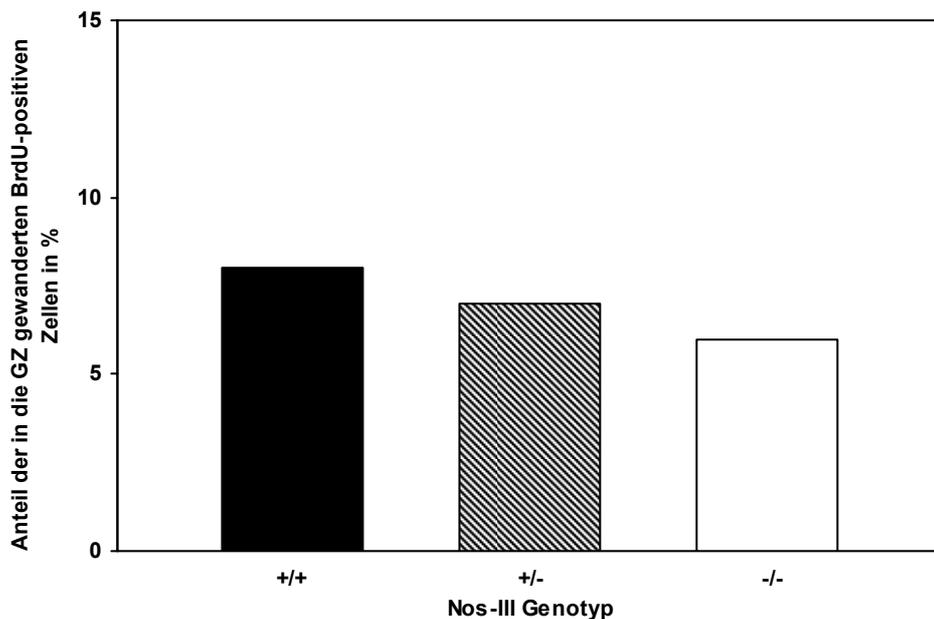


Abbildung 11: Anteil der in die GZ gewanderten BrdU-positiven Zellen 6 d nach der letzten BrdU-Injektion. Ein geringer Teil der BrdU-positiven Zellen begann bereits bei den Untersuchungen zur Proliferation in die Körnerzellschicht zu wandern. Dargestellt ist der prozentuale Anteil gewanderter Zellen.

3.2 Survival der neu gebildeten Zellen

Um die Survivalrate der neu gebildeten Zellen bei NOS-III-Knockout-Mäusen zu bestimmen, wurden die Versuchstiere 28 d nach den BrdU-Injektionen getötet. Die BrdU-positiven Zellen wurden gezählt und deren Verteilungsmuster innerhalb der Körnerzellschicht registriert. Im Gegensatz zu den Proliferationsversuchen konnten hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden.

28 d nach BrdU-Injektion waren die BrdU-positiven Zellen sowohl in der Körnerzell- wie auch in der Subgranularzellschicht lokalisiert (Abb. 12 und 13).

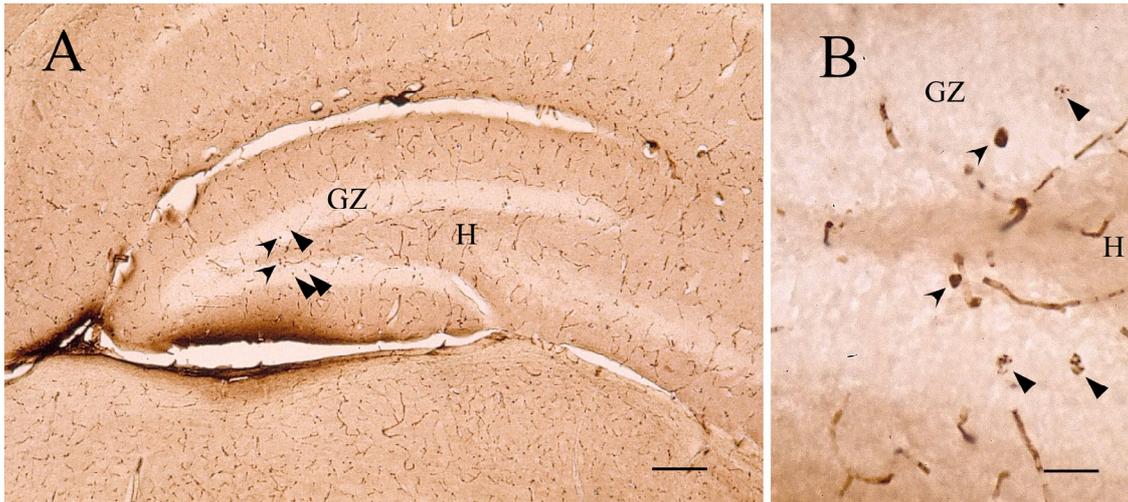


Abbildung 12: Survival neu gebildeter Zellen bei NOS-III-Knockout-Mäusen. Die Mikrophotographien koronarer Schnitte des Gyrus dentatus zeigen BrdU-positive Zellkerne reifer Zellen. Zu diesem Zeitpunkt (28 d nach BrdU-Injektion) sind die BrdU-positiven Zellen sowohl in der GZ wie auch in der SGZ lokalisiert (A). Die stärkere Vergrößerung (B) zeigt ein unterschiedliches Färbeverhalten der einzelnen Zellkerne (schwarzer Maßstab entspricht bei (A) 120 μm und bei (B) 35 μm).

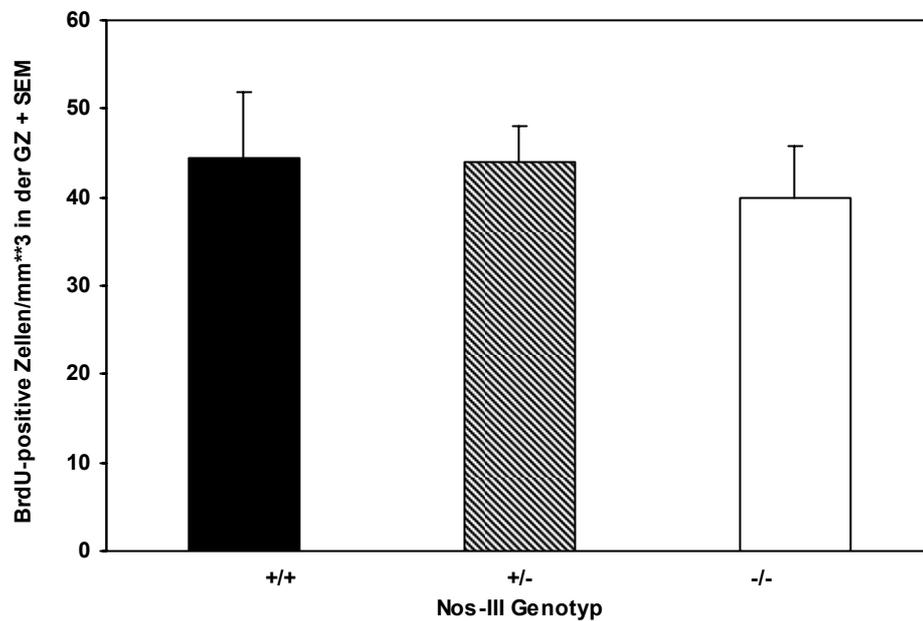


Abbildung 13: Anzahl der neu gebildeten Zellen im Gyrus dentatus, die 28 d nach BrdU-Injektion noch nachzuweisen waren.

Die Survivalrate ist bei NOS-III-Knockout-Mäusen (-/-; weißer Balken) verglichen mit den Wildtyp- (+/+; schwarzer Balken) und heterozygoten (+/-; schraffierter Balken) Varianten nicht signifikant reduziert.

3.3 Migration der neu gebildeten Zellen

Von den überlebenden Zellen waren nach 28 d sowohl bei den NOS-III +/+ wie auch bei den NOS-III +/- Mäusen 37% in die Körnerzellschicht gewandert. Bei den Knockout-Mäusen hingegen waren es 33%. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abb. 14).

