Aktivitätsabhängige Regulation von Neurogenese im erwachsenen Hippocampus

HABILITATIONSSCHRIFT

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach
Experimentelle Neurologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

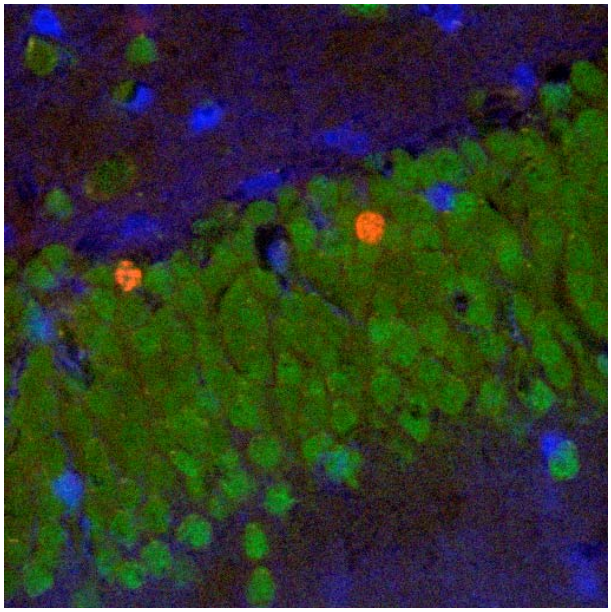
von Herrn Dr. med. Gerd Kempermann
geboren am 27. November 1965 in Köln-Lindenthal

Präsident: Prof. Dr. J. Mlynek
Dekan: Prof. Dr. J. W. Dudenhausen

Eingereicht: 25. April 2001
Datum der Habilitation: 29. Januar 2002

Gutachter: 1. Prof. Dr. O. Wiestler
2. Prof. Dr. M. Bähr

Für Uta.



Neugeborene Nervenzellen (gelb-orange) im Hippocampus einer erwachsenen Maus.

Inhaltsverzeichnis

1		**Einführung**	
	1.1	Einleitung und Kapitelübersicht	5
	1.2	Stammzellen	8
	1.3	Neurogenese im adulten Hippocampus	13
	1.4	Neurogene Permissivität	15
	1.5	Regulation adulter hippocampaler Neurogenese	18
2		**Aktivitätsabhängige Regulation adulter hippocampaler Neurogenese**	
	2.1	Vorbemerkungen und Übersicht	27
	2.2	Allgemeine genetische Determinanten adulter Neurogenese	29
	2.3	Aktivitätsabhängige Regulation adulter hippocampaler Neurogenese	37
	2.4	Aktivitätsabhängige Regulation adulter Neurogenese im alternden Hippocampus	40
	2.5	Genetischer Einfluß auf die aktivitätsabhängige Regulation adulter Neurogenese	46
	2.6	Wirkung von Langzeitreizen und Reizentzug in der aktivitätsabhängigen Regulation adulter Neurogenese	50
	2.7	Körperliche Aktivität fördert Zellteilungen und Neurogenese im erwachsenen Gyrus dentatus	62
3		**Diskussion und Ausblick**	
	3.1	Adulte hippocampale Neurogenese als Bestandteil zellulärer neuronaler Plastizität des erwachsenen Gehirns	68
	3.2	Adulte hippocampale Neurogenese und hippocampale Funktion	71
	3.3	Adulte hippocampale Neurogenese und neurologische Erkrankungen	72
	3.4	Stammzellbasierte Therapie für die Neurologie	76
4		**Schlußfolgerungen (Zusammenfassung)**	79
5		**Anhang**	
	5.1	Danksagungen	80
	5.2	Literaturverzeichnis	81

1 Einführung

1.1 Einleitung und Kapitelübersicht

An die Nutzung von Stammzellen als Grundlage zukünftiger neurologischer Therapie knüpfen sich große Erwartungen. Die Vorstellung, einen Verlust von Neuronen durch gezielte Neubildung von Nervenzellen ausgleichen zu können, ist konzeptionell unmittelbar einsichtig und kommt Idealen von kausaler Therapie sehr nahe. Theoretisch gibt es kaum eine neurologische Erkrankung, die wenn sie mit Zellverlust oder –degeneration einhergeht, nicht potentiell direkt oder indirekt von einem Zellersatz profitieren könnte. Dabei reicht das Spektrum theoretisch denkbarer Einsätze von relativ umschriebenen Neuronenverlusten wie beim Morbus Parkinson oder der Chorea Huntington über komplexere Ausfälle wie beim Morbus Alzheimer bis hin zu diffusen Ausfällen im Rahmen von Hypoxien und Ischämien. Große Hoffnungen knüpfen sich auch an den Ersatz der Neuroglia, so etwa myelinbildender Oligodendrocyten bei der Multiplen Sklerose. Schließlich gibt es Bestrebungen, die Kompatibilität transplantierter neuraler Stammzellen mit der zellulären Umgebung eines Empfängergehirns zu nutzen, um sie als genetisch modifizierte Zellen, die Wachstumsfaktoren oder andere wünschenswerten Faktoren produzieren, in das erkrankte Gehirn einzubringen (zur Übersicht siehe beispielsweise [55, 165]).

Es bestehen heute schon vergleichsweise große Erfahrungen mit der Transplantation von unreifem fetalem Gewebe aus dem ventralen Mesencephalon in das Corpus striatum von Parkinsonpatienten [22], und erste experimentelle Therapien dieser Art sind auch mit einigem Erfolg bei Patienten mit Chorea Huntington durchgeführt worden [5]. Der Therapieerfolg bei diesen Studien war zwar weder einheitlich noch durchschlagend, der Beweis der grundsätzlichen Machbarkeit aber wurde so geführt. Es ist zu vermuten, jedoch bis heute nicht schlüssig gezeigt, daß die im Transplantat enthaltenen neuralen Stamm- oder Vorläuferzellen hierbei die für den therapeutischen Effekt verantwortlichen Zellen sind. Auch wenn wertvolle Kenntnisse, vor allem hinsichtlich prinzipieller technischer Fragen, aus diesen Arbeiten erwachsen sind und der relative Erfolg dieser Methode auch in mancherlei Hinsicht Berechtigung und Gewicht verleiht [78], so ist der Einsatz von Embryonen zur Gewinnung des Transplantates ethisch in höchstem Maße problematisch und zusätzlich auch quantitativ nur so begrenzt möglich, daß er für eine potentielle Standardtherapie nicht in Frage kommt.

Das therapeutische Wissen über den Einsatz definierter Stammzellpopulationen stammt zur Zeit noch nahezu ausschließliche aus Tierversuchen. Trotz voreiliger klinischer Einsätze, wie beispielsweise die Behandlung von Schlaganfallpatienten mit „Stammzellen“ [97, 107], ist der gegenwärtige Grundtenor, daß die Zeit für die Klinik noch nicht reif ist, aber sich ihr mit großer Geschwindigkeit nähert. Einige sehr grundsätzliche Fragen sind jedoch noch zu klären, bevor Stammzellen wirklich klinisch einsetzbar werden. Nicht allein aus Sicherheitsgründen, sondern auch im Sinne einer möglichst gezielten und effizienten Anwendung, sollte man sich eine sehr genaue Vorstellung davon verschaffen, was Stammzellen können, was mit ihnen

nicht möglich ist, welche ihre physiologische Funktion ist und wie weit sich diese Funktion in therapeutischer Absicht sinnvoll ausdehnen läßt. Dabei zeigt schon eine oberflächliche Betrachtung, daß sich hinter dem Ruf nach „Stammzellen für die Neurologie“ keineswegs ein einheitliches Konzept verbirgt. Unter dem weiten Oberbegriff stammzellbasierter Therapien finden sich höchst unterschiedliche zugrundeliegende Strategien und “Stammzellen”. Kapitel 1.2 beleuchtet daher zunächst die Definition des Begriffs der Stammzelle, bespricht die verschiedenen Arten von Stammzellen und ihre Potenz und diskutiert die möglichen Therapieformen, die auf diesen Zellen basieren.

Der weitaus größte Teil der neurobiologischen Stammzellforschung hat sich bislang auf die Zellkultur konzentriert, und die auf solcher Forschung basierenden neuen Therapieformen zielen in der Regel primär auf eine Transplantation von neuronalen Stammzellen in das erkrankte Gehirn ab. Neuronale Stammzellen lassen sich wahrscheinlich aus dem gesamten Gehirn, sei es embryonal oder adult, gewinnen und nahezu beliebig in Kultur propagieren [54]. Auch mit Stammzellkulturen aus dem menschlichen Gehirn liegen erste Erfahrungen vor [155]. Rein theoretisch könnten mit den Stammzellen eines einzigen Spenders (im Unterschied zur Lage bei den fetalen Transplantaten) alle Parkinsonpatienten der Welt mit implantierbaren Zellen versorgt werden. Die Praxis ist davon sehr weit entfernt. Einer der Gründe hierfür ist (unter sicherlich vielen), daß über das Verhalten der Zellen nach der Transplantation sehr wenig Genaues bekannt ist. So ist die Überlebensrate implantierter Zellen (und erst recht implantierten Gewebes) sehr gering [22], und Probleme wie eine gezielte Migration oder Differenzierung *in vivo* sind außerhalb des Spektrums des momentan Erreichbaren. Hingegen ist aus Tierversuchen bekannt, daß sich transplantierte Zellen lokalisationsspezifisch differenzieren können. Vorläuferzellen aus dem Hippocampus differenzierten nach Implantation in den Hippocampus erwartungsgemäß zu hippocampalen Neuronen [56], im Riechkolben jedoch zu dort ansässigen neuronalen Phänotypen [171] und in der Retina zumindest morphologisch in so verschiedenartige Zelltypen wie Photorezeptoren, bipolare Zellen und amakrine Zellen [172]. Stammzellen aus dem Rückenmark verhielten sich nach Implantation in den Hippocampus nicht anders als die ortsansässigen Stammzellen [163].

Neuronale Stammzellen können aber auch in ihrer normalen Umgebung des Gehirns untersucht werden. Neuronale Stamm- und Vorläuferzellen lassen sich aus wahrscheinlich allen Regionen auch des erwachsenen Gehirns gewinnen [134]. Zu den bisher untersuchten Hirnregionen zählen der Hippocampus [136], die subventrikuläre Zone der Seitenventrikel [45], das Septum, das Striatum [135], die Retina [175], das Rückenmark [164], der Neocortex, und Regionen weißer Substanz, wie Corpus callosum und Nervus opticus [134]. Nur in zwei offensichtlich privilegierten Regionen jedoch, dem Gyrus dentatus des Hippocampus und dem Bulbus olfactorius, werden aus diesen Stammzellen auch *in vivo* neue Nervenzellen in größerer Zahl produziert. Es gibt darüber hinaus allerdings bislang auch drei Berichte von „adulter Neurogenese“ (d.h. der Bildung neuer Nervenzellen im erwachsenen Gehirn) im Cortex [67, 77, 112] und einen Kongreßbericht von Neurogenese in der adulten Substantia nigra (Jonas Frisén, persönliche Mitteilung). Ungeachtet dessen ist adulte

Neurogenese im erwachsenen Gehirn weit mehr die Ausnahme als die Regel. Kapitel 1.3 stellt adulte Neurogenese im Hippocampus als die modellhafte neurogene Region des erwachsenen Gehirns vor.

Wenn nun einerseits bekannt ist, daß sich neuronale Stamm- und Vorläuferzellen aus praktisch dem gesamten Gehirn gewinnen lassen [134], und man andererseits weiß, daß offensichtlich adulte Neurogenese auf wenige Areale eingeschränkt ist, so stellt sich die entscheidende Frage, was eine neurogene Region neurogen macht. Die oben bereits erwähnten Transplantationsexperimente haben gezeigt, wie sehr die Mikroumgebung die Differenzierung der Zellen beeinflußt. Kernfrage der neuronalen Stammzellbiologie, sofern sie darauf abzielt, Nervenzellen "zu machen", ist daher die der „neurogenen Permissivität" — der Bedingungen im Gewebe, die Neurogenese erlauben. Kapitel 1.4 stellt im Vorgriff auf die folgenden Kapitel dar, wie ein Konzept der neurogenen Permissivität im erwachsenen Gehirn aussehen könnte.

Diese Bedingungen adulter Neurogenese betreffen selbstverständlich nicht nur Stammzellen innerhalb neurogener Regionen wie dem Hippocampus und Vorläuferzellen, die in neurogene und nicht-neurogene Regionen implantiert werden, sondern selbstverständlich auch die offensichtlich ruhenden neuronalen Stammzellen in den nicht-neurogenen Regionen des erwachsenen Gehirns. Eine Kernfrage in Bezug auf diese letztere Population ist, warum das Gehirn im Falle von Schädigungen das in diesen Stammzellen ruhende Potential zur Neuroregeneration nicht ausnutzt. Da die Zellen aus dem Gehirn extrahiert und in Kultur gebracht ihre ganzen Möglichkeiten zur Differenzierung zeigen, liegt die Vermutung nahe, daß *in vivo* inhibierende Faktoren der Mikroumgebung wirksam sind. Auch dies ist somit eine Frage neurogener Permissivität. Eine mögliche Strategie neuartiger neurologischer Therapie bestünde daher darin, das Potential der neuronalen Stammzellen *in vivo* zu wecken und gezielt im erwachsenen Gehirn Neurogenese zu induzieren. Dieses Vorgehen hätte unter anderem auch die maßgeblichen Vorteile, frei von den ethischen Beschränkungen zu sein, wie sie der Anwendung embryonalen Gewebes entgegenstehen, und außerdem die technischen und immunologischen Probleme der neuronalen Transplantationsmedizin zu umgehen. Einen ersten experimentellen Hinweis, daß das zumindest im Tierversuch auch in der Tat möglich ist, gibt es mittlerweile. Macklis und Mitarbeiter haben gezeigt, daß es nach sehr gezielt ausgelöstem Zelltod corticaler Neurone mit Erhalt der umliegenden Strukturen in der Maus zu einer Neubildung von derartigen Nervenzellen kommen kann [112]. Dieser prinzipielle Nachweis eröffnet eine Vielzahl neuer Fragen und stellt das Problem, was denn die Neurogenität einer Region definiert, umso deutlicher in den Vordergrund.

Die in dieser Schrift vorgestellte Forschung nähert sich der Frage, was eine neurogene Region neurogen macht, über die damit verwandte Frage, wie adulte Neurogenese *in vivo* reguliert ist. Kenntnis der Regulation erlaubt einen Einblick in die Komplexität der Faktoren, die zusammenspielen müssen, um adulte Neurogenese *in vivo* zu kontrollieren. Kapitel 1.5 stellt daher zusammen, was aus der Literatur über die Regulation adulter hippocampaler Neurogenese bekannt ist und nimmt damit wieder Bezug auf das zuvor entwickelte Modell neurogener Permissivität. Dabei wird

deutlich, wie sehr die Erforschung der Regulation adulter Neurogenese über viele Jahre von Beispielen negativer Kontrolle geprägt war. So unterdrücken beispielsweise offensichtlich sowohl Glucocorticoide als auch glutamaterge Afferenzen zum Hippocampus physiologischerweise die Neurogenese im adulten Gyrus dentatus [117].

Die im zweiten Teil der vorliegenden Schrift vorgestellten eigenen Arbeiten waren die ersten, die eine positive Regulation adulter hippocampaler Neurogenese nachgewiesen haben. Diese Regulation scheint mit der normalen Funktion des Hippocampus in engem Zusammenhang zu stehen. Aktivitätsabhängige Regulation adulter hippocampaler Neurogenese zeigt, daß es sich bei dieser Regulation um einen komplexen, mehrstufigen Prozess handelt, der genetischen Dispositionen unterliegt und durch verschiedene Stimuli in verschiedener Weise beeinflußt wird. Kapitel 2.1 gibt einen orientierenden Überblick der in den Kapiteln 2.2 bis 2.7 in deutscher Übersetzung folgenden Einzeldarstellungen.

Der dritte Teil dieser Schrift gibt zunächst eine zusammenfassende Diskussion dieser Arbeiten (3.1). Während aus medizinischer Sicht bei der Erforschung adulter Neurogenese zunächst ihr im weitesten Sinne modellhafter Charakter für die Grundlagen neuronaler Stammzellbiologie im Vordergrund stehen mag, so erhebt sich natürlich gleichzeitig die Frage nach der physiologischen Rolle adulter Neurogenese und ihrer aktivitätsabhängigen Regulation in der Funktion des Hippocampus (3.2). Die Tatsache, daß das erwachsene Gehirn nicht nur in der Lage ist, neue Nervenzellen zu rekrutieren und funktionell zu integrieren, stellt ältere Konzepte in Frage, die auf einer relativ rigiden Verschaltung zumindest auf Ebene der Nervenzellen aufbauten. Die Interpretation unserer Ergebnisse legt nahe, daß adulte hippocampale Neurogenese eine, wenn auch komplexe Rolle in Lern- und Gedächtnisvorgängen spielen könnte. Aus dieser funktionellen, hippocampusbezogenen Sichtweise ergeben sich wiederum medizinisch relevante Aspekte. So kann eine Beteiligung gestörter Neurogenese im erwachsenen Hippocampus in der Pathogenese von so unterschiedlichen Erkrankungen wie der Depression, Temporallappenepilepsie und Tumoren diskutiert werden. Kapitel 3.3 gibt einen kurzen Überblick über Fragen von Stammzellfunktion und –pathologie *in vivo*. In Kapitel 3.4 wird schließlich ausgeführt, welche Möglichkeiten stammzellbasierter neurologischer Therapie es prinzipiell gibt und wie die hier vorgestellte Forschung sich in diese Systematik einordnet.

1.2 Stammzellen

Unter einer Stammzelle versteht man nach gängiger Definition eine undifferenzierte Zelle, aus der durch Zellteilung entweder zwei neue Stammzellen hervorgehen können (symmetrische Teilung) oder aber eine neue Stammzelle und eine Zelle, die Ausgangspunkt für eine Ausdifferenzierung ist (asymmetrische Teilung). Je nach Vielfalt der Zelltypen, die aus einer Stammzelle durch asymmetrische Teilung direkt und über Zwischenstufen entstehen können, wird die Potenz der Stammzelle bemessen. Die befruchtete Eizelle kann als die ultimative Stammzelle betrachtet werden

(obwohl ihre Selbsterneuerung begrenzt ist), da aus ihr alle Zellen der Körpergewebe hervorgehen können und hervorgehen. Man bezeichnet die Eizelle als *„totipotent“*. Im frühen Embryonalstadium enstehen Stammzellen, die noch beinahe totipotent sind, da sie alle Zell- und Organtypen hervorbringen können, jedoch kein vollständiges Individuum. Diese sogenannten „embryonalen Stammzellen“ sind *„pluripotent“*. Im weiteren Verlauf der Entwicklung entstehen in den einzelnen Geweben gewebespezifische Stammzellen, aus denen die Zellen des betreffenden Gewebes hervorgehen können. Diese Zellen werden als *„multipotent“* bezeichnet. Die Zellen, um die es in den hier besprochenen Arbeiten geht, sind multipotente gewebespezifische Stammzellen.

Einige aufsehenerregende Arbeiten haben das ungeheure therapeutische Potential, das embryonalen Stammzellen innewohnt, eindrucksvoll vorgeführt. So gelang es in einer Mausmutante mit dem Krankheitsbild der von fehlender Myelinbildung geprägten Pilizäus-Merzbacher-Krankheit, durch Einsatz von embryonalen Stammzellen die Tiere mit myelinbildenden Oligodendrozyten auszustatten und die Ausbildung des kranken Phänotyps zu verhindern [23]. Im Vorgriff auf zukünftige Therapiemöglichkeiten am Menschen, die sich aus derartigen Experimenten ergeben könnten, hat das britische Parlament nicht nur die Anwendung humaner embryonaler Stammzellen gestattet, sondern auch ihre bedarfsgerechte Herstellung mittels therapeutischen Klonens.

Jedoch sind embryonale Stammzellen nicht unproblematisch. Zwar werden die gängigen Definitionen beispielsweise eines „Embryos“ bei ihnen weit strapaziert, aber es besteht doch auch kein Zweifel, daß in Deutschland das Embryonenschutzgesetz auf sie Anwendung zu finden hat. Danach ist die Gewinnung (allerdings nicht die Nutzung) humaner embryonaler Stammzellen in Deutschland nicht zugelassen. Die Diskussionen hierüber und über ethische, juristische und auch wirtschaftliche Konsequenzen einer auf embryonalen Stammzellen beruhenden Therapie ist zur Zeit noch nicht abgeschlossen. Sie wird verkompliziert dadurch, daß die Grenzen der gängigen Definitionen durch neue Ergebnisse der Biologie in Frage gestellt werden: Wie „embryonal“ ist eine embryonale Stammzelle, wenn sie durch „Reprogrammierung“ einer adulten Zelle gewonnen wurde? Diese Abgrenzungen sind nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Im folgenden werden daher Stamm- oder Vorläuferzelle des Gehirns so verstanden, wie sie sich *in vivo* oder *ex vivo* darstellen ohne weitere Aussage darüber, ob es Manipulationen gibt oder geben könnte, die ihre Gewebespezifität oder Potenz ausdehnen und verändern könnten.

Für Stammzellen des Gehirns bedeutet Multipotenz die Fähigkeit, die drei hauptsächlichen neuroektodermalen Zelltypen des Gehirns, Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten, hervorbringen zu können. Mit Antikörpern gegen Markerproteine wie NeuN für Nervenzellen [126], GFAP oder S100ß für Astrozyten [17] und RIP oder O4 für Oligodendrozyten [135] lassen sich diese Zelltypen in Zellkulturexperimenten bestimmen. Wenn man dabei von einzelnen Stammzellen ausgeht, läßt sich so auch der Nachweis der Klonalität führen [136].

Der Begriff der „Vorläuferzelle“ wird in der Regel dann verwendet, wenn unklar ist, ob eine Zelle den strikten Kriterien einer Stammzellen gehorcht. Es handelt sich

dann um einen ungenauer definierten Oberbegriff. Gleichzeitig aber kann unter einer Vorläuferzelle auch der Zelltyp verstanden ist, der aus einer multipotenten Stammzelle hervorgegangen ist, noch teilungsfähig ist, aber nur noch unipotent ist. Diese Zellen werden häufig auch als „Blasten" bezeichnet, obwohl auch diese Bezeichnung nur unscharf definiert ist. Im Englischen werden diese Blasten *„blasts"* oder *„precursors"* genannt. Auch hier jedoch besteht eine zusätzliche Begriffsverwirrung mit den *„progenitors"*, den Vorläuferzellen in obigem Sinne.

In Untersuchungen *in vivo* läßt sich in der Regel nicht sicher festlegen, ob es sich bei den untersuchten Zellen um Stammzellen im strengen Sinne handelt. Eine klonale Analyse *in vivo* ist möglich, indem man Stammzellen *in situ* mit einem Retrovirus infiziert und anhand der identischen Integrationsstellen im Genom der Tochterzellen auf Klonalität folgert [180]. Diese Experimente sind extrem aufwendig und bisher für den Hippocampus, in den Retroviren nur erschwert eingebracht werden können, nicht durchgeführt worden. Wenn im folgenden im *in-vivo*-Kontext von „Stammzellen" die Rede ist, so folgt dies dem allgemeinen Sprachgebrauch und unter Vernachlässigung der Frage der nachgewiesenen Klonalität.

Neuronale Vorläuferzellen wurden erstmals 1992 aus dem Vorderhirn der erwachsenen Maus extrahiert [147, 149]. Während die ursprüngliche Publikation von Reynolds und Weiss noch von Zellen aus dem Striatum spricht, so wurde später klar, daß es sich genaugenommen um Zellen der subventrikulären Zone handelte. Hier befindet sich eine Population von Stamm- und Vorläuferzellen, die auch im Erwachsenenalter noch in großer Zahl neue Nervenzellen produziert. *In vitro* zeigten diese Zellen die Charakteristika der Multipotenz [148]. Es folgten Experimente, die darauf abzielten, den Charakter der neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen *in situ* genauer zu charakterisieren. Die Arbeitsgruppe um Arturo Alvarez-Buylla stellte in aufwendigen Untersuchungen fest, daß es sich bei der Stammzelle der subventrikulären Zone um eine Zelle handelt, die Charakteristika von Astrozyten besitzt und zumindest phasenweise eine Zellfortsatz zwischen den Ependymzellen hindurch an die Ventrikelwand sendet und dort ein Cilium besitzt [45]. Diese Eigenschaft des zilienbesetzten Kontaktes zur Ventrikelwand könnte erklären, warum die Arbeitsgruppe um Jonas Frisén zu dem scheinbar divergenten Ergebnis kam, die Stammzellen dieser Region als Ependymzellen zu bezeichnen [87]. Die wissenschaftliche Auseinandersetzung ist noch nicht endgültig beigelegt, es spricht aber vieles dafür, daß die Astrocytenhypothese die wahrscheinlichere ist und das Problem zu einem nicht geringen Anteil ein nomenklatorisches ist.

Einer Hypothese von Dereck van der Kooy zufolge ist die Stamm- und Vorläuferzellpopulation in der subventrikulären Zone nicht homogen, sondern unterscheidet sich in zumindest in bestimmten Aspekten der Zellteilungsaktivität [125]. So vermutet van der Kooy, daß aus einer sich sehr selten teilenden echten Stammzelle eine rascher teilende Vorläuferzellpopulation hervorgeht, die dann vorrangig *in vivo* nachweisbar ist und die Zellen ausmacht, die in der Zellkultur anzutreffen sind. Die Evidenz für diese prinzipiell einleuchtende Theorie ist bislang gering.

Arbeiten zur embryonalen Neurogenese in der ventrikulären Zone haben gezeigt, daß die Stamm- und Vorläuferzellen dort je nach Stadium des Zellzyklus unter

schiedliche Positionen relativ zur Ventrikelwand einnehmen [31]. Aus diesen Arbeiten von Susan McConnell rührt auch die Hypothese, daß sich Stammzellen auf zwei verschiedene Arten teilen. Aus symmetrischen Teilungen gehen zwei neue, identische Stammzellen hervor, aus einer asymmetrischen Teilung nur eine neue Stammzelle und eine Zelle, die differenziert. Dieses Modell ist auf die Zustände im erwachsenen Gehirn und auf adulte Neurogenese im Hippocampus übertragen worden [4], auch wenn bislang keine experimentellen Daten vorliegen, die dies in allen Aspekten eindeutig belegen.

1993 zeigten Ray und andere, daß sich neuronale Stamm- und Vorläuferzellen auch aus dem erwachsenen Hippocampus von Ratten gewinnen lassen [146]. Palmer wies später nach, daß es sich bei diesen Zellen in der Tat um Stammzellen im engeren Sinne der Definition handelt [136]. Damit war gezeigt, daß sich aus einer Region, von der bereits seit den 60-er Jahren bekannt war, daß in ihr auch im Erwachsenenalter noch neue Nervenzellen entstehen [3], neuronale Stamm- oder Vorläuferzellen enthält. Bis heute ist aber nicht schlüssig bewiesen, daß es sich bei den Zellen, die *in vivo* sichtbar gemacht werden können, um exakt diese in der Kultur identifizierbaren Stammzellen handelt. Der Zusammenhang ist aber suggestiv und naheliegend.

Während es sich bei der subventrikulären Zone und dem Gyrus dentatus des Hippocampus um zwei Regionen handelt, von denen bekannt war, daß sie *in vivo* neurogen sind, ergaben weitere Versuche, daß man neuronale Stamm- und Vorläuferzellen auch aus Regionen des erwachsenen Gehirns isolieren kann, die *in situ* keine Anzeichen von Neurogenese zeigen. So finden sich neuronale Stamm- und Vorläuferzellen auch im Septum, im Striatum [135], im Rückenmark [164], im Neocortex, im Balken, im optischen Nerv [134] und in der Retina [175]. Wahrscheinlich kommen sie im gesamten Gehirn vor.

Bei allen diesen Zellen ist, auch wenn mitunter die detaillierte Analyse aussteht, anzunehmen, daß es sich um gewebespezifische Stammzellen handelt. Verblüffenderweise konnte aber eine aus dem erwachsenen Gehirn gewonnene Stammzelle benutzt werden, um analog zu einer Knochenmarkstransplantation in einer bestrahlten Maus ein komplettes blutbildendes System wieder aufzubauen [14]. In einem verwandten Ansatz gelang es der Arbeitsgruppe von Jonas Frisén, adulte neuronale Stammzellen so „umzuprogrammieren“, daß sie sich wie embryonale Stammzellen verhielten [32]. Irritierenderweise erschienen diese Zellen nach Implantation jedoch in nahezu alle Körperorganen *außer* dem blutbildenden System. Diese Ergebnisse zeigen, auch wenn bestimmte Details verwirrend und unklar sind und einer weiteren Überprüfung harren, daß die eingangs dargestellte Kaskade der Stammzellentwicklung von totipotenten mit eingeschränkter Selbstreplikation zu multipotenten gewebespezifischen Zellen mit nahezu unbegrenzter Selbstreplikation in einem wahrscheinlich nicht geringen Maße artifiziell ist. Im folgenden Kapitel wird auf die mutmaßliche Rolle, die die unmittelbare zelluläre Umgebung auf die Stamm- und Vorläuferzellen hat, weiter eingegangen.

Eine ebenfalls noch unklare Stellung in der Systematik neuronaler bzw. neuroektodermaler Stammzellen nehmen die glialen Vorläuferzellen ein, wie sie von den Arbeitsgruppe um Martin Raff beschrieben wurden [52, 142]. Die Mehrheit dieser Ar

beiten war der sogenannten O2A-Vorläuferzelle gewidmet, einer ursprünglich aus dem optischen Nerv isolierten Vorläuferzelle, die Oligodendrozyten und Typ 2 Astrozyten hervorbringen kann. Bei diesen Oligodendrozytenvorläuferzellen dürfte es sich um die bestcharakterisierten Vorläuferzellen des adulten Gehirns handeln: über Jahre hinweg war eine eigene Systematik dieser und verwandter Zellen entstanden, deren Zuordnung zu den oben dargestellten Ergebnissen anderer Gruppen weitgehend unscharf blieb. Überraschenderweise ließ sich nun auch diese Zelle so reprogrammieren, daß sie sich wie eine multipotente neuronale Stammzelle verhielt [96]. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß die O2A-Vorläuferzelle eine Position weit hinter der neuronalen Stammzelle einnimmt, auch ihre scheinbar so scharf umrissenen Charakteristika jedoch Ausdruck der zellulären Mikroumgebung bzw. der definierten Zellkulturparameter sind.

Bis heute sind keine Markerproteine bekannt, die eine eindeutige Zuordnung der Stamm- und Vorläuferzellen zu bestimmten Stadien der Stammzellsystematik erlauben würden. Entsprechend ist ihre Detektion *in vivo* nur indirekt möglich. Dazu werden sich teilende Zellen mit einem Proliferationsmarker markiert und zu einem späteren Zeitpunkt analysiert, welchen Phänotyp die Zellen in der Zeit seit der Markierung angenommen haben (Abb. 1). Als Marker wird in der Regel heute das Thymidinanalogon Bromodesoxyuridin (BrdU) eingesetzt, das nach systemischer Gabe während der Synthesephase des Zellzyklus mit Thymidin um den Einbau in die DNA konkurriert. Die Bioverfügbarkeit von BrdU ist kurz und liegt bei circa zwei Stunden [173]. Das bedeutet, daß der Zeitpunkt des Einbaus in die DNA sehr genau bekannt ist. In der Regel läßt man nach der Injektion des Versuchstieres mit BrdU etwa vier Wochen bis zur Untersuchung des Gehirns vergehen, um genug Zeit für eine Zelldifferenzierung zu geben. BrdU läßt sich dann mit einem Antikörper nachweisen und mittels Immunfluoreszenz sichtbar machen [168]. Die gleichzeitige Untersuchung mit Antikörpern gegen zellspezifische Marker wie z.B. NeuN für Nervenzellen oder GFAP für Astrozyten erlaubt dann die Aussage, daß die vorliegende Zelle sich, wenn sie BrdU im Zellkern enthält, zu dem Zeitpunkt als BrdU im Organismus zugegen war, geteilt haben muß. Da die ausdifferenzierten Zellen, insbesondere die Nervenzellen, postmitotisch sind, wird auf einen undifferenzierteren Zustand zu dem früheren Zeitpunkt gefolgert. Im Kontext mit den *in vitro* Daten wird angenommen, daß es sich bei diesen Zellen um die gleichen neuronalen Stammzellen handelt, wie sie in der Zellkultur identifizierbar sind. Alle bislang vorliegenden Daten decken sich mit dieser Hypothese. Gleichwohl wird diese Forschung sehr von der Identifizierung eines stammzellspezifischen Antigens profitieren. Dessen Suche hat sich bislang als äußerst schwierig herausgestellt. Die oben genannten Ergebnisse von Alvarez-Buylla, die für eine Identität (zumindest der subventrikulären Stammzellen) mit einer Art von Astrozyt sprechen, könnten, erklären warum: die Stammzelle hielte sich im Gewand einer mutmaßlich wohlbekannten Zelle verborgen.

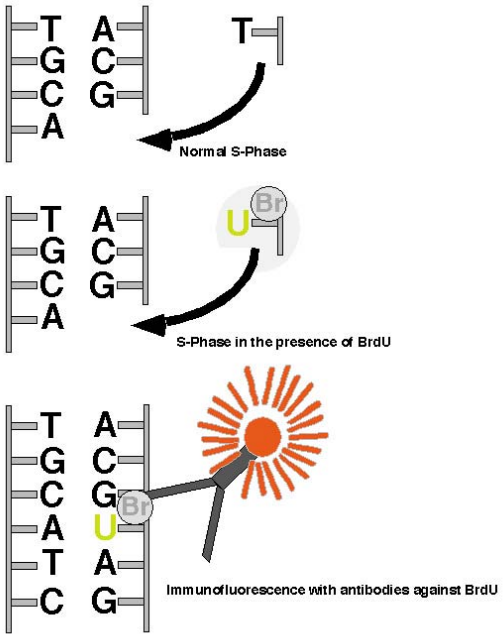


Abb. 1: Markierung von mitotischen Zellen mit Bromodesoxyuridin. Die schematische Zeichnung zeigt im oberen Teil, wie in der normalen Synthesephase (S-Phase der Mitose Thymidin (T) sich mit Adenin (A) paarend in den neuen Strang der DNA eingebaut wird. Wird das Thymidinanalogon Bromodesoxyuridin (BrdU) im Überfluß angeboten, kompetiert es mit Thymidin um den Einbau in die DNA und wird statt Thymidin in den neu synthetisierten Strang inkorporiert (mittleres Bild). Nicht eingebautes BrdU wird schnell vom Körper eliminiert. Zellen, die BrdU enthalten, können mit Antikörpern gegen BrdU sichtbar gemacht werden.

