

Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Peter Falkai

**Molekulare Mechanismen der Schizophrenie:  
Adulte Neurogenese, Apoptose und Alterationen der hippokampalen  
Ultrastruktur in einem auf NMDA-Rezeptorantagonismus  
basierenden Tiermodell der Schizophrenie**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Nadine Reuter

aus  
Gütersloh

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dan Rujescu

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Edgar Meinel

Priv. Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. Manfred Uhr

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Just Genius

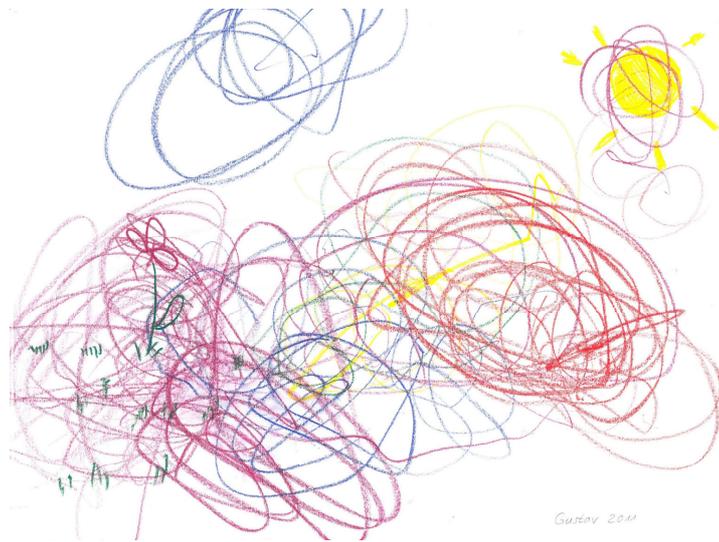
Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 26.07.2012





*meinen Kindern Luisa & Gustav*





# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Schizophrenie</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Pathogenese der Schizophrenie</b>	<b>1</b>
1.2.1	Biologische vs. psychosoziale Genese	1
1.2.2	Schizophrenie als Konsequenz einer abnormen neuronalen Entwicklung oder als neurodegenerative Erkrankung?	2
<b>1.3</b>	<b>Die hippocampale Formation</b>	<b>4</b>
<b>1.4</b>	<b>Glutamaterges System</b>	<b>5</b>
<b>1.5</b>	<b>Gliale Zellpopulationen und ihre Interaktionen mit dem glutamatergen System und mit adulten Neurogenese</b>	<b>8</b>
<b>1.6</b>	<b>Neurobiologische Grundlagen der Schizophrenie</b>	<b>9</b>
1.6.1	Dopaminhypothese der Schizophrenie	9
1.6.2	Glutamathypothese der Schizophrenie	10
1.6.2.1	Pharmakologische Evidenzen durch NMDA-Rezeptorantagonisten	10
1.6.2.2	biochemische Befunde (Liquor)	12
1.6.2.3	genetische Befunde	13
<b>1.7</b>	<b>Neuropathologie der Schizophrenie</b>	<b>14</b>
1.7.1	<i>Post mortem</i> Studien	14
1.7.1.1	Neuronale Veränderungen	14
1.7.1.2	Synaptische Veränderungen	14
1.7.1.3	Gliale Veränderungen	15
1.7.2	MRT-Studien	15
1.7.2.1	Querschnittsstudien	15
1.7.2.2	Longitudinale Studien	15
<b>1.8</b>	<b>Adulte Neurogenese</b>	<b>16</b>
1.8.1	Geschichte	16
1.8.2	Mechanismen und Detektion der Neurogenese	17
1.8.3	BDNF (brain derived neurotrophic factor)	20
<b>1.9</b>	<b>Apoptose</b>	<b>20</b>
1.9.1	Apoptose allgemein	20
1.9.2	Synaptische Apoptose	24

<b>1.10</b>	<b>Apoptotische Mechanismen als Grundlage der Schizophrenie.....</b>	<b>24</b>
1.10.1	Reduktion der Neuronenzahl ohne reaktive Gliose in <i>post mortem</i> Studien.....	25
1.10.2	Apoptotische Regulatorproteine in <i>post mortem</i> Studien.....	25
1.10.3	Caspase-3-Expression in <i>post mortem</i> Studien.....	26
<b>1.11</b>	<b>Tiermodell der Schizophrenie .....</b>	<b>27</b>
<b>2</b>	<b><i>Fragestellung</i>.....</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b><i>Material und Methoden</i>.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....</b>	<b>31</b>
<b>3.2</b>	<b>Applikationsschema .....</b>	<b>31</b>
<b>3.3</b>	<b>Verhaltenstests.....</b>	<b>32</b>
3.3.1	Y-Maze-Tests.....	32
3.3.1.1	Spontan alternierendes Verhalten im Y-Maze .....	33
3.3.1.2	Zweizeitiger Y-Maze Test.....	33
3.3.2	Tail Suspension Test.....	34
<b>3.4</b>	<b>Gewebeaufbereitung .....</b>	<b>34</b>
3.4.1	RNA-Extraktion und Genchip-Array .....	34
3.4.2	Gefrierdünnschnitte.....	35
<b>3.5</b>	<b>Immunhistologie.....</b>	<b>36</b>
3.5.1	Immunfluoreszenzhistologie (PCNA, GFAP, NeuN, Caspase 3).....	36
3.5.1.1	Primäre Detektion.....	36
3.5.1.2	Sekundäre Detektion .....	37
3.5.2	Immunhistochemie (BDNF).....	39
3.5.2.1	Primäre Detektion.....	40
3.5.2.2	Sekundäre Detektion .....	40
<b>3.6</b>	<b>Bildanalyse.....</b>	<b>41</b>
3.6.1	Digitalisierung der Zielregionen .....	41
3.6.2	Auswertung der Färbungen .....	42
<b>3.7</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>43</b>
<b>4</b>	<b><i>Ergebnisse</i>.....</b>	<b>44</b>
<b>4.1</b>	<b>Immunhistologie.....</b>	<b>44</b>
4.1.1	Vermehrte Anzahl PCNA-positiver Zellen in der subgranulären Zone des Hippocampus der mit MK-801 behandelten Tiere .....	44

4.1.2	Verminderte Dichte GFAP-positiver Zellen in der subgranulären Zone der mit MK-801- und Haloperidol-Koapplikation behandelten Tiere .....	46
4.1.3	Behandlungseffekte auf die neuronale Zellzahl (NeuN) und die Gesamtzellzahl in der polymorphen Schicht des Hippocampus .....	49
4.1.4	Keine Alterationen der BDNF-Expression innerhalb der untersuchten hippocampalen Strukturen zwischen den Behandlungsgruppen.....	52
4.1.5	Keine signifikanten Veränderungen der Apoptoserate zwischen den Gruppen .....	57
<b>4.2</b>	<b>Microarray.....</b>	<b>61</b>
4.2.1	Behandlungseffekte auf die relative mRNA-Expression apoptoseassoziiierter Gene im Hippocampus.....	61
4.2.2	Behandlungseffekte auf die relative mRNA-Menge von proliferationsassoziierten Genen im Hippocampus .....	64
4.2.3	Behandlungseffekte auf die relative mRNA-Expression glialer Marker im Hippocampus	66
4.2.4	Erhöhte Menge an mRNA-Transkripten von neuroprotektiven Proteinen in der Gruppe der MK-801- und Haloperidol-Koapplikation.....	68
<b>4.3</b>	<b>Verhaltenstests.....</b>	<b>69</b>
4.3.1	Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen .....	69
4.3.2	Korrelation zwischen hippocampalen ultrastrukturellen Veränderungen (Immunhistologie) und Verhaltenstests .....	71
4.3.2.1	Korrelation zwischen proliferationsassoziierten Markern und Verhalten.....	71
4.3.2.2	Korrelation zwischen neuronaler Zelldichte und –größe in der polymorphen Zellschicht des Gyrus dentatus und Gedächtnisscore/ Verhalten.....	72
4.3.2.3	Korrelation zwischen glialer Dichte im Hippocampus und Verhalten.....	72
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>74</b>
<b>5.1</b>	<b>Diskussion der Methode.....</b>	<b>74</b>
5.1.1	Der tierexperimentelle Ansatz .....	74
5.1.2	Tiermodell der Schizophrenie auf Grundlage eines NMDA-Rezeptorantagonismus.....	74
5.1.3	Prinzip der neuronalen (pyramidalen) Disinhibition.....	75
5.1.4	Die immunhistologische Färbung .....	76
5.1.5	Interpretation von immunhistologischen Färbungen.....	77
5.1.6	Verhaltenstests.....	79
5.1.7	Genexpressionsanalyse.....	80
<b>5.2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse.....</b>	<b>81</b>
5.2.1	Änderungen der hippocampalen Neuronen- und Gesamtzellzahl (Immunhistologie) in der vorliegenden Arbeit und in der Literatur .....	81

5.2.2	Gliale Alterationen in der subgranulären Schicht und differenzielle Expression glialer Gene im Gesamthippocampus nach MK-801- und Haloperidol-Koapplikation .....	83
5.2.3	Hinweise für einen neurotoxischen Effekt von Haloperidol bei glutamaterger Dysfunktion durch NMDA-Rezeptor-Blockade.....	85
5.2.4	Mögliche zugrundeliegende Mechanismen der neuronalen und glialen Veränderungen in der Gruppe der MK- und Haloperidol-Koapplikation .....	86
5.2.5	hippokampale BDNF-Expression (Immunhistologie und Microarray) in diesem Versuch und in der Literatur.....	88
5.2.6	Neurodegenerative Veränderungen und programmierter Zelltod in der vorliegenden Arbeit und in der Literatur (Immunhistologie und Microarray) .....	91
5.2.7	Veränderungen der adulten Neurogenese nach chronischem NMDA-Rezeptorantagonismus in diesem Versuch (Immunhistologie und Microarray) und in der Literatur .....	93
5.2.8	Hinweise für eine gesteigerte hippocampale Neurogenese mit proapoptotischer Stoffwechsellage ohne erhöhte Apoptoserate in der MK-801-Gruppe in dieser Arbeit .....	94
5.2.9	Hypothese eines gestörten Gleichgewichts zwischen hippocampaler Neurogenese und Selektion der neugebildeten Neurone als Grundlage limbischer Funktionseinschränkungen nach NMDA-Rezeptorantagonismus .....	97
5.2.10	Änderung des Verhaltens und der Gedächtnisleistung.....	99
<b>6</b>	<b><i>Schlussfolgerung</i></b> .....	<b>103</b>
<b>7</b>	<b><i>Zusammenfassung</i></b> .....	<b>105</b>
<b>8</b>	<b><i>Abkürzungsverzeichnis</i></b> .....	<b>107</b>
<b>9</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i></b> .....	<b>109</b>
<b>10</b>	<b><i>Danksagung</i></b> .....	<b>134</b>

# **1 Einleitung**

## **1.1 Schizophrenie**

Die Schizophrenie ist eine schwere, zumeist chronisch verlaufende Erkrankung, die betroffene Patienten oft sehr stark in ihrer Lebensqualität einschränkt. Die Lebenszeitprävalenz dieser Erkrankung beträgt weltweit 0,5 bis 1,6% [Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie, 2005]. Neben dem empfindlichen Eingreifen in das Leben der Patienten und ihrer Familien verursacht die Schizophrenie der Gesellschaft auch hohe Kosten durch Produktivitätsverlust und therapiebezogene Ausgaben. Nach Einschätzung der WHO dürfte die Schizophrenie die „teuerste“ psychiatrische Erkrankung darstellen. So entsprechen etwa die Kosten für das Gesundheits- und Sozialsystem denen somatischer Volkskrankheiten wie Diabetes mellitus [Kompetenznetz Schizophrenie, 2009]. Die klinischen Symptome der Erkrankung sind vielfältig und variieren in ihrer Ausprägung von Patient zu Patient. Es kann dabei zu vielgestaltigen psychiatrischen Querschnittsbildern mit Wahn, Halluzinationen, formalen Denkstörungen, Ich-Störungen, Affektstörungen und psychomotorischen Störungen kommen [Möller and Deistler, 2002]. Prognostisch ungünstige Faktoren für den Verlauf sind unter anderem männliches Geschlecht, Erstmanifestation in jungem Alter, längeres prodromales Syndrom, schleichender Beginn, Beginn mit Negativsymptomatik und akustische Halluzinationen. Die Bedeutung dieses Krankheitsbildes sowohl für den Patienten als auch für die Gesellschaft lässt sich unter anderem daran ablesen, dass 5- 10 % der an Schizophrenie Erkrankten Suizid begehen und dass die Lebenserwartung der Patienten in den industrialisierten Nationen um 20 bis 25 Jahre reduziert ist [Kilbourne et al., 2009; Palmer et al., 2005; Phillips et al., 2004].