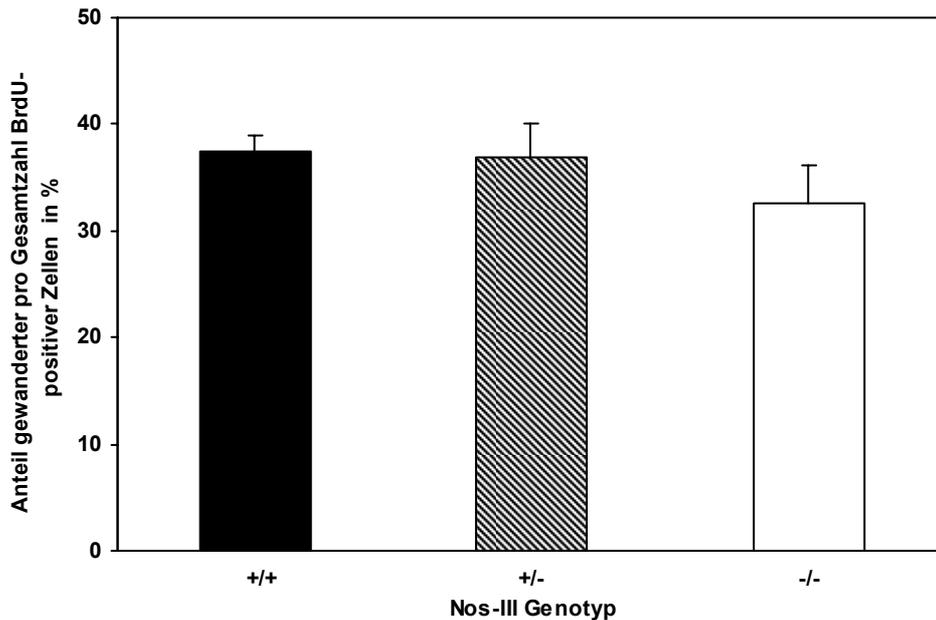


Abbildung 14: Anteil der in die GZ gewanderten BrdU-positiven Zellen, die 28 d nach Injektion noch nachzuweisen waren. Dargestellt ist der prozentuale Anteil gewanderter Zellen bei NOS-III-Knockout-Mäusen (-/-; weißer Balken), heterozygoten (+/-; gestrichelter Balken) und Wildtypvarianten (+/+; schwarzer Balken) an allen angefärbten Zellen.

3.4 Morphologische Auffälligkeiten gewanderter Zellen

Viele der BrdU-positiven Zellkerne neu gebildeter Zellen zeigten bei genauerer Betrachtung ein verändertes Färbeverhalten im Sinne einer distinkten Zellkern-Morphologie (Abb. 15). Diese Zellkerne wiesen keine homogene BrdU-Färbung auf, wie sie beim größten Teil der Proliferations-Experimente nachzuweisen war, sondern zeigten gesprenkelte Bereiche starker und weniger starker Färbung. Ein ähnliches Muster der Kernfärbung ist auch bei Zellkernen während der Pyknose zu beobachten.

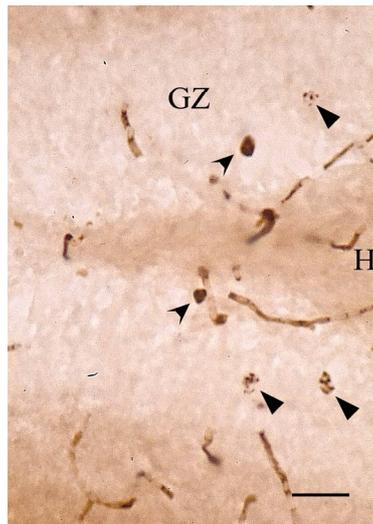


Abbildung 15: Unterschiedliches BrdU-Färbeverhalten überlebender, neu gebildeter Neurone. Ein Teil der Zellkerne war im Gegensatz zu den Experimenten zur Proliferation nicht homogen gefärbt (Pfeilköpfe). Diese Zellen zeigten vielmehr gesprenkelte Bereiche starker und weniger starker Färbung. Pfeilspitzen markieren normal gefärbte Zellen.

Der Anteil dieser Zellen ist bei NOS-III $-/-$ Mäusen ($36,4\% \pm 5,6$) numerisch geringer als bei NOS-III $+/+$ ($40,2\% \pm 5,7$) und NOS-III $+/-$ ($39,8\% \pm 2,8$). Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (Abb. 16).

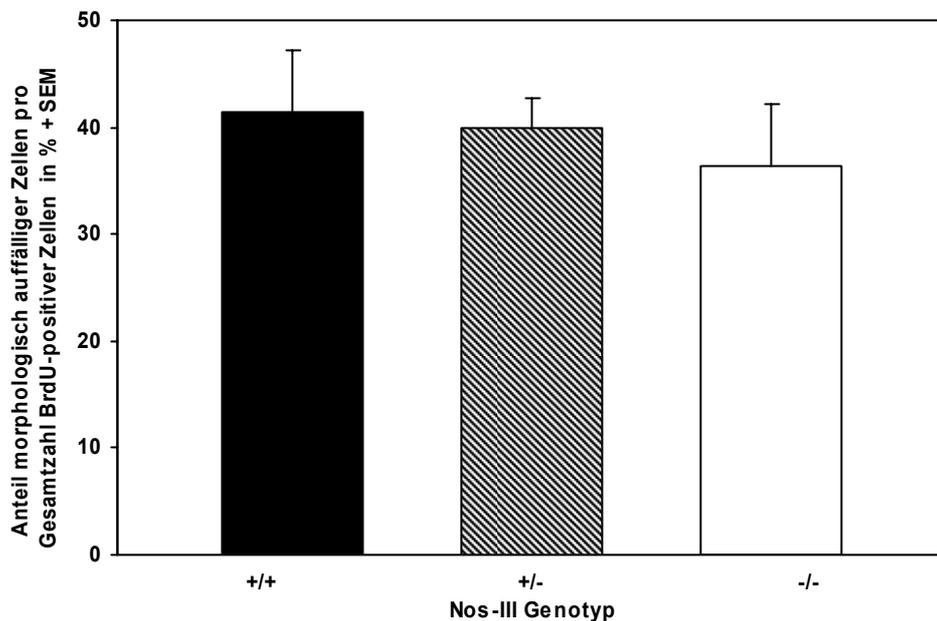


Abbildung 16: Anteil der Zellen, die 28 d nach BrdU-Injektion ein auffällig verändertes inhomogenes Färbeverhalten zeigten.

Dieser Anteil war bei NOS-III-Knockout-Mäusen (-/-; weißer Balken) gegenüber den Wildtyp-Mäusen (+/+; schwarzer Balken) und heterozygoten Varianten (+/-; gestrichelter Balken) nicht signifikant verändert.

3.5 Phänotypisierung der neu gebildeten Zellen

Um die weitere Differenzierung der überlebenden BrdU-positiven Zellen in NOS-III-Knockout- und Wildtypmäusen zu untersuchen, wurden die Gewebeschnitte einer immunhistochemischen Doppelmarkierung unterzogen. Einige Schnitte wurden mit Markern für BrdU und dem neuronalen Marker NeuN gefärbt. Des weiteren kam eine Doppelmarkierung mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen für BrdU und dem Astrocytenmarker GFAP zum Einsatz.

Es konnten Zellen, die sowohl BrdU als auch NeuN exprimierten, detektiert werden (Abb. 17). Dieses spricht für eine Differenzierung dieser neu gebildeten Zellen zu reifen Neuronen.

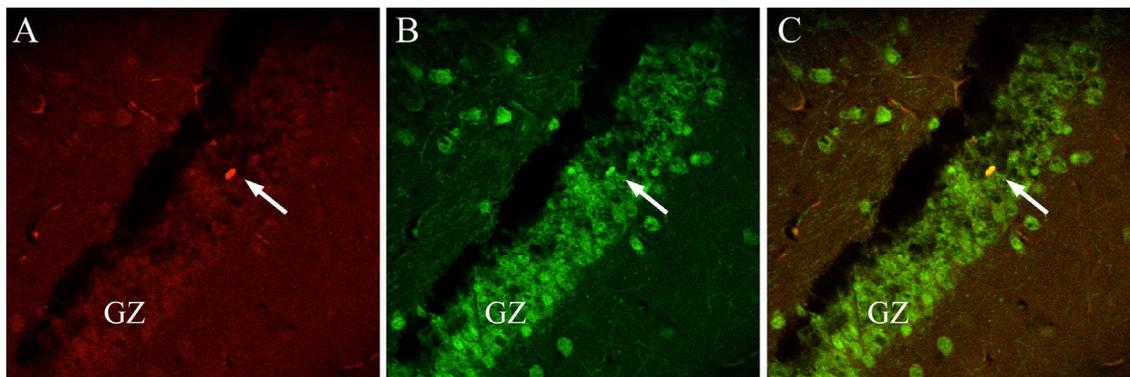


Abbildung 17: Doppel-Immunfluoreszenzfärbung eines Schnittes aus dem Survival-Versuch zum Nachweis von BrdU (rot) und NeuN, einem Marker adulter Neurone (grün). Das überlagerte Bild (C) zeigt eine für BrdU und NeuN doppelt markierte Zelle (gelb) in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus, was für einen neuronalen Phänotyp der neu gebildeten Zellen spricht.