1.3 Neurogenese im adulten Hippocampus

Adulte hippocampale Neurogenese wurde erstmals 1965 von Altman und Das beschrieben [3] und erlebte seither mehrere Wiederentdeckungen [8, 27, 90]. Die Beobachtung widersprach jedoch gängigen Vorstellungen von der Architektur des Gehirns und vom Umfang überhaupt möglicher Plastizität und setzte sich deshalb zunächst nicht durch. Erst Arbeiten von F. Nottebohm und Mitarbeitern, die zeigten, daß in den für das Liederlernen von Kanarienvögeln verantwortlichen Kerngebieten, offenbar in Abhängigkeit vom Vorgang des Liederlernens selbst, eine massive Neubildung von Nervenzellen zu beobachten war [58], ließ größeres Interesse an den Befunden an Nagetieren wachwerden. Da adulte hippocampale Neurogenese zunächst in Primaten nicht gefunden werden konnte [144], war jedoch die Relevanz dieser Untersuchungen in biomedizinischer, anthropozentrischer Sicht fragwürdig. Es stellte sich jedoch heraus, daß man adulte hippocampale Neurogenese im Primaten nur aus methodischen Gründen nicht gefunden hatte. Kuhn et al. adaptierten

1996 die auf BrdU basierende nicht-radioaktive Methode [44, 168] für die Neurogeneseforschung, kombinierte diese Technik mit confokaler Mikroskkopie [100], und lösten so die bis dahin vorherrschende Markierung der sich teilenden Zellen durch radioaktiv markiertes Thymidin ab (Abb. 1). Diese erlaubte eine quantitativere und validere Untersuchbarkeit adulter Neurogenese *in vivo* und leitete den Beginn umfassenderer Untersuchungen ein. In der Folge wurde adulte hippocampale Neurogenese im Affen [69, 99] und schließlich auch beim Menschen [50] beschrieben.

In der subgranulären Zone des Gyrus dentatus existiert eine Population sich teilender Stamm- oder Vorläuferzellen (Abb. 2A). Tochterzellen, die aus asymmetrischen Teilungen dieser Zellen hervorgehen, schlagen den Weg zur Differenzierung in eine Nerven- oder Gliazelle ein. Dabei überlebt nur ein Bruchteil der neugeborenen Zellen; zumeist die Mehrheit wird über apoptotische Mechanismen eliminiert [13]. Wie in der Embryogenese scheint also auch in der adulten Neurogenese ein Überschuß an potentiellen Nervenzellen produziert zu werden, von denen durch Selektionsvorgänge die wirklich benötigten Zellen rekrutiert werden. Und wie in der Embryogenese scheinen somit die Vorgänge der Zellgeburt und des Zelltod auf das Engste miteinander verknüpft [15]. Daß dieser Rekrutierungsvorgang in der Tat aktivitätsabhängig ist, wurde in einer der hier im Folgenden vorgestellten Arbeiten gezeigt [94, 95]. Auch daß es dabei zu einer gegenläufigen Regulation der Apoptose kommt, ist demonstriert worden [193].

Einige der neugeborenen Zellen aus der subgranulären Zone wandern in die Körnerzellschicht hinein. Bereits vier Wochen nach der Zellteilung lassen sie sich überall in der Körnerzellschicht nachweisen (Abb. 2B). Diese Migration und möglicherweise auch die damit einsetzende Differenzierung der Zellen steht offenbar in engem Zusammenhang mit der Expression der polysialierten Form des neuronalen Oberflächenmoleküls NCAM (PSA-NCAM; [157-159]). Dabei exprimieren sowohl die neugeborenen Zellen als auch umliegende Zellen, insbesondere wohl Gliazellen, PSA-NCAM. Aus dem olfaktorischen System ist bekannt, daß neugeborene Zellen in einem PSA-NCAM-positiven Trakt in einer sehr schnellen und einzigartigen Form neuronaler Migration wandern [110]. Ob diese Kettenmigration (*chain migration*) auch im Hippocampus eine Rolle spielt, ist derzeit noch unklar. Auch die Bedeutung der umgebenden Glia für die Migration in die Körnerzellschicht ist nicht aufgeklärt. Möglicherweise persistiert im erwachsenen Gyrus dentatus eine Form der Radiärglia, die wie in der Embryogenese die Führung der neuen Nervenzellen übernimmt.

In den Wochen nach der Zellteilung beginnen einige der neugeborenen Zellen neuronale Marker zu exprimieren. Dazu gehören ßIII-Tubulin, das neuronale Kernprotein NeuN und Körnerzellmarker wie Calbindin D28k.. Auf dem immunhistochemischen Nachweis dieser Marker basiert in der Regel der Nachweis, daß in der Tat Neurogenese stattgefunden hat.

Die neugeborenen Zellen, die zu Neuronen werden, beginnen auch früh, Axone und Dendriten auszusenden [79, 80]. Durch retrograde Markierung von CA3 her ließ sich zeigen, daß sich ihr Axon wie das aller anderen Körnerzellen wirklich entlang des Moosfasertraktes nach CA3 ausstreckt und die neuen Nervenzellen somit Teil der körnerzellspezifischen Projektion werden [115, 169]. Es gibt Mutmaßungen, daß

sich die Funktion der neuen Körnerzellen dennoch von der der älteren unterscheidet, was bei der Annahme einer funktionellen Regulation auch nicht zu überraschend wäre [182]. Zur Zeit ist aber die Frage, ob dieser Unterschied, wenn er überhaupt existiert, prinzipiell oder nur graduell ist, noch nicht beantwortet. Über die elektrophysiologischen Eigenschaften einzelner nachweislich neuer Körnerzellen gibt es nämlich bislang keine Erkenntnisse. Allerdings konnten van Praag et al. zeigen, daß eine Steigerung der adulten Neurogenese im Gyrus dentatus auch mit gesteigerter LTP (*long-term potentiation*), dem mutmaßlichen elektrophysiologischen Korrelat der Akquisition in Lernvorgängen, einhergeht [177]. Dies spricht sehr dafür, daß die neuen Nervenzellen in funktionelle Zusammenhänge integriert werden.

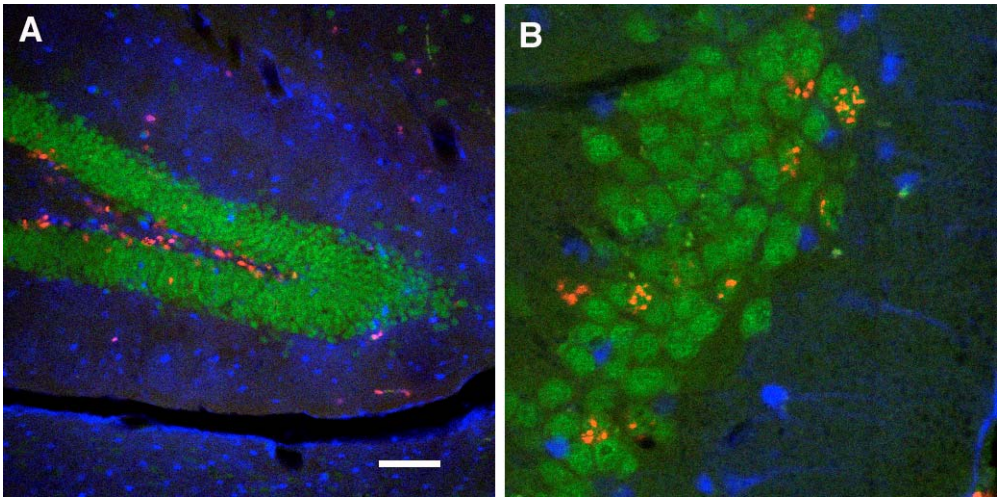


Abb. 2: Neue Nervenzellen im erwachsenen Gyrus dentatus der Maus. (A) Sich teilenden Zellen in der subgranulären Zone wurden mit Bromodesoxyuridin (BrdU; rot) sichtbar gemacht. Die Neurone der Körnerzellschicht sind mit Antikörpern gegen NeuN (grün) angefärbt, Astrocyten mit Antikörpern gegen S100ß in blau. (B) Vier Wochen nach der Markierung mit BrdU (d.h. nach der Zellteilung) sind die überlebenden Tochterzellen in die Körnerzellschicht hineingewandert und haben einen neuronalen Phänotyp (grün + rot = orange) angenommen. Abbildung von Zellen aus 3 Monate alten Mäusen (Maßstab in A entspricht 100µm für A und 20 µm für B). Vgl. auch das Titelbild.

1.4 Neurogene Permissivität

Die Frage neurogener Permissivität im erwachsenen Gehirn geht von der Annahme aus, daß den Stamm- oder Vorläuferzellen zwar das Potential innewohnt, sich in Neurone zu differenzieren, für die Umsetzung dieses Potentials aber Signale der unmittelbaren zellulären Umgebung erforderlich sind. Maßgeblich für diese Annahme sind die Befunde von Transplantationsstudien, die einhellig gezeigt haben, daß die Differenzierung vom Implantationsort abhängig ist, die implantierten Zellen also immer ortsspezifisch differenzierten.

Auch *in vivo* kann man aus der Tatsache, daß Neurogenese so lokal begrenzt im erwachsenen Gehirn anzutreffen ist, obwohl sich Stammzellen aus wahrscheinlich dem gesamten Gehirn extrahieren lassen [134], folgern, daß die Neurogenität einer Region sich nicht allein aus der Präsenz von neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen erklären lassen kann. Was aber macht eine neurogene Region neurogen, wenn es nicht die Stamm- oder Vorläuferzellen allein sind?

Einer Vielzahl von Arbeiten zur adulten Neurogenese liegt die allerdings irrige Annahme zugrunde, daß die Proliferation von Stamm- oder Vorläuferzellen bereits Neurogenese konstituiere. Wie weiter unten (2.2) gezeigt wird, ist adulte hippocampale Neurogenese jedoch ein mehrstufiger Prozess, bei dem die Quantität der Regulation auf einer Stufe keine eindeutigen Aussagen über die Regulation auf anderen Stufen und damit auch der Nettoneurogenese zuläßt.

Entsprechend verwenden wir eine strengere und dennoch umfassendere Definition von „Neurogenese" als oft üblich. Im hier benutzten Sinne ist „Neurogenese" diejenige Serie von Entwicklungsschritten, unabhängig ob während der Embryogenese oder im Erwachsenenalter, die von einer teilungsaktiven neuronalen Stamm- oder Vorläuferzelle zu einer neuen Nervenzelle führt. Neurogenese wird also vom Resultat der Entstehung einer neuen Nervenzelle her definiert. Daraus folgt z.B., daß Gliogenese nicht Neurogenese ist, auch wenn beide Prozesse mutmaßlich von der gleichen multipotenten neuralen Vorläuferzelle ausgehen können und bestimmte Entwicklungsschritte gemeinsam haben können. Wie in 2.2 (und beispielsweise in [13]) dargestellt, sterben die meisten Tochterzellen, die aus der Vorläuferzellproliferation hervorgehen, innerhalb weniger Tage nach der Zellteilung ab. Neurogenese kann daher nicht sinnvoll mit einer Definition erfaßt werden, in der nicht-neuronale oder gar keine neuen Zellen entstehen.

Diese strenge Unterscheidung geht weit über das Semantische hinaus. Bleibt man bei einer vereinfachten Definition, die bereits in der Zellproliferation in der subgranulären Zone Evidenz für Neurogenese erkennt, so wird man der Komplexität der neurogenen Regulation nicht gerecht und unterstellt möglicherweise regulatorische Effekte auf die Nettoneubildung von Nervenzellen, wo in Wirklichkeit nur die Zellproliferationsrate angeregt wurde, aber auch mehr der Tochterzellen starben. Einige der in Tabelle 1 dargestellten Regulatoren adulter hippocampaler Neurogenese (auf die noch genauer eingegangen wird) wirken beispielsweise nur transient; in vielen Fällen wurde die neuronale Differenzierung, die auf die Teilung der Vorläuferzellen folgen müßte, um zu neuen Nervenzellen zu führen, gar nicht untersucht. Eine der Kernaussagen dieser Schrift ist, daß adulte hippocampale Neurogenese auf mehreren Stufen der neuronalen Entwicklung relativ unabhängig voneinander reguliert wird. Als unterscheidbare Stufen sind zum Beispiel die Zellteilung der Vorläuferzellen, das Überleben der Tochterzellen, ihre Migration, die Expression von phänotypischen Proteinen, das Aussenden von Zellfortsätzen (Axonen und Dendriten), die Synapsenbildung, der Aufbau neuronenspezifischer, elektrophysiologischer Eigenschaften und das Generieren von Aktionspotentialen, und schließlich die Wirksamkeit in neuronalen Schaltkreisen abzugrenzen. Natürlich ist es weder praktikabel noch überhaupt möglich, immer alle diese Schritte dezidiert zu untersuchen. Es ist

aber auch nur entscheidend, sich dieser Komplexität bewußt zu bleiben und aus der Serie der Ereignisse zumindest ein weiteres nach der Zellteilung nachzuweisen, das eine eindeutig neuronale Eigenschaft erfaßt. Dies wird in der Regel die Expression von neuronenspezifischen Markerproteinen sein, wie sie sich immunhistochemisch nachweisen läßt.

Für die Frage, was neurogene Permissivität sei, bedeutet diese aufwendige Unterscheidung, daß sich neurogene Permissivität beispielsweise nicht vereinfachend mit Mitogenität gleichsetzen läßt. Vielmehr muß die zelluläre Umgebung in der Lage sein, eine Kaskade von Entwicklungsschritten zu steuern. Es gibt keine Hinweise darauf, daß nach der Zellteilung ein starres Programm abliefe, daß zwangsläufig und quantitativ in neuen Nervenzellen mündete.

Den hier dargestellten Experimenten liegt deshalb die Annahme zugrunde, daß sich neurogene Permissivität am besten zunächst in Modellen untersuchen läßt, die eine physiologische Regulation von adulter Neurogenese hervorrufen. Diese Ergebnisse zur physiologischen Regulation stehen aber im Kontext einer stetig wachsenden Zahl von Resultaten, die sich als spezifischere Manipulationen verstehen lassen, deren biologische Bedeutung unter normalen Bedingungen im Einzelfall noch sehr unklar bleiben kann. Trotzdem zeichnet sich ein Bild ab, das adulte Neurogenese, ihre Regulation und damit neurogene Permissivität als einen Prozess auf Zell- und Organebene definiert. Was neurogene Permissivität und was Regulation adulter Neurogenese intrazellulär bedeutet und wie also die Signaltransduktion, die diesen Vorgängen zugrundeliegt, aussieht, ist gegenwärtig noch sehr weitgehend unklar.

Diskutiert wurde aber beispielsweise bereits, daß dem *cAMP responsive element binding protein* (CREB) eine Schlüsselstellung in den intrazellulären Abschnitten der Regulation zukommen könnte [46, 113]. Diese Annahme wird gestützt durch die Tatsache, daß viele bekannte Regulatoren adulter Neurogenese auf Rezeptorsysteme wirken, deren nachgeschaltete *second messenger* Kaskaden auf CREB konvergieren. Trotzdem ist diese Schlüsselbedeutung noch spekulativ. Aus der neurogenen Zone des olfaktorischen Systems gibt es Hinweise darauf, daß *Eph/ephrin* für die Steuerung der Neurogenese notwendig ist [33]. Dieser Befund steht aber zur Zeit noch vergleichsweise isoliert da. Man muß sich jedoch vor Augen halten, daß neurogene Permissivität nicht an der Zellmembran haltmacht. Letztlich läuft die Frage darauf hinaus, welche Gene wann und in welcher Reihenfolge aktiviert werden, damit adulte Neurogenese stattfinden kann. Was wir hier unter neurogener Permissivität verstehen, sind mangels weitergehender Erkenntnisse noch der bezogen auf die Stamm- und Vorläuferzellen extrazelluläre Anteil und damit der Beitrag der zellulären Mikroumgebung an der Regulation adulter Neurogenese.

1.5 Regulation adulter hippocampaler Neurogenese

In Tabelle 1 wird der gegenwärtige Stand der Literatur zur Regulation adulter hippocampaler Neurogenese *in vivo* wiedergegeben. Wie erwähnt, gibt es derzeit noch kaum Kenntnis über Regulationsprozesse auf intrazellulärer und vor allem molekulargenetischer Ebene. Hierin liegt die große Herausforderung der kommenden Jahre. Experimentelle Modelle aber, die es ermöglichen werden, die Details neurogener Regulation aufzuklären, sind zum Teil bereits erkennbar.

Die Kenntnisse über die Regulation adulter hippocampaler Neurogenese *in vivo* fallen in derzeit drei große, überlappende Kategorien: 1. Die physiologische Regulation, zu der Alters- und Geschlechtsunterschiede, saisonale Einflüsse und auch die aktivitäts- und erfahrungsabhängige Regulation gehören. 2. Die Regulation durch pathologische Einflüsse wie epileptische Anfälle, Ischämie, Läsionen, etc. 3. Die große Gruppe der Kenntnisse, die einzelne chemische Komponenten betreffen, seien es Wachstumsfaktoren, Hormone, Neurotransmitter oder auch Medikamente, und die sowohl in physiologischer als auch pathologischer Regulation eine Rolle spielen könnten, deren einzelner Beitrag zum Gesamtgeschehen derzeit aber noch nicht gewichtend einzuordnen ist.

Grundsätzlich werden sich physiologische und pathologische Regulation nicht fundamental unterscheiden; im Falle der Pathologie werden aber einzelne Regulationsstufen so über- oder unterreguliert werden, daß es zu der beobachteten Störung kommt. Dies einschätzen zu können, setzt aber eine gewisse Kenntnis der physiologischen Regulation voraus. Durch Auslösen von epileptischen Anfällen beispielsweise wird die Proliferation der neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen in der subgranulären Zone massiv stimuliert [139]. Es kommt auch zu einer, wenn auch nicht in gleichem Maße gesteigerten Förderung der Neurogenese. Welche Bedeutung diesem Vorgang zukommt, ist weitgehend unklar, nicht zuletzt deshalb, weil die Rolle der neuen Nervenzellen unter physiologischen Bedingungen nur ansatzweise bekannt ist.

Grundsätzlich scheinen aktivitätsfördernde Stimuli aller Art direkt oder indirekt zu einer Wirkung auf die proliferative Aktivität zu führen. Welche Faktoren neurogener Permissivität aber müssen hinzukommen, damit dieses so erhöhte neurogene Potential auch zu einer größeren Zahl funktionierender neuer Nervenzellen führt? Im Kontext der hier vorgestellten Forschung lautet die Frage: Welche funktionellen Zustände oder welche Art von Aktivität und Erfahrung beeinflussen neurogene Permissivität so, daß ein funktioneller Nutzen dabei entsteht? Eine plausible und im Folgenden näher dargestellte Theorie besagt, daß allgemeine Stimuli wie körperliche Aktivität über die Steuerung der Vorläuferzellproliferation auf das neurogene Potential wirken, aus dem spezifischere Reize, insbesondere Lernstimuli neue Nervenzellen rekrutieren können.

Eine gegenwärtig noch nicht letztlich einzuordnende Rolle nimmt „Stress“ in diesen Konzepten ein. Während mehrere Experimente, insbesondere von E. Gould und Mitarbeitern [25, 26, 62], gezeigt haben, daß starker akuter Stress und auch die Manipulation von biochemischen Stresskorrelaten wie den Serumglucocorticoid

spiegeln schnelle und deutliche Auswirkungen auf adulte hippocampale Neurogenese haben, so stehen diese Befunde zumindest partiell im Widerspruch zur positiven Regulation durch beispielsweise körperliche Aktivität, die ebenfalls eine Streßkomponente hat. Das Dosis-Wirkungsverhältnis von Stress und adulter Neurogenese bleibt aufzuklären. Wahrscheinlich ist es so, daß „milder Stress" die neuronale Plastizität eher fördert als hemmt. So haben beispielsweise Arbeiten von T. Shors gezeigt, daß milder Stress zu einer Ergebnisverbesserung in Lerntests führt [191].

Während Ergebnisse, wie die Wirkung von Wachstumsfaktoren, z.B. *epidermal growth factor* (EGF) und *basic fibroblast growth factor* (bFGF), auf Zellkulturbefunde Bezug nehmen oder sich wie im Falle von Hormonen oder Neurotransmittern, relativ leicht auch in vorläufige Gesamtkonzepte neuronaler Plastizität einordnen lassen, so ist die Bedeutung von isoliert dastehenden Befunden wie einer Wirkung von Haloperidol [43] oder Opiaten [49] auf adulte hippocampale Neurogenese noch völlig unklar. Gleichwohl können gerade aus derartigen Einzelbefunden interessante Querverbindungen entstehen. So zeigten Chen et al., daß das bei der Behandlung der Manie eingesetzte Lithium die Zellproliferation in der subgranulären Zone fördert und gleichzeitig die Expression des antiapoptotisch wirksamen Proteins bcl-2 steigert [30]. Daß damit alle bislang untersuchten antidepressiv wirksamen Maßnahmen einen positiven Effekt auf die Regulation adulter Neurogenese haben, wird weiter unten noch gesondert diskutiert (3.3). Hier aber ist entscheidend, daß sich in diesem Resultat eine mögliche Verknüpfung zwischen der Regulation der Proliferation und des Zellüberlebens (durch einen antiapoptotischen Effekt) auftut.

Zusammenfassend ist der derzeitige Kenntnisstand der Regulation adulter Neurogenese *in vivo* ein sehr unfertiges Mosaik, in dem jedoch an einigen Stellen das zugrundeliegende Muster aufzuscheinen beginnt. Im nun Folgenden geht es um den physiologischen Kontext dieser Regulation: wie wird adulte hippocampale Neurogenese normalerweise gesteuert? Was können wir daraus für die allgemeinen Prinzipien dieser Regulation und damit neurogene Permissivität folgern? Und welche Konsequenzen ergeben sich aus diesen Befunden für Konzepte hippocampaler Funktion und Fehlfunktion.

Tab. 1: Bis Ende 2000 veröffentlichte Informationen über Faktoren, die regulatorisch auf adulte hippocampale Neurogenese oder Aspekte von ihr wirken. Nur Beiträge zu Zeitschriften mit Begutachtungsverfahren sind berücksichtigt. Das „Erwachsensein" wurde für Nagetiere als durch den Zeitpunkt der Entwöhnung von der Mutter gegeben angenommen.

Variable	Manipulation	Spezies Stamm	W/M	Alter/ Gewicht	Auswirkung Prolif.	Überl.	Differenz.	Verhalten	Neuronale Marker?	Bemerkungen	Lit.
Individuum											
Natürliche Variable											
1. Geschlecht		Meadow vole	W/M	> 20g	≤ (non-breeding females)	•	•	•	•	Effekt. von Saison und Geschlecht: Nicht-säugende W. hatten mehr prolif. Zellen als säugende W. und M.	[12]
		Ratte SD	W/M	200-280g 320-350g	≤ (females)	gleich (14d)	gleich	•	TOAD 64, Calb.	Kein Unterschied in Gesamtkörnerzellzahl; siehe auch Hormone	[43]
• Alter		Ratte Wistar	M	35d–18m	/	•	•	•	•	Abnahme mit zunehmendem Alter; Prolif. am 12. Tag nach BrdU; / PSA-NCAM	[40]
		Ratte F344	W	3, 6, 21m	/	•	•	•	Calb., NeuN	Abnahme mit zunehmendem Alter; Prolif. am 1. Tag nach BrdU; / PSA-NCAM	[26]
		Maus B6	W	6/18 m	/	gleich	/	•	NeuN		[24]
• Stamm (genetischer Hintergrund)		Maus B6, BALB/c, CD1, 129	W	8/9w	≤/	≤/	gleich	•	Calb.	Richtung der Unterschiede abhängig von den verglichenen Stämmen	[22]
Kognition											
1. Reizreiche Umgebung		Maus B6	W	1m	gleich	≤	gleich	≤ Wasser-labyrinth	NeuN	Kein signifikanter Effekt nach Lang-zeitstimulation [21]; Wkg. auf Gesamtkörnerzellzahl und Volumen	[23]
		Maus B6	W	6/18m	gleich	≤	≤ (%NeuN)	≤ Wasser-labyrinth	NeuN		[24]
		Maus 129	W	1m	≤	gleich	≤	≤ Wasser-labyrinth	NeuN	Relatives Überleben nahm ab	[20]
		Ratte SD	W	9w	gleich	≤	gleich	≤ Wasser-labyrinth	Calb.		[35]
• Entzug reizreicher Umgebung		Maus B6	W	6m	≤	/	gleich	Wasser labyrinth wie Kontrollen	NeuN		[21]

• Lernen	Wasserlabyrinth	Maus B6	W	3m	gleich	gleich	gleich	•	NeuN		[46]
	Blinkreflex (*trace paired*) oder Wasserlabyrinth	Ratte SD	M	300-350g	•	≤	gleich	•	TOAD 64, Calb.	Proliferationsdaten während Training nicht mitgeteilt, angebl. nicht versch.	[13]
	Wasserlabyrinth	Ratte SD	M	2m	gleich	•	•	•	•	Deskriptiv lokale Zunahme der Prolif.; nicht stat. signifikant	[2]
• Interindividuelle Unterschhiede i. d. Reaktion auf Neuartigkeit		Ratte Wistar	M	2m	⁄ (highly reactive)	gleich	gleich		NeuN		[29]
Körperliche Aktivität	Freiwilliges Laufen	Maus B6	W	3m	≤	≤	≤ (%NeuN)	≤ Wasserlabyrinth	NeuN	≤ LTP	[45, 46]
Pathologie											
• Epileptische Anfälle	Pilocarpin	Ratte SD	M	200-250g	≤	•	gleich	•	ß-III-tub., MAP-2, TOAD 64		[36, 37]
	Hippocamp. kindling	Ratte SD	M	280-300g	≤	•	≤ (% NeuN)	•	NeuN	Schwerpunkt auf Apoptose	[3]
	Kainsäure (i.c.v.)	Ratte Wistar	M	3-4m	≤ (bilat.)	•	•	•	ß-III-tub.	Differenzierung: absolute Zunahme	[18]
	Amygdala kindling	Ratte Wistar	M	?	≤	•	•	•	TOAD 64	Kein Unterschied unmittelbar nach Kindling	[38]
	Tract. perf. kindling / Kainsäure (i.p.)	Ratte SD	M	250-300g	≤/⁄	•	•	•	•	Transiente Zunahme nach Kainsäure, nach 13 d unter Kontrollen; Keine erhöhte Teilungsrate nach fest etablierten Anfällen	[34]
	Electrocovulsiver Schock	Ratte Wistar	M	250-400g	≤	≤	gleich	•	NeuN	Transienter Effekt auf Proliferation	[32]
	—	Ratte Wistar	M	320-400g	≤	•	≤ (%NeuN)	•	NeuN		[39]
	—	Ratte SD	M	250-300g	≤	≤	gleich	•	•	Siehe auch Absch. Medikamente	[33]
• Ischämie	Global (transient)	Gerbils	M	11-13w	≤	≤	≤ (NeuN)	•	Calb., MAP-2, NeuN	≤ neue Astrozyten im Hilus	[31]
	Global (transient)	Maus B6	M	25-29g	≤/⁄	•	•	•	•	⁄ ungefähr 2 Wochen nach Reperf.	[42]
	Global (transient) plus Acupunktur	Gerbils	M	11-13w	≤/≤	•	•	•	•	Zunahme in Gruppe mit Akupunktur nach Ischämie größer als in Gruppe mit nur Ischämie	[25]
• Läsion	Ibutensäure (lokal)	Ratte SD	M	50-65 d	≤	≤	≤/⁄	•	NSE, Calb., NR-1	% Überleben distäl der Läsion erhöht, proximal erniedrigt; Vergleich läsionierte Seite mit Gegenseite	[16]

• Stress	Psychosozial	Tree shrew	M	7-30m	⁄	•	•	•	(NSE)		[15]
	—	Marmoset	M	3y	⁄	•	gleich	•	NSE		[17]
	Pränatal	Ratte SD	W	1, 3,10, 22 m	⁄	•	gleich	•	NeuN	Experiment zeigt auch stressunabhängigen Alterseffekt; Auswirkung auf Gesamtkörnerzellz.	[30]
• Bestrahlung	Röntgenstrahlen (2 – 15 Gy)	Ratte F344	M	8-10w	⁄	•	•	•	•	Transient ≤ Proliferation bei niedrigen Dosen	[41]
	Röntgenstrahlen (1 – 5 Gy)	Ratte SD	M	170-250g	⁄	•	•	•	TOAD 64	Bestrahlung verhindert auch pilocarpininduzierte Zunahme der Proliferation; ⁄ PSA-NCAM	[36]
• Diabetes	Streptozotocininduziert	Ratte SD	M	150-175g	⁄	•	•	•	•		[19]
• Kalorienreduktion		Ratte SD	M	3m	gleich	≤	•	•	•		[28]
System- / Zellebene											
Hormone											
2. Glucocorticoide	Adrenalektomie	Ratte SD	M	3-5m	≤	•	•	•	NSE		[6, 14]
	Adrenalektomie	Ratte SD	?	5m, 26m	≤	•	≤	•	TOAD 64, NSE, NeuN	altersabhängige Abhnahme der Prolif. nicht in adrenalektormierten Tieren	[8]
	s.c. Injektion	Ratte SD	M	3-5m	⁄	•	•	•	NSE		[6, 14]
• Östrogen	Ovarectomie	Ratte SD	W/M	200-280g 320-350g	⁄	•	gleich	•	TOAD 64, Calb.	Wkg. durch Östrogengabe reversibel Siehe auch Abschn. Geschlecht	[43]
• Weibl. Zyklus		Ratte SD	W/M	200-280g 320-350g	≤ proestrus	gleich	•	•	TOAD 64, Calb.	Siehe auch Abschn. Geschlecht	[43]
Afferenzen											
• Glutamat	Läsion des Tr. perf.	Ratte SD	M	> 3m	≤	•	•	•	NSE		[7]
• Serotonin	Läsion der Raphekerne	Ratte	W	?	⁄	•	•	•	•	⁄ PSA-NCAM	[4]
Neurotransmitter											
• Glutamat (NMDA)	NMDA	Ratte SD	M	> 3m	⁄	•	•	•	NSE		[7]
	MK-801 + CGP37849 (NMDA Rezeptor-antagonisten)	Ratte SD	M	> 3m	≤/≤	≤/≤	≤/≤ (%NSE)	•	NSE		[7]
	MK-801	Tree shrew	M	7-30m	≤	•	•	•	(NSE)		[15]
• Serotonin	Inhib. 5-HT Synthese	Ratte	W	?	⁄	•	•	•	•	⁄ PSA-NCAM	[4]
	Tansplantation von Raphegewebe	Ratte Wistar	W	220g	≤	•	•	•	(5-HAT)	Restoration nach Läsion; kein Anstieg über Ausgangswert; ≤ PSA-NCAM	[5]
	5-HT-Wiederaufnahme-inhibit.	Ratte SD	M	250-300g	≤	≤	gleich	•	NeuN	Chron. nicht akute Behandlung	[33]

Wachstumsfaktoren											
• FGF-2 (lokal)	i.c.v. Infusion	Ratte F344	M	13-14w	gleich	gleich	gleich	•	NeuN	Signifikant. Wkg. in der SVZ	[27]
• EGF	i.c.v.Infusion	Ratte F344	M	13-14w	gleich	gleich	≤↗	•	NeuN	≤ Astrozyten ,↗ Neurone	[27]
• IGF	s.c. Infusion	Ratte SD (hx)	W	50d	≤	≤	≤ (%Calb.)	•	Calb., MAP-2, NeuN	Experiment an hypophysectomierten(hx) Ratten	[1]
Medikamente und Drogen											
• Haloperidol	5mg/kg, i.p., 3d	Gerbil	M	90 d	≤	•	•	•	•	Verstärkt. septo-temporaler Gradient prolif. Zellen	[10]
	1-2mg/kg, i.p., 14d	Ratte SD	M	250-300g	gleich	•	•	•	•	Siehe auch Abschnitt Serotonin	[33]
• Metamphetamine	Einzeldosis i.p.	Gerbil	M	90d	≤	•	•	•	•	Transiente Zunahme, kein Unterschied nach 36h	[44]
• Opiate	Morphin s.c. (Pellet) / Heroin i.v. Selbstadministration	Ratte SD	M	275-300g	↗↗	↗ •	•	•	NeuN	Wkg. von chron. nicht akuter Beh.; Naltrexone antagonisiert Morphin Wkg.; keine Wkg. von Adrenalectom. plus Korticosteronsubstitution auf morphininduz. Wkg.	[11]
• Antidepressiva	Tranylcypromin, Reboxetin	Ratte SD	M	250-300g	≤	•	•	•	•	Chron. Behandl.; siehe auch Absch. Serotonin	[33]
3. Lithium	oral	Maus B6	M	?	≤	•	gleich	•	NeuN	≤ bcl-2 (Westernblot)	[9]

Literaturverzeichnis zur Tabelle 1:

1. Aberg MA, Aberg ND, Hedbacker H, Oscarsson J, Eriksson PS: **Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus**. *J Neurosci* 2000; **20**:2896-2903.
2. Ambrogini P, Cuppini R, Cuppini C, Ciaroni S, Cecchini T, Ferri P, Sartini S, Del Grande P: **Spatial learning affects immature granule cell survival in adult rat dentate gyrus**. *Neurosci Lett* 2000; **286**:21-24.
3. Bengzon J, Kokaia Z, Elmér E, Nanobashvili A, Kokaia M, Lindvall O: **Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; **94**:10432-10437.
4. Brezun JM, Daszuta A: **Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats**. *Neuroscience* 1999; **89**:999-1002.
5. Brezun JM, Daszuta A: **Serotonin may stimulate granule cell proliferation in the adult hippocampus, as observed in rats grafted with foetal raphe neurons**. *Eur. J. Neurosci.* 2000; **12**:391-396.
6. Cameron HA, Gould E: **Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus**. *Neuroscience* 1994; **61**:203-209.
7. Cameron HA, McEwen BS, Gould E: **Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus**. *J. Neurosci.* 1995; **15**:4687-4692.
8. Cameron HA, McKay RD: **Restoring production of hippocampal neurons in old age**. *Nat Neurosci* 1999; **2**:894-897.
9. Chen G, Rajkowska G, Du F, Seraji-Bozorgzad N, Manji HK: **Enhancement of hippocampal neurogenesis by lithium**. *J Neurochem* 2000; **75**:1729-1734.
10. Dawirs RR, Hildebrandt K, Teuchert-Noodt G: **Adult treatment with haloperidol increases dentate granule cell proliferation in the gerbil hippocampus**. *J Neural Transm* 1998; **105**:317-127.
11. Eisch AJ, Barrot M, Schad CA, Self DW, Nestler EJ: **Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**:7579-7584.
12. Galea LA, McEwen BS: **Sex and seasonal differences in the rate of cell proliferation in the dentate gyrus of adult wild meadow voles**. *Neuroscience* 1999; **89**:955-964.
13. Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ: **Learning enhances adult neurogenesis in the hippoampal formation**. *Nat. Neurosci.* 1999; **2**:260-265.
14. Gould E, Cameron HA, Daniels DC, Woolley CS, McEwen BS: **Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus**. *J Neurosci* 1992; **12**:3642-3650.
15. Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LAM, Fuchs E: **Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation**. *J. Neurosci.* 1997; **17**:2492-2498.
16. Gould E, Tanapat P: **Lesion-induced proliferation of neuronal progenitor cells in the dentate gyrus of the adult rat**. *Neuroscience* 1997; **80**:427-436.
17. Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E: **Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; **95**:3168-3171.
18. Gray WP, Sundstrom LE: **Kainic acid increases the proliferation of granule cell progenitors in the dentate gyrus of the adult rat**. *Brain Res* 1998; **790**:52-59.