## **1.2 Pathogenese der Schizophrenie**

### **1.2.1 Biologische vs. psychosoziale Genese**

Dass der Erkrankung auch genetische Faktoren zugrunde liegen, konnte bereits in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts in Zwillingsstudien belegt werden [Gottesman and Shields, 1966; McGuffin et al., 1987]. Das Risiko zu erkranken korreliert hierbei mit dem Verwandtschaftsgrad, also der Anzahl gemeinsamer Gene. Im Gegensatz zur ca. einprozentigen Lebenszeitprävalenz in der Allgemeinbevölkerung beträgt das Risiko, an Schizophrenie zu erkranken, bei drittgradigen Verwandten 2% und bei einem zweitgradigen Verwandtschaftsverhältnis 2-6%. Bei Verwandten ersten Grades, d.h. etwa Geschwistern eines Betroffenen, steigt die Lebenszeitprävalenz bereits auf 6 -17% an [Gottesman, 1991]. Bei dizygoten Zwillingen beträgt

## Einleitung

die Lebenszeitprävalenz 17% und bei monozygoten Zwillingen fast 50% [Gottesman, 1991]. Dagegen zeigte sich in Adoptionsstudien, dass das Risiko an Schizophrenie zu erkranken allein mit dem Vorkommen der Erkrankung in der biologischen Abstammungslinie korreliert, nicht aber mit dem Auftreten der Erkrankung bei den Adoptiveltern [Rice et al., 1982].

Somit gilt eine genetische Mitursache der Schizophrenie als gesichert. Da die Konkordanzrate bei eineiigen Zwillingen jedoch bei deutlich unter hundert Prozent liegt, muss davon ausgegangen werden, dass zur tatsächlichen Ausprägung der Erkrankung noch weitere Faktoren eine Rolle spielen. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass in der Vorgeschichte schizophrener Patienten prä- und perinatale Schädigungen gehäuft vorkommen [Brown et al., 2001; Brown, 2006; O'Callaghan et al., 1991]. Im Einzelnen wird ein Zusammenhang für maternale Infektionen während der Schwangerschaft, sowie durch prä- oder perinatale Komplikationen entstandener Hypoxie mit der Manifestation einer Schizophrenie in der Adoleszenz genannt. Dies scheint jedoch nur für eine kleine Untergruppe der an Schizophrenie Erkrankten zuzutreffen. Bei der großen Mehrzahl der schizophrenen Patienten ist die Vorgeschichte bezüglich prä- oder perinataler Komplikationen leer. Dass sich jedoch im Gegensatz zu nicht erkrankten Menschen bei schizophrenen Menschen gehäuft derartige Komplikationen finden lassen, wird als Hinweis dafür gesehen, dass eine Störung in der Entwicklung des Zentralnervensystems einen möglichen Risikofaktor für die Entwicklung einer Schizophrenie darstellt.

Als Arbeitshypothese für die Pathogenese der Schizophrenie hat sich bislang am ehesten das Vulnerabilitäts-Stress-Modell von Zubin durchgesetzt [Zubin and Spring, 1977]. Hierbei geht man davon aus, dass eine Person durch persönliche, z.B. biologische und psychische Charakteristika, und soziale Voraussetzungen mehr oder weniger anfällig (vulnerabel) für den Ausbruch einer Schizophrenie ist. Durch hinzukommende Umweltfaktoren, sei es psychosozialer Stress oder seien es etwa eine intermittierende Infektionserkrankung oder sonstige widrige Rahmenbedingungen, kann es dann zur Krankheitsmanifestation kommen.

### 1.2.2 Schizophrenie als Konsequenz einer abnormen neuronalen Entwicklung oder als neurodegenerative Erkrankung?

Die Diskussion, ob die Pathogenese der Schizophrenie auf neurodegenerativen Mechanismen beruht oder Folge einer Störung der embryofetalen Entwicklung ist, konnte noch nicht mit letzter Sicherheit zugunsten einer der alternativen Hypothesen beigelegt werden. Derzeit wird davon ausgegangen, dass der Erkrankung am ehesten Teilaspekte beider Theorien zugrunde liegen. Schon der Erstbeschreiber der Schizophrenie Emil Kraepelin, der 1919 den Terminus „Dementia praecox“ für die Erkrankung prägte, betonte den progressiven Verlauf der Krank-

## Einleitung

heit. Seit der ersten Beschreibung der Schizophrenie sind verschiedene Modelle der Pathogenese entstanden. Im Vergleich zu klassischen progressiven, neurodegenerativen Erkrankungen fehlen im Verlauf einer Schizophrenie jedoch die bei jenen regelmäßig gefundenen Veränderungen im Sinne einer Gliose. Außerdem standen in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts noch keine bildgebenden Verfahren zur Verfügung, die einen progressiven Verlauf *in vivo* hätten zeigen können. Es lagen lediglich *post mortem* Befunde vor, die hinsichtlich einer reaktiven Gliose und auch der neuronalen Zellzahl keine übereinstimmenden Ergebnisse lieferten.

Es wurde letztlich eine weitere, scheinbar entgegengesetzte Hypothese aufgestellt, nämlich dass eine Schädigung während der embryofetalen Entwicklung ursächlich sei für die dann mit einer Latenz von zwei bis drei Jahrzehnten auftretende Schizophrenie. Die genaue Art dieser Schädigung bei dieser Hypothese ist nicht endgültig geklärt. Es zeigten sich Assoziationen verschiedener möglicher Faktoren mit dem Auftreten einer Schizophrenie im Erwachsenenalter. Unter anderem waren maternale Infektionen während der Schwangerschaft [Brown et al., 2001; Brown, 2006; Buka et al., 2008; O'Callaghan et al., 1991], prä- und perinatale Hypoxie [Cannon et al., 2008; Dalman et al., 1999; Geddes et al., 1999; Zornberg et al., 2000], entwicklungsbiologische Besonderheiten wie zum Beispiel eine Gaumenspalte [Gourion et al., 2004] oder leichte neurokognitive Defizite während der Kindheit [Keshavan et al., 2005] positiv mit der Entwicklung einer Schizophrenie vergesellschaftet. Jedoch ist das Auftreten derlei unspezifischer Merkmale auch bei Gesunden, oder bei anderen psychiatrischen Erkrankungen sehr hoch und hat daher keinen prädiktiven Wert.

Neuen Aufwind für die These einer neurodegenerativen Störung gab es nun jedoch durch die Einführung bildgebender Verfahren. In mehreren longitudinalen MRT-Studien konnte eine progressive Erweiterung der Liquorräume sowie ein Volumenverlust des Hirnparenchyms – sowohl global als auch in umschriebenen Hirnregionen- nach Erstmanifestation der Erkrankung gezeigt werden [Hulshoff Pol and Kahn, 2008]. Eine reaktive Gliose wie bei den klassischen neurodegenerativen Erkrankungen konnte dabei nicht gezeigt werden [Arnold et al., 1996; Casanova et al., 1990; Roberts et al., 1986; Stevens et al., 1988]. Somit vereint die Schizophrenie einige Charakteristika, die im Einklang mit einer neurodegenerativen Entstehungstheorie stehen, mit Eigenschaften einer embryofetalen Entwicklungsstörung ohne sich jedoch klassisch in eine dieser Theorien einfügen zu können.

Als mögliches anatomisches Substrat der Schizophrenie liegt das Hauptaugenmerk aus mehreren Gründen auf der hippocampalen Formation. Zum einen konnten wiederholt in bildgebenden longitudinalen Studien sowie in *post mortem* Studien Volumenverluste bzw. eine selektive Abnahme von Zellpopulationen in dieser Hirnregion gezeigt werden [Lawrie et al., 2008]

## Einleitung

[Zhang et al., 2002]. Zum anderen rückt die hippocampale Formation fast zwangsläufig ins Zentrum des Interesses, wenn man den Ansatz über die klinische Symptomatik der Schizophrenie wählt. Vergleicht man diese mit den bekannten funktionellen Strukturen des zentralen Nervensystems, fällt auf, dass die hippocampale Formation als morphologisches Substrat gleich mehrerer Funktionen gilt, die im Rahmen einer Schizophrenie beeinträchtigt sein können. Hierzu zählen zum Beispiel die Funktionen des Hippocampus als Reizfilter und als Arbeitsgedächtnis.

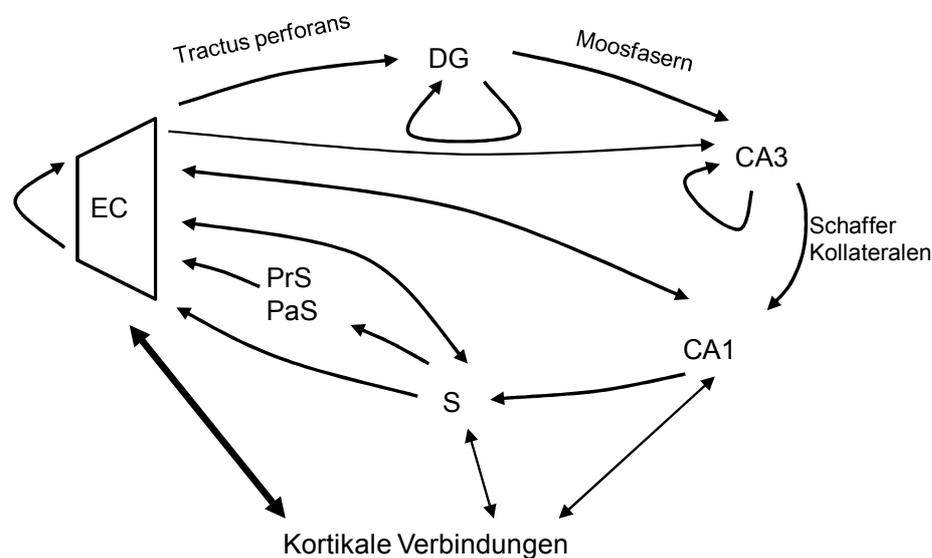
### **1.3 Die hippocampale Formation**

Die hippocampale Formation und der parahippokampale Kortex gehören anatomisch zum Schläfenlappen des Gehirns und sind elementare Bestandteile des limbischen Systems. Funktionell kommt dem Hippocampus eine herausragende Rolle bei Gedächtniskonsolidierung zu, das heißt bei der Überführung von Gedächtnisinhalten aus dem Kurz- in das Langzeitgedächtnis sowie bei der räumlichen Orientierung [Morris, 2006; O'Keefe and Black, 1977; Squire, 1992]. Die Bedeutung des Hippocampus bei der Abspeicherung von Informationen in das Langzeitgedächtnis wurde 1957 erkannt. Scoville und Milner beschrieben den Patienten H.M., der sich zur Behandlung einer schweren Temporallappenepilepsie einer beidseitigen medialen Temporallappenresektion unterzog. Im Anschluss an die Operation litt er lebenslang unter einer ausgeprägten Störung des Langzeitgedächtnisses in Form einer anterograden Amnesie. Vom Zeitpunkt der Operation an war es ihm nicht mehr möglich, neue Informationen im Langzeitgedächtnis zu speichern. Einzelheiten aus der Zeit vor der Operation waren ihm hingegen noch erinnerlich [Scoville and Milner, 1957]. Als weitere Besonderheit des Hippocampus ist zu erwähnen, dass hier sowie auch in der periventriculären Zone, auch im Erwachsenenalter noch neue Neurone heranreifen (adulte Neurogenese) [Ehninger and Kempermann, 2008; Kempermann and Gage, 1998]. Die Bedeutung des Hippocampus in der Schizophrenieforschung wird dadurch unterstrichen, dass Volumenveränderungen im medialen Temporallappen einer der häufigsten Befunde in *post mortem* Studien oder bildgebenden Untersuchungen an schizophrenen Patienten sind [Bogerts, 1997].