Im Gegensatz dazu waren nahezu keine Zellen für BrdU und GFAP doppelt markiert (Abb. 18). Angesichts der äußerst geringen Anzahl BrdU / GFAP doppelt markierter Zellen erschien eine quantitative Analyse entbehrlich. Unterschiede im Färbeverhalten waren zwischen den NOS-III-Knockout-Mäusen und den entsprechenden Wildtypen nicht zu erkennen.

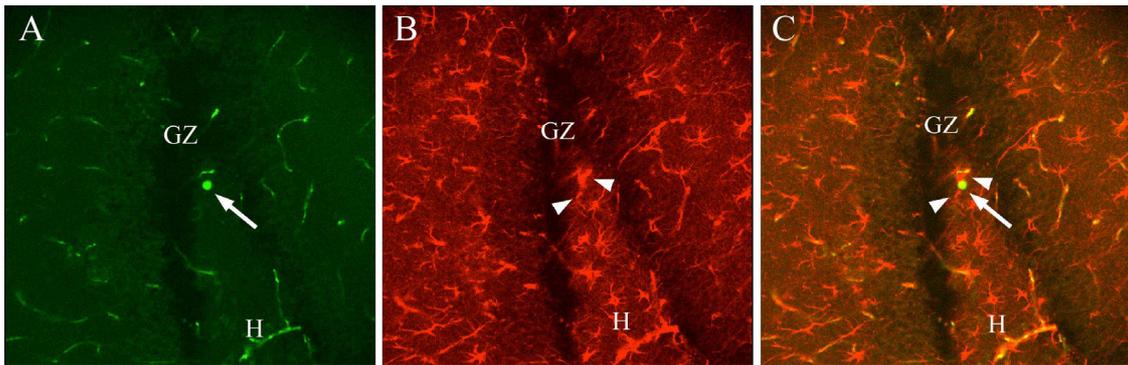


Abbildung 18: Immunfluoreszenzfärbung eines Schnittes aus dem Survival-Versuch zum Nachweis von BrdU (rot) und dem gliazellspezifischen Marker GFAP (grün). Gezeigt sind BrdU-positive Zellen (grün) und GFAP-exprimierende Astrocyten (rot) in der Hilusregion des Gyrus dentatus. Die Überlagerung der Einzelbilder (C) zeigt keine doppelmarkierten Zellen, was gegen einen astrozytären Phänotyp der Zellen spricht. Zu erkennen ist, dass die GFAP-positiven Fortsätze nicht von einem BrdU-positiven Zellkern ausgehen, viele GFAP-positive Astrocyten jedoch in der Nähe BrdU-positiver Zellkerne nachzuweisen sind.

3.6 Morphologischer Vergleich des Gyrus dentatus

Im Zusammenhang mit der quantitativen Bestimmung BrdU-immunreaktiver Zellen im Gyrus dentatus wurde in jedem immunhistochemisch gefärbten koronaren Gewebeschnitt die Fläche der Körnerzellschicht vermessen. Beginnend im frontalen Bereich des Gyrus dentatus und endend im dorsalen Abschnitt ergibt sich so ein charakteristisches Muster. Der Vergleich dieses Musters (Abb. 19) zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Phänotypen ($p > 0,05$ *wt* vers. *het* und *wt* vers. *Ko*; Students t-test).

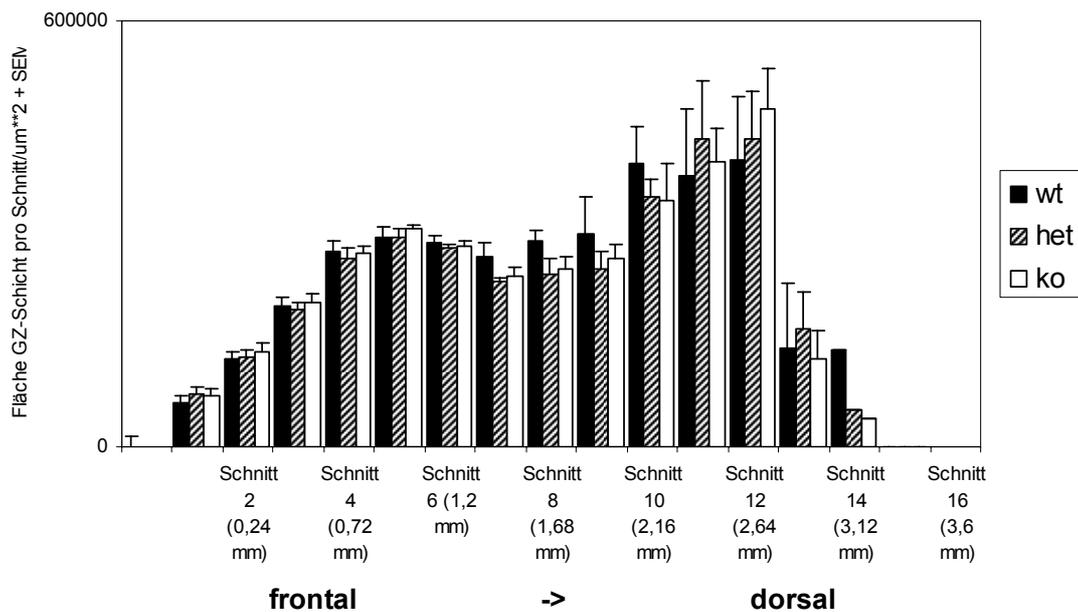


Abbildung 19: Größenvergleich der gemessenen SGZ-Fläche in den verschiedenen Schnittebenen.

4 Diskussion

Die Ergebnisse der Proliferationsversuche zeigen, dass bei NOS-III-KO-Mäusen die Proliferationsrate neuronaler Stammzellen reduziert ist. Die Survivalrate neu gebildeter Zellen nach vier Wochen ist bei NOS-III-KO-Mäusen und NOS-III-WT-Mäusen jedoch annähernd gleich. Diese Resultate legen nahe, dass NOS-III die Proliferation neuronaler Stammzellen stimuliert, während das Überleben der Zellen (= *Survival*) unbeeinflusst bleibt. NOS-III scheint also eine komplexe Rolle in der Steuerung der Neurogenese zu spielen.

4.1 Die Steigerung der Neurogenese durch NOS-III könnte durch VEGF vermittelt sein

NOS-III-Knockout-Mäuse leiden häufiger als die entsprechenden Kontrollen an Herzerkrankungen und angeborenen Herz-/Septumdefekten [105]. Vermutlich sind diese pathologischen Veränderungen durch eine reduzierte Kapillardichte des Myokards und verminderte Angiogenese [113] hervorgerufen. Als zugrunde liegender Mechanismus wurde eine reduzierte Expression von VEGF in NOS-III-Knockout-Mäusen postuliert und belegt [113]. Dieser Effekt von NO auf VEGF wird womöglich durch die Aktivierung der Proteinkinase Akt und dadurch ausgelöste downstream-Mechanismen hervorgerufen [114]. Die Ausschaltung von NOS-III führt zu einer Reduktion der VEGF Expression im Hippocampus [115]. Umgekehrt stimuliert VEGF die Produktion von NO durch verstärkte Expression von NOS-III [116], Dephosphorylierung an Ser116 [117] und Akt-vermittelte Phosphorylierung an Ser1177 von NOS-III [118-120]. Beides führt zur Enzymaktivierung. NOS-III und VEGF verstärken sich somit gegenseitig .

Neben seiner wichtigen Rolle in der embryonalen Morphogenese des Gehirns [121] stimuliert VEGF die AN über verschiedene Wege, z.B. die

Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie [122]. Dieser Effekt wurde sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen. *In vitro* konnte nach Gabe von VEGF ein Anstieg der Neurogeneserate um 20-30% gezeigt werden [123]. Das entspricht den Ergebnissen dieser Arbeit über den Anstieg der Proliferation von Progenitorzellen bei NOS-III-Knockout-Mäusen. In einer Studie von Maurer et al. wurde das Vorhandensein von VEGF und dessen Rezeptoren auf neuronalen Stammzellen gezeigt, was für eine direkte Interaktion von VEGF und neuronalen Progenitorzellen spricht. Wird die Expression von VEGF komplett unterbunden, versiegt auch die durch eine reizreiche Umgebung erreichte Induktion der adulten Neurogenese völlig [124]. Dies legt nahe, dass der Effekt von reizreicher Umgebung auf die Neurogenese und das Lernen durch VEGF vermittelt wird.