19. Jackson-Guilford J, Leander JD, Nisenbaum LK: **The effect of streptozotocin-induced diabetes on cell proliferation in the rat dentate gyrus [In Process Citation]**. *Neurosci Lett* 2000; **293**:91-94.
20. Kempermann G, Brandon EP, Gage FH: **Environmental stimulation of 129/SvJ mice results in increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus**. *Curr. Biol.* 1998; **8**:939-942.
21. Kempermann G, Gage FH: **Experience-dependent regulation of adult hippocampal neurogenesis: effects of long-term stimulation and stimulus withdrawal**. *Hippocampus* 1999; **9**:321-332.
22. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH: **Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; **94**:10409-10414.
23. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH: **More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment**. *Nature* 1997; **386**:493-495.
24. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH: **Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus**. *J. Neurosci.* 1998; **18**:3206-3212.
25. Kim EH, Kim YJ, Lee HJ, Huh Y, Chung JH, Seo JC, Kang JE, Yim SV, Kim CJ: **Acupuncture increases cell proliferation in dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils**. *Neurosci Lett* 2001; **297**:21-24.
26. Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH: **Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation**. *J. Neurosci.* 1996; **16**:2027-2033.
27. Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH: **Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain**. *J. Neurosci.* 1997; **17**:5820-5829.
28. Lee J, Duan W, Long JM, Ingram DK, Mattson MP: **Dietary restriction increases the number of newly generated neural cells, and induces BDNF expression, in the dentate gyrus of rats**. *J Mol Neurosci* 2000; **15**:99-108.
29. Lemaire V, Aurousseau C, Le Moal M, Abrous DN: **Behavioural trait of reactivity to novelty is related to hippocampal neurogenesis**. *Eur J Neurosci* 1999; **11**:4006-4014.
30. Lemaire V, Koehl M, Le Moal M, Abrous DN: **Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus [In Process Citation]**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**:11032-11037.
31. Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR: **Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient ischemia in gerbils**. *J. Neurosci.* 1998; **18**:7768-7778.
32. Madsen TM, Treschow A, Bengzon J, Bolwig TG, Lindvall O, Tingstrom A: **Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy**. *Biol. Psychiatry* 2000; **47**:1043-1049.
33. Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS: **Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus**. *J Neurosci* 2000; **20**:9104-9110.
34. Nakagawa E, Aimi Y, Yasuhara O, Tooyama I, Shimada M, McGeer PL, Kimura H: **Enhancement of progenitor cell division in the dentate gyrus triggered by initial limbic seizures in rat models of epilepsy**. *Epilepsia* 2000; **41**:10-18.
35. Nilsson M, Perflilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson P: **Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory**. *J. Neurobiol.* 1999; **39**:569-578.
36. Parent JM, Tada E, Fike JR, Lowenstein DH: **Inhibition of dentate granule cell neurogenesis with brain irradation does not prevent seizure-induced mossy fiber synaptic reorganization in the rat.** *J. Neurosci.* 1999; **19**:4508-4519.
37. Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH: **Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus**. *J. Neurosci.* 1997; **17**:3727-3738.

38. Scott BW, Wang S, Burnham WM, De Boni U, Wojtowicz JM: **Kindling-induced neurogenesis in the dentate gyrus of the rat**. *Neurosci Lett* 1998; **248**:73-76.

39. Scott BW, Wojtowicz JM, Burnham WM: **Neurogenesis in the dentate gyrus of the rat following electroconvulsive shock seizures [In Process Citation]**. *Exp Neurol* 2000; **165**:231-236.
40. Seki T, Arai Y: **Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus**. *Neuroreport* 1995; **6**:2479-2482.
41. Tada E, Parent JM, Lowenstein DH, Fike JR: **X-irradiation causes a prolonged reduction in cell proliferation in the dentate gyrus of adult rats**. *Neuroscience* 2000; **99**:33-41.
42. Takagi Y, Nozaki K, Takahashi J, Yodoi J, Ishikawa M, Hashimoto N: **Proliferation of neuronal precursor cells in the dentate gyrus is accelerated after transient forebrain ischemia in mice**. *Brain Res* 1999; **831**:283-287.
43. Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E: **Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat**. *J. Neurosci.* 1999; **19**:5792-5801.
44. Teuchert-Noodt G, Dawirs RR, Hildebrandt K: **Adult treatment with methamphetamine transiently decreases dentate granule cell proliferation in the gerbil hippocampus**. *J Neural Transm* 2000; **107**:133-143.
45. Van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH: **Running enhances neurogenesis, learning and long-term potentiation in mice**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999; **96**:13427-13431.
46. Van Praag H, Kempermann G, Gage FH: **Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus**. *Nat. Neurosci.* 1999; **2**:266-270.

2 Aktivitätsabhängige Regulation adulter hippocampaler Neurogenese

2.1 Vorbemerkung und Übersicht

Die im folgenden gewählte Darstellung der Untersuchungsergebnisse zur aktivitätsabhängigen Regulation adulter hippocampaler Neurogenese, faßt die jeweilige (im Anhang im Original wiedergegebene) Publikation in einer dem Kontext und dem gegenwärtigen Wissensstand Rechnung tragenden und daher relativ freien Übersetzung zusammen. Das bedeutet, daß redundante einführende Abschnitte weggelassen worden sind, die Interpretation und Diskussion enger auf den in Rede stehenden Aspekt eingeschränkt wurden und offene Fragen bzw. zum betreffenden Zeitpunkt als "zukünftig" zu untersuchende Aspekte in Bezug auf die heute bereits vorliegenden eigenen und fremden Arbeiten diskutiert werden. Material und Methoden werden in der Übersetzung nur kursorisch zusammengefaßt, sofern dies für das Verständnis des betreffenden Experimentes notwendig ist. Für experimentelle Details sei grundsätzlich auf die Originalpublikation verwiesen. Die Verweise auf Abbildungen und Tabellen in den Übersetzungen (2.2 bis 2.7), die dort mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet sind, beziehen sich jeweils auf die Abbildung im gleichen Kapitel bzw. auf die Originalabbildungen im Anhang. Auslassungen und zusammenfassende Anmerkungen sind durch eckige Klammern gekennzeichnet.

Entsprechend der klassischen Theorie der Entwicklungsbiologie und –psychologie, daß das Gehirn und seine Leistungen Produkt von Genen *und* Umwelt sind, untersuchten wir zunächst, inwieweit die Regulation erwachsener Neurogenese von genetischen Faktoren bestimmt wird (2.2; [93]). Dazu untersuchten wir Neurogenese in verschiedenen ingezüchteten Mausstämmen. Die Inzucht führt zu genetischer Homogenität, und der Versuch war damit das tierexperimentelle Äquivalent zu einer Zwillingsstudie. Es zeigte sich, daß in Bezug auf adulte Neurogenese drastische Stammesunterschiede bestehen, die auf verschiedenen Stufen neurogener Regulation wie der Proliferation der Vorläuferzellen, Überleben und Differenzierung unterschiedlich ausfallen. Dies konnte als Hinweis darauf verstanden werden, daß erstens erwachsene Neurogenese genetischer Disposition unterliegt und zweitens diese genetische Disposition sich auf verschiedene regulativ wirksame Gene erstreckt.

Die folgenden Arbeiten beschäftigen sich mit der Umwelt- und Aktivitätskomponente in der Regulation adulter Neurogenese. Trotz der bahnbrechenden Arbeiten von Fernando Nottebohm in den 80er Jahren über mit Lernverhalten korrelierender Neurogenese in Singvögeln [6, 7, 58] wurde Neurogenese im Hippocampus von Säugetieren lange als eine Art Atavismus oder Kuriosität betrachtet. Unsere Arbeiten waren die ersten, die zeigten, daß Neurogenese im erwachsenen Gehirn von Säugetieren durch Umweltreize stimulierbar ist und das Ausmaß erwachsener Neurogenese ebenfalls mit Lernparametern korreliert (2.3; [94]). In diesen Experimenten wurden Mäuse einer reizreichen Umgebung ausgesetzt, die mehr Platz und Laufräder zur höherer physischer Aktivität, wechselnde Objekte und Tunnelsystemen zur Exploration und durch Leben in

größeren Gruppen Möglichkeit zur stärkeren sozialen Interaktion bot. Es zeigte sich, daß Mäuse, die unter den Bedingungen dieses *enriched environment* lebten, nicht nur den Test des Wasserlabyrinths nach Morris, als einen Test für hippocampale Funktion in Nagern, besser lernten, wie dies auch zuvor schon gezeigt worden war [133, 179], sondern auch, daß die Neurogenese im Hippocampus um 60% gegenüber Tieren in normalen Käfigen gesteigert war. Interessanterweise war der Effekt auf die erwachsene Neurogenese in dem hier untersuchten Mausstamm C57BL/6 nicht auf eine gesteigerte Proliferation der Vorläuferzellen im Gyrus dentatus zurückzuführen. Es war vielmehr ein Effekt im Sinne eines verbesserten Überlebens der neugeborenen Zellen festzustellen. Dies konnte als eine Art Selektionsmechanismus, wie er auch bei der Gehirnentwicklung während der Embryogenese anzutreffen ist, verstanden werden.

Der stimulierende, umweltabhängige oder expositionsabhängige Effekt ließ sich in einem zweiten Experiment, auch in alten Mäusen nachweisen (2.4; [95]). Dieses Resultat zeigte, daß zumindest in Mäusen auch im höheren Alter noch eine aktivitäts- und erfahrungsabhängige Regulation von neuronalen Vorläuferzellen besteht und damit eine zelluläre Plastizität möglich ist.

Der Mausstamm 129/SvJ, der im Vergleich der verschiedenen Mausstämme die geringste Neurogenese gezeigt hatte und zudem als "schlechter Lerner" betrachtet wird [190], wurde in einem weiteren Experiment einer reizreichen Lebensumgebung analog zum beschriebenen Versuch mit C57BL/6 ausgesetzt (2.5; [91]). Hier zeigte sich nicht nur, daß die als „genetisch schlechten Lerner" eingestuften Tiere nach Stimulation in der reizreichen Umgebung im Morris Wasserlabyrinth gutes Lernen zeigten, sondern auch, daß der korrelierende Effekt auf die Neurogenese im erwachsenen Hippocampus sogar etwas größer war als in C57BL/6. Was die Ergebnisse aber besonders interessant machte, war die Tatsache, daß in 129/SvJ Mäusen der Nettoeffekt auf die Neurogenese nicht allein auf einen überlebensfördernden Selektionsprozess wie in C57BL/6 zurückzuführen war, sondern auch auf eine auf das doppelte gesteigerte Proliferation der Vorläuferzellen im Gyrus dentatus. Dies wies nicht nur auf ein größeres Potential von "stummen", aber potentiell rekrutierbaren Vorläuferzellen im Gyrus dentatus hin, sondern auch darauf, daß sich genetische Disposition auch auf das *Wie* der erfahrungsinduzierten Regulation erstreckt.

Als wir C57BL/6 Mäuse in der reizreichen Umgebung hielten, danach aber für drei Monate in den Standardlaborkäfig zurückkehren ließen, zeigten diese Tiere auf Entzug der komplexen Stimuli hin überraschenderweise eine Zunahme der proliferierenden Zellen im Hippocampus gegenüber Kontrolltieren und Tieren, die für sechs Monate in der reizreichen Umgewbung gelebt hatten (2.6; [92]). Dieses Ergebnis kann so interpretiert werden, daß der überlebensfördernde Effekt während der früheren Stimulationsphase nicht nur auf potentielle neue Nervenzellen wirkte, sondern auch auf die verbleibenden Vorläuferzellen selbst. Es stand somit auch drei Monate nach der Beendigung der Stimulationsphase weiterhin ein erhöhtes Potential für gesteigerte Neurogenese zur Verfügung. Das Potential allerdings lag brach — vermutlich da

keine neue Komplexität der Umwelt die Rekrutierung neuer Nervenzellen förderte. Diese Arbeit legte nahe, daß ein erfahrungsabhängiger überlebensfördernder Effekt auch auf die Vorläuferzellpopulation selbst wirken und somit das Potential zur Neurogenese im erwachsenen Gehirn frühzeitig steigerbar sein könnte.

Da eine reizreiche Umgebung aus einer komplexen Mischung sehr verschiedener Reize besteht, stellte sich die wichtige Frage, welche dieser Reize für die Auslösung des stimulierenden Effektes auf die Neurogenese im erwachsenen Gehirn die entscheidenden sind. Wir zeigten hierzu, daß körperliche Aktivität in der Lage ist, eine gesteigerte Neurogenese hervorzurufen (2.7; [178]). Mäuse die unbegrenzten und zwanglosen Zugang zu einem Laufrad in ihrem anderweitig nicht besonders ausgestatteten Käfig hatten, zeigten eine Verdoppelung in der Zahl der proliferierenden Vorläuferzellen im Hippocampus und hierdurch eine gesteigerte Neurogenese. Dieses Resultat belegte wiederum, daß die Regulation der Neurogenese im erwachsenen Hippocampus auf verschiedenen Ebenen erfolgt und darüberhinaus, daß verschiedene Reize auch auf verschiedene Aspekte der Regulation Einfluß nehmen.

2.2 Allgemeine genetische Determinanten adulter hippocampaler Neurogenese

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. **Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 94 (1997) 10409-10414.

Zusammenfassung: Um den Einfluß des genetischen Hintergrundes auf adulte hippocampale Neurogenese in erwachsenen Mäusen zu identifizieren, haben wir in C57BL/6, BALB/c, CD1(ICR) und 129 Sv/J Mäusen die Zellproliferation, das Überleben der neugeborenen Zellen und ihre Differenzierung untersucht. Die Zellproliferation im Gyrus dentatus war am höchsten in C57BL/6; die Überlebensrate war am höchsten in CD1. In allen Stämmen nahmen ungefähr 60% der neugeborenen Zellen einen neuronalen Phänotyp an, aber 129 Sv/J produzierten mehr neue Astrozyten als die anderen Stämme. Über einen Zeitraum von sechs Tagen produzierten C57BL/6 0.36% ihrer absoluten Körnerzellzahl von 239 000 als neue Nervenzellen, BALB/c 0.30% von 242 000, CD1 (ICR) 0.32% von 351 000 und 129 Sv/J 0.16% von 280 000. Diese Ergebnisse zeigten, daß unterschiedliche Stufen der Regulation adulter hippocampaler Neurogenese unterschiedlicher Beeinflussung durch den genetischen Hintergrund unterliegen.

[Ziel dieser Arbeit war, erste Anhaltspunkte über die genetischen Determinanten der Regulation adulter hippocampaler Neurogenese zu gewinnen. Es waren zu diesem Zeitpunkt bereits einige Faktoren bekannt, die adulte Neurogenese beeinflussen. Dazu gehörten insbesondere E. Goulds Arbeiten über die Rolle, die Steroidhormone und excitatorische Afferenzen spielen. Beide Faktoren wirken als negative Regulatoren. Nachdem wir zeigen konnten, daß adulte hippocampale Neurogenese durch Umweltreize positiv reguliert wird, lag es

nahe zu prüfen, wie diese funktionelle Regulation genetischen Determinanten unterliegt.]

Dazu wählten wir als ersten Schritt den Vergleich von vier ingezüchteten Mausstämmen, die unter identischen Bedingungen gehalten wurden, um den Umwelteinfluß zu minimieren.

Die Proliferation der Stamm- und Vorläuferzellen in der subgranulären Zone wurde durch Markierung mit BrdU und anschließender Immunhistochemie untersucht. Die Überlebensrate wurde abgeschätzt, indem die Zahl BrdU-positiver Zellen einen Tag nach der letzten von sechs BrdU-Injektionen (eine pro Tag) mit dem Wert vier Wochen später verglichen wurde. Die Zellzahlen wurden stereologisch bestimmt. Die phänotypische Differenzierung wurde mittels Immunhistochemie und konfokaler Mikroskopie mit Antikörpern gegen BrdU, den Körnerzellmarker Calbindin D28k und den Astrozytenmarker GFAP untersucht. [Für die Details der Methoden sei auf die Originalpublikation verwiesen.]

Ergebnisse

Proliferation. In allen vier untersuchten Mausstämmen konnten proliferierende Zellen in der subgranulären Zone des Gyrus dentatus nachgewiesen werden (Abb. *1). Außerdem waren BrdU-positive Zellen in der Hilusregion (CA4) und in der Molekularschicht zu finden; Zellgenese, jedoch keine Neurogenese ist in diesen Regionen beschrieben worden [27, 94, 100]. Die Dichte der Proliferation in der Molekularschicht hob sich nicht deutlich von der sehr niedrigen allgemeinen Zellproliferation ab, wie sie überall im Gehirn gefunden werden kann. Eine Quantifizierung erwies, daß sich die Proliferation in C57BL/6 signifikant von der in den anderen Stämmen unterschied und etwa 1.5-fach höher war (Abb. *2A und Tabelle *2.

Tab. 2: Statistische Analysen: Signifikanzniveaus

	C57 vs. BALB/c	C57 vs. CD1	C57 vs. 129/Sv	BALB/c vs. CD1	BALB/c vs 129/Sv	CD1 vs. 129/Sv
Proliferation - 1 Tag nach der letzten BrdU-Injektion (siehe Abb. 2a) F-Wert: 3.311; P-Wert: 0.0470	0.0162	0.0164	0.0381	n/s	n/s	n/s
Überlebende Zellen - 4 Wochen nach der letzten BrdU-Injektion (siehe Abb. 2b) F-Wert: 7.696; P-Wert: 0.0021	n/s	n/s	0.0158	0.0114	n/s (0.0789)	0.0002
Neuronale Differenzierung - 4 Wochen nach der letzten BrdU-Injektion (siehe Abb. 3) F-Wert: 0.392; P-Wert: 0.7609	n/s	n/s	n/s	n/s	n/s	n/s
Gliale Differenzierung - 4 Wochen nach der letzten BrdU-Injektion (siehe Abb. 3) F-Wert: 2.767; P-Wert: 0.0781	n/s	n/s	(0.0440)	n/s	(0.0332)	(0.0288)
Volumen der Körnerzellschicht (siehe Tab. 2) F-Wert: 8.570; P-Wert: 0.0013	n/s	0.0003	n/s	0.0007	n/s	0.0047
Gesamtkörnerzellzahl (siehe Tab. 2) F-Wert: 16.664; P-Wert: <0.0001	n/s	<0.0001	0.0344	<0.0001	n/s (0.0526)	0.0012
Neuronale Dichte (siehe Tab. 2) F-Wert: 0.815; P-Wert: 0.5042	n/s	n/s	n/s	n/s	n/s	n/s
BrdU-positive Zellen in Prozent der Gesamtkörnerzellzahl (siehe Resultate) F-Wert: 3.386; P-Wert: 0.0441	n/s	n/s	0.0083	n/s	n/s (0.0521)	0.0323

Statistische Analysen wurden mit ANOVA und Fisher post-hoc-Test durchgeführt. Ein P-Wert ≤ 0.05 wurde als statistisch signifikant angesehen. P-Werte zwischen 0.05 und 0.1 und P-Werte unter 0.05 in den Fällen, in denen der ANOVA P-Wert keine Signifikanz ergab sind in Klammern angegeben. Signifikante Vergleiche sind unterlegt. Die erste Spalte listet die F-Werte und P-Werte der ANOVA auf. *N* ist 5 in allen Gruppen. "n/s" steht für "nicht signifikant".

Überlebensrate. Vier Wochen nach der letzten Injektion von BrdU wurde die Überlebensrate der neugeborenen Zellen abgeschätzt (Abb. *1B). Abb. *2B und Tabelle *2 zeigen die Quantifizierung dieser Untersuchungen. 129/SvJ hatten durchschnittlich nur etwa halb soviele überlebende neugeborene Zellen wie die anderen untersuchten Stämme und unterschieden sich signifikant von CD1 und relativ deutlich (P = 0.0864) von C57/BL6. Die Ratio der Zahl BrdU-positiven Zellen vier Wochen nach der letzten Injektion gegenüber der Zahl am 1. Tag nach Injektion verdeutlicht dieses Muster: 129/SvJ hatten eine Vierwochenüberlebensrate von nur 1 aus 4, während C57BL/6 eine Rate von 1 aus 3 hatten, BALB/c von 1 aus 2 und CD1 von ungefähr 1 aus 1.3.

Differenzierung. Die Kolokalisation von BrdU-Immunreaktivität mit einer Immunreaktion von Antikörpern gegen den Körnerzellmarker Calbindin D28k und den Astrozytenmarker GFAP wurde untersucht, um den Phänotyp der neugeborenen Zellen vier Wochen nach der letzten BrdU-Injektion zu untersuchen. Die Abb. *1G bis I zeigen konfokale Mikroskopbilder von dreifachmarkierten neugeborenen Zellen. In allen vier Stämmen konnte sowohl eine neuronale (Abb. *1G) als auch eine gliale (Abb. *1H) Differenzierung festgestellt werden. Ungefähr ein Drittel der überlebenden neugeborenen Zellen wies keine Doppelmarkierungen auf, was entweder darauf schließen läßt, daß es sich um eine undifferenzierte Vorläuferzelle oder aber um eine differenzierte Zelle, deren Phänotyp hier nicht erfaßt wurde, handelt. Neugeborene Astrozyten wurden nahezu ausschließlich in der subgranulären Zone gefunden. 129/SvJ zeigten einen Trend (p = 0.0781) zu mehr neuen Gliazellen als die anderen Stämme (Tabelle *2).

Neue Nervenzellen im Gyrus dentatus erwachsener Mäuse. Alle vorgestellten Daten beziehen sich auf die stereologisch gewonnene Abschätzung des Volumens des Gyrus dentatus (Tabelle *2). CD1-Mäuse hatten einen signifikant größeren Gyrus dentatus als die anderen Stämme. Auch die absolute Körnerzellzahl zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen: CD1 hatten signifkant mehr Körnerzellen als die anderen Stämme, 129/SvJ hatten signifikant weniger (außer für den Vergleich mit BALB/c, für den der P-Wert 0.0526 war). Die Packdichte der Körnerzellen war annähernd gleich in den vier untersuchten Stämmen (Tabelle *2, Abb. *1C bis F).

Die Zahl der BrdU-positiven Zellen vier Wochen nach der letzten Injektion kann als Prozentwert der absoluten Zahl an vorhandenen Körnerzellen ausgedrückt werden. Die Werte sind (Mittelwert +/- Standardfehler): 0.58 +/- 0.29% in C57BL/6, 0.48 +/- 0.07% in BALB/c, 0.51 +/- 0.12% in CD1 und 0.27 +/- 0.03% in 129/SvJ. 129/SvJ unterschied sich von den anderen Stämmen durch eine signifikant niedrigere Ratio (nur der Vergleich BALB/c und 129/SvJ ist mit P = 0.0521 knapp nicht signifikant; vgl. Tabelle *2).

Tab. 3: Stereologische Kennzahlen des Gyrus dentatus

	C57	BALB/c	CD1 (ICR)	129/SvJ
Volumen der Körnerzellschicht (μm^3)	2.63×10^8 ± 0.16×10^8	2.71×10^8 ± 0.34×10^8	3.57×10^8 ± 0.27×10^8	2.90×10^8 ± 0.45×10^8
Gesamtzahl der Körnerzellen	2.39×10^5 ± 0.25×10^5	2.42×10^5 ± 0.30×10^5	3.51×10^5 ± 0.27×10^5	2.80×10^5 ± 0.32×10^5
Neuronale Dichte in der Körnerzellschicht (Zellen pro Proben- volumen)	8.14 ± 0.18	9.19 ± 0.77	8.86 ± 0.18	8.77 ± 0.21

Stereologische Daten des Gyrus dentatus: Volumen, Gesamtkörnerzellzahl und Neuronale Dichte. Alle Zahlen sind Mittelwerte ± Standardfehler. *N* ist 5. Probenvolumen: 9000 μm^3. Statistische Angaben in Tab. 2.

Durch Multiplikation dieser Werte mit der Prozentzahl der BrdU-/Calbindin-positiven Zellen (Abb. *2B) kann die Zahl der neugebildeten Neurone relativ zur Gesamtzahl der vorhandenen Körnerzellen abeschätzt werden. In der sechstägigen Periode der BrdU-Injektionen produzierten C57BL/6 mindestens 0.36% ihrer Körnerzellpopulation als neue calbindinpositive Nervenzellen in der Körnerzellschicht, BALB/c 0.30%, CD1 0.32% und 129/SvJ nur 0.16%.

Diskussion

In diesem Experiment wurde in vier Mausstämmen die Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen, das Überleben ihrer Tochterzellen und deren phänotypische Differenzierung untersucht. Adulte hippocampale Neurogenese konnte in allen vier untersuchten Stämmen nachgewiesen werden. Stammesunterschiede wurden im Hinblick auf die Proliferation, das Überleben, die Differenzierung, die absoluten Zellzahlen im Gyrus dentatus und das Volumen des Gyrus dentatus festgestellt.

Stammesunterschiede in der Zahl der BrdU-positiven Zellen einen Tag nach der letzten BrdU-Injektion, die hier als Maßzahl für "Proliferation" herangezogen werden, reflektieren nicht notgedrungen analoge Unterschiede in der Größe der Vorläuferzellpopulation in der subgranulären Zone, da der Einbau von BrdU in die sich replizierende DNA auch von Zellzyklusparametern beeinflußt wird. Da BrdU nur in der S-Phase der Mitose inkorporiert wird und die Bioverfügbarkeit mit ungefähr zwei Stunden angegeben wird [173], könnte eine einzige Injektion pro Tag nicht alle Zellen, die sich während dieser 24 Stunden teilen, treffen. Andererseits kann dieses Injektionsschema nicht zu Überschätzungen führen. Trotzdem beinhaltet die gewonnene Zahl BrdU-positiver Zellen auch die Tochterzellen, die aus Zellteilungen markierter Zellen nach Beendigung der Injektionen hervorgegangen sind. Obwohl auch diese

Zellen "neugeboren" sind, beeinflußt diese Tatsache Aussagen über den exakten Geburtszeitpunkt der markierten Zellen. Der Grund dafür, die Injektionen über einen Zeitraum von sechs Tagen auszudehnen, ist der Wunsch, den quantitativen Einfluß der fortgesetzten Teilungen markierter Zellen in der Abwesenheit von systemischem BrdU zu minimieren.

Für C57BL/6 wird die Zellzyklusdauer am Tag P20 mit ca. 16 Stunden angegeben, wovon ca. 8 Stunden auf die S-Phase entfallen [131]. Andere Studien haben gezeigt, daß sich die Zellzyklusdauer mit steigendem Alter verlängert [24]. Daraus kann für die hier erhobenen Ergebnisse gefolgert werden, daß C57BL/6 entweder einen schnelleren Zellzyklus oder eine größere Population proliferierender Vorläuferzellen als die anderen Stämme haben oder eine Kombination von beidem. Unabhängig davon ergibt sich als das Nettoergebnis, daß C57BL/6 mehr neugeborene Zellen aufweisen als die anderen Stämme.

Durch Vergleich der Zahl der BrdU-positiven Zellen einen Tag und vier Wochen nach der Injektion von BrdU wird eine dramatische Abnahme der Zellzahl deutlich, die in 129/SvJ mit 75% am ausgeprägtesten war und mit 23% in CD1 am geringsten ausfiel. Dabei ist die Erklärung, daß ein Teil der Zellen durch massive fortgesetzte Teilungsaktivität die BrdU-Markierung in ihrem Genom unter die immunhistochemische Nachweisgrenze verdünnt haben könnte, in Betracht zu ziehen; sie kann aber nicht den gesamten Effekt erklären. [...]

Eine Abnahme der Zahl BrdU-positiver Zellen durch Verdünnung implizierte, daß sich die große Mehrheit der Stamm- und Vorläuferzellen symmetrisch teilte. Da die BrdU-Injektionen über sechs Tage verteilt wurden, würden Zellen, die den Zellzyklus zumindest in den ersten Tagen bei asymmetrischen Teilungen verließen, als BrdU-positive Zellen nachweisbar bleiben. Symmetrische Teilungen in derartigem verdünnend wirksamem Ausmaß würden dadurch eine enorme Zahl undifferenzierter Zellen in der subgranulären Zone generieren; was jedoch nicht geschieht. Auf der anderen Seite könnte z.B. apoptotischer Zelltod diesen Effekt ausbalancieren.

Während der embryonalen Entwicklung spielt apoptotischer Zelltod eine herausragende Rolle in der Regulation der endgültigen Zellzahl. [Das Auftreten von Apoptose, das für die proliferativen Regionen des sich enwickelnden Gehirns beschrieben wurde, war zum Zeitpunkt der Veröffenlichung dieser Arbeit für die neurogenen Regionen des erwachsenen Gehirns noch nicht untersucht. Mittlerweile gibt es Studien, die eine analoge Beziehung auch im erwachsenen Gehirn nachweisen [13]. Daher spricht viel dafür, daß diejenigen Zellen, die in den vier Wochen zwischen den beiden Untersuchungszeitpunkten "verschwinden", durch Apoptose eliminiert werden.]

Unabhängig von dieser Reduktion differenziert eine gewisse Anzahl der überlebenden Zellen, was *post hoc* belegt, daß asymmetrische Zellteilungen aufgetreten sein müssen. Sollte durch einen hypothetisch kürzeren Zellzyklus und durch Verdünnungseffekte die Proliferation in 129/SvJ unterschätzt worden sein, so würde dies zu einer Nettoüberlebensrate sogar unter der angegebenen

1:4 ergeben. Es sollte aus diesem Grund hier aber die Existenz eindeutiger Stammesunterschiede stärker betont werden als ihre exakte quantitative Ausprägung.

Vier Wochen nach der letzten Injektion waren neuronal und glial differenzierte BrdU-positive Zellen in allen vier untersuchten Stämmen nachweisbar. [...] Daraus kann nicht unmittelbar geschlossen werden, daß die *in situ* nachweisbaren Stamm- und Vorläuferzellen (Abb. *1A, B, G) "identisch" mit den in der Zellkultur als multipotent ausgewiesenen Stammzellen sind. Daraus folgt auch, daß nicht sicher ausgesagt werden kann, ob die im Experiment nachgewiesenen differenzierten (calbindin- bzw. GFAP-positiven) Zellen aus einer multipotenten Vorläuferzelle stammen oder aus zwei unterschiedlichen, in ihrer Differenzierungslinie festgelegten Blastenpopulationen.

Das Ergebnis, daß sich 129Sv/J von den anderen drei Stämmen in der Zahl der Zellen, die in Astrozyten differenzierten, unterschied, legt deshalb zwei Interpretationen nahe: (1.) in 129/SvJ-Mäusen tendiert die Entscheidung zur Differenzierung eher zur glialen Linie oder (2.) in 129/SvJ sind Glioblasten empfänglicher für eine Stimulation zur Differenzierung.

Unsere Ergebnisse bezüglich der absoluten Körnerzellzahl fallen in den durch andere Publikationen gesteckten Rahmen und bestätigen, daß beachtliche Stammesunterschiede für diesen Parameter bestehen [183, 187-189]. So hatten 129/SvJ nicht weniger Körnerzellen als andere Stämme, aber sie produzierten deutlich weniger neue Körnerzellen im Erwachsenenalter. Es ist, gerade auch im Lichte der Daten zur Apoptose in den neurogenen Regionen nicht mit allerletzter Sicherheit geklärt, inwieweit adulte hippocampale Neurogenese kontinuierlich neue Nervenzellen der Körnerzellschicht hinzufügt oder Teil eines Austauschprozesses ist, in dem alte Körnerzellen ersetzt werden. Wimer et al. haben den Hippocampus von Mäusen bis zum Tag P84 untersucht und haben einen Zuwachs der Körnerzellschicht gesehen [188]. Sowohl für adulte Neurogenese in Ratten [37] als auch in alten Mäusen, wie die diesbezüglichen, weiter unten dargestellten Ergebnisse zur erfahrungsabhängigen Regulation adulter Neurogenese und die dabei erhobenen stereologischen Daten zeigen, lassen sich mittlerweile jedoch starke Argumente dafür ins Feld führen, daß die Gesamtkörnerzellzahl über die ersten 12 Lebensmonate ansteigt und etwa um diese Zeit (bei dann deutlich reduzierter adulter hippocampaler Neurogenese) ein Plateau erreicht [9]. [...]

Der ausgeprägteste Stammesunterschied in adulter hippocampaler Neurogenese wurde zwischen C57BL/6 und 129/SvJ nachgewiesen. Ausgerechnet diese beiden Stämme werden in Experimenten mit transgenen oder nullmutanten Tieren sehr häufig gekreuzt. Bei der Interpretation von Daten zur adulten hippocampalen Neurogenese in Tieren mit gezielten Mutationen muß dies berücksichtigt werden, da flankierende Hintergrundgene das Resultat beeinträchtigen könnten [39, 57, 105].