Der Begriff „hippokampale Formation“ umfasst sechs zytoarchitektonisch unterschiedliche Regionen: den Gyrus dentatus; das Ammonshorn (Cornu ammonis), welches dem Hippocampus im engeren Sinne entspricht und sich in 3 Areale unterteilen lässt: CA3, CA2 und CA1; Subiculum; Präsubiculum; Parasubiculum und den entorhinalen Kortex [Amaral and Witter M.P., 1995]. Der Hauptgrund warum diese oben genannten Einheiten zur hippocampalen Formation zusammengefasst werden ist, dass sie im Gegensatz zu den übrigen neuronalen Netz-

## Einleitung

werden in für das Hirn sonst einzigartiger Weise weitestgehend *unidirektional* miteinander verbunden sind. Die Hauptafferenzen enthält die hippocampale Formation aus dem entorhinalen Kortex, dieser entsendet über den Tractus perforans die wichtigsten Afferenzen an den Gyrus dentatus. Diese Projektionen sind nicht reziprok, keine Zelle des Gyrus dentatus projiziert in den entorhinalen Kortex zurück. Die Granularzellen projizieren stattdessen unidirektional über die Moosfasern in die CA3-Zone des Hippocampus. Wenige CA3-Zellen entsenden Axonkollateralen in die polymorphe Zellschicht, jedoch keine zurück an die Granularzellen. Die intrahippokampalen Hauptafferenzen der CA3-Zellen gehen über die Schaffer-Kollateralen an die CA1-Schicht. Aus der CA1-Schicht entspringen nun hippocampale Efferenzen in kortikale Areale [Amaral and Witter M.P., 1995] (s. Abbildung 1.1).



**Abbildung 1.1:** Hauptverbindungen innerhalb der hippocampalen Formation der Ratte; charakteristisch für den hippocampalen Erregungskreis sind die weitestgehend unidirektionalen Verbindungen (z.B. Tractus perforans, Moosfasern, Schaffer Kollateralen) EC = Entorhinaler Kortex, DG = Gyrus dentatus, PrS = Presubiculum, PaS = Parasubiculum, S = Subiculum (nach Amaral und Witter, *Hippocampal Formation, The Rat Nervous System*, 1999)

## 1.4 Glutamaterges System

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im Gehirn von Wirbeltieren und ist bei ca. 40 Prozent aller Synapsen an der Signaltransmission beteiligt. Auch innerhalb der hippocampalen Formation, der eine herausragende Rolle bei der Pathogenese der Schizophrenie zugeschrieben wird (s. Kapitel 1.7), stellt die Aminosäure Glutamat den wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter dar [Mattson, 2008]. Glutamat wirkt außerdem auf die Synaptogenese, das Dendritenwachstum sowie die postsynaptische Bildung von neurotrophen Faktoren

## Einleitung

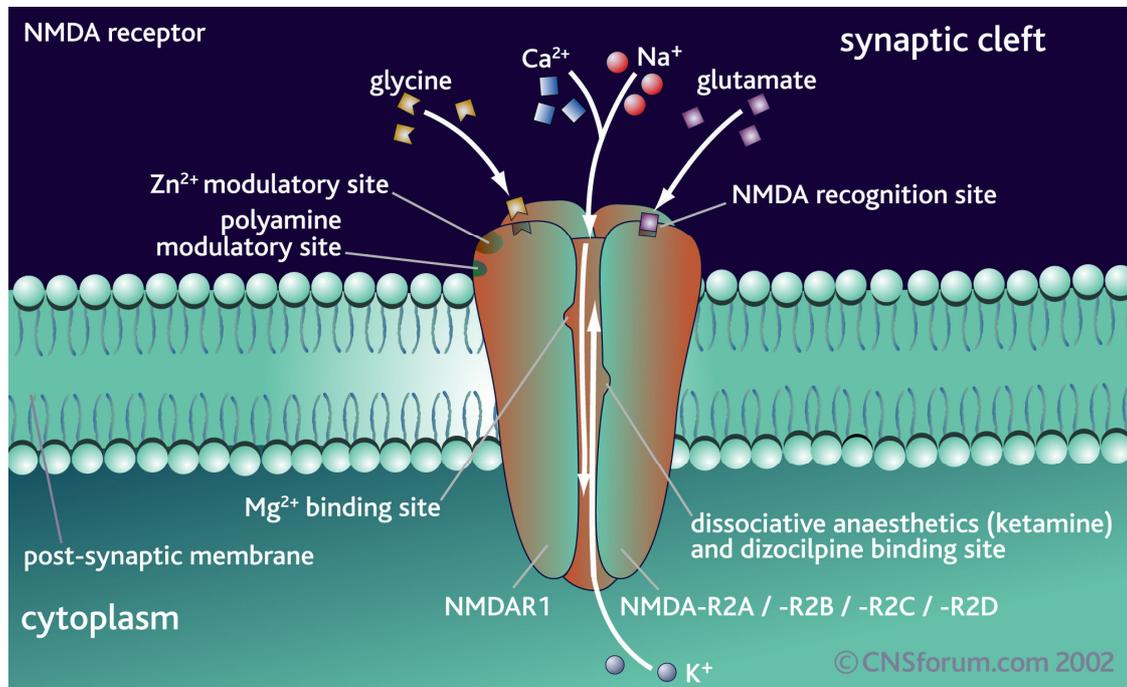
[Mattson, 2008]. Durch Mechanismen wie Langzeit-Potenzierung oder Langzeit-Depression ist Glutamat zudem an der Überführung von Gedächtnisinhalten aus dem Kurz- in das Langzeitgedächtnis (Gedächtniskonsolidierung) beteiligt [Konradi and Heckers, 2003].

Glutamat wirkt über zwei verschiedene Rezeptorklassen: die ionotropen und die metabotropen Glutamatrezeptoren. Die metabotropen Rezeptoren wirken über Guaninnukleotid bindendes Protein (G-Protein) gekoppelte second messenger Systeme, etwa das Adenylatzyklase/ zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) oder das Phospholipase-System. Die ionotropen Glutamatrezeptoren sind nach ihren spezifischen Liganden in  $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazol-4-Propionat (AMPA)-, N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)- und Kainatrezeptoren benannt. Sie bestehen aus vier Untereinheiten, die eine funktionale Rezeptoreinheit mit Ionenkanal bilden. Eine Besonderheit des NMDA-Rezeptors gegenüber den anderen beiden ionotropen Glutamatrezeptoren ist, dass der Ionenkanal des NMDA-Rezeptors bei Ruhemembranpotential (-70 bis -50mV) von  $Mg^{++}$  blockiert ist. Erst bei leichter Depolarisierung der Membran verlässt  $Mg^{++}$  den Kanal, so dass ein Agonist ihn öffnen kann. Damit der Ionenkanal des NMDA-Rezeptors öffnet, muss also präsynaptisch Glutamat freigesetzt worden sein und postsynaptisch eine Depolarisation vorliegen. Dies ist der Fall, wenn das postsynaptische Neuron bereits kurz zuvor auf anderem Wege depolarisiert wurde oder bei hochfrequenter tetanischer Stimulation, d.h. wenn die Synapse insgesamt häufiger „benutzt“ wird.

Die NMDA-Rezeptoren tragen aufgrund dieser Eigenschaft über den Mechanismus der Langzeitpotenzierung und -depression einen wesentlichen Teil zur synaptischen Plastizität bei [Konradi and Heckers, 2003]. Die Langzeitpotenzierung führt zur Erhöhung der Übertragungsstärke häufig benutzter Synapsen und bildet zusammen mit der Langzeitdepression, die analog hierzu zu einer Abschwächung von Synapsen mit wenig stabilen Verbindungen führt, die Grundlage für synaptische Plastizität [Bliss and Lomo, 1973; Citri and Malenka, 2008]. Es ist außerdem bekannt, dass der NMDA-Rezeptor eine Glycin-Bindungsstelle besitzt. Glycin potenziert die Wirkung von NMDA und Glutamat. Nach Ligandenbindung ist der Ionenkanal für  $Na^+$ ,  $K^+$  und in unterschiedlichem Maße auch für  $Ca^{++}$  durchlässig. Durch Natriumeinstrom und Kaliumausstrom wird die neuronale Zellmembran depolarisiert. Durch die membranpotentialabhängige Blockade durch  $Mg^{++}$  sind die NMDA-Rezeptoren in hohem Maße an der Plastizität des Gedächtnisses beteiligt. Zusätzlich zur Membrandepolarisierung können ionotrope Glutamatrezeptoren auch molekulare Langzeitveränderungen in Neuronen bewirken. Diese Veränderungen werden über einen  $Ca^{++}$ -Einstrom durch den Ionenkanal ausgelöst. Hierdurch werden über Kinasen und Phosphatasen weitere intraneuronale Signalübertragungskaskaden ausgelöst, die in Abhängigkeit vom aktivierten Signalübertragungsweg zur Bildung neuer Sy-

## Einleitung

napsen, zur Verstärkung bestehender Synapsen oder auch zum kontrollierten Zelltod führen. Für letztere langfristig wirksamen Modulationen ist der NMDA-Rezeptor aufgrund seiner hohen  $\text{Ca}^{++}$ -Permeabilität in besonderem Maß wichtig [Konradi and Heckers, 2003] (s. Abbildung 1.2).



**Abbildung 1.2:** schematische Darstellung eines NMDA-Rezeptors; Glycin, Zink und Polyamide binden an die NMDAR1-Untereinheit. Auf der NMDAR2-Untereinheit (Subtypen NMDAR2-A bis -D) befinden sich die Bindungsstellen für Glutamat/ NMDA und für Dizocilpin/ Ketamin/ MK-801. Die  $\text{Mg}^{++}$ -Bindungsstelle im Ionenkanal ist eine Besonderheit des NMDA-Rezeptors: Bei negativem Membranpotential blockiert  $\text{Mg}^{++}$  hier den Kanal. Die Membrandepolarisation muss daher zunächst auf anderem Wege geschehen (z.B. über AMPA-Rezeptor), dann löst sich  $\text{Mg}^{++}$  aus dem Ionenkanal und ermöglicht den  $\text{K}^{+}$ -Ausstrom und  $\text{Na}^{+}$  und  $\text{Ca}^{++}$ -Einstrom in die Nervenzelle. Durch den  $\text{K}^{+}$ -Ausstrom und  $\text{Na}^{+}$ -Einstrom kommt es zur Membrandepolarisation. Der intrazelluläre  $\text{Ca}^{++}$ -Anstieg hingegen löst Signalkaskaden aus, die z.B. zur Verstärkung von bestehenden Synapsen oder zur Bildung neuer Synapsen führen, und spielt daher eine große Rolle bei der synaptischen Plastizität [CNSforum.com, 2002].