In diesem Zusammenhang wurde kürzlich auch berichtet, dass NO und VEGF einen synergistischen Effekt auf die Atorvastatin-induzierte Angiogenese haben. Dieses stellt unter anderem selbst auch einen indirekten NO-Donor dar und fördert ebenfalls die Neurogenese. Atorvastatin aktiviert via Phosphorylierung von Akt und ERK die posttranskriptionelle Aktivierung von NOS-III [125]. Die Elektrokonvulsionstherapie (EKT) steigert auf dem gleichen Weg die Neurogeneserate [125]. In Übereinstimmung hiermit konnte gezeigt werden, dass den Wachstumsfaktoren FGF-2, NGF und IGF-1 neurotrophische und neuroprotektive Eigenschaften zukommen. Diese greifen steuernd in die NO-Signaltransduktionskaskade ein [125]. Sehr interessant sind in diesem Zusammenhang auch Studien, die zeigen, dass EKT – eine die AN steigernde Maßnahme [126, 127] – die Expression von VEGF [128] steigert und damit auch das Wachstum von Endothelzellen sowie Angiogenese induziert [129]. Dies ist ein weiteres Indiz für das enge Zusammenspiel zwischen antidepressiver Therapie, Angiogenese, adulten Neurogenese und einer Schlüsselfunktion von VEGF (Abb. 20).

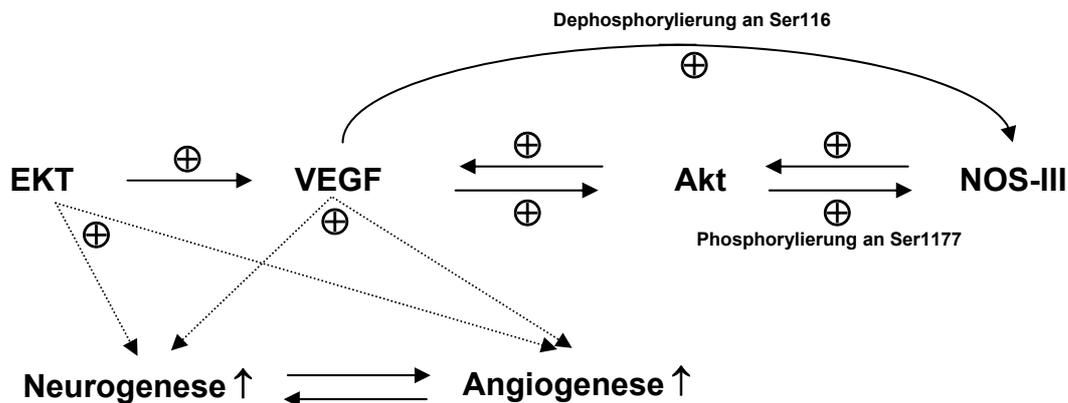


Abbildung 20: VEGF und NOS-III verstärken sich in ihrer Wirkung gegenseitig und stimulieren die AN im Gyrus dentatus.

Die Ausschaltung von NOS-III in den Knockout-Tieren führt zu verminderter hippocampaler Expression von VEGF und bewirkt damit eventuell eine Verminderung der Neurogenese. EKT hingegen induziert die Expression von VEGF. Dadurch werden Neurogenese und Angiogenese stimuliert, was eine Expressionssteigerung von NOS-III zur Folge hat und wiederum über VEGF die Neurogenese steigert. Eingebunden in diesen Mechanismus sind vermutlich Akt und NOS-III Phosphorylierung.

4.2 Gefäßsystem und Neurogenese

Eine mögliche alternative Erklärung für einen negativen Effekt des NOS-III-Genotyps auf die AN könnte der veränderte Blutdruck sein, da NOS-III-Knockout-Mäuse zu spontaner Hypertension neigen [112]. Zur Zeit gibt es allerdings keinen Beweis für einen Einfluss von Hypertension auf AN. Lokale Minderperfusion aufgrund endothelialer Dysfunktionen kann ebenso nicht ausgeschlossen werden, doch sind bis dato keine entsprechenden neuropathologischen Schäden bei NOS-III-Knockout-Mäusen nachgewiesen worden [130]. In aktuellen Studien wird eine räumliche Nähe von Orten, wo AN stattfindet, zu Blutgefäßen und damit Endothelzellen beschrieben [104]. Endothel ist reich an NOS-III. Wenn man davon ausgeht, dass NO Einflüsse

auf Neurogenese vermittelt, könnte NO gut der von Palmer et al. 2000 [104] und Shen et al. 2004 [131] postulierte „*endothelium-derived neural growth factor*“ sein. Diese Überlegung wird durch die lokale Verteilung von NOS-III gestützt, welches im Endothel nahe den BrdU-gefärbten Zellen zu finden ist.

4.3 Der Einfluss von NOS-III auf die adulte Neurogenese im Vergleich zu NOS-I und NOS-II

Die Ergebnisse von Studien über pharmakologische Verfahren und die Tatsache, dass Ischämie oder Adrenalektomie eine gesteigerte Neurogenese hervorruft [82-84, 86], decken sich mit dem stimulierenden Effekt von NOS-III auf die Proliferation von Progenitorzellen. Die durch Ischämie hervorgerufene Steigerung der Neurogenese scheint jedoch durch NOS-II vermittelt zu werden. Die basale Rate der Neurogenese bleibt jedoch vom NOS-II Genotyp unabhängig [86]. Da NOS-II die einzige NOS-Isoform ist, die schnell bereitgestellt werden kann, wäre nur durch sie eine zügig vermittelte Steigerung der Neurogenese z.B. im Ischämiefall zu bewerkstelligen. Da normalerweise keine NOS-II in cerebralem Gewebe zu finden ist, muss die endogene, basale Stimulation der Neurogenese auf anderen Mechanismen beruhen. NO von anderen NOS-Isoformen könnte – genau wie NO von NOS-II – die Proliferation der neuronalen Progenitorzellen beeinflussen.

Studien von Park et al. [84, 132] zeigten jedoch, dass AN durch Adrenalektomie mit gleichzeitiger Gabe des quasi-selektiven NOS-I-Inhibitors 7-Nitroindazol sowie die dauerhafte Gabe von 7-Nitroindazol alleine zu einer erhöhten Proliferationsrate führt. In keiner der beiden Studien wurde die Survivalrate gemessen. Neue Beobachtungen von Mattson [133] zeigten durch *in vivo*- und *in vitro*-Daten, dass NO von NOS-I Stammzell-Proliferation hemmt, die Differenzierung von Progenitorzellen zu Neuronen jedoch verstärkt. Dieses geschieht in positiver Rückkopplung mit BDNF. NOS-I scheint seinen Effekt

durch das Umschalten der Progenitorzellen von Proliferation auf terminale Differenzierung zu erreichen. NOS-III könnte die Differenzierung der Progenitorzellen auf ähnliche Weise wie NOS-I beeinflussen, was zur Zeit jedoch weder bewiesen noch widerlegt werden kann.

Packer et al. berichteten, dass eine nichtspezifische Hemmung von NOS und NOS-I-Knockout zu gesteigerter Neurogenese führen [134], was einen hemmenden Effekt von NOS-I auf die Neurogenese nahe legen würde. Diese Ergebnisse scheinen genau gegensätzlich zu den Resultaten dieser Arbeit zu sein. Während NOS-I überwiegend in Interneuronen lokalisiert ist, findet man NOS-III jedoch wie beschrieben vor allem in Blutgefäßen. Somit könnte aus räumlicher Sicht nur NOS-III, nicht jedoch NOS-I das Potential haben, neuronale Stammzellen auf direktem Wege zu beeinflussen. Demnach könnten zellspezifische Expression und unterschiedliche Verteilung der NOS-Isoformen im Gewebe zu unterschiedlichen Wirkungsweisen der Regulation adulter Neurogenese führen. Möglicherweise sind zwei verschiedene Regelkreise entscheidend:

NOS-I ↔ BDNF [133, 134]

und

NOS-III ↔ VEGF (s.o.).