Das Muster der im vorliegenden Experiment gefundenen Stammesunterschiede war nicht einheitlich bezüglich der verschiedenen untersuchten Parameter (vgl. Tabelle 1). So differenzierten beispielsweise in 129/SvJ, die die

niedrigste Zahl überlebender BrdU-positiver Zellen hatten, die gleiche relative Anzahl hiervon in Neurone wie in den anderen Stämmen. CD1-Mäuse hatten bezogen auf das Volumen einen größeren Hippocampus als die anderen Stämme, aber zeigten keine proportionale Steigerung in adulter hippocampaler Neurogenese. Grundsätzlich zeigte sich, daß die Gesamtzahl an Körnerzellen kein guter Indikator für das Ausmaß an adulter hippocampaler Neurogenese ist. 129/SvJ, die einen durchschnittlich großen Hippocampus haben, produzierten mit Abstand die niedrigste Zahl neuer Körnerzellen (lediglich 0.16% der absoluten Körnerzellzahl über den Injektionszeitraum von sechs Tagen hinweg). [...]

Die genetische und umweltabhängige Kontrolle von Nervenzellzahlen ist beispielsweise auch für die Retina untersucht worden, wo sich zeigte, daß vererbbare Faktoren etwa 75% der sichtbaren Unterschiede erklären [185]. [...]

Obwohl unsere Daten andeuten, daß der genetische Hintergrund adulte hippocampale Neurogenese stark beeinflußt, bedeutet dies nicht, daß die relevanten Gene nur diejenigen sind, die unmittelbar in der Regulation adulter hippocampaler Neurogenese involviert sind. Eine Vielzahl von Genen die Systeme beeinflussen, die ihrerseits Effekte auf die Regulation adulter hippocampaler Neurogenese haben (z.B. der Hormonstatus) könnten indirekt für die Stammesunterschiede verantwortlich sein.

Mit Ausnahme von 129/SvJ, die nur die Hälfte der durchschnittlichen Rate der anderen Stämme erreichten, produzierten die hier untersuchten Stämme über einen Zeitraum von nur sechs Tagen mehr als 0.30% ihrer Gesamtkörnerzellzahl als neue Nervenzellen. Dies entspricht einem neuen Neuron auf ca. 2000 bestehende Körnerzellen. Diese Neurogeneserate ist überraschend hoch. Adulte hippocampale Neurogenese ist daher kein quantitativ zu vernachlässigendes Phänomen. Es ist aber offen, inwieweit die Körnerzellzahl und die Rate adulter hippocampaler Neurogenese mit hippocampaler Funktion korreliert.

2.3 Aktivitätsabhängige Regulation adulter hippocampaler Neurogenese

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. **More hippocampal neurons in mice living in an enriched environment**. *Nature* 386 (1997) 493-495

Zusammenfassung: Neurogenese im Gyrus dentatus findet über die gesamte Lebensspanne hinweg statt. Die Funktion der neugeborenen Neurone und die Mechanismen, die ihre Geburt regulieren, sind jedoch noch unbekannt. Hier zeigen wir, daß signifikant mehr neue Nervenzellen im Gyrus dentatus von Mäusen zu finden sind, die einer reizreichen Lebensumgebung ausgesetzt wurden, als in Kontrolltieren in Standardkäfigen. Wir zeigen außerdem durch die Anwendung von stereologischen Techniken, daß die reizreich lebenden Mäuse eine vom Volumen her größere Körnerzellschicht und um 15% mehr Körnerzellen besitzen.

Seit langem ist bekannt, daß im erwachsenen Gehirn eine erfahrungsabhängige Plastizität neuroanatomischer Strukturen zu finden ist [2, 41, 72, 118, 154]. Eine reizreiche Lebensumgebung ("Enriched environment"), die sich durch die "Kombination von komplexer unbelebter und sozialer Stimulation"[153] gestaltet, wird dabei eingesetzt, um erfahrungsabhängige Neuroplastizität zu induzieren. Im Hippocampus nachweisbare Veränderungen umfassen eine vermehrte "Dicke" des Hippocampus [150, 181], Zunahme dendritischer Verzweigungen und der Zahl der Gliazellen. Reizreichtum besteht dabei normalerweise im Vergleich mit der Standardlaborhaltung, auch wenn Art und Ausmaß dieses Reizreichtums, wie er auch in dieser Studie angewandt wurde, noch eindeutig eine Reizarmut gegenüber Wildbedingungen darstellen [40]. Das im Folgenden dargestellte Experiment sollte zeigen, ob die Exposition gegenüber einer reizreicheren Umgebung zu einer erhöhten Nervenzellzahl im Gyrus dentatus führen könnte.

Dazu wurden 21 Tage alte Mäuse des Stammes C57BL/6 zufällig auf zwei Gruppen aufgeteilt und wuchsen entweder unter Standardbedingungen oder reizreichen Bedingungen für 40 weitere Tage heran (Abb. *1). Während der letzten zwölf Tage dieser 40 Tage erhielten sie eine tägliche intraperitoneale Injektion (50 mg pro Kilogramm Körpergewicht) BrdU. Einen Tag nach der letzten Injektion wurden fünf Mäuse aus jeder Gruppe mit 4%iger Paraformaldehydlösung perfundiert. Die verbleibenden Tiere wurden für fünf Tage im Wasserlabyrinth nach Morris untersucht und lebten während dieser Zeit und für 23 weitere Tage in der jeweilig zugewiesenen Umgebung.

Vier Wochen nach der letzten BrdU-Injektion wurden die verbliebenen Mäuse perfundiert. Gehirnschnitte wurden mit Immunhistochemie untersucht, und die Zahl der BrdU-positiven Zellen wurde mit stereologischen Methoden bestimmt. Es fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Zahl der BrdU-positiven Zellen zwischen den beiden Gruppen am Tag 1 nach der letzten BrdU-Injektion. Dieses Resultat legte nahe, daß reizreiche Bedingungen

keinen oder nur geringen Einfluß auf die Teilungsaktivität der Vorläuferzellen im Gyrus dentatus haben (Es zeigte sich in folgenden Experimenten, daß bezüglich dieses Punktes Stammesunterschiede bestehen und sich z.B. in 129/SvJ Mäusen unter identischen experimentellen Bedingungen ein massiver Effekt auf die Proliferation in der subgranulären Zone feststellen läßt — siehe 2.5).

Vier Wochen später jedoch fand sich ein hochsignifikanter Unterschied in der Zahl der überlebenden BrdU-positiven Zellen (Abb. *2A und *3A und B). Reizreich lebende Tiere hatten 57% mehr markierte Zellen pro Gyrus dentatus als Kontrollen. Dies legt nahe, daß reizreiche Lebensumgebung einen überlebensfördernden Effekt auf die sich teilenden neuronalen Vorläuferzellen (bzw. ihre Tochterzellen) im Gyrus dentatus hat.

Dreifachmarkierungen für BrdU, den Körnerzellmarker Calbindin D28k und saures Gliafaserprotein (GFAP) als Marker für Astrozyten wurden durchgeführt und zum Vierwochenzeitpunkt mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt, um den Phänotyp der BrdU-positiven Zellen zu bestimmen (Abb. *3C). Die relative Verteilung der Phänotypen zeigte zwischen den Gruppen keine Unterschiede: 61% in den reizreich lebenden Tieren und 57% in Kontrollen der BrdU-positiven Zellen waren auch calbindinpositiv und zeigten somit einen neuronaler Phänotyp mit Körnerzelldifferenzierung. Die Multiplikation der Zahl der BrdU-positiven Zellen mit der entsprechenden Rate neuronaler Differenzierung führte zu der Schlußfolgerung, daß von den während der zwölf Tage der Injektionen geborenen Zellen pro Gyrus dentatus durchschnittlich mindestens 2490 neue Neurone überlebten —im Vergleich zu nur 1330 in Kontrolltieren.

Im Gyrus dentatus der Kontrolltiere, waren 16% der BrdU-positiven Zellen auch GFAP-positiv, während 27% weder calbindin- noch GFAP-positiv waren. Die entsprechenden Zahlen für die reizreich lebende Gruppe waren: 11% und 29%. Reizreich lebende Tiere zeigten somit durchschnittlich ungefähr 450 überlebende neue Astrozyten im Gyrus dentatus gegenüber ungefähr 380 in den Kontrollen. Dieses Resultat ist in Übereinstimmung mit den früheren Berichten von einer gesteigerten Gliazellzahl in reizreich lebenden Tieren [2, 181].

Ältere Arbeiten haben berichtet, daß reizreiche Haltung zu einer Zunahme der hippocampalen "Tiefe" (*depth)* führt [150]. Wir haben das absolute Volumen der Körnerzellschicht stereologisch bestimmt und fanden einen statistisch signifikanten Zuwachs in der reizreich lebenden Gruppe (Abb. *2B). Diese Veränderung in der hippocampalen Morphologie war zuvor mit einer verstärkten Verzweigung der Dendriten, einer Zunahme der Kerngröße und mehr Gliazellen erklärt worden. Eine Zunahme der Nervenzellzahl könnte jedoch ebenfalls zu der Volumenvergrößerung beitragen. Als wir die absolute Körnerzellzahl stereologisch bestimmten, fanden wir, daß reizreich lebende Tiere durchschnittlich mehr als 310 000 Körnerzellen besaßen, im Gegensatz zu 270 000 in Kontrollen (Abb. *2C). Dies stellt eine Zunahme um mehr als 40 000 Neurone bzw. mindestens 15% dar. Obwohl keine entsprechenden, stereolo

gisch erhobenen Vordaten für C57BL/6 Mäuse existieren, befindet sich die Ausgangszahl in der Spanne, die für andere Stämme angegeben wurde [189].

Wir schließen aus diesen Ergebnissen, daß Erfahrung einer reizreichen Umgebung einen überlebensfördernden Effekt auf die Tochterzellen der neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen im Hippocampus von erwachsenen Mäusen hat und daß diese neuen Neurone zu einem erhöhten hippocampalen Volumen und einer gesteigerten Körnerzellzahl in diesen Tieren beitragen. Da die Stimulation durch Umweltreize theoretisch einen ähnlichen Effekt auf ruhende Stammzellen in anderen Regionen des Hippocampus haben könnte, untersuchten wir die CA-Regionen, fanden jedoch keine BrdU-positiven Zahlen in Maßen, die über den sehr niedrigen und verstreuten Hintergrund sich teilender Zellen, wie er überall im Hippocampus zu finden ist, hinausgeht (Abb. *3D bis G). Die Hilusregion (CA4) ist insofern eine Ausnahme, als daß eine gewisse Rate an Zellproduktion, wenn auch keine Neurogenese, in dieser Region bekannt ist [27, 100]. Vier Wochen nach der letzten BrdU-Injektion fanden sich (Mittelwert +/- Standardfehler) 824 +/- 105 BrdU-positive Hiluszellen in Kontrollen im Vergleich zu 886 +/- 119 in reizreich lebenden Tieren ($p > 0.7$; t-Test). Das Volumen des Hilus veränderte sich ebenfalls nicht und lag bei 0.43 +/- 0.02 mm^3 in Kontrollen und 0.47 +/- 0.03 mm^3 in reizreich lebenden Tieren ($p > 0.69$; t-Test). Diese Ergebnisse legen nahe, daß die Wirkung auf die neugeborenen Nervenzellen und Astrozyten in der subgranulären Zone relativ spezifisch ist.

Die regulatorischen Mechanismen, die adulte hippocampale Neurogenese steuern, sind weitgehend unbekannt. Sowohl Studien über adulte hippocampale Neurogenese als auch über erfahrungsabhängige Neuroplastizität unterstützen die These, daß Steroidhormone eine Rolle in dieser Regulation spielen könnten, möglicherweise über Signalwege, die die Aktivierung glutamaterger Rezeptoren beinhalten.

Aus *in vitro* und *in vivo* Studien ist bekannt, daß trophische Faktoren, inklusive *Epidermal Growth Factor* und *Fibroblast Growth Factor 2,* das Schicksal von neuronalen Vorläuferzellen beeinflussen können [35, 135, 147]. Daten über die erfahrungsabhängige Regulation dieser Faktoren fehlen bislang. Es ist auch anzunehmen, daß eine präzise zeitliche und räumliche Kontrolle verschiedener Parameter erforderlich ist, um das Überleben und die Differenzierung der endogenen neuronalen Vorläuferzellen zu gewährleisten.

Um darzustellen, daß der hier angewandte Reizreichtum der Umgebung ausreichte, um die Verbesserung der Leistung in Bezug auf räumliches Lernen, wie bereits von anderen berichtet [133, 179], hervorzurufen, testeten wir unsere Tiere im Wasserlabyrinth nach Morris und fanden eine moderate, jedoch signifikante Verbesserung in den reizreich lebenden Tieren (Abb. *2D). Hieraus kann man nicht schließen, daß die größere Zahl an Neuronen im Gyrus dentatus diese Verbesserung im Verhaltenstest bewirkte. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß eine Kombination von mehr Nervenzellen, Synapsen und Dendriten sowie Faktoren, die noch unbekannt sind, zu der verbesserten Leistung, die durch die reizreiche Umgebung induziert wurde, beiträgt.

2.4 Aktivitätsabhängige Regulation adulter Neurogenese im alternden Hippocampus

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. **Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus.** *Journal of Neuroscience* 18 (1998) 3206-3212

Zusammenfassung: Wir zeigen hier, daß unter physiologischen Bedingungen auch im Hippocampus von sehr alten Mäusen noch Neurogenese vorkommt und durch Leben in einer reizreichen Umgebung stimulierbar ist. Die Neurogenese verminderte sich mit steigendem Alter. Ein Wechsel aus der Standardunterbringung in eine reizreiche Lebensumgebung mit Möglichkeiten zur sozialen Interaktion, Exploration und körperlichen Aktivität für einen Zeitraum von 68 Tagen führte zu einem verbesserten Überleben BrdU-markierter Zellen. Phänotypische Analyse enthüllte, daß in reizreich lebenden Tieren relativ mehr Zellen zu Nervenzellen differenzierten, was zu einer Nettoverdreifachung der Zahl BrdU-markierter Neurone in zwanzig Monate alten Mäusen (105 gegenüber 32 Zellen) und einer Verdoppelung (684 gegenüber 285 Zellen) in acht Monate alten Mäusen im Vergleich zu gleichaltrigen Tieren in Standardkäfigen führte. Entsprechende Zahlen für BrdU-positive Astrozyten und BrdU-positive Zellen, die keine Doppelmarkierung mit den neuronalen oder glialen Markern zeigte, blieben unbeeinflusst. Der Effekt auf die relative Verteilung der Phänotypen kann als eine überlebensfördernde Wirkung mit einer Selektivität für Neurone interpretiert werden. Die Proliferation der Vorläuferzellen blieb von der Stimulation durch Umweltreize unbeeinflusst.

[...] Der alternde Hippocampus wird von einer Anzahl struktureller und funktioneller Veränderungen heimgesucht. Hierzu gehören beispielsweise auch ein neuronaler Zellverlust in den CA-Regionen und im Hilus [184], eine verminderte Synapsendichte [156] und eine verminderte Expression von Wachstumsfaktor- und Steroidhormonrezeptoren [12]. Neurogenese ist über das gesamte Leben einer Ratte hinweg nachweisbar [3, 27, 89, 100], aber läßt mit zunehmendem Alter nach [100]. Das Ausmaß, in dem die verbleibende Neurogenese im Gyrus dentatus reguliert wird und funktionelle Konsequenzen hat, ist noch unklar.

Wir haben das experimentelle Paradigma der reizreichen Lebensumgebung [152, 154] benutzt, um zu zeigen, daß eine erfahrungsabhängige Plastizität der Neuronenzahl im Gyrus dentatus besteht. Dieser Befund stellte adulte Neurogenese im Gyrus dentatus in einen funktionellen Kontext und erhob die Frage, ob funktionsabhängige Neuroplastizität auch im alten Gehirn noch möglich ist.

In der hier vorgestellten Studie haben wir die Wirkung des Lebens in reizreicher Umgebung auf die Neurogenese im Gyrus dentatus von C57BL/6 Mäusen im Alter von 6 und 18 Monaten untersucht. Die vier Gruppen des Experimentes werden mit folgenden Abkürzungen bezeichnet: Ctr-6 für sechs Monate alte Kontrolltiere, Ctr-18 für 18 Monate alte Kontrolltiere, Enr-6 für sechs Monate alte Tiere in reizreicher Umgebung *("enriched environment")* und Enr-18 für 18 Monate alte Tiere in reizreicher Umgebung. Diese Alterstufen entsprechen ungefähr einem mittleren Lebensabschnitt und dem Greisenalter,

wenn man sich vergegenwärtigt, daß die durchschnittliche Lebensdauer einer C57BL/6 Maus 26 Monate beträgt und daß die Menopause der weiblichen Mäuse bei rund 13 Monaten liegt [166]. Vor der Experimentalphase, die 40 oder 68 Tage dauerte, wurden alle Tiere unter Standardbedingungen gehalten. [Die weitere Untersuchung erfolgte in Analogie zum oben beschriebenen ersten Experiment an jüngeren Tieren; Kapitel 2.3]

Ergebnisse

Neurogenese, definiert als die Geburt einer neuen Nervenzelle, besteht aus einer Serie distinkter Entwicklungsschritte, von denen drei separat untersucht werden können: Proliferation, Überleben und Differenzierung.

Proliferation einer Vorläuferzelle in der subgranulären Zone wurde durch Markierung mit dem Proliferationsmarker BrdU und immunhistochemische Untersuchung einen Tag nach der letzten Injektion von BrdU untersucht. Zu diesem Zeitpunkt sahen wir keine signifikante Wirkung der reizreichen Lebensumgebung auf die Zellproliferation im Gyrus dentatus (Abb. *3A). Es fiel jedoch auf, daß die Teilungsaktivität der Stamm- und Vorläuferzellen mit steigendem Alter nachließ, denn greise Mäuse (Ctr-18) hatten signifikant weniger BrdU-positive Zellen im Vergleich zu Mäusen im mittleren Lebensalter (Ctr-6; $P < 0.0001$).

Die Überlebensrate der Nachkommenschaft der sich teilenden Vorläuferzellen kann untersucht werden, indem vier Wochen nach der letzten BrdU-Injektion mit Antikörpern gegen BrdU gefärbt wird und das Resultat mit den Werten, die einen Tag nach der letzten Injektion gewonnen wurden, verglichen wird (Abb. *3A). Wir stellten fest, daß die Gesamtzahl der überlebenden BrdU-positiven Zellen vier Wochen nach BrdU in den älteren Tieren (Ctr-18) im Vergleich zu den jüngeren signifikant reduziert war ($P = 0.0081$). Leben in reizreicher Umgebung erhöhte die Zahl der überlebenden markierten Zellen um 68% gegenüber Kontrolltieren im Alter von 6 Monaten ($P = 0.0025$) und um 32% in 18 Monate alten Mäusen ($P > 0.05$; Abb. *3A). Wenn man die Zahl der überlebenden Zellen in Prozent der markierten Zellen einen Tag nach der letzten BrdU-Injektion ausdrückt, zeigte sich, daß Alter allein keinen überlebensfördernden Effekt hat. In Ctr-6 waren durchschnittlich 42.7 +/- 1.8% der am ersten Tag detektierbaren Zellen zum Vierwochentermin nachweisbar, während 60.7 +/- 7.3% in Ctr-18 gefunden werden konnten ($P = 0.1540$; alle Werte Mittelwert +/- Standardfehler).

Die phänotypische Differenzierung der überlebenden BrdU-positiven Zellen wurde (wie oben beschrieben) mit konfokaler Mikroskopie untersucht, wobei in der Dreifachmarkierung neben Antikörpern gegen BrdU diesmal als neuronaler Marker NeuN und als glialer Marker S100ß eingesetzt wurde (Abb. *4). In Enr-18 machten Neurone (NeuN-positive Zellen) 28.6 +/- 8.6% der überlebenden BrdU-positiven Zellen gegenüber 12.6 +/- 7.3% in Ctr-18 aus ($P = 0.0002$). In Enr-6 fanden wir 58.0 +/- 6.8% Neurone gegenüber 40.8 +/- 4.7% in Ctr-6 ($P < 0.0001$; Abb. *3B und C).

Enr-18 Mäuse produzierten damit während der zwölftägigen Injektionsphase durchschnittlich insgesamt 105 +/- 18 BrdU-markierte Neurone pro Gyrus dentatus gegenüber lediglich 32 +/- 7 in Ctr-18: eine dreifache Zunahme (P = 0.0035; Abb. *3D). Im Vergleich dazu produzierten Enr-6 684 +/- 104 BrdU-markierte Neurone und Ctr-6 285 +/- 22, was einer Verdoppelung entspricht (P = 0.0109). Der Gesamteffekt war also absolut gesehen größer im Alter von 6 Monaten, aber relativ gesehen im Alter von 18 Monaten.

Vier Wochen nach der letzten BrdU-Injektion machten Astrozyten (S100ß-positive Zellen) 19.7 +/- 3.2% der überlebenden BrdU-positiven Zellen in Ctr-6, 15.5 +/- 1.7% in Enr-6, 32.9 +/- 2.0% in Ctr-18 und 26.6 +/- 1.8% in Enr-18 aus. Es fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen Ctr-6 und Enr-6 (P = 0.1864) und Ctr-18 und Enr-18 (P = 0.0553). In absoluten Zahlen gemessen, fanden sich 133 +/- 20 BrdU-markierte Astrozyten in Ctr-6, 185 +/- 38 in Enr-6, 92 +/- 13 in Ctr-18 und 99 +/- 16 in Enr-18. Auch hier bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Ctr-6 und Enr-6 (P = 0.1516) und Ctr-18 und Enr-18 (P = 0.8389).

BrdU-positive Zellen, die keine Kolokalisation mit NeuN oder S100ß zeigten, kamen auf 39.4 +/- 2.4% in Ctr-6 (absolute Werte: 275 +/- 23), 26.5 +/- 2.8% in Enr-6 (299 +/- 49), 56.0 +/- 1.6% in Ctr-18 (154 +/- 20) und 44.8 +/- 9.3% in Enr-18 (160 +/- 22). Statistische Analyse zeigte, daß die relativen Werte in beiden Altersstufen signifikant voneinander verschieden waren (P = 0.0027 für Ctr-6 und Enr-6; P = 0.0079 für Ctr-18 und Enr-18), nicht aber die absoluten Zahlen (P = 0.6099 bzw. P = 0.8965).

Die Auswirkung der reizinduzierten Neurogenese auf die Gesamtzahl der Körnerzellen wurde durch stereologische Techniken untersucht (Tabelle *1). Jedoch war die interindividuelle Varianz in diesen Vergleichen von zellulären Populationen sehr unterschiedlicher Größe verhältnismäßig größer als der zu erwartende Zuwachs in neuen Nervenzellen, so daß keine signfikanten Unterschiede in der Körnerzellzahl zwischen den vier Gruppen nachweisbar waren. Auch fand sich kein Unterschied in der Neuronendichte oder im Volumen der Körnerzellschicht.

Tab. 4: Stereologische Daten

	Ctr-6	Enr-6	Ctr-18	Enr-18
Volume of the granule cell layer (mm^3)	0.356 ± 0.009	0.373 ± 0.008	0.336 ± 0.010	0.365 ± 0.013
Neuronal density	9.91 ± 0.37	9.47 ± 0.23	9.55 ± 0.40	9.21 ± 0.16
Absolute number of granule cells	$3.90 \times 10^5 \pm 0.13 \times 10^5$	$3.91 \times 10^5 \pm 0.08 \times 10^5$	$3.57 \times 10^5 \pm 0.18 \times 10^5$	$3.74 \times 10^5 \pm 0.16 \times 10^5$

Ctr-6: 6 Monate alte Mäuse in Standardlaborkäfigen. Ctr-18: 18 Monate alte Mäuse in Standardlaborkäfigen. Enr-6: 6 Monate alte Mäuse in reizreichen Käfigen. Enr-18: 18 Monate alte Mäuse in reizreichen Käfigen. Probenvolumen: 9000 μm^3. Alle Werte sind Mittelwert ± Standardfehler. Statistische Auswertung dieser Daten (ANOVA) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Es ist berichtet worden, daß alte Mäuse die Aufgabe des Wasserlabyrinths lernen [71]. Gesamtanalyse des Tests im Wasserlabyrinth wies in Enr-18 gegenüber Ctr-18 (P = 0.0422; Abb. *5A) und Enr-6 gegenüber Ctr-6 (P = 0.0248) signifikant kürzere Zeiten nach, die die Tiere der entsprechenden Gruppe brauchten, um die Fluchtplattform zu erreichen. Da auch eine signifikante Erhöhung der Schwimmgeschwindigkeit in Enr-18 gegenüber Ctr-18 (P = 0.0307; Abb. *5B) und in Enr-6 gegenüber Ctr-6 (P = 0.0040) bestand, ließ sich kein Unterschied in der jeweiligen Länge der Schwimmstrecke bis zur Plattform nachweisen.

Diskussion

Der Begriff "Neurogenese" als der Geburt neuer Nervenzellen wird oft im eingeschränkten Sinne der Zellproliferation, die zu einem neuen Neuron führt, zugeschrieben, aber weitergefaßte Definitionen sind im Gebrauch [28, 162]. Die erwachsene Hippocampusformation enthält multipotente Stammzellen, die *in vitro* sowohl in Neurone als auch in Gliazellen differenzieren können [134]. Es ist daher uneindeutig, die Definition von Neurogenese auf einen Prozess zu stützen, der auch in Gliogenese münden könnte. Im Gegensatz zur sehr präzisen zeitlichen und räumlichen Verteilung neurogener Ereignisse während der Entwicklung [28] enthalten die neurogenen Regionen des Erwachsenenalters Zellen in allen Entwicklungsstufen. Als Konsequenz hieraus ist es im Erwachsenenalter weniger genau, die Zellteilung zur Basis der Definition von Neurogenese zu wählen, als es dies während der Embryogenese ist. Im Vergleich der Zahlen BrdU-positiver Zellen einen Tag und vier Wochen nach der letzten BrdU-Injektion wird klar, daß das Ausmaß der Zellproliferation kein Indikator für die letztlich resultierende Nettoanzahl neuer Neurone ist (2.2; siehe auch 2.6). Wir benutzen daher eine weitgefaßtere Definition von Neurogenese, die Proliferation, Überleben und Differenzierung beinhaltet.

Neurogenese im alten Gyrus dentatus. Neurogenese persistiert im Hippocampus auch alter Mäuse. In allen vier untersuchten Gruppen konnten sich teilende Zellen (Abb. *4A) in der subgranulären Zone nachgewiesen werden; differenzierende Zellen migrierten in die Körnerzellschicht und exprimierten nach vier Wochen den neuronalen Marker NeuN (Abb. *4B bis D).

Die Abnahme adulter Neurogenese in der alternden Maus bestätigt frühere Berichte aus Ratten [100]. Wir fanden keinen signifikanten Unterschied in der Gesamtkörnerzellzahl zwischen den beiden Altersstufen, was darauf hinweisen könnte, daß im hohen Alter Neurogenese keine die Gesamtzahl mehr beeinflussende Zahl neuer Nervenzellen in nachweisbarem Rahmen beisteuert. Der Vergleich mit Zahlen aus unserer früheren Studie weist einen Zuwachs in der Gesamtkörnerzellzahl zwischen zwei und sechs Monaten um rund 40 000 Zellen auf (Vgl. 2.3). Vergleichbare Zuwächse sind für Ratten beschrieben worden [9].

Zur Frage der Rolle, die Apoptose einerseits und Zellzyklusparameter anderseits auf die Interpretation der Zahlen haben könnten, siehe 2.2 und [13].

Schon früh ist das experimentelle Modell der reizreichen Lebensumgebung [154] auf die Untersuchung von Umwelteinflüssen auf Zellproliferation im erwachsenen Gehirn angewandt worden [2]. Unsere hier vorgestellten Daten weisen nach, daß erfahrungsabhängige Regulation von adulter hippocampaler Neurogenese nicht nur im jung-erwachsenen Mausgehirn, sondern auch im hohen Alter noch stattfindet. Wie in den jüngeren Mäusen wurde auch in den alten das Überleben neugeborener Zellen gefördert. Dem könnte eine Interaktion mit der Regulation apoptotischen Zelltods zumindest teilweise zugrundeliegen [wofür mittlerweile neue experimentelle Daten sprechen [13, 193]].

Zusätzlich entdeckten wir, daß in beiden Altersstufen in den reizreich lebenden Tieren relativ mehr BrdU-positive Zellen eine Doppelmarkierung für den neuronalen Marker NeuN zeigten, ein Effekt der in den jüngeren Tieren der vorangegangenen Studie nicht aufgetreten war. Dies kann als ein überlebensfördernder Effekt auf Zellen der neuronalen Entwicklungslinie gedeutet werden. Die absoluten Zahlen sowohl BrdU-markierter Astrozyten als auch BrdU-positiver Zellen ohne Doppelmarkierung für NeuN oder S100ß waren unbeeinflußt von der Umweltstimulation — ein Befund, der diese Hypothese stützt.

Als Alternativhypothese verbleibt jedoch zu prüfen, ob Umweltreize eine Wirkung auf das Differenzierungsverhalten der Tochterzellen der sich teilenden Stamm- und Vorläuferzellen haben könnten, indem sie direkt oder indirekt auf Mechanismen, die die Entscheidung für eine bestimmte Entwicklungslinie bestimmen, wirken könnten.

Die Bedingungen der zellulären Mikroumgebung und ihre erfahrungsabhängigen Veränderungen, die das Überleben von Zellen, die den Zellzyklus verlassen haben, fördern und diese zur Differenzierung führen, bleiben weiterhin unbekannt. Obwohl Gliogenese in den alten Tieren nicht signifikant durch

Erfahrung stimulierbar war, ist es trotzdem möglich, daß Umwelteinflüsse auf Astrozyten zu dem Gesamteffekt beitragen.

Daß in unserem Experiment kein Unterschied in der Zellproliferation zwischen Kontrollen und reizreich lebenden Mäusen nachweisbar war, erlaubt keine Schlußfolgerung über die Größe der Vorläuferzellpopulation. Grundsätzlich sind die erhobenen Befunde zur Zellproliferation in den reizreich lebenden Tieren sowohl mit einer kleineren Population mit kürzerem Zellzyklus als auch mit einer größeren Population mit längerem Zellzyklus vereinbar. Das Nettoergebnis, daß vier Wochen nach der letzten BrdU-Injektion signifikant mehr BrdU-markierte Neurone in den reizreich lebenden Mäusen präsent waren, ist von dieser Betrachtung unabhängig. Spätere Experimente werden untersuchen müssen, wie Zellzyklusparameter durch Alter und Umweltreize beeinflusst werden.

Die tägliche Stimulation von jungen Ratten in der Zeit zwischen Geburt und Entwöhnung von der Mutter ("*neonatal handling*" oder "*preweaning enrichment*") verhindert im Alter der Versuchstiere einen Zellverlust in den Regionen CA1 und CA3 und Defizite im räumlichen Lernen [118]. Der hypothetisch zugrundeliegende Mechanismus involviert die Herabregulation von Glucocorticoidausschüttungen. Glucocorticoide können auch Neurogenese im erwachsenen Gyrus dentatus inhibieren [65]. Ob daraus geschlossen werden kann, daß Glucocorticoide maßgeblich an der Regulation der Neurogenese im hier besprochenen Experiment beteiligt sind, muß offenbleiben. ["Preweaning enrichment" jedenfalls hat keinen Effekt auf adulte hippocampale Neurogenese, was auf einen unterschiedlichen Mechanismus schließen läßt (Kohl et al., *Preweaning enrichment has no lasting effects on size of the dentate gyrus and on adult hippocampal neurogenesis in four-month old mice*, zur Veröffentlichung eingereicht).]

Es bleibt gegenwärtig unklar, inwieweit Verbesserungen im räumlichen Lernen zu den Auswirkungen auf das Abschneiden im Lerntest in den hier untersuchten Tieren beigetragen haben. Immerhin jedoch haben die Versuchstiere nach sechs oder 18 Monaten unter Standardlaborbedingungen nach Exposition gegenüber reizreicher Umgebung innerhalb von weniger als 68 Tagen ein verbessertes oder zumindest verändertes Abschneiden im Wasserlabyrinthtest gezeigt. Diese Wirkung beweist keinen kausalen Zusammenhang mit den morphologischen Ergebnissen, aber sie positioniert adulte hippocampale Neurogenese in einen funktionellen Kontext.

Auch wenn die Ergebnisse nahelegen, daß die neuen Neurone für hippocampale Funktionen rekrutiert werden, sind weitere Untersuchungen notwendig, um zu zeigen, inwieweit die im Erwachsenenalter produzierten neuen Nervenzellen funktionell in die neuronale Verschaltung des Hippocampus integriert werden. Anatomisch gesehen entsenden die neuen Neurone ein Axon zur Region CA3, wie dies auch die älteren Körnerzellen tun [115, 169].

Eine funktionelle Interpretation adulter hippocampaler Neurogenese wird durch Forschungsergebnisse an *Chickadees* unterstützt, in denen Neurogenese im erwachsenen Gyrus dentatus mit den Jahreszeiten korreliert, in denen die

Vögel größere Territorien bewohnen und sich an den Ort von mehr Futterverstecken erinnern müssen [6, 7].

Die Gesamtzahl neuer Neurone, die im Hippocampus greiser Mäuse produziert werden kann, ist gering, und es ist von großer Bedeutung festzustellen, ob diese relativ wenigen Zellen zu den erfahrungsabhängigen funktionellen Effekten, wie sie hier (und in der vorherigen Studie) erhoben wurden, beitragen können. Verschiedene andere hippocampale Parameter sind durch eine reizreiche Lebensumgebung induzierbar [88]. Einige dieser Veränderungen, so beispielsweise die Plastizität synaptischer Eigenschaften [76], synaptischer Dichte [156] und dendritischer Verzweigung [75] treten auch im höheren Alter auf und tragen höchstwahrscheinlich zu den funktionellen Effekten bei. Jedoch spricht die Tatsache, daß im alternden Gehirn der komplexe regulatorische Apparat zur Neurogenese erhalten bleibt, dafür daß diese Plastizität funktionelle Vorteile bringt.