## **1.5 Gliale Zellpopulationen und ihre Interaktionen mit dem glutamatergen System und mit adulter Neurogenese**

Gliale Zellen im zentralen Nervensystem (ZNS) wurden Mitte des 19. Jahrhunderts erstmalig von Rudolf Virchow beschrieben. Ihnen wurde lange Zeit nur eine Art Stütz- oder Gerüstfunktion für die Nervenzellen zugeschrieben. Aus dieser Annahme entstammt auch der Name Gliazelle (gr. gliozyti), abgeleitet aus dem griechischen Wort für Leim (gr. glia). Inzwischen sind von glialen Zellen komplexe Funktionen wie z.B. für den Transmitterstoffwechsel und die neuronale Signalübertragung bekannt. Unterteilt werden Gliazellen derzeit in zwei Hauptgruppen: die Neuroglia (Makroglia) und die Mesoglia (Mikroglia). Die Mikroglia entstammt im Gegensatz zu den anderen Zellen des Nervensystems nicht dem Neuralrohr und der Neuroaleiste (Ektoderm), sondern dem blutbildenden System (Mesoderm). Mikroglia sind immunkompetente Zellen des zentralen Nervensystems mit der Fähigkeit zur Phagozytose von z.B. beschädigten oder abgestorbenen Zellen ähnlich den Makrophagen in anderen Organsystemen. Sie spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der Synaptogenese sowie bei der Einleitung von Apoptose [Bessis et al., 2007]. Die Neuroglia dagegen wird in weitere vier Untergruppen eingeteilt: Astrozyten, Oligodendrozyten, Ependymzellen und radiale Glia:

Astrozyten sind hierbei die zahlenmäßig stärkste Fraktion. Ihnen kommt eine wichtige neurotrophe Funktion für die umgebenden Neurone und Synapsen zu. Astrozyten sind essentiell für den Austausch von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten zwischen Neuronen und Blut [Edmond et al., 1987; Guzman and Blazquez, 2001; Kacem et al., 1998; Voutsinos-Porche et al., 2003]. Sie sind außerdem beteiligt an der Homöostase und der aktiven Veränderung des interzellulären Ionenmilieus sowie an der Wiederaufnahme von in ihrer Umgebung ausgeschütteten Transmittern und haben somit Einfluss auf die neuronale Signalübertragung [Araque et al., 1999; Araque et al., 2001; Carmignoto, 2000; Haydon, 2001; Nedergaard et al., 2003]. Von den insgesamt 5 im erwachsenen Gehirn identifizierten Glutamattransportern EAAT1 bis EAAT5 (Excitatory amino acid transporter) [O'Shea, 2002] werden die hochaffinen Glutamattransporter EAAT1 (glial glutamate and aspartate transporter = GLAST) und EAAT2 (glialer Glutamattransporter 1 = GLT-1) vor allem in Astrozyten exprimiert [Gadea and Lopez-Colome, 2001]. EAAT1 und EAAT2 sind die vorherrschenden Glutamattransportertypen im zentralen Nervensystem (ZNS) [Gadea and Lopez-Colome, 2001]. Für über 90 % der Glutamatwiederaufnahme aus dem Extrazellulärraum ist der Glutamattransporter EAAT2 verantwortlich [Rothstein et al., 1996]. Astrozyten sind damit für den Schutz vor glutamaterger Exzitotoxizität unerlässlich. Des Weiteren wird für die Glutamin-Synthetase ein hauptsächlich

## Einleitung

ches Vorkommen in Astrozyten beschrieben. Diese katalysiert die Reaktion von Glutamat und Ammonium zu Glutamin. Glutamin besitzt keine Transmitteraktivität und kann gefahrlos in den Extrazellulärraum freigesetzt, von Neuronen wieder aufgenommen und erneut zu Glutamat deaminiert werden [Broer and Brookes, 2001]. Astrozyten spielen somit eine wesentliche Rolle für die glutamaterge Transmission sowie für die Neuroprotektion gegenüber glutamaterger Exzitotoxizität.

Oligodendrozyten im zentralen Nervensystem erfüllen dagegen nach gängiger Lehrmeinung dieselben Funktionen wie die Schwann-Zellen im peripheren Nervensystem: Sie bilden Myelinscheiden um Axone und bewirken hierdurch eine elektrische Isolation derselben. Ependymzellen bilden eine einlagige Schicht zwischen dem Hirngewebe und den inneren Nervenwasserräumen (Ventrikelsystem und Zentralkanal). Die vierte Gruppe der Neuroglia ist die radiale Glia. Der 1971 erstmals beschriebene Terminus bezeichnete zunächst rein deskriptiv eine gliale (GFAP-positive) Zellart mit strahlenförmig angeordneten Zellausläufern [Rakic, 1971]. Radiale Gliazellen befinden sich in der subgranulären Schicht des Gyrus dentatus und in der subventrikulären Zone. Sie galten lange Zeit nur als Leitstruktur für radiale neuronale Migration, inzwischen konnte jedoch auch gezeigt werden, dass sie selbst Eigenschaften von Progenitorzellen oder neuronalen Stammzellen besitzen. Über asymmetrische Zellteilung besitzen sie die Fähigkeit neuronale Vorläuferzellen zu generieren und sich selbst zu erneuern [Kempermann et al., 2004a; Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; Malatesta et al., 2000; Nottor et al., 2001]. Im Gegensatz zu anderen Stammzelltypen können neuronale Stammzellen nicht über einen spezifischen Marker definiert werden [Maurer, 2005]. Mehrere Kandidaten sind beschrieben, darunter Vimentin [Dahl et al., 1982], Nestin [Lendahl et al., 1990] und GFAP (glial fibrillary acidic protein) [Doetsch et al., 1999]. Jedoch werden mit keinem dieser Marker alle neuronalen Stammzellen erfasst sondern jeweils nur Untergruppen zu einem bestimmten Zeitpunkt der Differenzierung. Aufgrund der vielfältigen Eigenschaften glialer Zellen ist es möglich, dass eine reduzierte gliale Zellzahl bei schizophrenen Patienten zu einem gestörten Glutamatstoffwechsel sowie einer reduzierten Synapto- und Neurogenese führen könnte.

## **1.6 Neurobiologische Grundlagen der Schizophrenie**

### **1.6.1 Dopaminhypothese der Schizophrenie**

Für ca. 3 Jahrzehnte basierte die dominierende Hypothese über die Pathogenese der Schizophrenie auf einer Dysregulation der dopaminergen Neurotransmission [Carlsson, 1963]. Diese These fußte auf zwei Beobachtungen: Zum einen war bekannt, dass die Einnahme von Stimu-

## Einleitung

lantien wie Amphetamin oder Kokain, die die zentrale dopaminerge Neurotransmission erhöhen, psychotische Zustände ähnlich den Positivsymptomen der Schizophrenie verursachen kann [Laruelle et al., 1996]. Außerdem haben antipsychotische Medikamente wie Haloperidol und Chlorpromazin die Gemeinsamkeit, den Dopamin-D2-Rezeptor zu blockieren. Ihre Affinität zu diesen Rezeptoren korreliert signifikant mit ihrem Potential, die klinischen Anzeichen einer Psychose zu lindern („neuroleptische Potenz“) [Miyamoto et al., 2005]. Jedoch kann die Dopaminhypothese der Schizophrenie nicht alle Facetten dieser Erkrankung erklären. Insbesondere die nur niedrige bis fehlende Wirksamkeit von typischen Neuroleptika, Negativsymptome zu lindern, gab Anlass an einer alleinigen dopaminergen Pathogenese zu zweifeln [Kane, 1999]. Außerdem wurde über eine paradoxe Linderung von Negativsymptomen nach Einnahme von Dopaminagonisten berichtet [Willner, 1997]. Um diese Diskrepanz zu erklären, wurde eine Imbalance zwischen dem kortikalen und subkortikalen dopaminergen System angenommen. Eine Minderfunktion des kortikalen dopaminergen Systems (präfrontaler Kortex) könnte ursächlich für die Ausbildung von Negativsymptomen sein, während Positivsymptome möglicherweise einer gesteigerten dopaminergen Aktivität im limbischen System zuzuschreiben sind [Knable and Weinberger, 1997]. Störungen im glutamatergen System könnten den teilweise gegenläufigen Veränderungen im dopaminergen System, welche bei der Schizophrenie gefunden werden, zugrunde liegen. In mehreren Studien konnte z.B. gezeigt werden, dass es nach Verabreichung eines NMDA-Rezeptorantagonisten zu einer gesteigerten Dopaminfreisetzung im präfrontalen Kortex und im Striatum kommt [Kegeles et al., 2000; Moghaddam et al., 1997; Verma and Moghaddam, 1998]. Der zugrunde liegende Mechanismus hierfür scheint eine vermehrte Stimulation der AMPA- und Kainatrezeptoren nach NMDA-Rezeptor-Blockade zu sein. Wurde nämlich zeitgleich ein AMPA-/ Kainatrezeptor-Antagonist verabreicht, so wurde die Erhöhung der Dopaminfreisetzung abgeschwächt [Moghaddam et al., 1997]. Unter anderem in dieser Funktion als komplexer Modulator des dopaminergen Systems könnte das glutamaterge System eine maßgebliche Rolle bei der Pathogenese der Schizophrenie spielen [Kegeles et al., 2000].

### 1.6.2 Glutamathypothese der Schizophrenie

#### *1.6.2.1 Pharmakologische Evidenzen durch NMDA-Rezeptorantagonisten*

Die ersten indirekten Hinweise, dass bei der Pathogenese der Schizophrenie das glutamaterge System eine Rolle spielen könnte, wurden durch Berichte über Nebenwirkungen von unkompetitiven NMDA-Rezeptorantagonisten gewonnen. Diese blockieren den Ionenkanal des NMDA-Rezeptors indem sie an dessen Phencyclidin-Bindungsstelle binden, welche sich innerhalb des Ionenkanals befindet. Eine Bindung der dort ansetzenden Antagonisten ist daher

## Einleitung

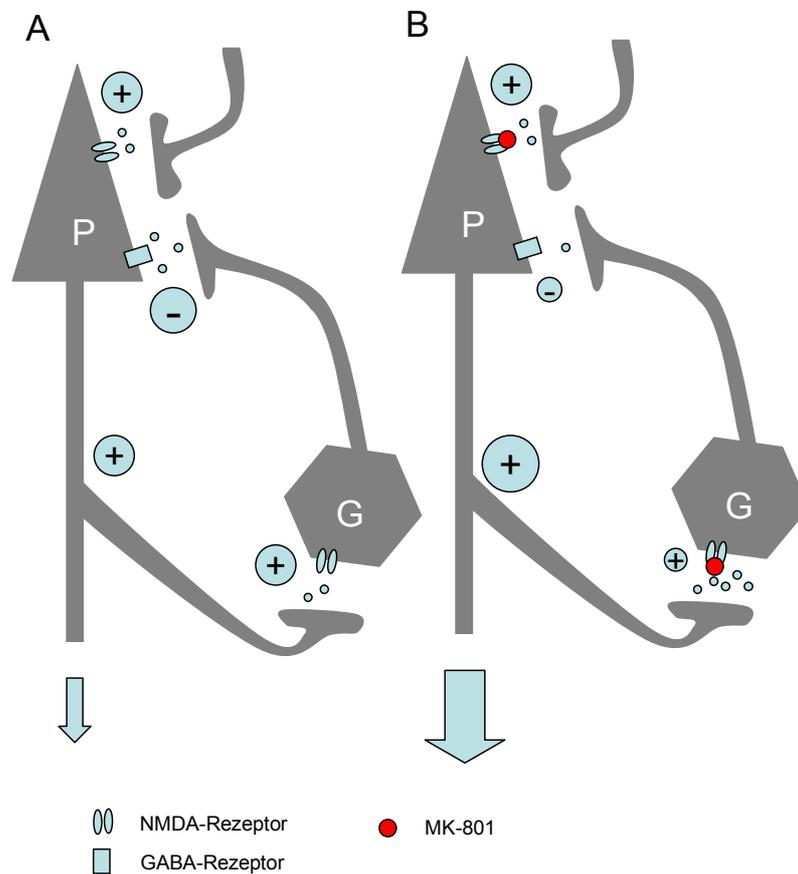
nur bei geöffnetem Ionenkanal, also in Anwesenheit des Agonisten Glutamat, möglich, weshalb es sich per definitionem um einen unkompetitiven Antagonismus handelt. Die Nebenwirkungen dieser NMDA-Rezeptorantagonisten ähnelten auffallend sowohl den Positiv- als auch den Negativsymptomen einer Schizophrenie.