Die Tatsache, dass nur eine chronische (15 d), nicht jedoch eine akute Hemmung von NOS einen stimulierenden Effekt auf die Proliferation von neuronalen Stammzellen hat, könnte dafür sprechen, dass in diesem Zusammenhang neuroadaptive Prozesse eine weitaus größere Rolle spielen als die Hemmung von NOS alleine. Alle Ergebnisse zusammen sprechen jedoch für eine wichtige Rolle von NO in der Regulation der adulten Neurogenese.

Trotz seines Effektes auf die Proliferation von Progenitorzellen hat NOS-III keine Auswirkungen auf die Nettosumme überlebender neu gebildeter

neuronaler Zellen. Proliferation, Survival und Migration neugeborener Zellen werden durch verschiedene Mechanismen vermittelt [14], weshalb eine getrennte Analyse dieser Prozesse durchgeführt werden muss, um den Vorgang und die Regulation der AN in verschiedene Stadien zu unterteilen. Die gezeigten Ergebnisse sprechen für eine Rolle von NOS-III bei der Proliferation neuronaler Progenitorzellen, was in gefäßnaher Umgebung wichtig sein könnte [135], da NO seine Wirkung nur über kurze Distanzen erzielen kann. Die Feinabstimmung von Survival, Migration und Differenzierung unterliegt jedoch sicherlich noch weiteren, komplexen Regulationsmechanismen, die es noch zu erforschen gilt.

4.4 Adulte Neurogenese und Depression

Die Ergebnisse dieser Arbeit führen zu der Frage, ob die AN – wie von Kempermann und Kronenberg vorgeschlagen [136] – Einfluss auf die Patophysiologie der Depression hat. Ein Anstieg der adulten Neurogenese könnte der Schlüssel oder wenigstens ein Beitrag zum entscheidenden Mechanismus antidepressiver Therapie sein [55]. Die starke Reduktion der adulten Neurogenese bei NOS-III-Knockout-Mäuse würde dann mit der Veränderung bestimmter Verhaltensweisen einhergehen, die bei Tieren als modellhaft für Depressionen gewertet werden. Das Gegenteil ist aber der Fall. Im so genannten „*Forced Swim Test*“ zeigten sich keine Unterschiede. In dem „Erlernte Hilflosigkeit“-Paradigma zeigten sich die NOS-III-Knockout-Mäuse sogar weniger hilflos [115]. Dieses Paradigma testet das erlernte Fluchtverhalten nach mehrfacher Verabreichung eines elektrischen Reizes. Beim Angstverhalten unterschieden sich diese Knockout-Tiere nicht signifikant von den Wildtyp-Varianten [130, 137]. Auffällig ist jedoch die deutlich reduzierte Aggression von männlichen NOS-III-Knockout-Mäusen. Zusammenfassend sind NOS-III-Knockout-Mäuse somit weniger aggressiv, lernen besser und zeigen weniger „depressives“ Verhalten.

Dieses spricht im Zusammenhang mit der reduzierten Proliferation neuronaler Progenitorzellen bei den Versuchstieren nicht für einen Einfluss der adulten Neurogenese auf die Pathophysiologie der Depression. Fraglich ist allerdings, ob das „Depressions-Modell“ Maus tatsächlich auf den Menschen übertragbar ist [138]. Das Ausmaß der Reduktion der adulten Neurogenese bei NOS-III-Knockout-Mäusen könnte auch zu gering sein, um Depressions-ähnliche Verhaltensweisen zu fördern. Denkbar wäre zudem, dass in diesem Zusammenhang anstelle der Proliferation die Survivalrate, die in dieser Arbeit keinen signifikanten Unterschied zeigte, entscheidend ist. Diese Punkte erklären aber weder die verminderte „Hilflosigkeit“, noch das verbesserte Lernvermögen. Ratten, die mehr BrdU-positive Zellen aufweisen, zeigten besseres Lernverhalten [139]. Umgekehrt führten die angewendeten Lerntest zu gesteigerter adulter Neurogenese [140]. Folglich ist der Zusammenhang von adulter Neurogenese und Lerneffizienz nicht linear, sondern weitaus komplexer. Dieses könnte sich auch für den Zusammenhang von Neurogenese und depressiven Erkrankungen bewahrheiten. Gegen eine Beteiligung der AN in der Pathogenese depressiver Erkrankungen sprechen jedoch auch neue Ergebnisse aus einer Studie mit humanem Gewebe. Mithilfe eines neu entwickelten Antikörpers gegen Proteinkinase-67 (Ki-67), einem Marker für Stammzellproliferation, konnte die erste Phase der adulten Neurogenese im Postmortem-Gewebe von an unipolarer Depression leidenden Patienten quantifiziert werden [141]. Die Proliferation neuronaler Stammzellen war hier aber gerade nicht reduziert. Die depressive Episode der Patienten wurde zu Lebzeiten durch therapeutische Maßnahmen wie Medikation oder EKT behandelt. Ein möglicherweise positiver Einfluss dieser Therapieverfahren auf die Proliferation neuronaler Stammzellen lässt jedoch keine eindeutigen Schlussfolgerungen aus diesen Ergebnissen zu, wobei jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Patienten festzustellen war. Zusammenfassend sprechen die bisherigen Ergebnisse aus Humanstudien also nicht für eine Reduktion der adulten Neurogenese bei depressiven Erkrankungen.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, einen möglichen Effekt von NOS-III auf die adulte Neurogenese (AN) zu erforschen. Einige Hinweise, wie z.B. die Expression dieses Enzyms im Endothel und die damit verbundene räumliche Nähe zu neuronalen Stammzellen, weisen darauf hin, dass dieses Enzym und das von ihm synthetisierte NO das Potential besitzen, die AN zu beeinflussen. Für die vorliegende Untersuchung wurden deshalb die Gehirne von NOS-III-Knockout-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen und den für dieses Gen heterozygoten Mäusen auf Proliferation und Survival neuronaler Stammzellen im Bereich des Gyrus dentatus untersucht.

Die Auswertung der Ergebnisse zeigte eine signifikant (23%) verringerte Proliferationsrate bei NOS-III-Knockout-Mäusen. Bei den Werten für die Survivalrate gab es jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen. Die Doppelmarkierung der Gehirnschnitte mittels Konfokalmikroskopie und Antikörpern gegen BrdU, den neuronalen Marker NeuN bzw. den Astrozytenmarker GFAP zeigten, dass die neu gebildeten Zellen vorwiegend zu reifen Neuronen und kaum zu Astrozyten differenzierten. Geschlechtsspezifische Unterschiede wurden ebenso wenig beobachtet wie morphologische Unterschiede im Gyrus dentatus.

6 Literaturverzeichnis

1. Altmann, J., *Autoradiographik and histologic evidence of postnatal neurogenesis in rats*. J Comp Neurol, 1965. **124**: p. 319-335.
2. Goldmann, S. and F. Nottebohm, *Neuronal production, migration and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain*. Proc Acad Sci USA, 1983. **80**: p. 2390-2394.
3. Barnea, A. and F. Nottebohm, *Recruitment and replacement of hippocampal neurons in young and adult chickadees: an addition to the theory of hippocampal learning*. Proc Natl Acad Sci USA, 1996. **93**: p. 714-8.
4. Barnea, A. and F. Nottebohm, *Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees*. Proc Natl Acad Sci USA, 1994. **91**: p. 11217-11221.
5. Kirn, J., et al., *Cell death and neuronal recruitment in the high vocal center of adult male canaries are temporally related to changes in song*. Proc Natl Acad Sci USA, 1994. **19**: p. 7844-7848.
6. Nottebohm, F., *Birdsong as a model in which to study brain processes related to learning*. Condor, 1984. **86**: p. 227-236.
7. Gould, E., et al., *Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation*. J Neurosci, 1997. **17**: p. 2492-2498.
8. Gould, E., et al., *Neurogenesis in the neocortex of adult primates*. Science, 1999. **286**: p. 548.
9. West, M., *Regional specific loss of neurons in the aging human hippocampus*. Neurobiol Aging, 1993. **14**: p. 287-293.
10. West, M., et al., *Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal aging and Alzheimer's disease*. Lancet, 1994. **344**: p. 769-772.
11. Kirschenbaum, B., et al., *In vitro neuronal production and differentiation by precursor cells derived from the adult human forebrain*. Cerebral Cortex, 1994. **6**: p. 576-589.
12. Eriksson, P., et al., *Neurogenesis in the adult human hippocampus*. Nature, 1998. **4**: p. 1313-1317.
13. del Rio, J. and E. Soriano, *Immunohistochemical detection of 5' bromodeoxyuridine incorporation in the central nervous system of the mouse*. Dev Brain Res, 1989. **49**: p. 311.