2.5 Genetischer Einfluß auf die aktivitätsabhängige Regulation adulter Neurogenese

Kempermann G, Brandon EP, Gage FH. **Environmental stimulation of 129/SvJ mice results in increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus.** *Current Biology* 8 (1998) 939-942

Zusammenfassung: Mäuse des Stammes 129/SvJ haben signifikant weniger adulte hippocampale Neurogenese als andere ingezüchtete Linien (siehe 2.5). Außerdem zeigen sie schlechte Leistungen in Lerntests. In diesem Experiment haben wir die Auswirkungen von Umweltreizen in reizreicher Umgebung auf die Hirnplastizität von 129/SvJ im Erwachsenenalter untersucht. Im Gegensatz zu den früheren Berichten über Mäuse des Stammes C57BL/6, die in Lerntests sehr gut abschneiden und bei denen die erfahrungsabhängige Regulation von adulter hippocampaler Neurogenese keinen Einfluß auf die Zellproliferation hatte, zeigten reizreich lebende 129/SvJ Mäuse eine Verdoppelung der proliferierenden Zellen im Gyrus dentatus im Vergleich zu Kontrolltieren. Umweltabhängige Stimulation förderte das Überleben der neugeborenen Zellen in 129/SvJ, wie es auch in C57BL/6 gesehen worden war. Phänotypische Analyse der überlebenden Zellen wies auf, daß Stimulation durch Umweltreize zu 67% mehr neuen Neuronen führte. In Zusammenschau mit unseren früheren Ergebnissen legen diese Ergebnisse nahe, daß erbliche Faktoren einen differenzierten Einfluß auf die umweltabhängige Regulation adulter hippocampaler Neurogenese haben. Zusätzlich beobachteten wir eine Wirkung auf das Abschneiden in Verhaltenstests in den stimulierten Tieren.

129/SvJ Mäuse verbrachten 40 Tage in einer reizreichen Umgebung und erhielten während der letzten zwölf Tage dieser Periode tägliche Injektionen mit dem Proliferationsmarker BrdU (50µg pro g Körpergewicht). Die Gehirne von 5 Tieren der experimentellen Gruppe (Enr-129) und von 5 Tieren der Kontrollgruppe (Ctr-129), die in regulären Laborkäfigen gehalten wurden, wurden immunhistochemisch untersucht. Im Gegensatz zu C57BL/6 Mäusen,

die keine Veränderung in der Zellproliferation der subgranulären Zone zeigten (Vgl. 2.4 und 2.5), hatten die Enr-129 Tiere eine signifikant höhere Zahl BrdU-positiver Zellen im Gyrus dentatus als Ctr-129 (Abb. *1A und 2; $P = 0.0017$). Dieses Ergebnis einer "erhöhten proliferativen Aktivität" kann (1.) als eine erhöhte Anzahl sich teilender Zellen interpretiert werden, (2.) als eine höhere Rate von Zellteilungen oder (3.) eine Kombination von beidem interpretiert werden.

Vier Wochen nach der letzten Injektion von BrdU, wenn die Gehirne der verbleibenden Mäuse untersucht wurden, fanden sich signifikant mehr BrdU-positive Zellen in Enr-129 als in Ctr-129 (Abb. *1A und 2; $P = 0.0186$). Dies impliziert, daß das Nettoüberleben neugeborener Zellen in Enr-129 erhöht war. Relativ gesehen jedoch war das Überleben der neuen Zellen in Enr-129 mit 29% niedriger als in Ctr-129 mit 40%. Dies steht im Gegensatz zu unseren früheren Ergebnissen mit C57BL/6, in denen der erfahrungsabhängige Nettoeffekt auf adulte hippocampale Neurogenese auf eine überlebensfördernde Wirkung auf die neugebildeten Zellen in der subgranulären Zone zurückzuführen war.

Stereologische Untersuchung des Gyrus dentatus vier Wochen nach der letzten Injektion von BrdU wies nach, daß Enr-129 eine höhere Zelldichte in der Körnerzellschicht hatten. Die durchschnittliche Zahl an Körnerzellen pro 9000 μm^3 Probenvolumen war 9.2 +/- 0.2 in Ctr-129 (Mittelwert +/- Standardfehler) und 10.0 +/- 0.2 in Enr-129 ($p = 0.0210$). Es ließ sich kein Unterschied am absoluten Volumen der Körnerzellschicht nachweisen (0.34 +/- 0.01 mm^3 in Ctr-129 und 0.32 +/- 0.02 mm^3 in Enr-129; $P = 0.5051$). Daraus resultierte eine durchschnittliche Gesamtkörnerzellzahl von 3.44 +/- 0.11 x 10^5 in Ctr-129 und 3.56 +/- 0.24 x 10^5 in Enr-129 ($P = 0.6827$) pro Hippocampus. In durch Umweltreize stimulierten C57BL/6 hatten wir eine statistisch signifikante Zunahme des Volumens der Körnerzellschicht und eine Zunahme der Körnerzellzahl um 15% gefunden (2.4). Wurden im jetzigen Experiment die gemessenen Volumina vom 1. Tag nach der letzten Gabe von BrdU verglichen, um eine zweite Schätzung des Volumens der Körnerzellschicht zu erhalten, so zeigte sich ein Volumen von 0.29 +/- 0.02 mm^3 in Ctr-129 und von 0.37 +/- 0.03 mm^3 in Enr-129 ($P = 0.0497$). Eine vorsichtige Interpretation könnte dahingehen, daß die volumetrischen Daten mit einem meßbaren Effekt auf die Gesamtkörnerzellzahl vereinbar sind, aber hier durch biologische Variabilität (Varianz) verschleiert werden.

In der Untersuchung der BrdU-markierten Zellen mittels dreifacher Immunhistochemie wiesen die prozentualen Anteile der Zellen, die Kolokalisationen für den neuronalen Marker NeuN oder den astrozytären Marker S100ß zeigten, keinen Unterschied zwischen Enr-129 und Ctr-129 auf. Der Prozentsatz von BrdU-positiven Zellen, die weder NeuN noch S100ß exprimierten, war jedoch signifikant niedriger in Enr-129 als in Ctr-129 (Abb. *1B; $P = 0.0247$). Um die absolute Anzahl neugebildeter Neurone (BrdU+/NeuN+) und Astrozyten (BrdU+/S100ß+) abzuschätzen, wurde der prozentuale Anteil des jeweiligen Phänotyps mit der absoluten Zahl BrdU-markierter Zellen vier

Wochen nach der letzten BrdU-Injektion multipliziert. Das Ergebnis waren 1573 +/- 191 neue Neurone in Enr-129 gegenüber 943 +/- 104 in Ctr-129 (Abb. *1C; $P = 0.0158$), was eine Nettozunahme adulter hippocampaler Neurogenese in Enr-129 von 67% bedeutet.

Obwohl umweltabhängige Stimulation von 129/SvJ Mäusen eine genauso starke neurogene Wirkung hatte wie zuvor für C57BL/6 berichtet (2.4), ergab eine detailiertere Analyse, daß der ähnliche Nettoeffekt in den 129/SvJ anders als in C57BL/6 auf eine Steigerung der Zellproliferation zurückzuführen war. Daraus folgt, daß Stammesunterschiede nicht nur die Ausgangsrate adulter hippocampaler Neurogenese (2.3), sondern auch die Art, auf die adulte hippocampale Neurogenese durch Umweltreize reguliert wird, beeinflussen. Proliferation, Überleben und Differenzierung der Vorläuferzellen und ihrer Tochterzellen sind jeweils separat durch vererbte Faktoren beeinflusst und werden als Antwort auf eine Stimulation durch Umweltreize nicht uniform heraufreguliert (2.2 und 2.3).

Das Ausmaß, in dem adulte hippocampale Neurogenese in 129/SvJ stimuliert werden konnte, war angesichts der niedrigen Ausgangsraten adulter Neurogenese in diesem Stamm nicht vorhersehbar (2.3). Da der relative Zuwachs an proliferierenden Zellen einen Tag nach der letzten Injektion größer als die Zunahme in der Zahl BrdU-markierter Zellen vier Wochen später war, wurde das neurogene Potential des Hippocampus der 129/SvJ offenbar noch nicht erschöpft. Es bleibt zu klären, ob eine erhöhte Proliferation in der subgranulären Zone in der Tat ein vergrößertes Angebot an Zellen schafft, aus denen sogar noch mehr neue Neurone generiert werden könnten, wenn andere oder komplexere Stimulationen durch Umweltreize eingesetzt würden als im hier vorgestellten Versuch.

Ex vivo Experimente haben gezeigt, daß multipotente Vorläuferzellen aus dem Hippocampus adulter Ratten isoliert werden können [136, 146]. *In vivo* ist Multipotentialität bislang nicht explizit nachgewiesen worden, aber Zellproliferation, Neurogenese und Astrogenese im Gyrus dentatus erwachsener Säugetiere sind seit den frühen 1960er Jahren bekannt [3]. Proliferation in der subgranulären Zone kann experimentell durch eine Vielzahl beeinflusst werden, darunter Glukocorticoidspiegel [65], glutamaterge Deafferentierung [26], Exzitotoxizität [138, 139] und (möglicherweise durch ein Zusammenspiel dieser Faktoren) durch Stress [66]. Die Wirkung dieser Faktoren auf die neuronale Entwicklung jenseits der Zellproliferation bleibt jedoch noch zu untersuchen.

Es sind erste Hypothesen zur funktionellen Relevanz adulter hippocampaler Neurogenese aufgestellt worden [6, 7, 66, 139, 178]. Da der Hippocampus als eine Struktur bekannt ist, die kritisch für verschiedene Formen von Gedächtnis ist [47], könnte die Produktion neuer Neurone im erwachsenen Hippocampus cognitive Bedeutung haben. Korrelationen zwischen Neurogenese und messbarer hippocampaler Funktion können Einblicke in die Regulation und die funktionelle Relevanz adulter hippocampaler Neurogenese erlauben.

Im Unterschied zu C57BL/6 Mäusen zeigen Mäuse des Stammes 129 schlechte Leistungen in diversen Verhaltenstests (siehe [57]), darunter Aufgaben, die das räumliche Lernen untersuchen [132, 190]. Hinzukommt, daß es bei beim Stamm 129 eine Vielzahl von mitunter schlecht abgegrenzten Unterstämmen gibt, die beachtliche Unterschiede zueinander aufweisen und die als "typisch" für Stamm 129 angesehenen Merkmale besitzen oder nicht [167]. Ungeachtet dieser Probleme sind Stamm 129 Mäuse im weitverbreiteten Einsatz bei Experimenten mit gezielter Genmanipulation ("Knockout") [36], die auf eine Aufklärung der molekularen Grundlagen von cognitivem Verhalten und dessen Verhältnis zu Morphologie und Physiologie abzielen [18, 29, 116]

Wie in unseren früheren Studien (2.4 und 2.5) verwendeten wir das Wasserlabyrinth nach Morris [124], um die Wirkung von Umweltreizen auf cognitive Funktionen, die vom Hippocampus vermittelt werden, zu untersuchen. Gesamtanalyse der Leistung im Wasserlabyrinth zeigte, daß Enr-129 die verborgene Plattform in signifikant kürzerer Zeit erreichten als Ctr-129 (Abb. *3A; p = 0.0026), dabei eine kürzere Strecke zurücklegten (528 +/- 41 cm gegenüber 640 +/- 40 cm; p = 0.0294) und dabei auch signifikant schneller schwammen als Ctr-129 Mäuse (26.9 +/- cm/s gegenüber 22.9 +/- 0.7 cm/s; p = 0.0172). In der darauffolgenden Probe, in der die rettende Plattform aus dem Becken entfernt wurde, hielten sich Enr-129 Mäuse durchschnittlich 28.1 +/- 3.6 s von 60 s (ungefähr 47%) im Zielquadranten des Beckens auf, während Ctr-129 auf 17.1 +/- 3.6 s (ungefähr 29%) kamen (Abb. *3B; p = 0.0482). Ctr-129 schwammen 465.9 +/- 98.0 cm im Zielquadranten und Enr-129 748 +/- 93.4 cm (p = 0.0574). Die durchschnittliche Entfernung zum Zielpunkt betrug dabei 38.4 +/- 3.1 cm in Enr-129 und 49.1 +/- 5.0 cm in Ctr-129 Mäusen (p = 0.0813). Eine Analyse der Interaktion für Quadranten und Gruppen zeigte ein p = 0.0410. Obwohl nicht-cognitive Faktoren wahrscheinlich zu diesen Ergebnissen beitragen, sind diese Resultate mit einer Verbesserung in der cognitiven Funktion vereinbar [109]. Die parallele erfahrungsabhängige Steigerung von adulter hippocampaler Neurogenese und allgemeiner Verbesserung in einem Lerntest legt eine Verbindung zwischen den beiden Beobachtungen nahe, aber gegenwärtig ist diese Beziehung korrelativ.

In der Kammer zur Aktvititätsmessung wiesen Enr-129 signifikant weniger spontane motorische Aktivität während der einstündigen Testphase auf als Ctr-129 (Abb. *3C; p = 0.0219). Enr-129 Mäuse waren auch in der Lage sich fast doppelt solange auf dem mit 20 UpM beschleunigenden Rotarod zu halten wie Ctr-129 (Abb. *3D; p = 0.0013). Diese zusätzlichen erfahrungsabhängigen Wirkungen lassen vermuten, daß die Effekte einer Stimulation durch Umweltreize breit angelegt sind und nicht auf den Hippocampus beschränkt sind. Dies bedeutet auch, daß die als genetisch angesehenen Hemmnisse, die scheinbar die Leistung von 129/SvJ in Verhaltenstest behindern, zum Teil von den Bedingungen der Tierhaltung abhängen.

Es ist deshalb problematisch, Stämme als "schlechte Lerner" oder als generell behindert in der Leistung in Lerntests zu kategorisieren, genausowenig wie anatomische Parameter als genetisch fixiert betrachtet werden sollten. Zu

einem gewissen Grad reflektiert das, was als genetisch bestimmte Ausgangslage angesehen wird, bereits eine spezifische Antwort auf die Umgebung. In Experimenten, die Stammesunterschiede oder Knockout-Tiere untersuchen, werden "normalisierte" Ausgangswerte unter identischen Umweltbedingungen für alle beteiligten Stämme ermittelt. Für jeden einzelnen Stamm könnten diese Bedingungen aber gerade die nicht opitmalen sein, um komplexe physiologische Prozesse zu untersuchen. Unsere Ergebnisse bedeuten, daß vererbbare Faktoren diese "normalisierten" Muster von Morphologie und Funktion beeinflussen sowie auch die dynamischen Veränderungen, die in diesen Systemen auftreten.

2.6 Wirkung von Langzeitreizen und Reizentzug in der aktivitätsabhängigen Regulation adulter Neurogenese

Kempermann G, Gage FH. **Experience-dependent regulation of adult hippocampal neurogenesis: effects of long-term stimulation and stimulus withdrawal.** *Hippocampus* 9 (1999) 321-332

Zusammenfassung: In dieser Studie untersuchten wir, wie die erfahrungsabhängige Regulation adulter hippocampaler Neurogenese in C57BL/6 Mäusen unter den Bedingungen einer Langzeitexposition oder dem Entzug nach erlebter reizreicher Umgebung moduliert wird. Wir stellten fest, daß eine Gruppe von Tieren, die Entzug nach Stimulation in der reizreichen Umgebung drei Monate vor der Untersuchung erleben mußte, mehr als doppelt so viele proliferierende Zellen in der subgranulären Zone hatte wie Kontrolltiere und Tiere unter Langzeitstimulation. Wir vermuten, daß die größere Anzahl an proliferierenden Zellen nach dem Entzug Hinweis auf einen überlebensfördernden Effekt auf die neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen während der früheren Stimulationsperiode sind. Es wurden keine Unterschiede bezüglich der überlebenden Tochterzellen oder ihrer Phänotypen festgestellt. Die Existenz von mehr teilenden Zellen in der Entzugsgruppe führte also ohne fortgesetzte Stimulation nicht zu einem Nettoanstieg an Neurogenese. Auch die Gruppe, die eine Langzeitexposition der reizreichen Umgebung erlebte, zeigte keinen klaren Vorteil gegenüber Kontrollen, was als eine verminderte Effizienz fortgesetzter Umweltreize im Bewirken einer neurogenen Antwort gedeutet werden kann. Wir schlagen deshalb als Arbeitshypothese vor, daß (1) eine Stimulation in jungem Lebensalter ein neurogenes Potential im Gyrus dentatus erhalten könnte und (2) die Neuartigkeit der komplexen Reize und nicht allein die reine Fortsetzung komplexer Reize für die umweltabhängige Wirkung auf adulte hippocampale Neurogenese verantwortlich sind.

Der Gyrus dentatus antwortet auf Umweltreize mit verschiedenen plastischen Veränderungen, anhand derer sich funktionelle und morphologische Adaptationen feststellen lassen. Diese erfahrungsabhängigen Modifikationen im neuronalen Netzwerk sind nicht auf das Neuropil beschränkt sondern beinhalten auch eine Vermehrung der Nervenzellzahl durch eine Stimulation der Neurogenese im Gyrus dentatus (2.3, 2.4 und 2.5). Erfahrungsabhängige Plastizität der Körnerzellzahl stellt eine physiologische und funktionelle Regula

tion der Aktivität neuronaler Stamm- und Vorläuferzellen im erwachsenen Gehirn dar. [...]

Die Tatsache, daß das erwachsene Gehirn die komplexen Mechanismen aufrechterhält, die für eine erfahrungsabhängige Regulation adulter Neurogenese notwendig sind, legt nahe, daß die neuen Körnerzellen funktionell relevant sind. Ein kausaler Bezug zwischen adulter hippocampaler Neurogenese und hippocampaler Funktion ist jedoch nicht bewiesen.

Das Abschneiden in Verhaltenstests, inklusive Tests von Lernen und Gedächtnis, korreliert nicht mit der absoluten Körnerzellzahl [189]. Eher als die Gesamtzahl der existierenden Körnerzellen könnten die Rate und das Ausmaß neuronaler Plastizität, die adulte Neurogenese miteinschließt, die Leistung im Verhaltenstest bestimmen.

Derartige Überlegungen führten zur folgenden experimentellen Fragen: Wie wird adulte hippocampale Neurogenese beeinflusst, wenn die Umweltreize (1) für länger als 68 Tage fortgesetzt werden oder (2) nach den initialen 68 Tagen abgebrochen werden?

Um diesen Fragen nachzugehen, haben wir an drei Gruppen von C57BL/6 Mäusen im Alter der Entwöhnung von der Mutter (P21) das folgende experimentelle Paradigma angewandt (Abb. *1). Eine Gruppe diente als Kontrollgruppe und lebte unter Standardlaborbedingungen für die Gesamtzeit der Experimentalperiode von sechs Monaten, eine Gruppe lebte in reizreicher Umgebung für 68 Tage und kehrte danach zu Standardkäfigbedingungen zurück ("Enr-WD", wobei das "WD" für englisch *withdrawal* steht) und ein Gruppe lebte für sechs Monate in der reizreichen Umgebung ("Enr-LT", wobei "LT" für englisch *long-term* steht). Am Ende der sechs Monate wurden die proliferierenden Vorläuferzellen mit Bromodesoxyuridin (BrdU) markiert und mittels BrdU-Immunhistochemie identifiziert. Die Hälfte jeder Gruppe überlebte vier weitere Wochen. Es wurde dann die Zahl der überlebenden BrdU-positiven Zellen vier Wochen nach der Markierung bestimmt. Die Phänotypen der neugeborenen Zellen wurden wiederum durch Immunfluoreszenz mit Dreifachmarkierungen von BrdU, dem neuronalen Marker NeuN und dem glialen Marker S100ß bestimmt. Mäuse aller Gruppen wurden in einer Aktivitätsmesskammer, auf dem Rotarod und im Wasserlabyrinth mit versteckter Plattform getestet.

Ergebnisse

Funktionelle Effekte

Exposition gegenüber einer reizreichen Umgebung bewirkt eine komplexe Reakion des Tieres, die zu Veränderungen in zahlreichen anatomischen und physiologischen Messgrößen führt. Im Mittelpunkt dieser Untersuchung standen die Auswirkungen auf adulte hippocampale Neurogenese. Um jedoch den funktionellen Kontext und die allgemeinen Bedingungen, innerhalb derer diese morphologischen Veränderungen stattfinden, besser zu verstehen und um ein allgemeines Maß für die allgemeine Antwort des Tieres auf die jeweilige expe

rimentelle Umgebung zu geben, haben wir das Körpergewicht der Tiere verfolgt und sie Verhaltenstests unterzogen.

Zu Beginn des Experimentes bestand kein Unterschied im Körpergewicht zwischen den Gruppen, da die Tiere zufällig den Versuchsgruppen zugeteilt worden waren. Abb. *2A zeigt, daß das Körpergewicht der Kontrolltiere stieg von 13.6 g im Alter von 21 Tagen auf 25.3 g am Ende des Experimentes (6 Monate). Der entsprechende Anstieg war signifikant geringer in Enr-LT, die mit 14.3 g anfingen, aber mit nur 22.7 g endeten. Enr-WD Mäuse dagegen unterschieden sich nach 3 Monaten, dem Ende der 68 Tage in der reizreichen Umgebung, nicht von Enr-LT (21.5 g bzw. 21.6 g), was auf eine vergleichbare allgemeine Wirkung in den beiden reizreich lebenden Gruppen hinweist. Mit einem Körpergewicht von 24.2 g näherten sich Enr-WD dem Gewicht der Kontrollen am Ende der sechs Monate an (Statistische Auswertung in Tab. *1). Es gab keinen signifikanten Unterschied im Hirngewicht zwischen den drei Gruppen. Die Hirngewichte waren 514 +/- 6 mg in Kontrollen, 504 +/- 7 mg in Enr-WD und 517 +/- 6 mg in Enr-LT.

Während einer Stunde in der Aktivitätsmesskammer waren Enr-LT signifikant weniger aktiv als Kontrollen und Enr-WD (Abb. *2B; ANOVA: $p = 0.0006$), was als eine schnellere Gewöhnung von Enr-LT an eine neue Umgebung interpretiert wird. Auf dem Rotarod hielten sich Enr-LT signfikant länger als die anderen zwei Gruppen auf dem rotierenden Rundstab (Abb. *2C; ANOVA: $p = 0.0015$). Im Vergleich der Werte am ersten Tag mit denen des vierten Tages (paarweiser t-Test) zeigten nur Enr-LT einen Trainingseffekt oder prozedurales Lernen ($p = 0.0103$).

Testergebnisse im Wasserlabyrinth, die allgemein als Ausdruck hippocampaler Funktionen angesehen werden, waren im Kontext dieser Untersuchung adulter hippocampaler Neurogense von besonderem Interesse. Unsere drei früheren Versuche mit kurzzeitigerer Exposition gegenüber der reizreichen Umgebung (2.3 bis 2.5) hatten signifikante Verbesserungen in den Leistungen im Wasserlabyrinth in den reizreich lebenden Tieren gezeigt. In diesem Langzeitexperiment jedoch konnten keine Unterschiede zwischen den drei Gruppen bezüglich der benötigten Zeit, um die Plattform zu finden, und der Länge der dazu benötigten Schwimmstrecke festgestellt wurde (Abb. *2D und E). Enr-LT jedoch schwammen im Durchschnitt signifikant schneller (Daten nicht gezeigt; ANOVA: $p = 0.0020$). In der Probe, als die Plattform aus dem Becken entfernt wurde, um als Maß räumlichen Lernens die Perseveration der Tiere zu messen, die Plattform an der antrainierten Stelle zu finden, konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse funktioneller Untersuchungen, daß (1) Langzeitexposition gegenüber einer reizreichen Umgebung im Hinblick auf einige Maßzahlen (Körpergewicht, Habituierung, Lokomotion, Schwimmgeschwindigkeit) signifikante Auswirkungen hatte, (2) die Langzeitreizung keine anhaltenden Verbesserungen im räumlichen Lernen, wie sie in den früheren Experimenten aufgefallen waren, hervorzurufen scheinen und (3) Tiere, die im jugendlichen Erwachsenenalter eine Kurzzeitexposition der

reizreichen Umgebung und einen folgenden Reizentzug durchmachen mussten (Enr-WD), sich von den Kontrollen in keinem der hier untersuchten Parameter unterschieden.

Auswirkungen auf adulte hippocampale Neurogenese

Unsere vorausgehenden Studien hatten gezeigt, daß eine kürzer anhaltende Exposition von C57BL/6 Mäusen gegenüber reizreicher Umgebung (68 Tage) die Zahl der BrdU-positiven Zellen einen Tag nach der letzten BrdU-Injektion als Maß der Zahl der Zellen, die während der 12-tägigen Injektionsperiode in Zellteilung waren, nicht beinflusste. Die erfahrungsabhängige Nettostimulation von adulter hippocampaler Neurogenese beruhte auf einem erhöhten Überleben der markierten Zellen, d.h. eine größere Anzahl BrdU-markierter Zellen vier Wochen nach der letzten BrdU-Injektion. Für eine grundsätzliche Diskussion von Daten auf BrdU-Basis siehe 2.2 [131, 173].

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigte die gegenwärtige Studie, daß einen Tag nach der letzten BrdU-Injektion in den Enr-WD signifikant mehr BrdU-positive Zellen nachgewiesen werden konnten als in Kontrollen und in Enr-LT (Abb. *3A, schraffierte Balken, und Abb. *4A-C). Enr-WD wiesen zweieinhalbfach soviele BrdU-positive Zellen in der Subgranulärschicht und in der Körnerzellschicht auf als Kontrollen. Die Zahl der BrdU-positiven Zellen in Enr-LT wich nicht signifikant von der in Kontrollen ab.

Vier Wochen später hatte die Zahl der BrdU-positiven Zellen in allen drei Gruppen abgenommen (Abb. *3A, offene Balken). Obwohl deskriptiv der Durchschnitt der überlebenden Zellen in Enr-WD und Enr-LT um rund 60% höher lag als in Kontrollen, ließ sich wegen sehr hoher Varianz innerhalb der Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachweisen (ANOVA: $p = 0.3660$). Die Abnahme der durchschnittlichen Zahl der BrdU-positiven Zellen zwischen einem Tag und vier Wochen nach der letzten Injektion war mit 66% in Enr-WD am größten und lag bei 45% in Enr-LT und den Kontrollen.

Bei der Untersuchung der relativen Verteilung der Phänotypen unter den BrdU-positiven Zellen vier Wochen nach der letzten BrdU-Injektion (Abb. *3 und *4D, Tab. *5), lag der Prozentsatz der BrdU/NeuN doppeltmarkierten Zellen ("neue Neurone") bei 58% in Enr-LT gegenüber 43% in sowohl Kontrollen als auch Enr-WD ($p = 0.0650$). BrdU/S100ß doppeltmarkierte Zellen ("neue Astrozyten") machten 17% der BrdU-positiven Zellen in Kontrollen, 13% in Enr-WD und 13% in Enr-LT aus. Die Gruppe von Zellen, die weder eine Kolokalisation von BrdU mit NeuN oder S100ß (daher hier in den Abb. *neither*, "weder noch" benannt) ist höchstwahrscheinlich heterogen und beinhaltet Zellen, deren Phänotyp nicht bestimmt wurde oder die undifferenziert blieben. Letztere müssten zu einem nicht bekannten Anteil auch die selbstreplizierenden Vorläuferzellen beeinhalten. Es fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den relativen Schätzungen der „Wedernoch"-Zellen in den drei Gruppen ($p = 0.0970$), obwohl der Unterschied der Mittelwerte zwischen Enr-LT und Enr-WD bei 16 Prozentpunkten lag und zwischen Enr-LT und

Kontrollen bei 11 Prozentpunkten, was auf einen starken Einfluß der Standardabweichung von rund 13%-Punkten in allen drei Gruppen spricht.

Die Gesamtzahl der neuen Neurone und neuen Astrozyten wurde durch die Multiplikation der Anzahl BrdU-positiver Zellen vier Wochen nach der letzten Injektion mit der Ratio für den jeweiligen Phänotyp bestimmt. Die durchschnittliche Zahl neuer Neurone war 2.5fach höher in Enr-LT im Vergleich zu Kontrolltieren, aber der Unterschied war nich statistisch signifikant (Tabelle *1). Es fand sich eine extreme Variabilität in Enr-LT. Das 95%-Konfidenzintervall reichte von knapp 200 bis 1300 neuen Neuronen. Der Varianzkoeffizient (VK% = Standardabweichung / arithmetisches Mittel x 100) war 77.2 in Enr-LT gegenüber 33.9% in Kontrollen und 42.7% in Enr-WD. Eine mögliche biologische Bedeutung dieser immensen Variabilität wird weiter unten diskutiert.

Es fand sich auch kein statistisch signifikanter Unterschied in der Gesamtzahl neuer Astrozyten oder neuer Zellen, die weder NeuN oder S100ß exprimierten (Abb. *3C, und Tabelle *5).

Die Gesamtzahl an Körnerzellen wurde durch Anwendung stereologischer Quantifizierungsprinzipien abgeschätzt (Tab. *6). Rein deskriptiv war die durchschnittliche Körnerzellzahl in Enr-LT um etwa 45 000 Zellen höher als in den anderen Gruppen (aber $p = 0.9567$ im Vergleich Enr-LT/Enr-WD und $p = 0.0881$ im Vergleich Enr-LT / Kontrolle; Tab. *5). Im Hinblick auf die neuronale Zelldichte in der Körnerzellschicht hatte Enr-LT signifikant mehr Körnerzellen pro Probenvolumen als Enr-WD ($p = 0.0026$), aber nicht signifikant mehr als die Kontrolltiere ($p = 0.0879$).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse unserer Untersuchung der Wirkung von Umweltreizen auf adulte hippocampale Neurogenese in einem Paradigma mit Langzeitexposition einerseits und einem Reizentzug andererseits ein sehr komplexes Muster, das vor allem von hoher interindividueller Variabilität geprägt ist. Dies steht einem offenkundigen Gegensatz zu den vorausgegangenen Experimenten, die klarere Unterschiede zwischen den für kürzere Zeit reizexponierten Tieren verschiedenen Alters oder genetischen Hintergrundes zu den jeweiligen Kontrollen gezeigt hatten.

Tab. 5: Statistische Auswertung der Vergleiche zwischen den Gruppen

	Kontrollen vs. Enr-WD	Kontrollen vs. Enr-LT	Enr-WD vs. Enr-LT
Körpergewicht: 2 Monate (F[2,35] = 6.099; *p* = 0.0053; see Fig. 2)	0.0036	0.0055	n/s
Körpergewicht: 6 Monate (F[2,35] = 4.926; *p* = 0.0130; see Fig. 2 A)	n/s	0.0036	(0.0922)
Proliferation ("1 Tag") (F[2,12] = 4.711; *p* = 0.0309; see Fig. 3 A)	0.0101	n/s	(0.0921)
Überleben ("4 Wochen") (F[2,15] = 1.076; *p* = 0.3660; see Fig. 3 A)	n/s	n/s	n/s
% Phänotypen: Neurone (F[2,15] = 3.298; *p* = 0.0650; see Fig. 3 B)	n/s	(0.0551)	(0.0386)
% Phänotypen: Astrocyten (F[2,15] =0.992; *p* = 0.3939; see Fig. 3 B)	n/s	n/s	n/s
% Phänotypen: "neither" (F[2,15] = 2.736; *p* = 0.0970; see Fig. 3 B)	n/s	n/s	(0.0379)
Neue Neurone (F[2,15] = 1.903; *p* = 0.18346; see Fig. 3 C)	n/s	(0.0719)	n/s
Neue Astrocyten (F[2,15] =0.322; *p* = 0.7299; see Fig. 3 C)	n/s	n/s	n/s
"Neither" Zellen (F[2,15] = 1.430; *p* = 0.2700; see Fig. 3 C)	n/s	n/s	n/s
Neuronale Dichte (F[2,20] = 5.974; *p* = 0.0092)	n/s	(0.0879)	0.0026
Absolutes Volumen der Körnerzellschicht (F[2,20] = 0.483; *p* = 0.6246)	n/s	n/s	n/s
Zahl der Körnerzellen (F[2,20] = 2.521; *p* = 0.1069)	n/s	(0.0881)	(0.0567)

Enr-LT, Mäuse für 6 Monate in reizreicher Umgebung; Enr-WT, Mäuse für 68 Tage in reizreicher Umgebung und anschließendem Entzug bis zum Endpunkt des Experimentes nach 6 Monaten (Vgl. Abb. *1). Die statistische Auswertung der stereologischen Daten wurde mittels ANOVA und Bonferroni-Dunn *post hoc* Test durchgeführt. Für ANOVA wurde ein $p = 0.05$ als statistisch signifikant angesehen. F und p der ANOVA finden sich in der ersten Spalte. Für den Bonferroni-Dunn *post hoc* Test lag die Signifikanzgrenze level bei $p \leq 0.0167$. Signifikante Unterschiede sind unterlegt. Bei p zwischen 0.0167 und 0.1 und bei $p < 0.05$, wenn p der ANOVA nicht keine Signifikanz anzeigte, sind die Werte in Klammern angegeben. n/s, nicht signifikant.

Tab. 6: Stereologische Ergebnisse

	Kontrollen	Enr-WD	Enr-LT
Neuronale Dichte (Zellen / Probenvol.)	9.34 ± 0.33	8.58 ± 0.49	10.16 ± 0.17
Absolutes Volumen der Körnerzellschicht (mm^3)	0.335 ± 0.007	0.367 ± 0.033	0.351 ± 0.020
Absolute Anzahl der Körnerzellen	3.47×10^5 ± 0.14	3.42×10^5 ± 0.19	3.93×10^5 ± 0.20

Stereologische Untersuchung des Gyrus dentatus: Neuronale Dichte, absolutes Volumen der Körnerzellschicht und Gesamtkörnerzellzahl. Alle Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. Probenvolumen: 9000 μm^3.

Diskussion

Interpretation der morphologischen Befunde

Stimulation durch Umweltreize mit nachfolgendem Reizentzug (Enr-WD) resultierte in einer signifikant größeren Anzahl BrdU-positiver Zellen einen Tag nach der letzten BrdU-Injektion. Dieser Befund stand in scheinbarem Widerspruch zu unseren früheren Studien mit C57BL/6 Mäusen [94, 95]. In diesen Versuchen (siehe 2.3 und 2.4) war die Rate der "Proliferation", wie sie durch die Zahl der BrdU-positiven Zellen unmittelbar nach Ende der Markierungsphase mit BrdU abgeschätzt werden kann, nicht durch die Stimulation durch Umweltreize beeinflusst worden. Der Nettoeffekt auf adulte Neurogenese in diesen Experimenten basierten auf einer überlebensfördernden Wirkung auf die Tochterzellen der proliferierenden Zellen der subgranulären Zone.