Die erste Veröffentlichung über schizophrenieähnliche Nebenwirkungen von dem NMDA-Rezeptorantagonisten Phencyclidin (PCP, im Szenejargon auch als „angel dust“ bekannt), stammt von Luby et al. [Luby et al., 1959]. Phencyclidin gehört wie auch MK-801 oder das Anästhetikum Ketamin zu den unkompetitiven NMDA-Rezeptorantagonisten. In den folgenden Jahren wurden diese Erfahrungen mehrfach repliziert und außerdem festgestellt, dass Phencyclidin bei Patienten im chronischen Stadium der Schizophrenie einige der Hauptsymptome verstärkt [Gonzalez-Maeso and Sealfon, 2009; Itil et al., 1967; Javitt and Zukin, 1991; Olney et al., 1999; Olney and Farber, 1995]. In Studien an Nagetieren mehrten sich jedoch Hinweise für einen neurotoxischen Effekt von PCP und somit wurden weitere pharmakologische Studien mit PCP am Menschen verboten [Olney et al., 1989]. Da PCP in den 60er Jahren in bestimmten Subkulturen jedoch eine große Popularität erlangte, konnte in weiteren retrospektiven Studien gezeigt werden, dass wiederholte PCP-Einnahme zu persistierenden schizophreniformen Symptomen führte, inklusive Psychosen, Halluzinationen, Affektverarmung, Wahnvorstellungen, formalen Denkstörungen, kognitiven Störungen und sozialem Rückzug [Javitt and Zukin, 1991; Rainey, Jr. and Crowder, 1975]. Der akute und auch der chronische PCP-Missbrauch verursachen schizophreniforme Symptome. Nach einmaliger akuter Gabe jedoch treten vor allem akustische Halluzinationen und paranoide Wahnvorstellungen auf, während nach chronischer PCP-Einnahme auch von unterschwelligen Einzeldosen eine wesentlich größere Bandbreite an schizophrenen Symptomen auftritt [Javitt and Zukin, 1991; Rainey, Jr. and Crowder, 1975].

Die Entdeckung der psychotomimetischen Wirkung von NMDA-Rezeptorantagonisten bereicherte die Schizophrenieforschung um die Glutathypothese der Schizophrenie. Zu einer generellen hypoglutamatergen Stoffwechsellage im Gehirn scheint es dabei jedoch nicht zu kommen. Vielmehr betrifft die NMDA-Rezeptor-Dysfunktion vor allem die Signalübertragung inhibitorischer Interneurone [Ikonomidou et al., 1999]. Durch das Wegfallen bzw. die Verminderung der hemmenden Afferenzen kommt es zu einer Zunahme der Aktivität und Glutamatfreisetzung von Pyramidenzellen (Prinzip der neuronalen Disinhibition s. Abbildung 1.3). So zeigte sich zum Beispiel nach intraperitonealer Verabreichung des NMDA-Rezeptorantagonisten Ketamin die Glutamatausschüttung im präfrontalen Kortex erhöht [Moghaddam et al., 1997]. Das hierbei vermehrt freigesetzte Glutamat scheint über die nicht-

## Einleitung

NMDA-Rezeptoren (AMPA- und Kainat-Rezeptoren) weitere postsynaptische Neurone aktivieren zu können, was von einigen Autoren als grundlegender Faktor für das Entstehen der bei der Schizophrenie typischen kognitiven Defizite anzusehen ist [Moghaddam et al., 1997; Olney et al., 1999].



**Abbildung 1.3:** Prinzip der neuronalen Disinhibition durch MK-801. A: die Pyramidenzelle (P) erregt via NMDA-Rezeptor ein GABAerges Interneuron (G). Dieses übt über einen GABA-Rezeptor inhibitorischen Einfluss auf die Pyramidenzelle aus. B: Blockade des NMDA-Rezeptors durch MK-801. Der NMDA-Rezeptor des GABAergen Interneurons ist durch MK-801 stärker geblockt als der NMDA-Rezeptor der Pyramidenzelle [Grunze et al., 1996]. Die Erregung des GABAergen Interneurons durch die Pyramidenzelle wird dadurch eingeschränkt und somit die rekurrente Inhibition der Pyramidenzelle durch das GABAerge Interneuron vermindert. Daraus resultiert bei gleichem „input“ an die Pyramidenzelle eine erhöhte Reizweiterleitung im Sinne einer neuronalen Disinhibition (Abbildung modifiziert nach Braun et al, 2007).

### 1.6.2.2 biochemische Befunde (Liquor)

Den ersten direkten Hinweis auf ein verändertes Glutamatsystem bei schizophrenen Patienten gewannen Kim et al. in einer Untersuchung von Liquor cerebrospinalis bei schizophrenen Pa-

## Einleitung

tienten und Gesunden. Sie konnten zeigen, dass die Glutamatkonzentration bei an Schizophrenie Erkrankten niedriger war als bei gesunden Personen [Kim et al., 1980]. Seither stützten verschiedene Studien die Theorie eines primär hypoaktiven glutamatergen Systems [Coyle, 1996; Jentsch and Roth, 1999; Olney and Farber, 1995] mit sekundär erhöhter Glutamatausschüttung in bestimmten Gehirnregionen [Olney et al., 1999].

### *1.6.2.3 genetische Befunde*

Erschwerend kommt bei der Untersuchung der Schizophrenie hinzu, dass es sich nicht um eine homogene Krankheitsentität handelt. Schon Eugen Bleuler, der den Begriff Schizophrenie einführte, nannte diesen Krankheitskomplex ursprünglich „die Schizophrenien“ und unterteilte ihn in verschiedene Manifestationsformen [Bleuler, 1914]. Noch immer ist unklar, ob die Schizophrenie eine tatsächliche Entität darstellt, oder eher als Überbegriff für verschiedene Ausprägungen eines Spektrums schizophrener Erkrankungen zu sehen ist. Dies würde z.B. auch die Schwierigkeit erklären, Gene zu detektieren, die mit der Ausbildung einer Schizophrenie assoziiert sind. Ein Lösungsansatz hierfür sind die Identifizierung und Definition von Endophänotypen. Hierbei werden zu einzelnen mit der Krankheit vergesellschafteten Defiziten wie zum Beispiel Störung des Arbeitsgedächtnisses oder Störungen der kognitiven Funktion Assoziationen mit Genvarianten gesucht. Dieses Vorgehen ist bei vermuteter ausgeprägter Heterogenität von Erkrankungen sinnvoll um Kandidatengene zu detektieren.

Für die Schizophrenie wurden durch Assoziationsstudien und Endophänotypisierung bereits mehrere solcher Kandidatengene detektiert. Hierzu gehört beispielsweise GRM3 (glutamate receptor, metabotropic 3), welches für den metabotropen Glutamatrezeptor 3 kodiert [Egan et al., 2004]. In einer Familien-Assoziationsstudie war ein bestimmter Haplotyp dieses Gens (Variante in einer Nukleotidsequenz, single-nucleotide polymorphism, SNP; A-Allel in SNP 4, Intron 2) stark mit dem Erkrankungsrisiko für Schizophrenie assoziiert. In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass gesunde Probanden mit diesem Haplotypen in kognitiven Tests, die die Funktion des präfrontalen Kortex und des Hippocampus erfassten, schlechter abschnitten als gesunde Probanden ohne diese Genvariante. GRM3 wird von Astrozyten exprimiert und reguliert die Expression des für die Glutathomöostase äußerst wichtigen Glutamattransporters EAAT2 (GLT-1). Ein weiteres durch eine Assoziationsstudie entdecktes Kandidatengen ist DISC1 (disrupted in schizophrenia 1) [St Clair et al., 1990], das mit Endophänotypen der Schizophrenie wie z.B. Einschränkungen im Arbeitsgedächtnis oder Reduktion der grauen Substanz vergesellschaftet ist [Callicott et al., 2005; Ishizuka et al., 2006]. Für DISC1 wurde interessanterweise 2010 eine bis dahin nicht bekannte Funktion beschrieben: Hayashi-Takagi et al. konnten *in vitro* und *in vivo* nachweisen, dass DISC1 einen modulieren-

## Einleitung

den Effekt auf NMDA-Rezeptoren hat [Hayashi-Takagi et al., 2010]. Somit unterstützen auch einige genetische Befunde die Hypothese einer glutamatergen Dysfunktion im Krankheitsbild der Schizophrenie.

### **1.7 Neuropathologie der Schizophrenie**

#### 1.7.1 *Post mortem* Studien

##### 1.7.1.1 *Neuronale Veränderungen*

In *post mortem* Studien konnte vielfach eine reduzierte Anzahl kortikaler Neurone gezeigt werden, wenn auch nicht einheitlich. In einigen Studien wurde eine signifikante schichtspezifische Verminderung der neuronalen Zelldichte verschiedener Nervenzellsubpopulationen gefunden. Interneurone in der Kortexsschicht II des präfrontalen Kortex und in den Schichten II bis VI des anterioren Cingulum [Benes et al., 1991] sowie Pyramidalzellen in der Zellschicht IV des anterioren Cingulum [Benes et al., 2001] wiesen demgemäß eine verminderte Dichte auf. Im Vergleich von nicht neuroleptisch behandelten schizophrenen Patienten mit gesunden Kontrollen wurde eine Verminderung der Dichte nicht-pyramidaler Neurone in der CA2-Region des Hippocampus bei schizophrenen Patienten gezeigt [Benes et al., 1998]. In einer Studie, die auf einer objektiven stereologischen Zählmethode basierte, war die Gesamtzahl der kortikalen Neurone von schizophrenen Patienten gegenüber den Kontrollen unverändert [Pakkenberg, 1993]. Eine andere Gruppe fand hingegen eine geringfügige aber signifikante Steigerung der neuronalen Dichte im präfrontalen und okzipitalen Kortex bei schizophrenen Patienten [Selemon et al., 1995; Selemon et al., 1998]. Die Autoren schlussfolgerten jedoch, dass nicht die Gesamtzellzahl abweiche, sondern die erhöhte Dichte das Resultat einer Verminderung des Neuropil sei [Selemon et al., 1995; Selemon et al., 1998]. Somit scheint es bei der Schizophrenie zwar nicht in großem Umfang zu einer Reduktion der neuronalen Zellzahl zu kommen, jedoch konnten vereinzelt Verminderungen von neuronalen kortikalen Subpopulationen sowie in ausgeprägterem Umfang auch Verminderungen subkortikaler Neuronenzahlen festgestellt werden.

##### 1.7.1.2 *Synaptische Veränderungen*

Bezüglich Neuropil und synaptischer Marker liegen übereinstimmende Ergebnisse aus *post mortem* Studien vor, die eine Verminderung der dendritischen Fortsätze und der dendritischen Gesamtlänge pyramidaler Neuronen [Black et al., 2004], eine Verminderung Parvalbuminpositiver Varikositäten [Lewis et al., 2001] sowie verminderte Synaptophysinexpression im Hippocampus [Eastwood et al., 1995] zeigten. Synaptophysin ist ein stetig exprimiertes,

## Einleitung

transmembranäres, synaptisches Vesikelprotein und damit ein geeignetes Leitprotein für strukturelle Untersuchungen der Synapsen. Diese Daten werden ebenfalls von einer Genexpressionanalyse gestützt, die im präfrontalen Kortex schizophrener Patienten durchweg eine verminderte Expression von mehreren synaptischen Genprodukten zeigte [Mirnics et al., 2000].

### *1.7.1.3 Gliale Veränderungen*

Einige ältere Studien zeigten, dass Schizophrenie mit einer kortikalen Gliose assoziiert sein könnte [Stevens, 1982]. Neuere Studien kommen jedoch übereinstimmend zu dem Schluss, dass eine kortikale Gliose kein typisches neuropathologisches Merkmal der Schizophrenie darstellt [Arnold et al., 1996; Casanova et al., 1990; Roberts et al., 1986; Stevens et al., 1988]. Dies wurde dahingehend interpretiert, dass neurodegenerativen Phänomenen zumindest keine zentrale Rolle bei der Pathogenese bzw. der Progredienz dieser Erkrankung zukommt [Benes et al., 1991; Stevens, 1982]. Während eine (reaktive) Gliose durch Proliferation glialer Elemente gekennzeichnet ist, konnte im Gegenteil sogar in einigen Untersuchungen an schizophrenen Patienten eine *Verminderung* der glialen Zellpopulation gezeigt werden, namentlich eine Reduktion von Oligodendrozyten im präfrontalen Kortex [Hof et al., 2003], eine reduzierte relative Dichte (area fraction) von glial fibrillary acidic protein (GFAP) im präfrontalen Kortex [Rajkowska et al., 2002] und eine Reduktion der absoluten glialen Zellzahl im anterioren Cingulum [Stark et al., 2004].