14. Duman, R.S., J. Malberg, and S. Nakagawa, *Regulation of adult neurogenesis by psychotropic drugs and stress*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **299**: p. 401-7.
15. Alvarez-Buylla, A. and C. Lois, *Neuronal stemcells in the brain of adult vertebrates*. Stem Cells, 1995. **13**: p. 263-272.
16. Lois, C. and A. Alvarez-Buylla, *Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia*. Proc Natl Acad Sci USA, 1993. **90**: p. 2074-2077.
17. Lois, C., J. Garcia-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla, *Chain migration of neuronal precursors*. Science, 1996. **271**: p. 978-981.
18. Cameron, H., et al., *Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat*. Neurosci, 1993. **56**: p. 337-344.
19. Kaplan, M., *Formation and turnover of neurons in young and senescent animals: an electromicroscopic and morphometric analysis*. Ann N Y Acad Sci, 1985. **457**: p. 173-192.
20. Parent, J., et al., *Dentate granular cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus*. J Neurosci, 1997. **17**: p. 3727-3738.
21. Stanfield, B. and J. Trice, *Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections*. Exp Brain Res, 1988. **72**: p. 399-406.
22. Kuhn, H.G., H. Dickinson-Anson, and F.H. Gage, *Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation*. J Neurosci, 1996. **16**: p. 2027-33.
23. Bayer, S., J. Yackel, and P. Puri, *Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life*. Science, 1982. **216**: p. 890-892.
24. Kempermann, G., H. Kuhn, and F. Gage, *Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice*. Proc Natl Acad Sci USA, 1997. **94**: p. 10409-10414.
25. Malberg, J., et al., *Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus*. J Neurosci, 2000. **20**: p. 9104-9110.
26. Corotto, F., W. CS., and J. Maruniak, *Odor deprivation leads to reduced neurogenesis and reduced neuronal survival in the olfactory bulb of the adult mouse*. Neurosci, 1994. **61**: p. 739-744.
27. Kempermann, G., H. Kuhn, and F. Gage, *More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment*. Nature, 1997. **386**: p. 493-495.
28. VanPraag, H., *Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus*. Nature Neurosci, 1999. **3**: p. 266-270.

29. Nottebohm, F., *Why are some neurons replaced in adult brain?* J Neurosci, 2002. **22**: p. 624-628.
30. Kirschenbaum, B. and S. Goldmann, *Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival of neurons arising from the adult rat forebrain subependymal zone.* Proc Natl Acad Sci USA, 1995. **92**: p. 210-214.
31. Pencea, V., et al., *Infusion of brain derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus and hypothalamus.* J Neurosci, 2001. **21**: p. 6706-6717.
32. Tanapat, P., et al., *Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat.* J Neurosci, 1999. **19**: p. 5792-5801.
33. Davies, A., *The role of neurotrophins in the developing nervous system.* J Neurobiol, 1994. **25**: p. 1334-1348.
34. Vicario-Abejon, C., C.T. Collin, P., and R. McKay, *Hippocampal stem cells differentiate into excitatory and inhibitory neurons.* Eur J Neurosci, 2000. **12**: p. 677-688.
35. Vicario-Abejon, C., et al., *Functions of basic fibroblast growth factor and neurotrophins in the differentiation of hippocampal neurons.* Neuron, 1995. **15**: p. 105-114.
36. Shetty, A. and D. Turner, *In vitro survival and differentiation of neurons derived from epidermal growth factor-responsive postnatal hippocampal stem cells: inducing effects of brain-derived neurotrophic factor.* J Neurobiol, 1998. **35**: p. 395-425.
37. Takahashi, J., T. Palmer, and F. Gage, *Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived stem cell cultures.* J Neurobiol, 1999. **38**: p. 65-81.
38. Linnarsson, S., C. Wilson, and P. Ernfors, *Cell death in regenerating populations of neurons in BDNF mutant mice.* Mol Brain Res., 2000. **75**: p. 61-69.
39. Zigova, T., et al., *Intravascular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb.* Mol Cell Neurosci, 1998. **11**: p. 234-245.
40. Liu, J., et al., *Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils.* J Neurosci, 1998. **18**: p. 7768-7778.
41. Takagi, Y., et al., *Proliferation of neuronal precursor cells in the dentate gyrus is accelerated after transient forebrain ischemia in mice.* Brain Res., 1999. **831**: p. 283-287.
42. Kee, N., E. Preston, and J. Wojtowicz, *Enhanced neurogenesis after transient global ischemia in the dentate gyrus of the rat.* Exp Brain Res, 2001. **136**: p. 313-320.

43. Sun, Y., et al., *VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis and angiogenesis after focal cerebral ischemia*. J Clin Invest, 2003. **111**: p. 1843-1851.
44. Czeh, B., T. Welt, and A. Fischer, *Chronic psychosocial stress and concomitant repetitive transcranial magnetic stimulation: effects on stress hormone levels and adult hippocampal neurogenesis*. Biol Psychiat, 2002. **52**: p. 1057-1065.
45. Lemaire, V., M. Koehl, and M. Le Moal, *Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus*. Proc Acad Sci USA, 2000. **97**: p. 11032-11037.
46. Coe, C., M. Kramer, and B. Czeh, *Prenatal stress diminishes neurogenesis in the dentate gyrus of juvenile rhesus monkeys*. Biol Psychiatry, 2003. **54**: p. 1025-1034.
47. Whitaker-Azmita, P., *Role of serotonin and other neurotransmitter receptors in brain development*. Pharmacol Rev, 1991. **43**: p. 553-561.
48. Yan, W., C. Wilson, and J. Haring, *5HT_{1A}-receptors mediate the neurotrophic effect of serotonin on developing dentate granule cells*. Brain Res Dev Brain Res, 1997. **98**: p. 185-190.
49. Mazer, C., et al., *Serotonin depletion during synaptogenesis leads to decreased synaptic density and learning deficits in the adult rat: a possible model of neurodevelopmental disorders with cognitive deficits*. Brain Res, 1997. **760**: p. 68-73.
50. Takuwa, N., et al., *Studies of the mitogenic effect of serotonin in rat renal mesangial cells*. Am J Physiol, 1989. **257**: p. F431-439.
51. Jacobs, B., et al., *Serotonin stimulates the production of new hippocampal granule neurons via 5HT_{1A} receptor in the adult rat*. Soc Neurosci Abstr, 1998. **23**: p. 1992.
52. Brezun, B. and A. Daszuta, *Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats*. Neurosci, 1999. **89**: p. 999-1002.
53. Radley, J. and B. Jacobs, *5-HT_{1a}-receptor antagonist administration decreases cell proliferation in the dentate gyrus*. Brain Res, 2002. **955**: p. 264-267.
54. Jacobs, B. and C. Fornal, *Chronic fluoxetine treatment increases hippocampal neurogenesis in rats: a novel theory of depression*. Soc Neurosci Abstr, 1999. **23**: p. 1992.
55. Santarelli, L., et al., *Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants*. Science, 2003. **301**: p. 805-9.
56. Eisch, A., et al., *Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus*. Proc Natl Acad Sci, 2000. **97**: p. 7579-7584.
57. Kempermann, G., *Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis*. J Neurosci, 2002. **22**: p. 635-8.