Theoretisch könnte die höhere Zahl BrdU-positiver Zellen einen direkten mitogenen Effekt auf die neuronale Vorläuferzellpopulation in der subgranulären Zone oder aber die Rekrutierung von mehr teilungsfähigen Zellen aus einem hypothetischen Reservoir an ruhenden neuralen Vorläuferzellen in der subgranulären Zone haben. In diesen Fällen wäre es jedoch sehr schwierig zu erklären, warum diese Wirkung nur nach dem Entzug der reizreichen Umgebung (Enr-WD) auftrat, nicht aber unter fortdauernder Stimulation (Enr-LT).

Interessanerweise jedoch führten 40 Tage Exposition gegenüber einer reizreichen Umgebung in 129/SvJ Mäusen (vgl. 2.5) zu einer signifikanten Steigerung der proliferativen Aktivität in der subgranulären Zone am ersten Tag nach der letzten Injektion von BrdU [91]. Wir haben diese Ergebnisse im Kontext der Resultate an C57BL/6 Mäusen als einen differentiellen Einfluß des genetischen Hintergrunds auf die umweltabhängige Regulation adulter hippocampaler Neurogenese interpretiert.

Wie unter 2.7 dargestellt, stimuliert körperliche Aktivität (Laufen) adulte hippocampale Neurogenese und hat auch eine starke Auswirkung auf die Zellproliferation im Gyrus dentatus von C57BL/6 Mäusen [178].

Diese Resultate zeigen deutlich, daß die Regulation der Zellproliferation in Mäusen möglich ist, aber sie bieten keine Lösung für die Frage, warum solch eine Effekt hier nur nach 97 Tagen Reizentzug sichtbar wurde.

Der Gesamteindruck in der vorliegenden Studie war, daß sowohl die Langzeitstimulation als auch der Reizentzug weniger klare Effekte als eine akute Reizwirkung von 68 Tagen, unmittelbar gefolgt von der Untersuchung, hatten. Nach 6 Monaten waren Kontrollen und Enr-LT nicht so verschieden voneinander wie man bei einer linearen Extrapolation der Resultate von 3 Monate alten Mäusen (siehe 2.3) hätte vermuten können. Trotzdem waren Enr-WD und Enr-LT wohl unterschiedlich genug um schlußfolgern zu können, daß fortgeführte Stimulation zumindest den früheren akuten Trend aufrechterhält.

Dieser Eindruck bestätigt sich, wenn man Enr-LT mit den kurzzeitig stimulierten, 6 Monate alten Tieren der unter 2.4 dargestellten Studie (dort mit "Enr-6" bezeichnet) vergleicht [95], auch wenn ein solcher Vergleich von zwei unterschiedlichen Versuchen nur mit größter Vorsicht geschehen sollte. Der Vergleich zeigt jedoch, daß Enr-LT signifikant mehr neue Nervenzellen (p = 0.0112) als die Kontrollen der anderen Studie (dort mit "Ctr-6" bezeichnet) hatten, aber nicht signifikant von der akut stimulierten Gruppe Enr-6 verschieden war (p = 0.1988). Analoge Vergleiche zwischen den Kontrollgruppen der beiden Versuche wiesen eine Differenz der Mittelwerte von nur 24.5 Zellen bei einem p von 0.8992 (ANOVA: p = 0.0420) auf.

Hinsichtlich vieler untersuchter Parameter waren Enr-WD den Kontrollen ähnlicher als Enr-LT, was darauf hinweisen könnte, daß viele Effekte von reizreicher Lebensumgebung nicht aufrechterhalten wurden, als die Exposition nicht fortgeführt wurde. Eine bemerkenswerte Ausnahme hiervon, die weitere und genauere Untersuchungen erfordert, ist die Zahl der BrdU-positiven Zellen vier Wochen nach der letzten Injektion von BrdU.

Deskriptiv lag die Differenz zwischen Enr-WD und Enr-LT bei nur 18 Zellen (von rund 1230), aber in beiden Gruppen war der Mittelwert ungefähr 60% höher als in Kontrollen (Abb. *3). Im Gegensatz dazu legte die resultierende Nettoneurogenese in Enr-WD eine sehr viel geringere Differenz zu den Kontrollen nahe (Abb. *3C). Beide Vergleiche waren im vorliegenden Experiment jedoch nicht signifikant. Trotzdem kann daraus eine Arbeitshypothese abgeleitet werden (Abb. *5).

In den jungen C57BL/6 Mäusen führten Umweltreize für 68 Tage nicht nur zu einem Anstieg in der Zahl neuer Nervenzellen, sondern auch zu einem ähnlichen Anstieg in der Zahl der BrdU-markierten Zellen, die weder einen neuronalen noch astrozytären Phänotyp aufwiesen (Vgl. 2.3). Dieser Anteil an Zellen beinhaltet auch die undifferenzierten, selbstreplizierenden Stamm- oder Vorläuferzellen. Komplexe Umweltreize für 68 Tage hatten daher höchstwahrscheinlich auch einen überlebensfördernden Effekt auf die Vorläuferzellen selbst, auch wenn ohne spezifische Marker dieser Effekt nicht quantifizierbar ist. Wenn nach 68 Tagen, dem Ende der Reizperiode für Enr-WD, sowohl Enr-WD als auch Enr-LT mehr überlebende Vorläuferzellen in der subgranu

lären Zone hatten, könnte die Differenz zwischen Enr-WD und Enr-LT nach sechs Monaten eine fortgesetzt erhöhte Rate an Vorläuferzellproliferation in Enr-WD widerspiegeln, ohne daß es dort, wie in Enr-LT, zu einer neuronalen Differenzierung der Tochterzellen gekommen wäre (Abb. 3). Dieses größere Reservoir an sich teilenden Zellen der subgranulären Zone kann demnach sogar noch drei Monate nach Reizentzug festgestellt werden. Anders als in Enr-LT wurden in Enr-WD jedoch ohne eine Herausforderung durch Umgebungsreize weniger Tochterzellen zur Differenzierung in Neurone aus diesem größeren Reservoir rekrutiert (Abb. *3 und Abb. *5). Eine Stimulation in Jugend- und frühem Erwachsenenalter könnte daher selbst im Falle des Reizentzuges zu einem erhöhten Potential für Neurogenese führen. Weitere Experimente sind notwendig, um diese Theorie eindeutig im Hinblick auf statistische Signifikanz zu bestätigen und ein erhöhtes neurogenes Potential der erhöhten Anzahl proliferierender Zellen in Enr-WD beispielsweise bei einer Wiederaufnahme der Reizexposition zu bestätigen.

Sogenanntes neonatales *Handling* als ein Beispiel für eine sogar noch früher ansetzende Manipulation der unmittelbaren Umgebung hat lebenslange Auswirkungen auf das Gehirn und kann altersabhängigen Veränderungen wie z.B. Zellverlusten in den Regionen CA3 und Defizite im räumlichen Lernen entgegenwirken [118]. Der vermutete dem zugrundeliegende Mechanismus soll zumindest teilweis in einer verminderten Sekretion von Glukokorticoiden liegen [118, 121]. Glucocorticoide ihrerseits wirken inhibitorisch auf adulte hippocampale Neurogenese [62, 117]. Die kurz- und langfristigen Effekte auf adulte hippocampale Neurogenese jedoch müssen noch untersucht werden.

Obwohl die Zahlen im vorliegenden Experiment dazu tendierten eine relativ hohe Varianz aufzuweisen, ist das Ausmaß der Varianz im Falle der Neurogenese in Enr-LT besonders augenfällig. Hier bestand ein 95%-Konfidenzintervall von 200 bis 1300 neuen Nervenzellen. Die Power bezüglich des Vergleiches von Enr-LT mit den Kontrollen in diesem Experiment lag bei nur 23% für eine angenommene Mittelwertdifferenz von 400 neuen Nervenzellen (wobei der wirkliche gemessene Wert 450 war), 50% für eine Differenz von 600 und 86% für eine Differenz von 900. Auch wenn diese große Varianz in erfahrungsinduzierter Neurogenese die Power im Vergleich zur Kontrolle vermindert, könnte sie doch auch selbst ein bedeutungsvolles Ergebnis darstellen. Sowohl genetischer Hintergrund als auch Umgebungsstimuli beeinflussen die unterschiedlichen Ebenen der Regulation und damit die Nettoauswirkungen auf adulte hippocampale Neurogenese. Außerdem ist gezeigt worden, daß Stress die Proliferationsrate in der subgranulären Zone senkt [66, 69]. Die große Varianz adulter Neurogenese in Enr-LT könnte daher das Spektrum der Erfahrungen und unterschiedlichen Reaktionen individueller Mäuse auf die Langzeitexposition reizreicher Umgebung darstellen. Man könnte sagen, daß während der 6 Monate komplexer Stimulation durch die Umgebung die fortgesetzte Reaktion auf diese Herausforderung die dem homogenen genetischen Hintergrund zuschreibbare Regulation überspielt hat und subtile individuelle Differenzen enthüllt hat.

Funktionelle Kontexte, in denen die erfahrungsabhängige Regulation adulter hippocampaler Neurogenese auftritt

[…] Die Auseinandersetzung mit der komplexen Umgebung führt zu einer messbaren Wirkung in nahezu allen Organen. Die hier berichteten Unterschiede im Körpergewicht (Abb. *2A) deuten darauf hin, daß das Leben in reizreicher Umgebung ähnliche Wirkungen auf Enr-WD und Enr-LT hatte. Nach 68 Tagen in der reizreichen Umgebung unterschieden sich Enr-WD und Enr-LT nicht bezüglich ihres Körpergewichtes; am Ende des Experimentes, drei Monate nach Reizentzug, hatten sich Enr-WD wieder dem Niveau der Kontrolltiere angenähert. Daß Tiere in reizreicher Umgebung ein niedrigeres Körpergewicht haben, wurde bereits früher berichtet [38, 108].

Mehrere andere Verhaltensdaten zeigten ebenfalls Unterschiede zwischen Enr-LT und den anderen beiden Gruppen, was auf messbare allgemeinere Effekte der Langzeitstimulation schließen läßt. Enr-LT habituierten nicht nur schneller an eine neue Umgebung in der Aktivitätsmesskammer, sie zeigten auch bessere Leistung auf dem Rotarod und waren die einzige Gruppe, die einen signifikanten prozeduralen Lerneffekt auf dem rotierenden Rundstab zeigte. Es gibt keinen älteren Bericht über erfahrungsinduzierte Rotarodleistungen, obwohl ein ähnlicher Effekt für Ratten, die einen rotierenden Stab längs traversieren mussten, beschrieben worden ist [86].

Im Wasserlabyrinth jedoch konnte in der vorliegenden Studie kein Unterschied im räumlichen Lernen festgestellt werden. In den früheren Versuchen hatten wir einen geringen, aber signifikanten Unterschied in der Leistung im Wasserlabyrinth zwischen Kontrollen und den Tieren in der reizreichen Umgebung festgestellt [91, 94, 95], was in Übereinstimmung mit älteren Berichten war [133, 179]. Die Wirkung von reizreicher Umgebung auf Lernleistungen war in 129/SvJ sogar klarer und mit signifikanten Unterschieden in der Probe, was auf eine spezifischere Verbesserung im räumlichen Lernen hinweisen könnte [91]. In 6 Monate alten C57BL/6 Mäusen führte die reizreiche Umgebung zu signifikanten Unterschieden sowohl in Bezug auf die Zeit zum Erreichen der Plattform als auch in der Schwimmgeschwindigkeit [95]. In der vorliegenden Studie fanden sich signifikante Ergebnisse nur bezüglich der Schwimmgeschwindigkeit. Im Lichte der Befunde am Rotarod und in der Aktivitätsmesskammer, könnte die erhöhte Schwimmgeschwindigkeit mit größerer Wahrscheinlichkeit körperliches Training lediglich als reine Hyperaktivität darstellen.

[…] Interessanterweise basiert bereits eine der älteren Theorien, die vorgeschlagen wurden, um die Wirkung der individuellen Erfahrung auf Hirnparameter zu erklären, auf Lernen und Gedächtnisvorgängen als Mediatoren [73, 151].

Aus alledem kann man die Hypothese ableiten, daß die funktionelle Relevanz adulter hippocampaler Neurogenese in einer relativ akuten Reaktion auf eine herausfordernde Umgebung, die Lernen erfordert, besteht. Neuartigkeit des Stimulus könnte dann der Auslöser für die neurogene Antwort sein, nicht

die Komplexität der Umgebung *per se*. Deshalb könnten Wechsel in der Umgebung eher als die Fortführung eines erhöhten Niveaus externer Stimuli für die erfahrungsinduzierte Hochregulation adulter hippocampaler Neurogenese.

Das vorliegende Experiment war nicht dahingehend ausgelegt, um abschließende Schlußfolgerungen über "Neuartigkeit" zu erlauben, da sich auch während der 68 Tage der Stimulationsphase jeder neuartige Stimulus abnutzt. Wie unter 2.7 diskutiert werden wird, fanden wir, daß auch eine nur insgesamt 43-tägigen Exposition gegenüber reizreicher Umgebung ausreichte, die beschriebenen Effekte hervorzurufen [178]. Gould et al. haben gezeigt, daß bereits kurze Lernstimuli zu einer Steigerung in adulter hippocampaler Neurogenese führen, was nahelegt, daß bereits sehr kurze Stimulation ausreicht, um zu einer neurogenen Antwort zu führen [64].

Diese auf Neuartigkeit des Reizes basierende Theorie wirft die Frage auf, welche Faktoren einer reizreichen Umgebung es sind, die diese Neuartigkeit oder generell die entscheidenden Variablen ausmachen. In der klassischen Form des *Enriched Environment* erlauben die Komplexität der Stimulation und ihre potentiellen Variabilität nicht zu diskriminieren, welchen Beitrag zur Gesamtwirkung einzelne Faktoren, die zusammen die Komplexität ausmachen, leisten. Dementsprechend ist es auch nicht möglich, in diesen Experimenten festzustellen, ob ein einzelner Reiztypus ausreichend gewesen wäre, die beobachteten Wirkungen auszulösen. In großem Maße bleiben die unabhängigen Variablen in Experimenten mit reizreicher Umgebung eine *black box*. Dennoch wurde in einer Vielzahl von Experimenten versucht, den Beitrag einzelner Variablen zum Gesamteffekt zu eruieren. Dazu gehörten beispielsweise soziale Interaktion und körperliche Aktivität [59, 121, 153]. Stress könnte eine weitere wichtige Variable sein, aber zur Zeit ist nicht bekannt, inwieweit eine reizreiche Umgebung Tiere stresste, und wenn dies der Fall wäre, wo "guter Stress" aufhörte und schädigender Stress begänne. Wie im folgenden besprochen (2.7), haben wir zeigen können, daß körperliche Aktivität allein ausreichend ist, um adulte hippocampale Neurogenese zu stimulieren [178], aber dies besagt nicht, daß nicht andere Faktoren zu den hier beobachteten Wirkungen mit beitragen.

Versuche, einzelne Faktoren der reizreichen Umgebung zu isolieren, könnten auch zu einer zu engen Fokussierung führen, denn die Antwort des Tieres umfaßt Veränderungen in verschiedenen Organsystemen, von denen viele, insbesondere im endokrinen System und im Nervensystem, weitreichende Auswirkungen auf andere System haben können. Im Falle der erfahrungsabhängigen Regulation adulter hippocampaler Neurogenese könnte eine sehr komplexe systemische Antwort, die endokrine und metabolische, aber auch kognitive und emotionale Faktoren umfassen würde, zu den Änderungen im Mikromilieu der subgranulären Zone führen, die die neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen stimulierten und zu adulter Neurogenese führten. Auch wenn bekannt ist, daß beispielsweise *Nerve growth factor* (NGF) und seine Rezeptoren [122] sowie auch Kortikoid- [121] und Neurotransmitterrezeptoren [145] im Hippocampus von Tieren in reizreicher Umgebung reguliert werden, bleibt es doch gegenwärtig noch schwierig, im Ganzen zu verstehen, wie der

Weg der Signaltransduktion von einem identifizierten Reiz zu einem neurogenen Signal an einer Vorläuferzellen in der subgranulären Zone führt. Die hier vorgestellten Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit, die erfahrungsabhängige Regulation adulter hippocampale Neurogenese über die Lebenszeit des Versuchstieres hinweg zu untersuchen, da frühe Erfahrung späte neurogene Antworten durch Veränderung der Ausgangslage beeinflussen könnte.

Es erscheint auch möglich und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Enr-LT, daß eine fortgesetzte Stimulation mit einer sich steigernden Komplexität der Umwelt adulte Neurogenese bis zu einer Grenze stimulieren könnte, und die erfahrungsabhängige Regulation demnach erschöpfbar sein könnte. Bedenkt man in diesem Zusammenhang, daß die reizreichen Bedingungen unserer Versuche im Vergleich zur Wildnis deprivierte Verhältnisse darstellen [40], könnten die beobachteten Auswirkungen unter Laborbedingungen robuster ausfallen als unter Wildbedingungen. Auch wenn diese Überlegung die generelle funktionelle Einordnung adulter hippocampaler Neurogenese beeinflusst, so wird doch das Prinzip, daß Erfahrung auf neuronale Vorläuferzellen im erwachsenen Gehirn wirken kann und dies möglicherweise mit langanhaltendem Effekt, dadurch nicht geschmälert.

2.7 Körperliche Aktivität fördert Zellteilungen und Neurogenese im erwachsenen Gyrus dentatus

Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. **Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus.** *Nature Neuroscience* 2 (1999) 266-270

Zusammenfassung: Die Exposition gegenüber einer reizreichen Umgebung erhöht Neurogenese im Gyrus dentatus von erwachsenen Nagetieren, aber eine reizreiche Umgebung besteht typischerweise aus sehr vielen verschiedenen Komponenten. Darunter sind z.B. erweiterte Möglichkeiten zu lernen, verstärkten soziale Interaktion, mehr körperliche Aktivität und mehr Platz. Wir haben in diesem Experiment versucht, einzelne Komponenten separat zu untersuchen, indem wir erwachsene Mäuse verschiedenen experimentellen Bedingungen unterwarfen: Lernen im Wasserlabyrinth (Lerner), Schwimmen für die Zeit, die die Lerner schwammen, aber ohne Gelegenheit, zu lernen (Schwimmer), freiwilliges Laufen im Laufrad (Läufer), reizreiche Umgebung (Reizreich) und Kontrolltiere in Standardkäfigen (Kontrollen). Weder Training im Wasserlabyrinth noch erzwungenes Schwimmen hatte einen Effekt auf die Zahl BrdU-positiver Zellen. Laufen jedoch verdoppelte die Zahl der überlebenden neugeborenen Zellen in einem Ausmaß, das etwa dem reizreicher Umgebung entsprach. Diese Ergebnisse zeigen, daß freiwillige körperliche Aktivität ausreicht, um eine Steigerung der Neurogenese im Gyrus dentatus der erwachsenen Maus auszulösen.

[…] Es ist nicht bekannt, welche Faktoren, die gemeinsam eine reizreiche Umgebung ausmachen, kritisch für den beobachteten Effekt auf adulte hippocampale Neurogenese sind. In diesem Experiment haben wir Komponenten von reizreicher Umgebung separat untersucht und ihre Wirkung auf die Zellproliferation und die Neurogenese im erwachsenen Hippocampus betrachtet.

Die gesteigerte Neurogenese im Hippocampus reizreich lebender Tiere ist mit Verbesserungen in Tests des räumlichen Lernens assoziiert [91, 94, 95]. Umgekehrt könnte Lernen selbst ein spezifischer Stimulus für Neurogenese sein. Training im Labyrinth und Leben in reizreicher Umgebung könnten zu gleichartigen neurochemischen Veränderungen führen [11]. Darüberhinaus korreliert in Vögeln, die Futterverstecke anlegen, diese Erfahrung mit Veränderungen in der Größe des Hippocampus und mit Neurogenese [6, 7, 141]. Eine wichtige interagierende Variable in Versuchen, den unmittelbaren Effekt von Lernen auf adulte hippocampale Neurogenese abzuschätzen, ist körperliche Aktivität, die Zellproliferation, Überleben oder Differenzierung beeinflussen könnte. In der Tat erleichtert Bewegung die Erholung von neurologischen Erkrankungen wie Schlaganfall [85] und verbessert die kognitive Leistungsfähigkeit [16, 53]. Außerdem geht körperliche Aktivität mit erhöhten Spiegeln von Neurotrophinen und deren Genexpression einher [129]. Insbesondere wird der Spiegel von basischem Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF), der für Überleben und Differenzierung von Vorläuferzellen *in vitro* [146] und *in vivo* [101, 174] notwendig ist, sowohl durch körperliche Aktivität als auch durch räumliches Lernen erhöht [59, 61]. Wir planten unsere Studie, um die Beiträge

der Variablen Lernen und körperliche Aktivität auf die Produktion neuer Körnerzellen zu untersuchen. Daher teilten wir die Mäuse in Gruppen ein, die in reizreicher Umgebung lebten, im Wasserlabyrinth mit verborgener Plattform trainierten, erzwungenerweise schwimmen mußten (unfreiwillige körperliche Aktivität), ein Laufrad benutzen durften (freiwillige körperliche Aktivität) oder in Kontrollbedingungen lebten.

Wir zeigen hier, daß weder Training im Wasserlabyrinth noch unfreiwillige körperliche Aktivität einen Effekt auf Zellproliferation oder Neurogenese hatten. Exposition gegenüber einer reizreichen Umgebung erhöhte die Zahl der überlebenden neugeborenen Zellen, aber beeinflusste, wie in den Vorgängerstudien (siehe 2.3 und 2.4) nicht die Proliferation der Vorläuferzellen in C57BL/6 Mäusen. Freiwillige körperliche Aktivität in einem Käfiglaufrad jedoch erhöhte die Zellproliferation, das Überleben und die Nettoneurogenese im Hippocampus. Dieser Befund legt nahe, daß körperliche Aktivität ausreichend ist, um verschieden Aspekte der Regulation adulter hippocampaler Neurogenese zu steigern.

Ergebnisse

Proliferation und Überleben BrdU-markierter Zellen im Gyrus dentatus

Die Teilungsaktivität der Stamm- oder Vorläuferzellen im Gyrus dentatus wurde mit BrdU-Markierung der sich teilenden Zellen über 12 Tage und immunhistochemischer Untersuchung einen Tag nach der letzten Injektion untersucht. Es fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p < 0.01$). Spezifischere Vergleiche zeigten, daß die Läufer mehr Zellproliferation aufwiesen als irgendeine der anderen Gruppen ($p < 0.02$; Abb. *1A).

Überleben der Tochterzellen der sich teilenden Vorläuferzellen wurde durch Anfärben BrdU-positiver Zellen vier Wochen nach der letzten BrdU-Injektion abgeschätzt. In Kontrollen und Lernern überlebten 42% der sich teilenden Zellen, in Schwimmern 46% und in den Läufern 56%. In den reizreich lebenden Tieren überlebten mit 85% signifikant mehr neue Zellen als in den anderen Gruppen ($p < 0.01$). Außerdem fanden wir eine hochsignifikante Differenz in der Anzahl der überlebenden Zellen zwischen den Gruppen ($p < 0.0009$). Die Gesamtzahl überlebender Zellen war signifikant höher in Läufern ($p < 0.002$) und reizreich lebenden Tieren ($p < 0.02$) als in Kontrollen, Lernern und Schwimmern. Läufer hatten 201% und reizreich Lebende 175% der Kontrollwerte an markierten Zellen pro Gyrus dentatus (Abb. *1B). Das Volumen des Gyrus dentatus unterschied sich nicht zwischen den Gruppen ($p > 0.39$; Tabelle *7).

Die phänotypische Differenzierung der überlebenden BrdU-positiven Zellen wurde wie immer vier Wochen nach der letzten BrdU-Injektion mittels Immunfluoreszenz und Dreifachmarkierungen von BrdU, NeuN und S100ß analysiert. Läufer und reizreich Lebende unterschieden sich sowohl im Hinblick auf den Prozentsatz BrdU/NeuN doppeltmarkierter Zellen ($p < 0.001$) als auch denjenigen der Zellen, die weder Kolokalisation von BrdU mit NeuN

oder S100ß zeigten ("*other*" in Tab. *7; $p < 0.0015$) signifikant von den Kontrollen und den Schwimmern. Es fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen im Hinblick auf den Prozentsatz neugeborener Zellen, die in Glia differenzierten ($p > 0.08$, Abb. *2, und Tab. *7).

Tab. 7: Proliferation, Überleben und Phänotypen BrdU-positiver Zellen

	Kontrollen	Lerner	Schwimmer	Läufer	Reizreich
Proliferation, 1 Tag	4393 ± 607	3637 ± 498	3755 ± 422	6773 ± 971***	3867 ± 617
Überleben, 4 Wochen	1880 ± 251	1528 ± 120	1711 ± 352	3791 ± 715**	3282 ± 265**
Überleben (%), 4 Wochen	43 ± 5.7	42 ± 12.8	46 ± 6	56 ± 10.6	85 ± 6.8***
Phänotypen:					
Neurone (%)	76.8 ± 3.2	82.5 ± 2.6	73.8 ± 3.6	88.3 ± 1*	88.8 ± 2.7*
Astrozyten (%)	7 ± 3.2	3.8 ± 2.7	6.3 ± 0.8	3.3 ± 0.6	3 ± 1.1
Andere (%)	16.3 ± 1.7	13.8 ± 2.1	20 ± 3	9 ± 1.3	8.3 ± 2*
Volumen (mm^3)	0.43 ± 0.02	0.37 ± 0.03	0.34 ± 0.03	0.42 ± 0.02	0.34 ± 0.03

Alle Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. *** bedeutet: signifikant verschieden von allen anderen Gruppen ($p < 0.02$). ** steht für: signifikant verschieden von Kontrollen, Lernern und Schwimmern ($p < 0.02$). * bedeutet: signifikant verschieden von Kontrollen und Schwimmern ($p < 0.02$).

Training im Wasserlabyrinth

Die Lerner trainierten im Wasserlabyrinth nach Morris, die Fluchtplattform zu finden [124]. Wir benutzten Blocks von je zwei Versuchen pro Tier und Tag, damit das Training über die vierwöchige Trainingsphase hinweg eine Herausforderung darstellte. Zunächst wurden 14 Mäuse für 12 Tage trainiert. Während dieser Zeit reduzierte sich die Zeit, die sie benötigten, um die Plattform zu finden, signifikant ($p < 0.0001$). Am Tag 13 wurden 6 dieser Tiere perfundiert, um die Zellproliferation zu untersuchen. Die verbleibenden acht Mäuse trainierten für weitere 11 Tage und zeigten eine signifikante Reduktion in der Zeit, die sie benötigten, um die Plattform zu finden ($p < 0.0001$). Danach wurde die Position der Plattform für sieben Tage verändert (*"reversal"*) . Wiederum verminderte sich die Zeit zum Erreichen der Plattform signifikant ($p < 0.0001$; Abb. *3). Die Schwimmdauer der Schwimmer entsprach der durchschnittlichen Schwimmzeit der Lerner an jedem einzelnen Tag. Unsere morphologischen Ergebnisse zeigen jedoch, daß weder die Zellproliferation (am Tag 13, einen Tag nach der letzten BrdU-Injektion) noch das Überleben der neuen Zellen (am Tag 43, vier Wochen nach der letzten BrdU-Injektion) in der Lerner- und der Schwimmergruppe beeinflusst war. Diese Ergebnisse legen nahe, daß weder extensives Training dieser Aufgabe zum räumlichen Lernen noch die begrenzte, erzwungene körperliche Aktivität die Zellproliferation oder das Überleben BrdU-positiver Zellen im Gyrus dentatus beeinflussen konnten.

Diskussion

Diese Studie wurde geplant, um festzustellen, ob körperliche Aktivität in freiwilliger oder unfreiwilliger Form oder in Verbindung mit einer Lernaufgabe in der Steigerung adulter hippocampaler Neurogenese, wie sie in reizreicher Umgebung beobachtbar ist, involviert ist. Die Ergebnisse zeigen, daß die Zellproliferation nur in den Mäusen gesteigert war, die ungehinderten Zugang zu einem Laufrad hatten (Läufer). Darüberhinaus verdoppelten sowohl reizreiches Leben als auch freiwillige körperliche Aktivität die Gesamtzahl der überlebenden neugeborenen Zellen im Gyrus dentatus. Außerdem wiesen sowohl in den Läufern als auch in den reizreich Lebenden relativ mehr Zellen einen neuronalen Phänotyp auf. Im Gegensatz dazu zeigten Mäuse, die im Wasserlabyrinth trainierten, und die Schwimmer, die eine den Lernern entsprechende Zeit schwimmen mussten, keine Veränderung in der Zahl BrdU-positiver Zellen, was nahelegt, daß diese Art von Lernen bzw. diese Art von Aktivität allein keine adäquaten Stimuli für adulte hippocampale Neurogenese sind. Unsere Ergebnisse erlaubten uns auch, verschiedene andere Faktoren, die neugeborene hippocampale Zellen beeinflussen könnten, auszuschließen. Weder reizreich Lebende noch die Läufer erhielten irgendwelche essbaren Belohnungen wie Äpfel oder Käse, wie wir sie in früheren Studien als Teil des Reizreichtums gegeben hatten [94], so daß Ernährung als mögliche Konfliktvariable ausgeschlossen werden kann. Die Läufer wurden zu dritt oder viert pro Käfig gehalten, woraus geschlossen werden kann, daß die soziale Interaktion mit einer großen Gruppe nicht notwendig für eine neurogene Antwort ist. Es ist jedoch möglich, daß der soziale Faktor in der relativ höheren Überlebensrate BrdU-positiver Zellen in den reizreich Lebenden gegenüber den Läufern eine Rolle spielt. Schließlich gaben wir in diesem Experiment im Gegensatz zu den früheren Versuchen, in denen die BrdU-Gaben stets nach einem Monat begonnen hatten (s.o.) hier BrdU vom ersten Versuchstag an, was dafür spricht, daß die Auswirkungen auf die Neurogenese relativ rasch zustandekommen.

Reizreiches Leben und Laufradtraining führten zu ungefähr der gleichen Anzahl an überlebenden BrdU-positiven Zellen. Zusätzlichen wurden unter beiden Bedingungen relativ mehr Zellen zu Neuronen als in den Kontrolltieren. Hinzu kam, daß der Prozentsatz der Zellen, die weder Marker für einen glialen noch für einen neuronalen Phänotyp aufwiesen, sank. Es ist möglich, daß die in diesem Anteil wahrscheinlich enthaltenen Vorläuferzellen von einem Reservoir multipotenter hippocampaler Stammzellen herrühren [136], deren Schicksal durch reizreiche Umgebung oder körperliche Aktivität in ähnlicher Weise beeinflusst werden könnte. Neurochemische Marker wie Acetylcholin [140] und trophische Faktoren wie *Nerve growth factor* (NGF) und *Brain derived neurotrophic factor* (BDNF) werden durch reizreiche Umgebung und körperliche Übung beeinflusst [51, 130]. In der reizreichen Umgebung sind diese Faktoren jedoch nur nach vorheriger Exposition eines Lerntests erhöht [51, 140], was allerdings auf unterschiedliche Mechanismen hinweisen könnte. Außerdem hatte reizreiches Leben keinen Einfluß auf Zellproliferation in C57BL/6 Mäusen (2.3 und 2.4), während Laufen die Zahl der BrdU-positiven Zellen einen

Tag nach der letzten BrdU-Injektion stark erhöhte. Interessanterweise erhöhte eine reizreiche Lebensumgebung die Zahl BrdU-positiver Zellen in 129/SvJ Mäusen, was eine unterschiedliche genetische Basis für die Zellproliferation und ihrer Regulation nahelegt (2.5). Die gegenwärtige Studie zeigt, daß innerhalb eines gegebenen genetischen Hintergrundes, Zellproliferation und –überleben durch unterschiedliche Manipulation des Verhaltens beeinflußt werden können. So könnte die sehr fokussierte Aktivität des Laufens den Zellzyklus verkürzt haben (Vgl. [131]) oder alternativ bewirkt haben, daß zusätzliche, bislang ruhende Zellen in den Zellzyklus eintreten. Darüberhinaus aber hatten Läufer und reizreich lebende Tiere vier Wochen nach der letzten BrdU-Injektion vergleichbare Zahlen an BrdU-positiven Zellen. Relativ ausgedrückt war die Überlebensrate der neugeborenen Zellen in den Läufern niedriger (56%) als in den reizreich lebenden (85%), was für unterschiedliche Langzeitwirkung der beiden Bedingungen sprechen könnte.

Bewegung korreliert stark mit hippocampalem Thetarhythmus [42]. Mäuse nutzen normalerweise ihr Laufrad heftig und kommen auf rund 20 000 bis 40 000 Umdrehungen pro Tag [176]. Fortgesetzte bewegungsinduzierte synchrone EEG-Aktivität könnte neurochemische Parameter beeinflussen. Veränderungen in der Neurotransmitterfunktion ihrerseits könnten subtile aber wichtige Veränderungen im Thetarhythmus auslösen. Beispielsweise kann serotonerge Übertragung Thetarhythmus verstärken [170], *Long-term potentiation (LTP)* und Gedächtnisleistungen verbessern und auch die Produktion neuer Nervenzellen beeinflussen [20, 21]. Im Gegensatz dazu könnte die Dauer der erzwungenen körperlichen Aktivität in der Gruppe der Schwimmer (zwischen 12 und 40 Sekunden pro Tag) zu kurz für langanhaltende Effekte gewesen sein. Alternativ könnten diese Aufgaben Stress hervorgerufen haben, der die möglichen positiven Wirkungen auf das Überleben BrdU-positiver Zellen ausgeglichen hat.