## 1.7.2 MRT-Studien

### *1.7.2.1 Querschnittsstudien*

In MRT-Querschnittsstudien wurden Hinweise für eine Verminderung der kortikalen grauen Substanz bei Schizophrenen gefunden. In einigen Untersuchungen zeigte sich eine globale Reduktion der grauen Substanz [Gur et al., 1998; Hulshoff Pol et al., 2002; Zipursky et al., 1992], in anderen ein Volumenverlust spezifischer kortikaler Areale bei schizophrenen Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen: Im Einzelnen eine Volumenreduktion des präfrontalen Kortex [Gur et al., 1998; Hulshoff Pol et al., 2002], des temporalen Kortex [Gur et al., 1998; Schlaepfer et al., 1994] und des parietalen Kortex [Schlaepfer et al., 1994]. Die Datenlage stimmt somit mit Beobachtungen aus *post mortem* Studien überein.

### *1.7.2.2 Longitudinale Studien*

Eine Einschränkung von Querschnittsstudien ist jedoch, dass aus diesen nicht zu entnehmen ist, ob die strukturellen Veränderungen der Untersuchung vorausgingen, oder auf einem zum Zeitpunkt der Untersuchung noch aktiven Prozess beruhen. Um diese Frage zu beantworten,

## Einleitung

wurden mehrere longitudinale Studien durchgeführt. Ein fortschreitender Volumenverlust der grauen Substanz konnte in verschiedenen Kollektiven nachgewiesen werden: In einer Studie konnte gezeigt werden, dass innerhalb einer Kohorte von Risikopersonen im Prodromalstadium der Schizophrenie nur diejenigen tatsächlich einen fortschreitenden Volumenverlust an grauer Substanz in bestimmten hippocampalen und frontalen Regionen zeigten, die später tatsächlich eine Psychose ausbildeten [Pantelis et al., 2003]. In einem anderen Patientenkollektiv mit Ausbruch der Schizophrenie schon in der Kindheit wurden progressive Volumenveränderungen in verschiedenen Arealen festgestellt: fortschreitende Erweiterung des Ventrikelsystems [Rapoport et al., 1997], Rückgang kortikaler grauer Substanz im frontalen und temporalen Kortex [Jacobsen et al., 1998; Rapoport et al., 1999] und auch zerebelläre Volumenreduktion [Keller et al., 2003; Rapoport et al., 1999]. Bei Patienten, die erstmalig eine Schizophrenie entwickelten, konnte mit MRT-Studien ein fortschreitender Volumenverlust der gesamten grauen Substanz [Cahn et al., 2002], des frontalen Kortex [Gur et al., 1998] und im Gyrus temporalis superior [Kasai et al., 2003] gezeigt werden. Dagegen fanden Lieberman et al. keine Unterschiede im Kortextvolumen. [Lieberman et al., 2001].

## **1.8 Adulte Neurogenese**

### **1.8.1 Geschichte**

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts war die unter anderem auch von Ramon und Cajal vertretene Lehrmeinung, dass es postnatal nicht zur Bildung neuer Nervenzellen kommen könne und die Regenerationsmechanismen des Hirngewebes folglich sehr begrenzt seien [Ramón y Cajal, 1928]. 1965 zeigten Altman und Das erstmalig, dass im adulten Hippocampus der Ratte neue Zellen entstehen [Altman and Das, 1965]. Sie wiesen dies mit radioaktiv markiertem Thymidin nach. Die Ergebnisse ihrer Untersuchungen wurden zunächst ignoriert oder bestenfalls äußerst kritisch betrachtet [Gross, 2000]. Zum einen entsprachen sie nicht den damaligen Vorstellungen, außerdem konnten sie mit der angewandten Methode nicht mit letzter Sicherheit nachweisen, dass es sich bei den neu entstandenen Zellen auch um Neurone und nicht um gliale Zellen handelte. Kaplan und Hinds konnten 1977 zeigen, dass mit radioaktivem Thymidin markierte, im adulten Organismus entstandene Zellen in der Körnerzellschicht des Hippocampus elektronenmikroskopisch ultrastrukturelle Eigenschaften von Neuronen aufwiesen [Kaplan and Hinds, 1977]. Goldmann und Nottebohm, die die Fähigkeit von Singvögeln erforschten, immer wieder neue Melodien zu erlernen, konnten erstmals zeigen, dass in der für das Lieder Erlernen zuständigen Hirnregion in großem Umfang funktionstüchtige Neurone aus Stammzellen entstehen (adulte Neurogenese) [Goldman and Nottebohm, 1983]. Hierzu verwandten sie

## Einleitung

ebenfalls radioaktiv markiertes Thymidin und untersuchten die Präparate anschließend licht- und elektronenmikroskopisch. Auch diese Ergebnisse änderten zunächst nichts an dem weiterhin verbreiteten Dogma, das im erwachsenen Gehirn keine neuen Nervenzellen entstehen. Einerseits wurde die Validität der Ergebnisse als solche in Frage gestellt, andererseits die Übertragbarkeit der Ergebnisse, die auf eine adulte Neurogenese bei Vögeln hinwiesen, auf Säugetiere geschweige denn auf den Menschen.

Ein indirekter Hinweis auf das Entstehen von neuen Neuronen im Gehirn von erwachsenen Säugetieren ergab sich in einer Arbeit von Gould et al.: Im Hirngewebe von Ratten nach Adrektomie fanden sich lichtmikroskopisch gehäuft pyknotische Zellen als Zeichen für eine gesteigerte Apoptoserate. Jedoch war die absolute Neuronenzahl gegenüber der Kontrollgruppe unverändert [Gould et al., 1991]. Nachdem die Autoren zunächst die angewandte Zählmethode in Frage stellten, entdeckten sie in der Literatur die Vorarbeiten von Altmann, Kaplan und Nottebohm, die ebenfalls Hinweise für eine adulte Neurogenese lieferten. Mit dem Aufkommen neuer Methoden, unter anderem der Markierung sich teilender Zellen mit dem künstlich hergestellten Thymidinanalogon BrdU (Bromdesoxyuridin), die eine Kombination mit anderen immunhistologischen Methoden zulässt, wurden in den folgenden Jahren nun in großem Umfang Untersuchungen der adulten Neurogenese bei verschiedenen Tierarten und beim Menschen durchgeführt [Gould et al., 1997; Gould et al., 1999a; Palmer et al., 2001; Reynolds and Weiss, 1992]. Eriksson et al. wiesen 1998 die postnatale Neurogenese auch beim Menschen nach [Eriksson et al., 1998]. Hierzu untersuchten sie *post mortem*-Hirngewebe von an Krebs erkrankten Personen, die 16 bis 781 Tage zuvor zu diagnostischen Zwecken mit dem Thymidinanalogon BrdU behandelt wurden, und führten kombinierte Immunfluoreszenzdarstellungen von BrdU und neuronalen Markern (neuronal nuclear protein (NeuN), Calbindin und Neuronspezifische Enolase (NSE)) durch. Übereinstimmend werden bei Säugetieren zwei Hirnareale genannt, in denen auch nach Abschluss der embryofetalen Hirnentwicklung noch neue Nervenzellen gebildet werden: der Gyrus dentatus der hippocampalen Formation und die subventrikuläre Zone des Bulbus olfactorius.

### 1.8.2 Mechanismen und Detektion der Neurogenese

Das Vorkommen postnataler Neurogenese wurde inzwischen über entwicklungsbiologische Grenzen hinweg von Krustentieren bis hin zu hoch entwickelten Wirbeltieren festgestellt [Altman and Das, 1965; Eriksson et al., 1998; Goldman and Nottebohm, 1983; Gould et al., 1999b; Harzsch and Dawirs, 1996]. Der Umfang der postnatalen Neuro(neo)genese nimmt mit zunehmender Komplexität des Gehirns ab [Kempermann et al., 2004b; Lledo et al., 2006]. Während niedrig entwickelte Wirbeltiere wie z.B. die Eidechse mittels adulter Neurogenese

## Einleitung

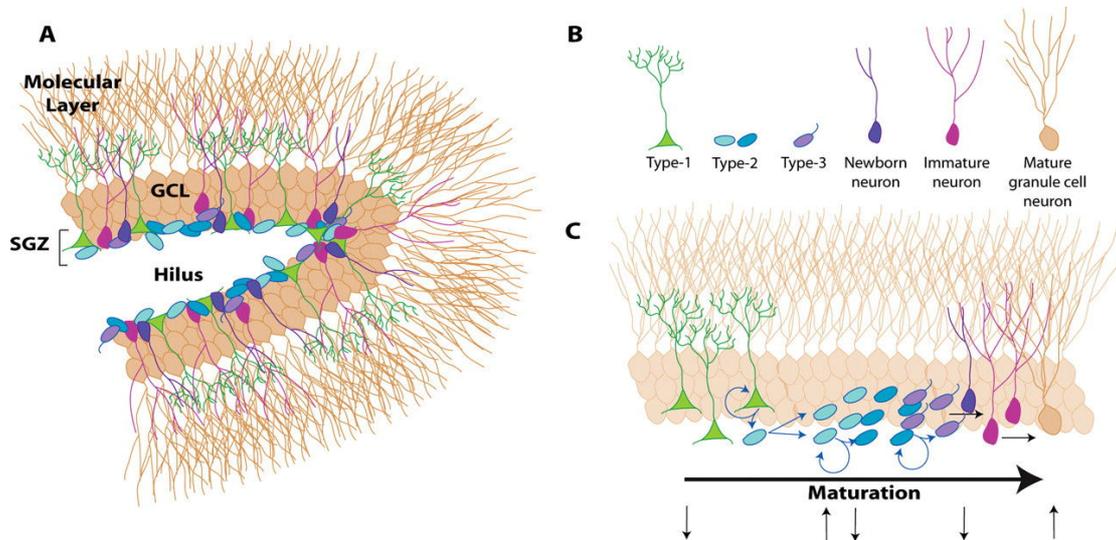
imstande sind, ganze Hirnareale zu regenerieren, ist die Neurogenese in adulten Säugetieren auf ganz spezielle Areale begrenzt, um in geringem Umfang neue Neurone zur Verfügung zu stellen. Das Maß der adulten Neurogenese innerhalb einer Gattung scheint eine Abstimmung zu sein zwischen dem durch neue Neurone entstehenden Benefit und dem möglichen Schaden, der bei der Integration in das bereits bestehende Netzwerk auftreten kann [Kempermann et al., 2004b]. Letzterer Aspekt scheint maßgeblich bei der adulten Neurogenese von hoch entwickelten Säugetieren eine Rolle zu spielen. Hier wurde die postnatale Neurogenese bislang nur in zwei Hirnregionen nachgewiesen: in der subgranulären Zone des Hippocampus und in der subventrikulären Zone des Bulbus olfactorius [Biebl et al., 2000; Kempermann et al., 1998; Kuhn et al., 1996].

Ausgangspunkt der adulten Neurogenese sind multipotente Stammzellen, die per definitionem in der Lage sind, in die im ZNS vorhandenen Zelltypen (Neurone, Astrozyten, Oligodendrozyten) auszdifferenzieren und die Fähigkeit besitzen, sich selbst zu erneuern [Abrous et al., 2005; Kempermann, 2002a; McKay, 1997]. Der Ablauf der adulten Neurogenese wird in die Phasen Proliferation, Migration und Differenzierung eingeteilt. Am Beispiel der hippocampalen Neurogenese erfolgt nachfolgend eine kurze Beschreibung: Bei der Proliferation teilt sich in der subgranulären Schicht des Gyrus dentatus eine multipotente Stammzelle asymmetrisch in eine multipotente Stammzelle (Prinzip der Selbst-Erneuerung) und in eine neuronale Vorläuferzelle. Die Vorläuferzelle wandert anschließend in die Körnerzellschicht ein (Migration) und reift hierbei zu einem ausdifferenzierten Neuron heran (Differenzierung). Die meisten auf diesem Wege neu entstandenen Zellen reifen zu Körnerzellen heran. Tierexperimentell mittels BrdU-Methode wird der Anteil der Körnerzellen an der Gesamtzahl der im erwachsenen Organismus neugebildeten Zellen bei 75 % [Malberg et al., 2000] oder bei 93 % angegeben [Biebl et al., 2000]. Nur ca. 10 bis 15 % der Vorläuferzellen differenzieren zu glialen Zellen [Malberg et al., 2000].