58. Aimone, J.B., J. Wiles, and F.H. Gage, *Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories*. Nat Neurosci, 2006. **9**: p. 723-7.
59. Hyman, B., et al., *Relative sparing of nitric oxide synthase-containing neurons in the hippocampal formation in Alzheimer's disease*. Ann Neurol, 1992. **32**: p. 818-820.
60. Mitchell, I., A. Cooper, and M. Griffiths, *The selective vulnerability of striatopallidal neurons*. Prog Neurobiol, 1999. **59**(59): p. 691-719.
61. Curtis, M., et al., *Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain*. Proc Natl Acad Sci USA, 2003. **100**: p. 9023-7.
62. Jin, K., et al., *Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease*. Proc Natl Acad Sci USA, 2004. **101**: p. 343.
63. Herrera, D., A. Yague, and S. Johnsen-Soriano, *Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: protective effects of an antioxidant*. Proc Acad Sci USA, 2003. **100**: p. 7919-7924.
64. Nixon, K. and F. Crews, *Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in the adult rat hippocampus*. J Neurochem, 2002. **83**: p. 1087-1093.
65. Abrous, D., W. Adriani, and M. Montaron, *Nicotine self-administration impairs hippocampal plasticity*. J Neurosci, 2002. **22**: p. 3656-3662.
66. Arango, C., B. Kirkpatrick, and J. Kroenig, *At issue: stress, hippocampal neuronal turnover, and neuropsychiatric disorders*. Schizophr Bull, 2001. **27**: p. 477-480.
67. Gurvits, T.V., et al., *Magnetic resonance imaging study of hippocampal volume in chronic, combat-related posttraumatic stress disorder*. Biol Psychiat, 1996. **40**: p. 1091-9.
68. Sheline, Y.I., et al., *Hippocampal atrophy in recurrent major depression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**: p. 3908-13.
69. Zhao, M., et al., *Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**: p. 7925-30.
70. Stryer, L., *Biochemistry*. 4 ed. Vol. 1. 1996, New York: Freeman and Company.
71. Schmidt, H. and U. Walter, *NO at work*. Cell, 1994. **78**: p. 919-925.
72. Petros, A., D. Bennet, and P. Vallance, *Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock*. Lancet, 1991. **338**: p. 1557-1558.
73. Harrison, D., *Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction*. J Clin Invest, 1997. **100**: p. 2153-2157.

74. Brett, D.S. and S.H. Snyder, *Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium*. *Neuron*, 1994. **13**: p. 301-313.
75. Contestabile, A., *Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development*. *Brain Res Rev*, 2000. **32**: p. 476.
76. Roskams, A.J., et al., *Nitric oxide mediates the formation of synaptic connections in developing and regenerating olfactory receptor neurons*. *Neuron*, 1994. **13**: p. 289-299.
77. Williams, C.V., D. Nordquist, and S.C. McLoon, *Correlation of nitric oxide synthase expression with changing patterns of axonal projections in the developing visual system*. *J Neurosci*, 1994. **14**: p. 1746-1755.
78. Snyder, J.S., N. Kee, and J.M. Wojtowicz, *Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus*. *J Neurophysiol*, 2001. **85**: p. 2423-31.
79. Kiss, J. and E. Vizi, *Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission*. *Trends Neurosci*, 2001. **24**: p. 211-215.
80. Kilic, F., D. Murphy, and G. Rudnick, *A human serotonin transporter mutation causes constitutive activation of transport activity*. *Mol Pharmacol*, 2003. **64**.
81. Jablonka-Shariff, A. and L.M. Olson, *The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes*. *Soc Endocrine*, 1998. **139**: p. 2944-2954.
82. Zhang, R., et al., *A nitric oxide donor induces neurogenesis and reduces functional deficits after stroke in rats*. *Ann Neurol*, 2001. **50**: p. 602-11.
83. Arvidsson, A., Z. Kokaia, and O. Lindvall, *N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke*. *Eur J Neurosci*, 2001. **14**: p. 10-8.
84. Park, C., et al., *Inhibition of neuronal nitric oxide synthase increases adrenalectomy-induced granule cell death in the rat dentate gyrus*. *Brain Res*, 2002. **933**: p. 81-4.
85. Moreno-Lopez, B., et al., *Morphological bases for a role of nitric oxide in adult neurogenesis*. *Brain Res*, 2000. **869**: p. 244-50.
86. Zhu, D., et al., *Expression of inducible nitric oxide synthase after focal cerebral ischemia stimulates neurogenesis in the adult rodent dentate gyrus*. *J Neurosci*, 2003. **23**: p. 223-229.
87. Alderton, W., C. Cooper, and R. Knowles, *Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition*. *Biochem J*, 2001. **357**: p. 593-615.
88. Alderton, W., C. Cooper, and R. Knowles, *Nitric oxide synthases: structure, funktion and inhibition*. *Biochem J*, 2001. **357**: p. 593-615.

89. Thomas, M. and O. Feron, *Nitric oxide synthetase which, where, and why?* J Clin Invest, 1997. **100**: p. 2146-2151.
90. Huang, P.L., *Neuronal and endothelial nitric oxide synthase gene knockout mice.* Braz J Med Biol Res, 1999. **32**: p. 1353-1359.
91. Zhu, D., et al., *Inducible nitric oxide synthase expression in the ischemic core and penumbra after focal cerebral ischemia in mice.* Life Sci, 2002. **17**: p. 1985-1997.
92. Schmidt, H., U. Walter, and K. Kochsiek, *Bildung und Wirkung von Stickstoffmonoxid im vaskulären System.* Der Internist, 1997. **38**: p. 406-410.
93. Seidel, B., A. Stanarius, and G. Wolf, *Differential expression of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in blood vessels of the rat brain.* Neurosci Lett, 1997. **239**: p. 109-120.
94. Teichert, A., et al., *In vivo expression profile of an endothelial nitric oxide synthase promotor-receptor transgene.* Am J Physiol. Heart Circ Physiol, 2000. **278**: p. H1352-61.
95. van Haperen, R., et al., *Funktional expression of endothelial nitric oxide synthase fused to green fluorescent protein in transgenic mice.* Am J Pathol, 2003. **163**: p. 1677-86.
96. Burette, A., et al., *Synaptic localisation of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the hippocampus.* J Neurosci, 2002. **22**: p. 8961-70.
97. Dinerman, J., et al., *Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity.* Proc Natl Acad Sci USA, 1994. **91**: p. 4241-8.
98. Doyle, C.A. and P. Slater, *Localization of neuronal and endothelial nitric oxide synthase isoforms in human hippocampus.* Neurosci, 1997. **76**: p. 387-95.
99. O'Dell, T.J., et al., *Blockade of LTP by inhibitors of nitric oxide synthase (NOS) in mice lacking neuronal NOS suggests a role for endothelial NOS.* Science, 1994. **265**: p. 542-546.
100. Gabbott, P. and S. Bacon, *Localisation of NADPH diaphorase activity and NOS immunoreactivity in astroglia in normal adult rat brain.* Brain Res, 1996. **714**: p. 135-144.
101. Luth, H., G. Munch, and T. Arendt, *Aberrant expression of NOS isoforms in Alzheimer's disease is structurally related to nitrotyrosine formation.* Brain Res, 2002. **953**: p. 135-143.
102. Chiang, L., et al., *Nitric oxide synthase expression in single hippocampal neurons.* Brain Res Mol Brain Res, 1994. **27**: p. 183-8.
103. Wiencken, A. and V.A. Casagrande, *Endothelial nitric oxide synthetase (eNOS) in astrocytes: another source of nitric oxide in neocortex.* Glia, 1999. **26**: p. 280-290.

104. Palmer, T.D., A.R. Willhoite, and F.H. Gage, *Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis*. J Comp Neurol, 2000. **425**: p. 479-94.
105. Feng, Q., et al., *Development of heart failure and congenital septal defects in mice lacking endothelial nitric oxide synthase*. Circulation, 2002. **106**: p. 873-879.
106. Huang, P.L., et al., *Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase*. Nature, 1995. **377**: p. 239-242.
107. Strauss, H.M., et al., *Blood-pressure control in eNOS knock-out mice: comparison with other species under NO blockade*. Acta Physiol Scand, 2000. **168**: p. 155-160.
108. Son, H., et al., *Long-term potentiation is reduced in mice that are double mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase*. Cell, 1996. **87**: p. 1015-1023.
109. Frisch, C., et al., *Superior water maze performance and increase in fear-related behavior in the endothelial nitric oxide synthase-deficient mouse together with monoamine changes in cerebellum and ventral striatum*. J Neurosci, 2000. **20**: p. 6694-700.
110. Olney, J., J. Newcomer, and N. Farber, *NMDA receptor hypofunktion model of schizophrenia*. J Psychiat, 1999. **33**: p. 523-533.
111. Chiavegatto, S. and R.J. Nelson, *Interaction of nitric oxide and serotonin in aggression behaviour*. Horm Behav, 2003. **44**: p. 233-41.
112. Huang, P.L., et al., *Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase*. Nature, 1995. **377**: p. 239-42.
113. Zhao, Y., K. Lu, and Q. Feng, *Deficiency in endothelial nitric oxide synthase impairs myocardial angiogenesis*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**: p. H2371-H2378.
114. Dulak, J. and A. Jozkowitz, *Regulation of vascular endothelial growth factor synthesis by nitric oxide: facts and controversis*. Antioxid Redox Signal, 2003. **5**: p. 123-132.
115. Reif, A., et al., *Differential effect of endothelial nitric oxide synthase (NOS-III) on the regulation of adult neurogenesis and behaviour*. Eur J Neurosci, 2004. **20**: p. 885-95.
116. Park, J., et al., *Expression and regulation of endothelial nitric oxide synthase by vascular endothelial growth factor in ECV 304 cells*. J Korean Med Sci, 2002b. **17**: p. 161-167.
117. Kou, R., D. Greif, and T. Michel, *Dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by vascular responses to cyclosporin*. Am J Biol Chem, 2002. **277**: p. 29669-29673.
118. Dimmler, S., et al., *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation*. Nature, 1999. **399**: p. 601-605.