Labyrinthtraining kann ähnliche neurochemische Veränderungen bewirken wie eine reizreiche Umgebung [11]. In unserem Experiment wurden die basalen Raten an Zellproliferation und Neurogenese durch einen Monat Training im Wasserlabyrinth nicht beeinflusst. Es ist möglich, daß zwei Versuche pro Tag die Tiere nicht genügend herausforderten, um eine Wirkung zu sehen. Kurzzeitiges massives Training, das eine transiente Steigerung in hippocampaler mRNA für bFGF induziert [60], könnte daher effektiver sein. In der Tat zeigt eine andere Studie (die parallel mit dieser veröffentlicht wurde), daß Training im Morris Wasserlabyrinth die Zahl der überlebenden BrdU-positiven Zellen steigerte [64]. Es ist jedoch interessant, daß einige Manipulationen, die eine Wirkung auf adulte Neurogenese zeigen, nicht notwendigerweise mit Lernen vereinbar sind. Die Blockierung von NMDA-Rezeptoren zum Beispiel, die normalerweise für Lernen notwendig sind [123], stimuliert adulte hippocampale Neurogenese [26]. Auch die Entfernung der Nebennieren beeinträchtigt Gedächtnisleistungen [34], aber ruft eine gesteigerte Zellproliferation im Gyrus dentatus hervor. Daher könnte die Hochregulation adulter hippocampaler

Neurogenese ein relativ generelles Phänomen sein, während spezifischere Lernaufgaben mehr auf die existierenden Zellen wirken.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, daß freiwillige körperliche Aktivität in gesteigerter Zellproliferation, erhöhtem Überleben der Tochterzellen und einer vermehrten neuronalen Differenzierung im Hippocampus erwachsener Mäuse führt.

3 Diskussion und Ausblick

3.1 Adulte hippocampale Neurogenese als Bestandteil zellulärer neuronaler Plastizität des erwachsenen Gehirns

Wir haben gesehen, daß im erwachsenen Gyrus dentatus in einem mehrstufigen und differentiell regulierten Prozess aus neuronalen Vorläuferzellen und in Abhängigkeit von funktionellen Zuständen neue Neurone gebildet werden.

Dieses Bild steht im klaren Gegensatz zur Lehrbuchmeinung, wie sie noch vor wenigen Jahren gängig war. Ramon y Cajal's Pessimismus, im erwachsenen Gehirn könne nichts regenerieren, hat sich, auch wenn er selbst später eine qualifizierende Einschränkung gemacht hat, die Neurobiologie dergestalt geprägt, daß man zuletzt von einem „Dogma" sprechen musste. Dieser Ausdruck hat sich wohl auch deshalb durchgesetzt, weil auch zu Zeiten, als noch nichts von adulter Neurogenese und erst recht nichts von ihren möglichen funktionellen Einbindungen bekannt war, die vorhandenen Begründungen, warum diese kategorische Unmöglichkeit bestehen sollte, immer als unbefriedigend angesehen wurden. Denn das Gehirn zeigte, abgesehen von der Ebene der Neuronenzahl selbst, durchaus Regenerationsleistungen vor allem in Bezug auf Neuriten und Synapsen, und die Konzepte von neuronaler Plastizität waren bereits so umfangreich, daß der Nachweis von adulter Neurogenese und ihrer Regulation (vgl. auch noch einmal Tab. 1), als er endlich überzeugend gelang, eine lange gespürte Lücke in diesem Konzept schloß. Nicht anders ist zu verstehen, warum Pasko Rakic, einer der Väter der modernen Vorstellungen corticaler Entwicklung und Plastizität, 1985 glaubte, ausführlich Gründe dafür zusammentragen und diskutieren zu müssen, warum adulte Neurogenese, im Gyrus dentatus von Nagetieren damals bereits überzeugend beschrieben, bei Primaten nicht vorkommen könne [144].

Das Kernargument der damaligen Argumentation war, daß es die Komplexität des Gehirns bei Primaten, die natürlich in der Tat erheblich über die bei Nagetieren hinausgeht, aus Stabilitätsgründen nicht zulassen könne, neue Nervenzellen zu integrieren. Das stand schon damals in gewissem Widerspruch zu der weitreichenden Plastizität, die sich im Cortex von Affen nachweisen ließ und „Stabilität" nicht als vorrangigste Eigenschaft corticaler Neuronennetzwerke erkennen ließ. Eines der bekanntesten Beispiele ist die Umformung und Verlagerung der Repräsentationsareale der Finger, wenn man Affen einen Finger amputierte [119]. Aus Läsionsstudien wußte man darüberhinaus bereits, daß die Funktionen geschädigter Cortexareale in erstaunlichem Maße von benachbarten Regionen übernommen werden können. Das Argument, der Verlust adulter hippocampaler Neurogenese sei ein evolutionärer Fortschritt, entsprang daher einem dogmatischen Gedankengang „daß nicht sein kann, was nicht sein darf".

Als mit der BrdU-Methode die Ausbeute an untersuchbaren Zellen in Experimenten zur adulten Neurogenese erhöht werden konnte, war es auch

Rakic, der sich selbst widerlegend adulte Neurogenese im Affen beschrieb [99]. Es zeigt sich an diesem Schritt exemplarisch, welch fundamentaler Wandel sich in den Neurowissenschaften in den letzten Jahren vollzogen hat. Dies ist auch der Kontext, in dem die hier diskutierten Ergebnisse stehen: Das „Zugeständnis", auch das adulte Gehirn könne Vorgänge von Plastizität zeigen, ist der grundlegenden Vorstellung gewichen, daß das erwachsene Gehirn plastisch sei.

Das Konzept der Persistenz multipotenter gewebespezifischer Stammzellen auch im erwachsenen Gehirn geht darüberhinaus aber noch einen Schritt weiter, indem es nahelegt, daß die Entwicklung des Gehirns in gewisser Weise niemals aufhöre. Wir sind heute an dem Punkt, uns nicht mehr über adulte Neurogenese zu wundern, sondern darüber, daß das Gehirn von dem darin innewohnenden Potential zur Neuroregeneration außerhalb der beiden bekannten neurogenen Regionen wohl gar nicht und selbst innerhalb nur begrenzt Gebrauch macht.

Während es ein Hauptthema der Forschung der kommenden Jahre sein wird, diesen Widerspruch aufzuklären, gilt es andererseits, zelluläre neuronale Plastizität noch weit genauer zu verstehen und insbesondere herauszufinden, welch eine Beziehung zwischen zellulärer Plastizität und der Plastizität beispielsweise auf Ebene der Synapsen und Neuriten besteht. Die umfangreiche Literatur zur Wirkung von reizreicher Umgebung auf das Gehirn und insbesondere den Hippocampus [88] läßt ahnen, wie vielfältig diese Interaktion sein könnte.

Man kann adulte hippocampale Neurogenese somit als besonders gut zugängliches und steuerbares Modellsystem für die Kontrolle neuronaler Stammzellen *in vivo* betrachten. Die Regulation adulter Neurogenese und die Parameter neurogener Permissivität sind deshalb auch im Zusammenhang von Transplantationsansätzen zur Behandlung neuronaler Erkrankungen von Relevanz. Sei es bei der Implantation von unreifem Hirngewebe, von Stammzellen oder aber von genetisch modifizierten Zellen, die neurotrophe Faktoren freisetzen sollen, immer ist eine möglichst physiologische Interaktion mit dem Wirtsgewebe erwünscht. Die Parameter dafür aber sind nichts anderes als die eines Konzeptes neurogener Permissivität. Grundsätzlich erhebt sich damit die Frage, ob man bei Kenntnis dieser Permissivität überhaupt noch wird transplantieren müssen, oder ob man sich ganz auf das den ruhenden Stammzellen des erwachsenen Gehirns innewohnende Potential beschränken kann und neuronalen Zellersatz *in situ* zu induzieren. Unabhängig davon, ob dies möglich sein wird, und unabhängig von den Details des therapeutischen Konzeptes, innerhalb dessen man sie sich zu Nutzen machen will. zeigen die Ergebnisse zur aktivitätsabhängigen Regulation adulter Neurogenese aber, wie vielschichtig und komplex neurogene Permissivität ist. Entsprechend werden auch darauf basierende neuartige Therapieformen nicht einfach zu verwirklichen sein.

Dies gilt auch in einem anderen Zusammenhang, in dem Vorstellungen von neuronaler Plastizität und vor allem der Multipotenz neuronaler Stammzellen kürzlich eine ganz unerwartete Ausweitung erfahren haben. Transplantationen innerhalb des Gehirns hatten gezeigt, wie oben dargestellt, daß Zellen

entsprechend des Implantationsortes differenzierten. Sie hatten indirekt damit auch gezeigt, wie ähnlich wenn nicht gleich das Potential dieser Zellen ist. Bjornson et al. gingen 1999 noch weit hierüber hinaus, in dem sie nachwiesen, daß aus dem Gehirn gewonnene Stammzellen in der Lage sind, wie in einer Knochenmarkstransplantation das blutbildende System einer letal bestrahlten Maus komplett zu rekonstituieren [14]. Clarke et al. dehnten den Begriff der Multipotentialität, der konventionell den „gewebespezifischen" Stammzellen zugebilligt wurde, noch weiter, indem es ihnen gelang, adulte neuronale Stammzellen so „umzuprogrammieren", daß sie sich wie embryonale Stammzellen verhielten und in diversen Organen des sich aus der Blastozyste, in den diese Zellen implantiert wurden, entwickelnden Organismus aufzufinden waren — interessanterweise nicht jedoch im blutbildenden System [32]. Zwei Arbeitsgruppen gelang es schließlich zeitgleich, das Rennen um die erste Demonstration eines neurogenen Potentials von Stammzellen des blutbildenden Systems für sich zu entscheiden [19, 120]. Nach Knochenmarkstransplantation konnten markierte Transplantatzellen mit neuronalem Phänotyp unter anderem im Bulbus olfactorius und im Vorderhirn nachgewiesen werden. Ebenfalls unerwartet war der Befund der Arbeitsgruppe um Martin Raff, der besagt, daß auch gliale Vorläuferzellen, die gewissermaßen nur noch bipotent sind und Astrocyten oder Oligodendrocyten hervorbringen können, in multipotente Stammzellen überführt werden können [96].

Gegen all diese Ergebnisse, die die prinzipielle Möglichkeit der Trans- oder Redifferenzierung nahelegen, lassen sich noch diverse methodische oder andere Einwände vorbringen. Insbesondere sind die geführten Beweise der Klonalität der untersuchten Stammzellen nicht überzeugend. Im Falle der Arbeit von Raff [96] kann man deshalb argumentieren, daß es sich letztlich lediglich um eine andere Interpretation der Befunde wie sie schon Palmer ein Jahr zuvor erhoben hatte handeln könnte [134]. Die kommenden Jahre werden zeigen, inwieweit Trans- und Redifferenzierung wirklich möglich ist. Trotzdem sollten diese Ergebnisse schon jetzt nicht unterschätzt werden; zusammengenommen sprechen Sie durchaus auch jetzt schon für einen notwendigen, sehr fundamentalen Wandel der Konzepte.

Für die Stammzellbiologie ganz allgemein und für die Zuschreibung von „Multipotenz" bei eben nicht mehr ohne weiteres als „gewebespezifisch" anzusehenden Stammzellen haben diese Ergebnisse weitreichende Konsequenzen. Biologische und auch ethische Konzepte müssen überdacht werden. Aber auch die Frage, was neurogene Permissivität sei und wie sie physiologischerweise reguliert sei, erhält hierdurch ein verändertes Gewicht.

3.2 Adulte hippocampale Neurogenese und hippocampale Funktion

Adulte hippocampale Neurogenese als Modellfall von neuronaler Plastizität aufzufassen, darf nicht davon ablenken, daß es sich primär offensichtlich um einen Bestandteil hippocampaler Funktion handelt. In den Diskussionen unter 2.3 bis 2.7 ist dieser Aspekt bereits besprochen worden. Van Praag et al. zeigten in einer auf die unter 2.7 dargestellten Arbeit folgenden Studie, daß die durch freiwillige Laufradaktivität gesteigerte Neurogenese auch mit verbesserten Lernleistungen im Morris Wasserlabyrinth und mit gesteigerter LTP im Gyrus dentatus (siehe auch 1.3) einhergeht [177].

William T. Greenough hat die Diskrepanz unserer Ergebnisse zu den zeitgleich von Gould et al. [64] publizierten Resultaten diskutiert [74]. Er sieht die Erklärung primär in den unterschiedlichen Versuchsprotokollen, die zur Anwendung kamen, vor allem dem unterschiedlichen zeitlichen Verhältnis von BrdU-Injektion und Lernstimulus. Die Daten sind aber wohl auch mit der These vereinbar, daß während allgemeine Stimuli, wie sie bei körperlicher Aktivität auftreten und zum Beispiel über Serotonin vermittelt werden könnten [20, 21, 63, 83], auf die Teilungsaktivität von Vorläuferzellen in der subgranulären Zone wirken und also relativ unspezifisch das Potential für Neurogenese erhöhen, könnten spezifischere Lernstimuli wie in der reizreichen Umgebung oder im Experiment von Gould et al. [64] für den überlebensfördernden Effekt und damit die Rekrutierung von Zellen für eine Entwicklung zu neuen Neuronen verantwortlich sein. In diese Theorie sind allerdings die unter 2.5 dargestellten Ergebnisse unserer Untersuchungen mit 129/SvJ Mäusen, in denen eine reizreiche Umgebung Wirkungen bei der Zellproliferation und dem Überleben hatte, nicht unmittelbar einzuordnen. Es könnte dies aber daran liegen, daß grundsätzlich die Trennschärfe der gewählten Experimente gering ist, da es bislang kein gutes Paradigma zur Untersuchung von „reinem" Lernen und isolierter körperlicher Aktivität gibt.

Zusammengenommen zeigen unsere Ergebnisse einen Zusammenhang, wenn auch nicht unbedingt eine strenge Korrelation zwischen adulter hippocampaler Neurogenese und hippocampaler Funktion. Fraglich aber bleibt, ob man „Funktion" in diesem Zusammenhang auf Lernen im engeren Sinne reduzieren darf. Lernen in einem sehr allgemeinen Sinne ist bereits von Mark Rosenzweig als einer der den Wirkungen reizreicher Umgebung zugrundeliegenden Mechanismen vorgeschlagen worden [152]. Diese Theorie setzte sich bewußt ab, von der sogenannten *arousal theory* von Cummins et al. [40], die die Hauptwirkung im *enriched environment* als von einer allgemeinen Steigerung der gespannten Aufmerksamkeit und der allgemeinen Aktivität ausgehend ansah (siehe Darstellung bei [152]). Es ist interessant zu beobachten, daß beide Theorien in der hier diskutierten Forschung eine unerwartete Berührung erfahren.

Wenn man sich noch einmal die von Rakic 1985 vorgebrachten Argumente gegen eine mögliche Neurogenese bei erwachsenen Primaten vor Augen führt, so bleibt in der Tat die damit verwandte Frage, warum und wie das Gehirn von den neuen Nervenzellen überhaupt profitieren *kann*. Wie unser unter

2.2 dargestelltes Experiment belegt, ist die Gesamtkörnerzellzahl ein sehr schlechtes Maß für die Rate adulter Neurogenese. Es ist außerdem bekannt, daß Lernfähigkeit nicht mit der Gesamtkörnerzellzahl korreliert [186]. Da der Hippocampus auch nicht der Speicher des Gedächtnisses ist, sondern vielmehr eine Filterfunktion ausübt und ein „Tor zum Gedächtnis" darstellt, kann der Zuwachs an Nervenzellen durch adulte Neurogenese nicht Ausdruck von einer Art „Speichererweiterung" sein [48]. Der zusätzliche speicherbare Inhalt wäre viel zu gering. Außerdem lernen alte Tiere, obwohl sie nur sehr wenig adulte hippocampale Neurogenese zeigen, vergleichsweise gut (vgl. 2.4). Gould et al. deuten nun die Funktion adulter Neurogenese dennoch sehr eng innerhalb des Lernvorganges selbst [68].

Die Ergebnisse unserer Versuche mit reizreichen Umgebungen lassen aber auch den Schluß zu, daß die Funktion adulter hippocampaler Neurogenese primär darin liegen könnte, mit der der Neuartigkeit von Reizen umzugehen. Dies wird durch Experiment 2.6 gestützt, in dem wir fanden, daß fortgesetzte Stimulation nicht zu einer linearen Steigerung in Neurogenese führt. Die Wirkung der weitgehend unveränderten und nur noch variierten Komplexität der Umgebung reichte als Stimulus nicht mehr aus, um ein signifikantes Ergebnis zu erhalten. Daß alte Mäuse gut lernen, aber weniger adulte hippocampale Neurogenese aufweisen, paßt ebenfalls in diese Theorie. Wenn man annimmt, daß Erfahrung bedeutet, weniger als „neu" erleben zu müssen, so könnten in den alten Tieren bereits die notwendigen zusätzlichen Knotenpunkte im neuronalen Netz, die bei einem jüngeren Tier durch adulte hippocampale Neurogenese bereitgestellt würden, vorhanden sein und also zur Bewältigung der Aufgabe keine neurogene Antwort gleichen Ausmaßes notwendig sein. Lemaire et al. zeigten, daß Ratten, die im Rahmen interindividueller Unterschiede sehr stark auf neue Umgebungen reagieren, weniger Neurogenese im adulte Hippocampus zeigen als Tiere mit gemäßigterer Reaktion [106]. Dieses Ergebnis beleuchtet einen wichtigen Aspekt, der wiederum einen Bezug zur streßinduzierten Regulation adulter Neurogenese herstellt: Neuartigkeit eines Reizes kann als Streß erlebt werden. Es ist hier aber unklar, ob diese Tiere gestreßt sind, weil ein geringeres Maß an hippocampaler Neurogenese ihnen einen effektiven Umgang mit der Situation erlaubt, oder ob Streß verhindert, daß sie adäquat reagieren.

3.3 Adulte hippocampale Neurogenese und neurologische Erkrankungen

Bereits aus theoretischen Überlegungen folgt aus einer Bedeutung adulter hippocampaler Neurogenese für hippocampale Funktion auch eine mögliche Relevanz bei der Erklärung hippocampaler Fehlfunktion. Begreift man adulte hippocampale Neurogenese als nur besonders offenkundiges Beispiel stammzellabhängiger zellulärer neuronaler Plastizität des erwachsenen Gehirns, so ergibt sich daraus, daß auch im Hinblick auf stammzellabhängige Pathologie

der Hippocampus Modellcharakter haben könnte. Untersuchungen zur Regulation adulter hippocampaler Neurogenese stellen somit ein wirksames Werkzeug dar, die Bedeutung von Stammzellen für die Pathogenese neurologischer Erkrankungen zu erforschen.

Am offenkundigsten ist ein möglicher Bezug stammzellbedingter Pathologie bei Tumorerkrankungen. Versteht man z.B. das Glioblastoma multiforme letztlich als „Stammzelltumor", so könnten sich einige bisher unklare und verwirrende Beobachtungen bei diesem häufigsten malignen Hirntumor aufklären.

Erklären ließe sich aus der Hypothese, daß das Glioblastoma multiforme letztlich aus einer zumindest multipotenten neuralen Stammzelle hervorgeht, beispielsweise die Beobachtung, daß innerhalb eines Tumors sehr unterschiedliche gliale Differenzierungen auftreten können. Wenn man akzeptiert, daß Neoplasien klonal sind, also aus einer einzelnen, entarteten Ursprungszelle hervorgehen, so ist die Vielfalt zellulärer Differenzierungsmuster im Glioblastoma multiforme durch die Herkunft aus einer multipotenten Stammzelle leichter erklärbar als bei Abstammung von einer ausdifferenzierten Gliazelle.

Rudimente neuronaler Differenzierung finden sich auch in den als „rein glial" verstanden Gliomen, insbesondere dem Glioblastoma multiforme. So konnten in frischen Tumorresektaten Aktionspotentiale, einem funktionellen Charakteristikum von Neuronen, gemessen werden [104] und die Expression von Neurotransmitterrezeptoren nachgewiesen werden [102, 103]. Auch diese abortive neuronale Differenzierung im Tumor könnten ihren Grund in einer Herkunft aus multipotenten Stammzellen haben.

Aber auch die Tatsache, daß neuronale Tumoren so extrem selten sind und man keine vollständige neuronale Differenzierung in Hirntumoren findet, ließe sich so möglicherweise leichter erklären. Nimmt man nämlich an, daß aus neuronalen Stammzellen in der Abwesenheit einer neurogenen Umgebung nur Gliazellen werden, so würde dies dafür sprechen, daß in einem Tumor diese Neurogenität nicht aufrechterhalten werden kann, selbst wenn sie je vorhanden war. Echte neuronale Tumoren wären dann Entartungen auf Ebenen, in denen das Potential zur Replikation zwar noch vorhanden aber sehr eingeschränkt wäre, die zelluläre Differenzierung aber bereits auf eine neuronale Differenzierung festgelegt wäre.

Unterstützt wird die Stammzellhypothese des Glioblastoma multiforme durch die Befunde, daß sich Vorläuferzellen (wenn auch bislang keine eigentlichen Stammzellen) aus Hirntumoren gewinnen lassen [114]. Bedenkt man, daß die Grenze zwischen glialen Vorläuferzellen und multipotenten Stammzellen fließend zu sein scheint [96], so gewinnt dieses Ergebnis zusätzliches Gewicht.

Interessant sind in diesem Zusammenhang der enge räumliche und wahrscheinlich auch zeitliche Bezug, der zwischen adulter hippocampaler Neurogenese und Angiogenese zumindest in der subgranulären Zone besteht [137].

Schon seit langem ist bekannt, daß Patienten mit Temporallappenepilepsie oft ektopische Körnerzellnester im Hippocampus aufweisen [81, 82]. Es ist nicht bekannt, ob diese Nester Folge oder Ursache der Epilepsie sind. Die Beobachtung, daß induzierte Anfälle eine Steigerung der Vorläuferzellprolife

ration im Hippocampus auslösen [10, 138, 139], spricht dafür, daß Anfälle zu solchen ektopischen Nestern führen können. Aberrante Zellverbindungen, die aber auch unabhängig von dem mitogenen Reiz auftreten, sind für die Propagation der Anfälle wahrscheinlich primär doch bedeutender [138]. Trotzdem muß von einer engen Beziehung zwischen Temporallappenepilepsie und adulter hippocampaler Neurogenese ausgegangen werden.

Einen unerwarteten Bezug zu proliferativer Aktivität von neuronaler Stammzellen weist auch die Beobachtung auf, daß es bei der Alzheimerschen Erkrankung zu einem abortiven Eintritt ausdifferenzierter Zellen in den Zellzyklus kommt, was dann zum Zelluntergang führt [192]. In der radikalen Form betrachtet diese Theorie den Morbus Alzheimer als eine Art „Krebs des Gehirns" (McShea et al., *Soc. Neurosci. Abstr.* 2000: 859.20). Hinter der schlagwortartigen Vereinfachung verbergen sich aufschlußreiche Beobachtungen auf biochemischer Ebene [143]. In unserem Zusammenhang ist vor allem die Expression von Zellzyklusproteinen im Hippocampus von Alzheimer-Patienten interessant [127, 128]. Der Hippocampus ist eine der Prädilektionsstellen der Alzheimerschen Erkrankung. Es wäre demnach möglich, daß dem Morbus Alzheimer auch eine Störung der Signalmechanismen zugrundeliegt, die Neurogenität definieren und normalerweise auf suszeptible Stamm- und Vorläuferzellen beschränken.

Theoretisch könnte eine gestörte neuronale Plastizität im Hippocampus für viele kognitive Probleme verantwortlich sein, insbesondere bei Lernstörungen und Demenzen. Um hierbei zu konkreteren Schlußfolgerungen zu kommen, müßte aber zunächst die Bedeutung adulter hippocampaler Neurogenese für die Funktion des Hippocampus sehr viel genauer aufgeklärt werden.

Sehr viel weiter fortgeschritten ist die Diskussion über einen möglichen pathogenetischen Beitrag adulter hippocampaler Neurogenese im Falle der Depression („*major depression*"). Hier stand die Beobachtung aus sorgfältigen kernspintomographischen Untersuchungen, daß Patienten mit einer Depression eine signifikante Atrophie des Hippocampus aufweisen [160, 161], am Anfang einer noch sehr spekulativen, aber plausiblen und biologisch ausgerichteten Theorie [46, 84]. Stützend sind hierbei beispielsweise die Beobachtung, daß alle bislang untersuchten Faktoren mit antidepressiver Wirkung, darunter Lithium [30], Fluoxetin (*Prozac*®) [113], elektrokonvulsive Therapie [111] und körperliche Aktivität [178] einen positiven Effekt auf adulte hippocampale Neurogenese haben. Auch das Wissen um die Rolle von Glucocorticoiden in der Depression einerseits und bei der Regulation adulter hippocampaler Neurogenese andererseits könnte für diese Verbindung sprechen [70]. Die Theorie, daß adulte hippocampale Neurogenese eine verbesserte Auseinandersetzung mit der Neuartigkeit eines Reizes ermöglichen könnte, paßt besonders gut zu der Vermutung, daß der Depression eine gestörte neuronale Plastizität zugrundeliegen könnte, da ein klinisches Charakteristikum der Depression die Unfähigkeit ist, sich dem Alltag mit seinen Unwägbarkeiten und Veränderungen zu stellen. Der Rückzug in die Isolation könnte darin begründet sein, daß die Patienten die Neuartigkeit von Reizen nicht adäquat verarbeiten können, was zu

Angstgefühlen führt. Auch die oben dargestellten Beobachtungen zur aktivitätsabhängigen Regulation adulter hippocampaler Neurogenese fügten sich in diese Annahme (siehe auch Kempermann G, *Regulation of adult hippocampal neurogenesis — implications for novel theories of major depression,* Bipolar Disorders, auf Einladung zur Veröffentlichung eingereicht).

Insgesamt zeigen diese Überlegungen, auch wenn sie bislang noch theoretisch und weitgehend spekulativ sind, daß neuronale Stammzellen im erwachsenen Gehirn sowie adulte hippocampale Neurogenese und die Regulation neuronaler Plastizität zunehmend in größeren Zusammenhängen gesehen werden. Nicht zuletzt so erklären sich das exponentielle Wachstum des Interesses an diesen Fragestellungen und die Zunahme an Publikationen in diesem Sektor.

Das Wissen um die Regulation von Neurogenese im erwachsenen Hippocampus ist möglicherweise übertragbar auf nicht-neurogene Hirnregionen, die doch ebenfalls neuronale Stammzellen enthalten [134, 135, 164]. Das regenerative Potential, das in diesen Zellen ruht, hofft man eines Tages in therapeutischer Absicht ausnutzen zu können. Während dies bei den obengenannten Erkrankungen, in denen Stammzellen möglicherweise eine pathogene Rolle spielen, relativ geradlinig erscheint, so sind doch auch Anwendungen in unspezifischeren Zusammenhängen denkbar. Die Beobachtung beispielsweise, daß experimentelle Hirntumoren neuronale Vorläuferzellen „anlocken"[1], hat zu der Überlegung geführt, diese Route zum Einschleusen von therapeutischen Genen in Hirntumoren auszunutzen.

Auch bei anderen, vor allem neurodegenerativen Erkrankungen ließen sich neuronale Stammzellen theoretisch als Vehikel für die Gentherapie nutzen. Denkbar wäre beispielsweise die durch Gentransfer bewirkte Ausschüttung von GDNF als trophische Unterstützung der degenerierenden Neurone in der Substantia nigra von Patienten mit Parkinsonscher Erkrankung (in Anlehnung an [98]).

Ansätze zu einem gewissermaßen „reinen" Zellersatz bei neurologischen Erkrankungen sind noch hypothetischer, da nicht bekannt ist, inwieweit das erkrankte Gehirn den Ersatz von beispielsweise durch Ischämie zugrundegegangenen Neuronen überhaupt nutzen kann. Dies bedeutet aber lediglich, daß die Forschung in dieser Richtung noch sehr umfassend sein muß. Das Potential dieser therapeutischen Strategie ist immens. Der *proof of principle* für solche Ansätze ist bereits gelungen. In allerdings hochspeziellen experimentellen Modellen gelang es zu zeigen, daß selektiv eliminierte korticale Neurone lokal durch korticale Neurogenese ersetzt werde können [77, 112]. Die Existenz einer korticalen Neurogenese im Erwachsenenalter in Abwesenheit von pathologischen Reizen ist zwar sogar für das Gehirn von Primaten berichtet worden [67], aber höchst umstritten. Es ist wahrscheinlicher, daß Neurogenität außerhalb der primär neurogenen Regionen des erwachsenen Gehirns unter normalen Bedingungen gehemmt ist, aber durch bestimmte pathologische Stimuli und in Abwesenheit von massiven Schädigungen durchaus stimulierbar ist. Die Experimente von Macklis und Mitarbeitern haben damit erstmals ge

zeigt, daß es sich hier um ein quantitatives und nicht um ein qualitatives Problem handelt [112] und induzierbare Neurogenese als Strategie des Zellersatzes möglich ist.

3.4 Stammzellbasierte Therapie für die Neurologie

Aus dem Gesagten ergibt sich, daß sich neue Therapien für die Neurologie, die das regenerative Potential von Stammzellen nutzen wollen, nicht allein auf Transplantationsstrategien beschränken werden. Vor allem Einsichten in die mögliche Rolle, die Stammzellen in der Pathogenese neurologischer Erkrankungen spielen könnten, aber auch sehr generell ein verbessertes Verständnis der physiologischen Rolle neuraler Stammzellen für die Funktion des erwachsenen Gehirns, beeinflussen die Stellung, die der Stammzellbiologie für die Neurologie zukommen wird. Zu Beginn des 21. Jahrhundert sieht sich die Menschheit mit gleich zwei Revolutionen oder Paradigmenwechseln in der Biologie konfrontiert. Die genetische Revolution, die sich an der Sequenzierung der menschlichen DNA festmacht, ist die sichtbarere der beiden. Die ethischen Diskussion über „Therapeutisches Klonen“ und die Nutzung „embryonaler Stammzellen“ haben aber auch die Stammzellbiologie zunehmend in den Fokus öffentlichen Interesses gerückt. Das revolutionäre liegt hier in der Einsicht, daß der ganze Mensch fortwährender zellulärer Erneuerung unterliegt; seine Entwicklung also in gewisser Weise nie beendet ist. Gerade im Falle des Gehirns hat diese Erkenntnis fundamentale Konsequenzen, deren Auswirkungen auf Konzepte von Gehirnfunktion und „Geist“, ja auf Betrachtungen, was das Leben ausmacht, erst in Ansätzen erkennbar sind. Damit ist „Stammzelltherapie“ immer weniger nur eine neue Technologie, sondern zunehmend die Auswirkung einer veränderten Sicht auf das Gehirn und seine Krankheiten.

Folgende Strategien zur Anwendung der Stammzellbiologie auf die neurologische Therapie erscheinen prinzipiell denkbar:

1. In Anlehnung an die bereits klinisch angewandte Transplantation von fetalem Hirngewebe in Patienten mit M. Parkinson oder der Chorea Huntington die Transplantation fetaler oder embryonaler Stammzellen. Wegen der Notwendigkeit, die transplantierbaren Zellen aus menschlichen Embryonen zu gewinnen, ist diese Strategie ethisch sehr problematisch und auch mit praktischen, technischen Schwierigkeiten behaftet.
2. Viele dieser Probleme ließen sich bereits umgehen, wenn die zu transplantierenden Stammzellen auf andere Weise als unmittelbar aus Embryonen gewonnen werden können. Hier verspricht der Kerntransfer einer Patientenzelle in eine enukleirte Spendereizelle Abhilfe (sogenanntes „therapeutisches Klonen“), da aus dem daraus entstehenden Embryoidkörper embryonale Stammzellen entwickelt werden können, die zudem noch die immunologischen Charakteristika des Patienten

selbst aufweisen. Diese Strategie stellt sehr große technische Herausforderung dar und ist, da man auf Spendereizellen angewiesen ist, ebenfalls nicht unproblematisch. Auch wegen seiner technischen Verwandtschaft zum reproduktiven Klonen werden ethische Bedenken gegen das therapeutische Klonen vorgebracht.

3. Auch die Verwendung von kryokonservierten Nabelschnurzellen könnte autologe transplantierbare Stammzellen zur Verfügung stellen. Es gibt bislang jedoch nur wenig Information über Anwendung von Nabelschnurstammzellen in der experimentellen Neurologie.
4. Als ethisch unbedenklich gilt die Verwendung adulter Stammzellen aus dem erwachsenen Gehirn. Ein starkes Argument für die Verwendung adulter neuraler Stammzellen ist, daß diese Zellen in ihrem Entwicklungspotential festgelegter sind als embryonale Stammzellen, was unter Sicherheitsaspekten von Bedeutung sein könnte. Mit adulten neuronalen Stammzellen sind ebenfalls autologe Transplantationen möglich.
5. Adulte neuronale Stammzellen ließen sich aber auch, wie in dieser Arbeit gezeigt, *in situ* stimulieren, so daß eine Transplantation überflüssig wäre. Dies könnte präventiv oder kurativ erfolgen. Trotz der Demonstration prinzipieller Machbarkeit, sind auf diesem Gebiet noch sehr viele Fragen offen. Dieser Ansatz ist wegen der Möglichkeit pharmakologischer Interventionen und der damit verbundenen praktischen Vorteile höchst attraktiv und könnte langfristig (mit Punkt 6) das Bild bestimmen..
6. Stammzellbasierte Therapie *in vivo* könnte sich aber auch unmittelbar auf die Beherrschung derjenigen Krankheiten beziehen, bei denen eine Beteiligung von Stammzellen an der Pathogenese angenommen werden kann.

Stammzellbasierte Therapie wird sich demnach nicht auf solche Erkrankungen mit relativ umschriebenem Zellverlust, wie beispielsweise M. Parkinson oder Chorea Huntington, beschränken. Für Zellersatzstrategien im engeren Sinne bleiben diese Krankheiten realistischere Ziele als diffusere Erkrankungen wie M. Alzheimer oder erst recht Schäden im Rahmen von Ischämie, Trauma und Entzündung. Das weitgefasstere Konzept der stammzellbasierten Therapie (Strategien 5 und 6) rückt auch diejenigen neurologischen Erkrankungen in das Blickfeld, die durch Transplantationsansätze nicht sinnvoll angehbar wären. Die Depression ist hier ein extremes Beispiel.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Forschung bezieht sich vor allem auf die Strategien 5 und 6. Aber auch alle Formen von Transplantationsansätzen, wie 1 bis 4, die darauf abzielen, neue Neurone entstehen zu lassen, müssen sich der Frage der neurogenen Permissivität stellen. Auch für das Überleben und die Differenzierung eines Transplantats sind die Faktoren der zellulären Umgebung am Implantationsort entscheidend. Zusammengenommen bedeutet dies, daß jeglicher Ansatz zur stammzellbasierten Therapie für das ZNS auf Er

kenntnisse darüber, wie adulte Neurogenese *in vivo* möglich ist und reguliert wird, zurückgreifen wird. Die Kernfragen bleiben: Was macht eine neurogene Region neurogen? Wie ist neurogene Permissivität definiert? Nur solide Grundlagenforschung wird es ermöglichen, aus der derzeitigen Sphäre der „qualifizierten Utopie“ einer stammzellbasierten neurologischen Therapie zu realistischen Umsetzungen zu gelangen.