Zwei Wochen nach Bildung der Vorläuferzelle wachsen die Dendriten des unreifen Neurons aus und erhalten glutamaterge Reize aus dem entorhinalen Kortex. Schlussendlich wird das reife Neuron strukturell und funktionell in das bestehende neuronale Netzwerk integriert [Tashiro et al., 2006; van Praag et al., 2002]. Auf die Integration der Nervenzellen in das vorbestehende Netzwerk folgt offensichtlich eine Phase der Selektion: Schon den Erstbeschreibern der adulten Neurogenese beim Menschen fiel auf, dass in Abhängigkeit von der Größe des Zeitintervalls zwischen BrdU-Injektion und Versterben der Patienten eine deutliche Abnahme der Anzahl BrdU-positiver Zellen im Hippocampus zu verzeichnen war [Eriksson et al., 1998]. Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass bis zu 50% der neu gebildeten Nerven-

## Einleitung

zellen innerhalb der ersten drei Monate durch Apoptose wieder eliminiert werden [Biebl et al., 2000; Winner et al., 2002]. Zwischen der Anzahl 3 Monate alter und der Anzahl 19 Monate alter Neurone im Hippocampus waren jedoch keine wesentlichen Unterschiede zu verzeichnen, so dass angenommen wird, dass der Mechanismus der Selektion insbesondere innerhalb der ersten 3 Monate nach Entstehung einer neuen Nervenzelle greift.



**Abbildung 1.4:** schematische Darstellung der adulten Neurogenese in der subgranulären Schicht des Gyrus dentatus des Hippocampus in Anlehnung an das von Kempermann et al. postulierte Modell der adulten hippocampalen Neurogenese [Kempermann et al., 2004b]: Aus hippocampalen Typ-1-Stammzellen (radiale Glia) entstehen durch langsame asymmetrische Zellteilung je eine Typ-1-Stammzelle und eine neuronale Typ-2-Vorläuferzelle. Die Typ-2-Vorläuferzellen teilen sich mit einer höheren Mitoserate in Vorläuferzellen Typ 2 und Typ 3, was zu einer Zunahme dieser Zellpopulation führt. Die Typ-3-Vorläuferzellen entwickeln sich zu postmitotischen unreifen Nervenzellen (immature neuron), welche durch Integration in das bestehende Netzwerk zu reifen Körnerzellen ausdifferenzieren (mature granule cell neuron). (SGZ) subgranuläre Zone, (GCL) Körnerzellschicht, (Hilus) polymorphe Zellschicht [Eisch et al., 2008].

Zur immunhistologischen Detektion von sich teilenden Zellen kann ein Antikörper gegen Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) verwendet werden. PCNA ist ein Enzym des Replikationskomplexes und kennzeichnet daher eine Zelle im Stadium der Mitose [Kurki et al., 1986; Prelich et al., 1987]. Eine weitere Methode zur Erkennung von Zellteilung ist die bereits in Abschnitt 1.8.2 erwähnte BrdU-Methode. BrdU ist ein Thymidinanalogon, das während der S-Phase in proliferierende Zellen eingebaut wird. Es muss daher den noch lebenden Tieren verabreicht werden [Gratzner, 1982].

## Einleitung

### 1.8.3 BDNF (brain derived neurotrophic factor)

BDNF wurde in den 80er Jahren von Yves-Alain Barde am Max-Planck-Institut für Neurobiologie in Martinsried entdeckt und war somit nach dem nerve growth factor (NGF) der zweite identifizierte Nervenwachstumsfaktor [Barde et al., 1987]. BDNF wirkt in erster Linie über seinen Rezeptor TrkB, eine hochaffine Rezeptortyrosinkinase. Mit niedrigerer Affinität bindet BDNF auch an den Rezeptor p75. Die BDNF-Wirkung am TrkB-Rezeptor spielt eine wichtige Rolle für die neuronale Differenzierung und das neuronale Überleben, sowie für die Synaptogenese und synaptische Plastizität [Thoenen, 1995]. BDNF fördert im Hippocampus die Langzeitpotenzierung (long-term potentiation, LTP) [Korte et al., 1995].

Interessant bei der Wirkungsweise von BDNF ist, dass die Wirkung aktivitätsabhängig erfolgt. BDNF wirkt vorzugsweise an aktiven Neuronen. Als in das Gewebe diffundierendes Molekül kommt BDNF selbst eher nicht die Rolle zu, die aktiven von den passiven Neuronen zu unterscheiden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass durch hochfrequente tetanische Stimulation die TrkB-Expression an der Neuronenoberfläche schnell gesteigert wurde und somit die Spezifität der BDNF-Wirkung offensichtlich über die aktivitätsabhängige Expression der TrkB-Rezeptoren hergestellt wird [Du et al., 2000]. In der gleichen Studie wurde auch gezeigt, dass der Mechanismus dieser aktivitätsabhängigen Veränderungen eines  $Ca^{++}$  Einstroms über NMDA- und  $Ca^{++}$ -Kanäle bedarf. Eine antiapoptotische Funktion von BDNF konnte 2004 von Madeddu et al. gezeigt werden. Gemessen wurden die Apoptoserate und die Expression proapoptotischer Proteine bzw. Effektorproteine in der Apoptosekaskade. Nach Ablation des visuellen Kortex bei Ratten kommt es im Nucleus geniculare dorsolaterale normalerweise zu ausgeprägtem Neuronenuntergang. Die Apoptoserate sowie der Nachweis aktivierter Caspase 3, Cytochrom c und phosphoryliertem c-Jun waren nach Gabe von extrinsischem BDNF halbiert [Madeddu et al., 2004].

## **1.9 Apoptose**

### 1.9.1 Apoptose allgemein

Apoptose (griechisch: **απόπτωσης** - von „apo“ = „weg“ und „ptosis“ = „Fall“) ist eine hoch organisierte Form des Zelltods. Die Definition der Apoptose als entwicklungsbiologisch determinierte physiologische Zelltodform in Abgrenzung zur Nekrose erfolgte 1972 durch Kerr et al. [Kerr et al., 1972]. Der programmierte Zelltod ist ein wichtiges Element bei der Entwicklung des Zentralnervensystems. Fast die Hälfte der ursprünglich angelegten Zellen wird im Rahmen der Bildung funktionierender neuronaler Netzwerke über den Apoptoseweg eliminiert

## Einleitung

[Burek and Oppenheim, 1996]. Aber auch im adulten Organismus ist der Mechanismus der Apoptose unerlässlich, um z. B. alte, geschädigte Zellen zu eliminieren. Zytomorphologische Zeichen der Apoptose sind Zellschrumpfung, „membrane blebbing“, Chromatinkondensierung, DNA-Fragmentierung und Zellauflösung durch Phagozytose [Bredesen, 1995]. Apoptose läuft ohne eine Entzündungsreaktion ab und braucht für das Voranschreiten typischerweise die Bildung neuer Genprodukte [Bredesen, 1995].

**Tabelle 1.1:** *morphologische und biochemische Kennzeichen von Apoptose und Nekrose*

	Apoptose	Nekrose
Definition	sog. Programmierter Zelltod, physiologischer oder pathologischer Zelltod, der durch genetische Informationen der betroffenen Zelle selbst reguliert wird	Pathologischer Zelltod, in dem die geschädigte Zelle eine Entzündungsreaktion hervorruft und passiv eliminiert wird
Vorkommen	Grundlage einer geregelten Embryogenese, Gewebemöostase und Funktion des Immunsystems	Nach Schädigung einer Zelle/ Zellgruppe durch z.B. mechanische Reize, Hitze, Kälte, Strahlung
Morphologisch	Zellkörper schrumpft	Zellkörper schwillt an
	Kern-DNA verdichtet und fragmentiert	
	Organellen (Mitochondrien und Endoplasmatisches Retikulum) bleiben nach Einsetzen der Apoptose länger intakt	Organellen frühzeitig geschädigt
	Kein Austreten des Zellinhalts in die Umgebung, somit keine Entzündungsreaktion	Entzündungsreaktion mit Einwandern von Leukozyten in das Gewebe
	Im Endstadium entstehen membranumhüllte „Apoptotic bodies“, die von ortsansässigen Zellen aufgenommen werden	Zellmembran frühzeitig geschädigt

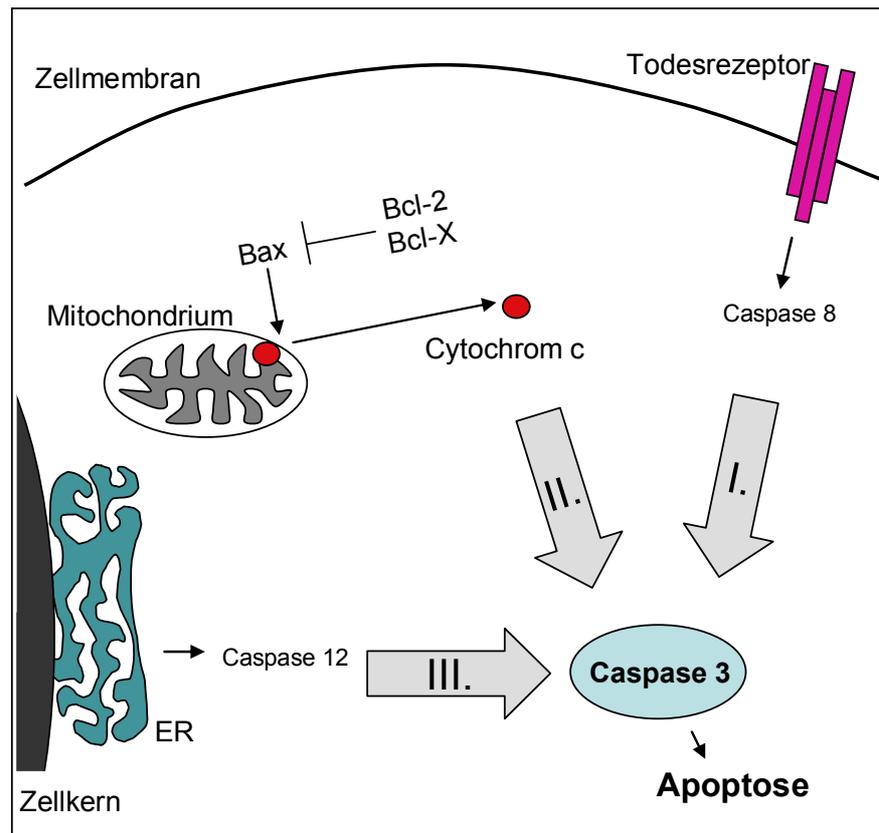
## Einleitung

	Apoptose	Nekrose
Biochemisch	Verlust der Plasmamembran-Phospholipid-Asymmetrie	Verlust der Membranintegrität
	Erhalt des ATP-Levels	ATP-unabhängiger passiver Prozess
	Aktivierung einer oder mehrerer Cystein-Proteasen der Caspase Familie	
	Mitochondriale Sauerstoffradikalproduktion und Calciumüberladung	

„Cysteine-dependent aspartate-directed proteases“ (Caspase-Proteine) regulieren den Apoptoseweg. Caspase 3 ist die am häufigsten mit Apoptose im ZNS assoziierte Effektorcaspase [Yuan and Yankner, 2000]. Effektorcaspasen werden aktiviert durch Spaltung der Carboxygruppe am Aspartatrest. Die aktivierten Effektorcaspasen spalten wiederum eine Reihe spezifischer struktureller und funktioneller Proteine und führen somit zu einer charakteristischen apoptotischen Morphologie. Mindestens drei verschiedene Mechanismen, die zur Caspase-3-Aktivierung führen, wurden identifiziert: Der mitochondriale (intrinsische) Weg, der Todesrezeptor vermittelte (extrinsische) Weg und der durch Stress des Endoplasmatischen Retikulums (insbesondere durch Änderungen der Ca<sup>++</sup>-Homöostase) eingeleitete Apoptoseweg [Rao et al., 2004].