119. Fulton, D., et al., *Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by protein kinase Akt*. Nature, 1999. **399**: p. 597-601.
120. Michhell, B., et al., *The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase*. Curr Biol, 1999. **9**: p. 845-848.
121. Raab, S., et al., *Impaired angiogenesis and neuronal apoptosis induced by conditional homozygous inactivation of vascular endothelial growth factor*. Thromb Haemost, 2004. **91**: p. 595-605.
122. Zhu, Y., et al., *Vascular endothelial growth factor promotes proliferation of cortical neuron precursors by regulating E2F expression*. FASEB J, 2003. **17**: p. 186-193.
123. Jin, K., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA, 2002. **99**: p. 11946-11950.
124. Cao, L., et al., *VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory*. Nat Genet, 2004. **36**: p. 827-35.
125. Chen, J., et al., *Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke*. Ann Neurol, 2003. **53**: p. 743-751.
126. Scott, B., J. Wojtowicz, and W. Burnham, *Neurogenesis in the dentate gyrus of the rat following electroconvulsive shock seizures*. Exp Neurol, 2000. **165**: p. 231-236.
127. Madsen, T., et al., *Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapie*. Biol Psychiat, 2000. **47**: p. 1043-1049.
128. Newton, S., et al., *Gene profile of electroconvulsive seizures: induction of neurotrophic and angiogenic factors*. J Neurosci, 2003. **23**: p. 10841-10851.
129. Hellsten, J., et al., *Electroconvulsive seizures induce endothelial cell proliferation in adult rat hippocampus*. Biol Psychiat, 2004. **55**: p. 420.
130. Demas, G.E., et al., *Elimination of aggressive behaviour in male mice lacking endothelial nitric oxide synthase*. J Neurosci, 1999. **19**: p. C1-C5.
131. Shen, Q., et al., *Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells*. Science, 2004. **304**: p. 1338-40.
132. Park, C., et al., *The chronic inhibition of nitric oxide synthase enhances cell proliferation in the adult rat hippocampus*. Neurosci Lett, 2003. **339**: p. 9-12.
133. Cheng, J., et al., *Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain*. Dev Biol, 2003. **258**: p. 319-333.
134. Packer, M., et al., *Nitric oxide negatively regulates mammalian adult neurogenesis*. Proc Natl Acad Sci USA, 2003. **100**: p. 9566-9571.

135. Palmer, R.M.J., A.R. Willhoite, and F. Gage, *Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis*. J Comp Neurol, 2000. **425**: p. 479-494.
136. Kempermann, G. and G. Kronenberg, *Depressed new neurons-adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression*. Biol Psychiat, 2003. **54**: p. 499-503.
137. Dere, E., et al., *Unaltered radial maze performance and brain acetylcholine of the endothelial nitric oxide synthase knockout mouse*. Neuroscience, 2001. **107**: p. 561-70.
138. Cryan, J.F. and C. Mombereau, *In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice*. Mol Psychiat, 2004. **9**: p. 326-57.
139. Dobrossy, M.D., et al., *Differential effects of learning on neurogenesis: learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date*. Mol Psychiat, 2003. **8**: p. 974-82.
140. Ambrogini, P., et al., *Learning may reduce neurogenesis in adult rat dentate gyrus*. Neurosci Lett, 2004. **359**: p. 13-6.
141. Reif, A., et al., *Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia but not in depression*. Mol Psychiat, 2006. **11**: p. 514-22.

7 Abkürzungsverzeichnis

AK: Antikörper

AKT: Proteinkinase AKT

BDNF: brain derived neurotrophic factor

BrdU: 5-Bromo-2-Deoxyuridin

cAMP: Cyclisches Adenosinmonophosphat

Ca²⁺: Kalzium

CREB: cAMP response element-binding protein (Transkriptionsfaktor)

DAB: Diaminobenzidin

DNA: Desoxyribonucleinsäure

EKT: Elektrokonvulsionstherapie

GFAP: Glial fibrillary acidic protein

GTP: Guanosintriphosphat

5-HT: 5-Hydroxytryptamine (Serotonin)

MAP: Mikrotubuli-assoziierte Proteinkinase

NeuN: Neuron-specific nuclear protein

NMDA: N-methyl-D-aspartat

NOS: NO-Synthase

PBS: Phosphat buffered Saline

PKA: cAMP-dependent protein kinase

RT: Raumtemperatur (21°C)

Ser: Serotonin (5-Hydroxytryptamine)

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

ZNS: Zentrales Nervensystem

8 Publikationen

Reif A., Schmitt A., Fritzen S., Chourbaji S., **Bartsch C.**, Urani A., Wycislo M., Mossner R., Sommer C., Gass P., Lesch K.P., Differential effect of endothelial nitric oxide synthase (NOS-III) on the regulation of adult neurogenesis and behaviour. *Eur J Neurosci*, 2004. 20(4): p. 885-95.

Reif A., Schmitt A., Fritzen S., **Bartsch C.**, Sommer C., Lesch K.P. (2004), Endothelial nitric oxide synthase (NOS-III) knockout differentially affects the regulation of adult neurogenesis in mice; *European Neuropsychopharmacology* 14 (Suppl. 1), S8

Reif A., Schmitt A., Fritzen S., Urani A., Chourbaji S., Gass P., **Bartsch C.**, Sommer C., Lesch K.P. (2004), Endothelial Nitric Oxide Synthase (NOS-III) disruption differentially affects the regulation of adult neurogenesis; *International Journal of Neuropsychopharmacology* 7 (Suppl. 1), S362

9 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch für die Überlassung des interessanten Promotionthemas sowie Frau Prof. Dr. Claudia Sommer für die Übernahme des Koreferats.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Angelika Schmitt, Herrn Dr. med. Andreas Reif und Frau Dipl.-Biol. Sabrina Klein für die intensive fachliche Betreuung und ihre konstruktiven Anregungen, die im großen Maße zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Darüber hinaus möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des neurobiologischen Labors der psychiatrischen Universitätsklinik in Würzburg danken, die mich im Rahmen meiner Arbeit tatkräftig unterstützt haben. In diesem Zusammenhang sei speziell Frau Ingrid Fischer genannt, die mir stets zur Erklärung der technischen Geräte zur Seite stand.

10 Lebenslauf

Name: Colin Bartsch

Geburtstag: 10. Oktober 1975

Geburtsort: Gütersloh

Eltern: Monika Bartsch, Industriekauffrau
Jörg-Rainer Bartsch, Studiendirektor

Geschwister: Dr. med. dent. Nils Bartsch, Zahnarzt
Gunnar Bartsch, Student der
Wirtschaftsinformatik
Marit Ulrike Bartsch, Studentin der Medizin

Schullaufbahn:

1982 – 1986: Grundschule Pavenstädt in Gütersloh

1986 –1995: Evangelisch Stiftisches Gymnasium in
Gütersloh

Zivildienst:

1995-1996: Krankentransportdienst im St. Elisabeth
Hospital Gütersloh

Hochschulausbildung:

1996 – 2002: Studium der Zahnmedizin an der Julius-
Maximilians-Universität zu Würzburg

22.04.1998 Naturwissenschaftliche Vorprüfung

19.10.1999 Zahnärztliche Vorprüfung

13.06.2002 Zahnärztliche Prüfung

Famulatur:

2000 Hilfsprojekt und zahnärztliche Famulatur in
Brasilien

Berufstätigkeit:

2003 – 2005

Assistenz Zahnarzt in zahnärztlicher Praxis in
Riegel am Kaiserstuhl

Seit 10/2005

Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik
für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg /
Abteilung Zahnerhaltung

Würzburg, 02. Mai 2007

A handwritten signature in black ink on a light gray background. The signature is stylized and appears to consist of two parts: a cursive name on the left and a large, bold, geometric symbol on the right that resembles a stylized 'A' or a similar character.