4 Schlußfolgerungen (Zusammenfassung)

- Das erwachsene Gehirn enthält neuronale, multipotente Stammzellen, aus denen in den beiden bekannten neurogenen Regionen des Gehirn, im Hippocampus und im olfaktorischen System, neue Nervenzellen hervorgehen.
- Aus Transplantationsstudien und anderen Untersuchungen weiß man, daß es die zelluläre Umgebung ist, die die *neurogene Permissivität* und damit die Entwicklung einer reifen neuen Nervenzelle aus einer Stamm- oder Vorläuferzelle, bestimmt.
- Die Schlüsselfrage lautet daher: Was macht eine neurogene Region neurogen? Neurogenität ist mehr als die Präsenz von neuralen Stammzellen.
- Die aktivitätsabhängige Regulation adulter hippocampaler Neurogenese stellt eine physiologische, positive Modulation von Neurogenität im erwachsenen Gehirn dar.
- Aktivitätsabhängige Regulation adulter hippocampaler Neurogenese ist vielstufig und kein An/Aus-Phänomen. Die unterschiedlichen Stufen der Regulation unterliegen unterschiedlicher genetischer Determination und unterschiedlicher Empfindlichkeit auf aktivitätsabhängige Stimuli.
- Die Steuerung des Überlebens neugeborener Zellen stellt möglicherweise den entscheidenden Schritt auf dem Weg zu einem neuen Neuron dar. Die aktivitätsabhängige Selektion durch eine überlebensfördernde Wirkung rekrutiert jedoch aus einem Pool proliferierender Vorläuferzellen, die das neurogene Potential darstellen.
- Die subtile Regulation adulter hippocampaler Neurogenese durch funktionsabhängige Stimuli legt eine Relevanz für hippocampale Funktion, insbesondere Lern- und Gedächtnisvorgänge nahe. Entsprechend muß aber auch eine Bedeutung für hippocampale Pathologie diskutiert werden.
- Das Verständnis darüber, wie Neurogenität funktions- und aktivitätsabhängig modulierbar ist, ist von größter Relevanz für die Frage, ob und wie sich Neurogenese aus ruhenden neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen auch außerhalb neurogener Regionen induzieren und in therapeutischer Absicht nutzen läßt.

5 Anhang

5.1 Danksagungen

Ich danke vor allem Fred H. Gage, der mir die Möglichkeit gab, in großer Freiheit, aber mit aller nur wünschenswerter Unterstützung über adulte Neurogenese und ihre Regulation zu arbeiten. Die Gespräche mit ihm haben mein wissenschaftliches Denken nachhaltig und entscheidend geprägt. Auch mein erster akademischer Lehrer, Benedikt Volk, hat mich nicht zuletzt dadurch maßgeblich beeinflußt, daß er mein wissenschaftliches Interesse weckte und mir auch vermittelte, wie Wissenschaft immer auch in den größeren Kontexten und „mitten im Leben" zu verstehen ist. H. Georg Kuhn war mein Mentor am Salk Institut, führte mich in das Thema adulter Neurogenese ein und wurde zum Freund und wichtigsten Gesprächspartner. Jürgen Winkler und Ulrich Bogdahn in Regensburg danke ich für ihre Unterstützung während meiner Regensburger Jahre. Helmut Kettenmann danke ich für die Förderung dieser Habilitation in Berlin.

Darüberhinaus gilt mein Dank all den Mitautoren, Kollegen, technischen Mitarbeitern und den Studenten, die zum Gelingen der hier vorgestellten Arbeiten beigetragen haben.

Schließlich danke ich meiner Familie für die Unterstützung, die meine Arbeit ermöglicht hat, und vor allem Uta, dem maßgeblichen Faktor meines ganz persönlichen *enriched environment*. Ihr ist diese Arbeit auch gewidmet.

5.2 Literaturverzeichnis

1. Aboody KS, Brown A, Rainov NG, Bower KA, Liu S, Yang W, Small JE, Herrlinger U, Ourednik V, Black PM, Breakefield XO, Snyder EY: Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; *97:*12846-12851.
2. Altman J, Das GD: Autoradiographic examination of the effects of enriched environment on the rate of glial muliplication in the adult rat brain. Nature 1964; *204:*1161-1163.
3. Altman J, Das GD: Autoradiographic and histologic evidence of postnatal neurogenesis in rats. J. Comp. Neurol. 1965; *124:*319-335.
4. Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Mateo AS, Merchant-Larios H: Primary neural precursors and intermitotic nuclear migration in the ventricular zone of adult canraries. J. Neurosci. 1998; *18:*1020-1037.
5. Bachoud-Levi AC, Remy P, Nguyen JP, Brugieres P, Lefaucheur JP, Bourdet C, Baudic S, Gaura V, Maison P, Haddad B, Boisse MF, Grandmougin T, Jeny R, Bartolomeo P, Dalla Barba G, Degos JD, Lisovoski F, Ergis AM, Pailhous E, Cesaro P, Hantraye P, Peschanski M: Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation. Lancet 2000; *356:*1975-1979.
6. Barnea A, Nottebohm F: Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994; *91:*11217-11221.
7. Barnea A, Nottebohm F: 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:*714-718.
8. Bayer SA: Neuron production in the hippocampus and olfactory bulb of the adult rat brain: addition or replacement? Ann N Y Acad Sci 1985; *457:*163-172.
9. Bayer SA, Yackel JW, Puri PS: Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. Science 1982; *216:*890-892.
10. Bengzon J, Kokaia Z, Elmér E, Nanobashvili A, Kokaia M, Lindvall O: Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997; *94:*10432-10437.
11. Bennett EL, Rosenzweig MR, Morimoto H, Hebert M: Maze training alters brain weights and cortical RDA/DNA ratios. Behav Neural Biol 1979; *26:*1-22.
12. Bhatnagar M, Cintra A, Chadi G, Lindberg J, Oitzl M, De Kloet ER, Möller A, Agnatis LF, Fuxe K: Neurochemical changes in the hippocampus of the brown norway rat during aging. Neurobiol. Aging 1997; *18:*319-327.
13. Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG: Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self- renewing capacity in the adult rat brain. Neurosci Lett 2000; *291:*17-20.
14. Bjornson CRR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL: Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. Science 1999; *283:*534-537.
15. Blaschke AJ, Staley K, Chun J: Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex. Development 1996; *122:*1165-1174.

16. Blomquist KB, Danner F: Effects of physical conditioning on information-processing efficiency. Percept Mot Skills 1987; *65:*175-186.
17. Boyes BE, Kim SU, Lee V, Sung SC: Immunohistochemical co-localization of S-100b and the glial fibrillary acidic protein in rat brain. Neurosci. 1986; *17:*857-865.
18. Brandon EP, Idzerda RL, McKnight GS: Targeting the mouse genome: a compendium of knockouts. Curr Biol 1995; *5:*625-634, 758-765, 873-881.
19. Brazelton TR, Rossi FMV, Keshet GI, Blau HM: From Marrow to Brain: Expression of Neuronal Phenotypes in Adult Mice. <EM>Science</EM> 2000; *290:*1775-1779.
20. Brezun JM, Daszuta A: Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. Neuroscience 1999; *89:*999-1002.
21. Brezun JM, Daszuta A: Serotonin may stimulate granule cell proliferation in the adult hippocampus, as observed in rats grafted with foetal raphe neurons. Eur. J. Neurosci. 2000; *12:*391-396.
22. Brundin P, Pogarell O, Hagell P, Piccini P, Widner H, Schrag A, Kupsch A, Crabb L, Odin P, Gustavril B, Bjorklund A, Brooks DJ, David Marsden C, Oertel WH, Quinn NP, Rehncrona S, Lindvall O: Bilateral caudate and putamen grafts of embryonic mesencephalic tissue treated with lazaroids in Parkinson's disease. Brain 2000; *123:*1380-1390.
23. Brustle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, Duncan ID, McKay RD: Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. Science 1999; *285:*754-756.
24. Cai L, Hayes NL, Nowakowski RS: Local homogeneity of cell cycle length in developing mouse cortex. J Neurosci 1997; *17:*2079-2087.
25. Cameron HA, Gould E: Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. Neuroscience 1994; *61:*203-209.
26. Cameron HA, McEwen BS, Gould E: Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. J. Neurosci. 1995; *15:*4687-4692.
27. Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E: Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. Neuroscience 1993; *56:*337-344.
28. Caviness VS, Jr., Takahashi T, Nowakowski RS: Numbers, time and neocortical neuronogenesis: a general developmental and evolutionary model. Trends Neurosci. 1995; *18:*379-383.
29. Chen C, Tonegawa S: Molecular genetic analysis of synaptic plasticity, activity-dependent neural development, learning, and memory in the mammalian brain. Annu Rev Neurosci 1997; *20:*157-184.
30. Chen G, Rajkowska G, Du F, Seraji-Bozorgzad N, Manji HK: Enhancement of hippocampal neurogenesis by lithium. J Neurochem 2000; *75:*1729-1734.
31. Chenn A, McConnell S: Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. Cell 1995; *82:*631-641.
32. Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlström H, Lendahl U, Frisén J: Generalized potential of adult neural stem cells. Science 2000; *288:*1660-1663.

33. Conover JC, Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Gale NW, Yancopoulos GD, Alvarez-Buylla A: Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone [In Process Citation]. Nat Neurosci 2000; *3:*1091-1097.
34. Conrad CD, Roy EJ: Selective loss of hippocampal granule cells following adrenalectomy: implications for spatial memory. J Neurosci 1993; *13:*2582-2590.
35. Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, Reynolds BA, Weiss S, van der Kooy D: In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. J. Neurosci. 1996; *16:*2649-2658.
36. Crawley JN: Unusual behavioral phenotypes of inbred mouse strains. Trends Neurosci 1996; *19:*181-182; discussion 188-189.
37. Crespo D, Stanfield BB, Cowan WM: Evidence that late-generated granule cells do not simply replace earlier formed neurons in the rat dentate gyrus. Exp. Brain Res. 1986; *62:*541-548.
38. Crnic LS: Effects of nutrition and environment on brain biochemistry and behavior. Dev. Psychobiol. 1983; *16:*129-145.
39. Crusio WE: Gene-targeting studies: new methods, old problems. Trends Neurosci 1996; *19:*186-187; discussion 188-189.
40. Cummins RA, Livesey PJ, Evans JG: A developmental theory of environmental enrichment. Science 1977; *197:*692-694.
41. Cummins RA, Walsh RN, Budtz-Olsen OE, Konstantinos T, Horsfall CR: Environmentally-induced changes in the brains of elderly rats. Nature 1973; *243:*516-518.
42. Czurko A, Hirase H, Csicsvari J, Buzsaki G: Sustained activation of hippocampal pyramidal cells by 'space clamping' in a running wheel. Eur. J. Neurosci. 1999; *11:*344-352.
43. Dawirs RR, Hildebrandt K, Teuchert-Noodt G: Adult treatment with haloperidol increases dentate granule cell proliferation in the gerbil hippocampus. J Neural Transm 1998; *105:*317-127.
44. del Rio JA, Soriano E: Immunocytochemical detection of 5'-bromodeoxyuridine incorporation in the central nervous system of the mouse. Dev. Brain Res. 1989; *49:*311-317.
45. Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A: Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. Cell 1999; *97:*703-716.
46. Duman RS, Malberg J, Nakagawa S, D'Sa C: Neuronal plasticity and survival in mood disorders. Biol Psychiatry 2000; *48:*732-739.
47. Eichenbaum H: Is the rodent hippocampus just for "place"? Trends in Neuroscience 1996; *6:*187-195.
48. Eichenbaum H, Dudchenko P, Wood E, Shapiro M, Tanila H: The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or a memory space? Neuron 1999; *23:*209-226.
49. Eisch AJ, Barrot M, Schad CA, Self DW, Nestler EJ: Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; *97:*7579-7584.
50. Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH: Neurogenesis in the adult human hippocampus. Nat. Med. 1998; *4:*1313-1317.

51. Falkenberg T, Mohammed AK, Henriksson B, Persson H, Winblad B, Lindefors N: Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment. Neurosci Lett 1992; *138:*153-156.
52. Ffrench-Constant C, Raff MC: Proliferating bipotential glial progenitor cells in adult rat optic nerve. Nature 1986; *319:*499-502.
53. Fordyce DE, Wehner JM: Physical activity enhances spatial learning performance with an associated alteration in hippocampal protein kinase C activity in C57BL/6 and DBA/2 mice. Brain Res 1993; *619:*111-119.
54. Gage F: Mammalian neural stem cells. Science 2000; *287:*1433-1438.
55. Gage FH: Cell Therapy. Nature 1998; *392 Supplement:*601-605.
56. Gage FH, Coates PW, Palmer TD, Kuhn HG, Fisher LJ, Suhonen JO, Peterson DA, Suhr ST, Ray J: Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995; *92:*11879-11883.
57. Gerlai R: Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype? Trends Neurosci 1996; *19:*177-181 and 188-189.
58. Goldman SA, Nottebohm F: Neuronal production, migration and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. Proc. Acad. Sci. USA 1983; *80:*2390-2394.
59. Gomez-Pinilla F, Dao L, So V: Physical exercise induces FGF-2 and its mRNA in the hippocampus. Brain Res. 1997; *764:*1-8.
60. Gomez-Pinilla F, So V, Kesslak JP: Spatial learning and physical activity contribute to the induction of fibroblast growth factor: neural substrates for increased cognition associated with exercise. Neuroscience 1998; *85:*53-61.
61. Gomez-Pinilla F, Vu L, Cotman CW: Regulation of astrocyte proliferation by FGF-2 and heparan sulfate in vivo. J Neurosci 1995; *15:*2021-2029.
62. Gould E: The effects of adrenal steroids and excitatory input on neuronal birth and survival. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1994; *743:*73-92; discussion 92-73.
63. Gould E: Serotonin and hippocampal neurogenesis. Neuropsychopharmacology 1999; *21 (2 Suppl):*46S-51S.
64. Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ: Learning enhances adult neurogenesis in the hippoampal formation. Nat. Neurosci. 1999; *2:*260-265.
65. Gould E, Cameron HA, Daniels DC, Woolley CS, McEwen BS: Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. J Neurosci 1992; *12:*3642-3650.
66. Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LAM, Fuchs E: Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. J. Neurosci. 1997; *17:*2492-2498.
67. Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG: Neurogenesis in the neocortex of adult primates. Science 1999; *286:*548-552.
68. Gould E, Tanapat P, Hastings NB, Shors TJ: Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. Trends Cogn Sci 1999; *3:*186-192.
69. Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E: Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998; *95:*3168-3171.
70. Gould E, Tanapat P, Rydel T, Hastings N: Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood. Biol Psychiatry 2000; *48:*715-720.

71. Gower AJ, Lamberty Y: The aged mouse as a model of cognitive decline with special emphasis on studies in NMRI mice. Behav Brain Res 1993; *57:*163-173.

72. Greenough WT: Experiential modification of the developing brain. Am Sci 1975; *63:*37-46.

73. Greenough WT: Enduring brain effects of differential experience and training. In: Neural mechanisms of learning and memory Edited by Rosenzweig MR, Bennett EL. pp. 255-278. Cambridge: MIT Press; 1976: 255-278.
74. Greenough WT, Cohen NJ, Juraska JM: New neurons in old brains: learning to survive? Nat. Neurosci. 1999; *2:*203-205.
75. Greenough WT, Volkmar FR: Pattern of dendritic branching in occipital cortex of rats reared in complex environments. Exp. Neurol. 1973; *40:*491-504.
76. Greenough WT, West RW, DeVoogd TJ: Postsynaptic plate perforations: changes with age and experience in the rat. Science 1978; *202:*1096-1098.
77. Gu W, Brannstrom T, Wester P: Cortical neurogenesis in adult rats after reversible photothrombotic stroke. J Cereb Blood Flow Metab 2000; *20:*1166-1173.
78. Hagell P, Crabb L, Pogarell O, Schrag A, Widner H, Brooks DJ, Oertel WH, Quinn NP, Lindvall O: Health-related quality of life following bilateral intrastriatal transplantation in Parkinson's disease. Mov Disord 2000; *15:*224-229.
79. Hastings N, Gould E: Erratum: rapid extension of axons into the CA3 region by adult- generated granule cells. J comp neurol 413:146-154. J Comp Neurol 1999; *415:*144.
80. Hastings NB, Gould E: Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. J Comp Neurol 1999; *413:*146-154.
81. Houser CR: Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. Brain Res. 1990; *535:*195-204.
82. Houser CR, Miyashiro JE, Swartz BE, Walsh GO, Rich JR, Delgado-Escueta AV: Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in human hippocampal epilepsy. J Neurosci 1990; *10:*267-282.
83. Jacobs BL, Fornal CA: Serotonin and motor activity. Curr. Opin. Neurobiol. 1997; *7:*820-825.
84. Jacobs BL, Praag H, Gage FH: Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. Mol Psychiatry 2000; *5:*262-269.
85. Johannsson BB, Ohlson AL: Environment, social interaction, and physical activity as determinants of functional outcome after cerebral infarction in the rat. Exp. Neurol. 1996; *139:*322-327.
86. Johansson BB: Functional outcome in rats transferred to an enriched environment 15 days after focal brain ischemia. Stroke 1996; *27:*324-326.
87. Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J: Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. Cell 1999; *96:*25-34.
88. Jones DG, Smith BJ: The hippocampus and its response to differential environments. Prog Neurobiol 1980; *15:*19-69.
89. Kaplan MS, Bell DH: Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. J Neurosci 1984; *4:*1429-1441.
90. Kaplan MS, Hinds JW: Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. Science 1977; *197:*1092-1094.

91. Kempermann G, Brandon EP, Gage FH: Environmental stimulation of 129/SvJ mice results in increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. Curr. Biol. 1998; *8*:939-942.

92. Kempermann G, Gage FH: Experience-dependent regulation of adult hippocampal neurogenesis: effects of long-term stimulation and stimulus withdrawal. Hippocampus 1999; *9*:321-332.

93. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH: Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997; *94*:10409-10414.

94. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH: More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. Nature 1997; *386*:493-495.

95. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH: Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. J. Neurosci. 1998; *18*:3206-3212.

96. Kondo T, Raff M: Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. Science 2000; *289*:1754-1757.

97. Kondziolka D, Wechsler L, Goldstein S, Meltzer C, Thulborn KR, Gebel J, Jannetta P, DeCesare S, Elder EM, McGrogan M, Reitman MA, Bynum L: Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. Neurology 2000; *55*:565-569.

98. Kordower JH, Emborg ME, Bloch J, Ma SY, Chu Y, Leventhal L, McBride J, Chen EY, Palfi S, Roitberg BZ, Brown WD, Holden JE, Pyzalski R, Taylor MD, Carvey P, Ling Z, Trono D, Hantraye P, Deglon N, Aebischer P: Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. Science 2000; *290*:767-773.

99. Kornack DR, Rakic P: Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the macaque monkey. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999; *96*:5768-5773.

100. Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH: Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. J. Neurosci. 1996; *16*:2027-2033.

101. Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH: Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. J. Neurosci. 1997; *17*:5820-5829.

102. Labrakakis C, Patt S, Hartmann J, Kettenmann H: Functional GABA(A) receptors on human glioma cells. Eur J Neurosci 1998; *10*:231-238.

103. Labrakakis C, Patt S, Hartmann J, Kettenmann H: Glutamate receptor activation can trigger electrical activity in human glioma cells. Eur J Neurosci 1998; *10*:2153-2162.

104. Labrakakis C, Patt S, Weydt P, Cervos-Navarro J, Meyer R, Kettenmann H: Action potential-generating cells in human glioblastomas. J Neuropathol Exp Neurol 1997; *56*:243-254.

105. Lathe R: Mice, gene targeting and behaviour: more than just genetic background. Trends Neurosci 1996; *19*:183-186; discussion 188-189.

106. Lemaire V, Aurousseau C, Le Moal M, Abrous DN: Behavioural trait of reactivity to novelty is related to hippocampal neurogenesis. Eur J Neurosci 1999; *11*:4006-4014.

107. Li Y, Chopp M, Chen J, Wang L, Gautam SC, Xu YX, Zhang Z: Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. J Cereb Blood Flow Metab 2000; *20*:1311-1319.

108. Liljequist R, Henriksson BG, Latif N, Pham T, Winblad B, Mohammed AH: Subchronic MK-801 treatment to juvenile rats attenuates environmental effects on adult spatial learning. Behav. Brain Res. 1993; *56:*107-114.

109. Lipp HP, Wolfer DP: Genetically modified mice and cognition. Curr. Opin. Neurobiol. 1998; *8:*272-280.

110. Lois C, Garcia-Verdugo J-M, Alvarez-Buylla A: Chain migration of neuronal precursors. Science 1996; *271:*978-981.

111. Madsen TM, Treschow A, Bengzon J, Bolwig TG, Lindvall O, Tingstrom A: Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. Biol. Psychiatry 2000; *47:*1043-1049.

112. Magavi S, Leavitt B, Macklis J: Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. Nature 2000; *405:*951-955.

113. Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS: Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. J Neurosci 2000; *20:*9104-9110.

114. Mao X, Barfoot R, Hamoudi RA, Noble M: Alleletyping of an oligodendrocyte-type-2 astrocyte lineage derive from a human glioblastoma multiforme. J Neurooncol 1998; *40:*243-250.

115. Markakis E, Gage FH: Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to the field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. J. Comp. Neurol. 1999; *406:*449-460.

116. Mayford M, Abel T, Kandel ER: Transgenic approaches to cognition. Curr Opin Neurobiol 1995; *5:*141-148.

117. McEwen BS: Gonadal and adrenal steroids regulate neurochemical and structural plasticity of the hippocampus via cellular mechanisms involving NMDA receptors. Cell. Mol. Neurobiol. 1996; *16:*103-116.

118. Meaney MJ, Aitken DH, van Berkel C, Bhatnagar S, Sapolsky RM: Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus. Science 1988; *239:*766-768.

119. Merzenich MM, Nelson RJ, Stryker MP, Cynader MS, Schoppmann A, Zook JM: Somatosensory cortical map changes following digit amputation in adult monkeys. J. Comp. Neurol. 1984; *224:*591-605.

120. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR: Turning Blood into Brain: Cells Bearing Neuronal Antigens Generated in Vivo from Bone Marrow. <EM>Science</EM> 2000; *290:*1779-1782.

121. Mohammed AH, Henriksson BG, Soderstrom S, Ebendal T, Olsson T, Seckl JR: Environmental influences on the central nervous system and their implications for the aging rat. Behav. Brain Res. 1993; *57:*183-191.

122. Mohammed AK, Winblad B, Ebendal T, Lärkfors L: Environmental influence on behavior and nerve growth factor in the brain. Brain Res. 1990; *528:*62-72.

123. Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M: Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. Nature 1986; *319:*774-776.

124. Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J: Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. Nature 1982; *297:*681-683.

125. Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, van der Kooy D: Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. Neuron 1994; *13:*1071-1082.

126. Mullen RJ, Buck CR, Smith AM: NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. Development 1992; *116*:201-211.
127. Nagy Z, Esiri MM, Cato AM, Smith AD: Cell cycle markers in the hippocampus in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol (Berl) 1997; *94*:6-15.
128. Nagy Z, Esiri MM, Smith AD: Expression of cell division markers in the hippocampus in Alzheimer's disease and other neurodegenerative conditions. Acta Neuropathol. (Berl) 1997; *93*:294-300.
129. Neeper SA, Gomez-Pinilla F, Choi J, Cotman C: Exercise and brain neurotrophins [letter]. Nature 1995; *373*:109.
130. Neeper SA, Gomez-Pinilla F, Choi J, Cotman CW: Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. Brain Res. 1996; *726*:49-56.
131. Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW: Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. J. Neurocytol. 1989; *18*:311-318.
132. Owen EH, Logue SF, Rasmussen DL, Wehner JM: Assessment of learning by the Morris water task and fear conditioning in inbred mouse strains and F1 hybrids: implications of genetic background for single gene mutations and quantitative trait loci analyses. Neuroscience 1997; *80*:1087-1099.
133. Pacteau C, Einon D, Sinden J: Early rearing environment and dorsal hippocampal ibotenic acid lesions: long-term influences on spatial learning and alternation in the rat. Behav. Brain Res. 1989; *34*:79-96.
134. Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH: Fibroblast Growth Factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from divers regions of the adult CNS. J. Neurosci. 1999; *19*:8487-8497.
135. Palmer TD, Ray J, Gage FH: FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. Mol Cell Neurosci 1995; *6*:474-486.
136. Palmer TD, Takahashi J, Gage FH: The adult rat hippocampus contains premordial neural stem cells. Mol. Cell. Neurosci. 1997; *8*:389-404.
137. Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH: Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. J Comp Neurol 2000; *425*:479-494.
138. Parent JM, Tada E, Fike JR, Lowenstein DH: Inhibition of dentate granule cell neurogenesis with brain irradation does not prevent seizure-induced mossy fiber synaptic reorganization in the rat. J. Neurosci. 1999; *19*:4508-4519.
139. Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH: Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. J. Neurosci. 1997; *17*:3727-3738.
140. Park GA, Pappas BA, Murtha SM, Ally A: Enriched environment primes forebrain choline acetyltransferase activity to respond to learning experience. Neurosci Lett 1992; *143*:259-262.
141. Patel SN, Clayton NS, Krebs JR: Spatial learning induces neurogenesis in the avian brain. Behav Brain Res 1997; *89*:115-128.
142. Raff MC, Miller RH, Noble M: A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. Nature 1983; *303*:390-396.

143. Raina AK, Zhu X, Rottkamp CA, Monteiro M, Takeda A, Smith MA: Cyclin' toward dementia: cell cycle abnormalities and abortive oncogenesis in Alzheimer disease. J Neurosci Res 2000; *61*:128-133.
144. Rakic P: Limits of Neurogenesis in Primates. Science 1985; *227*:1054-1056.
145. Rasmuson S, Olsson T, Henriksson BG, Kelly PA, Holmes MC, Seckl JR, Mohammed AH: Environmental enrichment selectively increases 5-HT1A receptor mRNA expression and binding in the rat hippocampus. Brain Res. Mol. Brain Res. 1998; *53*:285-290.
146. Ray J, Peterson DA, Schinstine M, Gage FH: Proliferation, differentiation, and long-term culture of primary hippocampal neurons. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; *90*:3602-3606.
147. Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S: A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. J Neurosci 1992; *12*:4565-4574.
148. Reynolds BA, Weiss S: Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. Dev. Biol. 1996; *175*:1-13.
149. Richards LJ, Kilpatrick TJ, Bartlett PF: De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; *89*:8591-8595.
150. Rosenzweig MR: Environmental complexity, cerebral change, and behavior. Am. Psychol. 1966; *21*:321-332.
151. Rosenzweig MR: Responsiveness of brain size to individual experience: behavioral and evolutionary implications. In: Development and evolution of brain size: behavioral implications Edited by Hahn ME, Jensen C, Dudek BC. pp. 263-294. New York: Academic Press; 1979: 263-294.
152. Rosenzweig MR, Bennett EL: Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. Behav. Brain Res. 1996; *78*:57-65.
153. Rosenzweig MR, Bennett EL, Hebert M, Morimoto H: Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. Brain Res. 1978; *153*:563-576.
154. Rosenzweig MR, Krech D, Bennett EL, Diamond MC: Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy. J. Comp. Physiol. Psychol. 1962; *55*:429-437.
155. Roy NS, Wang S, Jiang L, Kang J, Benraiss A, Harrison-Restelli C, Fraser RA, Couldwell WT, Kawaguchi A, Okano H, Nedergaard M, Goldman SA: In vitro neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. Nat Med 2000; *6*:271-277.
156. Saito S, Kobayashi S, Ohashi Y, Igarashi M, Komiya Y, Ando S: Decreased synaptic density in aged brains and its prevention by rearing under enriched environment as revealed by synaptophysin contents. J Neurosci Res 1994; *39*:57-62.
157. Seki T, Arai Y: The persistent expression of a highly polysialylated NCAM in the dentate gyrus of the adult rat. Neurosci. Res. 1991; *12*:503-513.
158. Seki T, Arai Y: Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system. Neurosci. Res. 1993; *17*:265-290.
159. Seki T, Arai Y: Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat. J. Neurosci. 1993; *13*:2351-2358.

160. Sheline YI: 3D MRI studies of neuroanatomic changes in unipolar major depression: the role of stress and medical comorbidity [In Process Citation]. Biol Psychiatry 2000; *48:*791-800.
161. Sheline YI, Wang PW, Gado MH, Csernansky JG, Vannier MW: Hippocampal atrophy in recurrent major depression. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; *93:*3908-3913.
162. Shepherd GM: Neurobiology. New York: Oxford University Press; 1994.
163. Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, Gage FH: Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. J Neurosci 2000; *20:*8727-8735.
164. Shihabuddin LS, Ray J, Gage FH: FGF-2 is sufficient to isolate progenitors found in the adult mammalian spinal cord. Exp. Neurol. 1997; *148:*577-586.
165. Shihabuddin LS, Ray J, Gage FH: Stem cell technology for basic science and clinical application. Arch. Neurol. 1999; *56:*29-32.
166. Silver LM: Mouse genetics. New York: Oxford University Press; 1995.
167. Simpson EM, Linder CC, Sargent EE, Davisson MT, Mobraaten LE, Sharp JJ: Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice. Nature Gen. 1997; *16:*19-27.
168. Soriano E, Del Rio JA: Simultaneous immunocytochemical visualization of bromodeoxyuridine and neural tissue antigens. J Histochem Cytochem 1991; *39:*255-263.
169. Stanfield BB, Trice JE: Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. Exp. Brain Res. 1988; *72:*399-406.
170. Staubli U, Xu FB: Effects of 5-HT3 receptor antagonism on hippocampal theta rhythm, memory and LTP induction in the freely moving rat. J. Neurosci. 1995; *15:*2445-2452.
171. Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, Gage FH: Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. Nature 1996; *383:*624-627.
172. Takahashi M, Palmer TD, Takahashi J, Gage FH: Widespread integration and survival of adult-derived neural progenitor cells in the developing optic retina. Mol. Cell. Neurosci. 1998; *12:*340-348.
173. Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness VS, Jr.: BUdR as an S-phase marker for quantitative studies of cytokinetic behaviour in the murine cerebral ventricular zone. J Neurocytol 1992; *21:*185-197.
174. Tao Y, Black IB, DiCicco-Bloom E: Neurogenesis in neonatal rat brain is regulated by peripheral injection of basic fibroblast growth factor (bFGF). J. Comp. Neurol. 1996; *376:*653-663.
175. Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, van der Kooy D: Retinal stem cells in the adult mammalian eye. Science 2000; *287:*2032-2036.
176. Valentinuzzi VS, Scarbrough K, Takahashi JS, Turek FW: Effects of agin on the circadian rhythm of wheel-running activity in C57BL/6 mice. Am. J. Physiol. 1997; *273:*1957-1964.
177. Van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH: Running enhances neurogenesis, learning and long-term potentiation in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1999; *96:*13427-13431.

178. Van Praag H, Kempermann G, Gage FH: Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. Nat. Neurosci. 1999; *2:*266-270.
179. Wainwright PE, Levesque S, Krempulec L, Bulman-Fleming B, McCutcheon D: Effects of environmental enrichment on cortical depth and Morris-maze performance in B6D2F2 mice exposed prenatally to ethanol. Neurotoxicol. Teratol. 1993; *15:*11-20.
180. Walsh C, Cepko CL: Widespread dispersion of neuronal clones across functional regions of the cerebral cortex. Science 1992; *255:*434-440.
181. Walsh RN, Budtz-Olsen OE, Penny JE, Cummins RA: The effects of environmental complexity on the histology of the rat hippocampus. J. Comp. Neurol. 1969; *137:*361-366.
182. Wang S, Scott BW, Wojtowicz JM: Heterogenous properties of dentate granule neurons in the adult rat. J Neurobiol 2000; *42:*248-257.
183. West MJ, Andersen AH: An allometric study of the area dentata in the rat and mouse. Brain Res Rev 1980; *2:*317-348.
184. West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC: Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. Lancet 1994; *344:*769-772.
185. Williams RW, Strom RC, Rice DS, Goldowitz D: Genetic and environmental control of variation in retinal ganglion cell number in mice. J Neurosci 1996; *16:*7193-7205.
186. Wimer C, Wimer RE, Wimer JS: An association between granule cell density in the dentate gyrus and two-way avoidance conditioning in the house mouse. Behav. Neurosci. 1983; 97:844-856.
187. Wimer CC, Wimer RE: On the sources of strain and sex differences in granule cell number in the dentate area of house mice. Brain Res Dev Brain Res 1989; *48:*167-176.
188. Wimer RE, Wimer CC, Alameddine L: On the development of strain and sex differences in granule cell number in the area dentata of house mice. Brain Res 1988; *470:*191-197.
189. Wimer RE, Wimer CC, Vaughn JE, Barber RP, Balvanz BA, Chernow CR: The genetic organization of neuron number in the granule cell layer of the area dentata in house mice. Brain Res 1978; *157:*105-122.
190. Wolfer DP, Muller U, Stagliar M, Lipp HP: Assessing the effects of the 129/Sv genetic background on swimming navigation learning in transgenic mutants: a study using mice with a modified beta-amyloid precursor protein gene. Brain Res 1997; *771:*1-13.
191. Wood GE, Shors TJ: Stress facilitates classical conditioning in males, but impairs classical conditioning in females through activational effects of ovarian hormones. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; *95:*4066-4071.
192. Wu Q, Combs C, Cannady SB, Geldmacher DS, Herrup K: Beta-amyloid activated microglia induce cell cycling and cell death in cultured cortical neurons. Neurobiol Aging 2000; *21:*797-806.
193. Young D, Lawlor PA, Leone P, Dragunow M, During MJ: Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. Nat. Med. 1999; *5:*448-453.

5.4 Eidesstattliche Erklärung gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren anhängig sind,
- Weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- dem Bewerber die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 23. April 2001

Dr. Gerd Kempermann