Der mitochondriale Apoptoseweg wird durch die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium aktiviert. Cytochrom c ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und ist Bestandteil der Atmungskette. Die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium in das Zytoplasma und somit die Aktivierung der Apoptosekaskade wird durch Wechselwirkungen von pro- und antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie (b-cell-lymphoma) reguliert. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass in Anwesenheit von Bcl-2 kein Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt wird [Kluck et al., 1997; Yang et al., 1997]. Murphy et al konnten zeigen, dass eine erhöhte Bcl-2-Expression die maximale Kalziumaufnahme-fähigkeit von neuronalen Mitochondrien erhöht und vor Dysfunktion der Zellatmung schützte [Murphy et al., 1996]. In einer weiteren Untersuchung fanden diese Autoren heraus, dass Bcl-2 die neuronale Zelle vor einem durch erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration ausgelösten Zelltod schützt.

## Einleitung



**Abbildung 1.5:** Aktivierung der Effektorcaspase 3 über die drei bekannten Signalwege: I: Todesrezeptor vermittelte Apoptosekaskade (extrinsischer Weg); II: mitochondrial aktivierte Apoptose (intrinsischer Weg), hierbei kommt es zur Cytochrom c-Freisetzung aus dem Mitochondrium. Dies führt über weitere hier nicht gezeigte Schritte zur Aktivierung der Effektorcaspase 3. Das proapoptotische Protein Bax führt in aktivierter Form zu einer Durchlässigkeit der äußeren Mitochondrienmembran und somit zur Cytochrom c-Freisetzung. Die antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-X dagegen vermögen Bax zu inaktivieren. Ob ein gegebener Reiz zu Apoptose führt oder nicht, wird daher unter anderem durch das Verhältnis von Bax zu Bcl-2 beeinflusst (Bax/Bcl-2-Quotient). III: über das Endoplasmatische Retikulum (ER) vermittelte Apoptose.

Im Verlauf wurden weitere antiapoptotische Proteine (Bcl-2, Bcl-X) sowie proapoptotische Proteine wie z.B. Bax und Bcl-xS entdeckt, die jeweils der Bcl-2-Familie zugeordnet werden. Durch Aktivierung und Membraneinbau des proapoptotischen Proteins Bax (Bcl-2 associated X Protein) wird die äußere Mitochondrienmembran durchlässig für Cytochrom c [Antonsson et al., 1997; Bleicken, 2008]. Bcl-2 hingegen führt zu einer Inaktivierung von Bax. Je nach Verhältnis von pro- zu antiapoptotischen Proteinen führt ein gegebener Reiz zu Apoptose oder nicht. Ein hier wichtiger Quotient ist der von Bax zu Bcl-2. Ein hoher Bax/Bcl-2-Quotient begünstigt Apoptose, ein niedriger Bax/Bcl-2-Quotient verhindert Apoptose [Oltvai et al.,

## Einleitung

1993]. Das Bcl-2-Protein besitzt zusätzlich direkte neurotrophe Eigenschaften, die unabhängig vom Zelltodmechanismus ablaufen. Überexpression von Bcl-2 führt zu vermehrtem Neuritenwachstum, Differenzierung, Synaptogenese und Vernetzung [Oh et al., 1996; Zhang et al., 1996] und fördert die Regeneration von beschädigten Neuronen [Chen et al., 1997].

### 1.9.2 Synaptische Apoptose

Ein relativ neues Konzept schreibt der Apoptose eine weitere Funktion zu: Apoptotische Mechanismen müssen nicht unbedingt zum Tod der gesamten Zelle führen, sondern können sich auch auf Synapsen oder distale Neuriten beschränken [Mattson et al., 1998]. Der sogenannten synaptischen Apoptose kommt eine zentrale Rolle bei der synaptischen Plastizität zu [Garden et al., 2002; Gilman and Mattson, 2002]. Mehrere Studien zeigen, dass die Apoptosekaskade isoliert in Synaptosomen aktiviert werden kann [Gylys et al., 2002; Mattson and Duan, 1999]. Dies ist eine Suspension aus physiologisch intakten synaptischen Endigungen ohne Kernmembran. Auch in intakten Neuronen verursachte die fokale Applikation von Glutamat an distalen Dendriten *in vitro* eine lokalisierte Erhöhung der Caspase-3-Aktivität ohne sich weiter zum Zellkörper fortzusetzen [Mattson et al., 1998]. Mattson und Duan vermuten, dass neurotrophe Faktoren, die ebenfalls in den Neuriten vorkommen, die Ausbreitung der lokalen Caspaseaktivität über den gesamten Zellkörper verhindern [Mattson and Duan, 1999].

## **1.10 Apoptotische Mechanismen als Grundlage der Schizophrenie**

Der auf einer gestörten Entwicklung des Zentralnervensystems (ZNS) basierende Erklärungsansatz der Schizophrenie brachte einen tiefgreifenden Fortschritt für das Verständnis des Zusammenspiels von umweltbedingtem Stress und der Pathogenese der Schizophrenie [Harrison and Weinberger, 2005; McDonald and Murray, 2000]. Dieses Modell liefert jedoch auf neurobiologischer Ebene keine ausreichende Erklärung für die fortschreitende Natur der Schizophrenie, ebenso wenig für die Verzögerung zwischen einem vermutetem initialen Insult und der späteren klinischen Manifestation der Erkrankung. Ein Modell gestörter proliferativer oder apoptotischer Aktivität jedoch, in Analogie zu anderen neurodegenerativer Erkrankungen, wo dies gut etabliert ist, bietet eine attraktive und schlüssige Erklärung für diese Charakteristika [Berger et al., 2003; Lewis and Lieberman, 2000; Margolis et al., 1994].

## Einleitung

### 1.10.1 Reduktion der Neuronenzahl ohne reaktive Gliose in *post mortem* Studien

In den in oben angerissenen *post mortem* Studien fanden sich mehrheitlich Hinweise für synaptische und dendritische Defizite in Kortex und Hippocampus schizophrener Patienten [Black et al., 2004; Eastwood and Harrison, 1995; Lewis et al., 2001]. In einigen *post mortem* Studien zeigte sich eine umschriebene Reduktion der neuronalen Dichte, jedoch ohne damit einhergehende Gliose [Benes et al., 1991; Benes et al., 1998; Benes et al., 2001]. Im Gegenteil scheint die gliale Zellzahl bei schizophrenen Patienten in *post mortem* Studien im Vergleich zu gesunden Kontrollen eher vermindert zu sein [Rajkowska et al., 2002; Stark et al., 2004]. Insgesamt weist eine verminderte Zellzahl ohne Gliosereaktion auf einen programmierten Zelltod (Apoptose) hin. Auch der reduzierten synaptischen Dichte können apoptotische Mechanismen zugrunde liegen. Somit stellt sich die Frage, ob möglicherweise Änderungen im Apoptosestoffwechsel bei der Entstehung und im Verlauf der Schizophrenie eine Rolle spielen.

Die erste Veröffentlichung, die eine mögliche Rolle von Apoptose bei der Entstehung der Schizophrenie in Erwägung zog, stammt von Margolis et al. [Margolis et al., 1994]. Die Autoren bringen *post-mortem*-Befunde bei schizophrenen Patienten, die Veränderungen der neuronalen Zellzahl in verschiedenen Hirnregionen zeigten, in Zusammenhang mit dem damals am Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* entdeckten Mechanismus des programmierten Zelltods und postulieren eine mögliche Rolle des programmierten Zelltods bei der Entstehung der Schizophrenie oder anderen neuropsychiatrischen Erkrankungen.

### 1.10.2 Apoptotische Regulatorproteine in *post mortem* Studien

Jarskog et al. bestimmten mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) und Western Blot die Expression des antiapoptotischen Regulatorproteins Bcl-2 *post mortem* im temporalen Kortex [Jarskog et al., 2000]. Es zeigte sich eine um 25% verminderte Expression des Bcl-2-Proteins im Gyrus temporalis medialis bei schizophrenen Patienten im Vergleich zu Kontrollen. Wie bereits im Kapitel 1.9.1 beschrieben, ist Bcl-2 ein potentes antiapoptotisches Protein. *In vivo* und *in vitro* konnte gezeigt werden, dass es vor proapoptotischen Stimuli wie Ischämie, Entzug von Wachstumsfaktoren und Glutamattoxizität schützt [Lawrence et al., 1996; Zhong et al., 1993a; Zhong et al., 1993b]. Somit stellt ein vermindertes Bcl-2-Niveau einen möglichen pathogenetischen Faktor dar, der den Schutz vor proapoptotischen Stimuli bei der Schizophrenie vermindert. Die beschriebenen Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Befunden bei klassischen neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. M. Alzheimer, bei denen es zu einer Überexpression von Bcl-2 im Kortex kommt und gleichzeitig die neuronale Apoptose beschleunigt

## Einleitung

stattfindet. Die hohen Bcl-2-Level bei klassischen neurodegenerativen Erkrankungen werden einem Kompensationsmechanismus als Antwort auf den neurodegenerativen Prozess zugeschrieben [Satou et al., 1995]. In dieser Hinsicht unterscheidet sich die Pathophysiologie der Schizophrenie von der Mehrzahl der „klassischen“ neurodegenerativen Erkrankungen im engeren Sinne. Ein niedriges Niveau an Bcl-2 im temporalen Kortex kann einerseits ein Hinweis darauf sein, dass dort nicht in besonderem Maße Apoptose stattfindet und folglich auch nicht kompensatorisch Bcl-2 exprimiert wird. Andererseits kann aber auch das niedrige Bcl-2-Niveau ein Defizit darstellen, auf proapoptotische Reize kompensatorisch zu reagieren, und somit die Anfälligkeit neuronaler und glialer Zellen für proapoptotische Stimuli erhöhen [Benes et al., 2003]. Des Weiteren wirkt Bcl-2 aber auch direkt als neurotropher Faktor und fördert das Aussprossen von Neuriten sowie die neuronale Regeneration [Chen et al., 1997; Oh et al., 1996; Zhang et al., 1996]. Niedrige Bcl-2-Level können somit auch unabhängig von apoptotischen Mechanismen zu einer reduzierten axodendritischen Verästelung führen. In einer späteren Untersuchung wies die Arbeitsgruppe um Jarskog einen um 50% erhöhten Bax/Bcl-2-Quotienten bei schizophrenen Patienten nach [Jarskog et al., 2004]. Dieser Quotient hat Bedeutung bei der Cytochrom c-Freisetzung und somit bei der Einleitung des Apoptosevorgangs (s. Abschnitt 1.9.1). Bax ist ein Protein der Bcl-2-Familie, von dem durch Untersuchungen an Bax-Knock-out-Mäusen bekannt ist, dass es im Rahmen der postmitotischen Selektion die Apoptose von neu gebildeten Neuronen vermittelt [Sun et al., 2003]. Der erhöhte Bax/Bcl-2-Quotient kann somit als Hinweis für eine proapoptotische Stoffwechsellage bei an Schizophrenie erkrankten Menschen gewertet werden. Des Weiteren scheint im Kontext dieser Befunde interessant zu sein, dass Wang et al. in einem Tierversuch einen erhöhten Bax/Bcl-X-Quotienten nach kurzfristigem NMDA-Rezeptor-Antagonismus im temporalen Kortex der neugeborenen Ratte zeigen konnten [Wang et al., 2001]. Bcl-X ist ein weiteres antiapoptotisches Protein aus der Bcl-2-Familie.

### 1.10.3 Caspase-3-Expression in *post mortem* Studien

Hinsichtlich der Caspase-3-Aktivität wurde in *post mortem*-Untersuchungen bei schizophrenen Patienten keine wesentliche Zunahme festgestellt. Dies steht im Gegensatz zu den *post mortem*-Befunden bei klassischen neurodegenerativen Erkrankungen, wie zum Beispiel M. Alzheimer oder M. Parkinson. Hier zeigten sich in immunhistochemischen und Western Blot-Untersuchungen an *post mortem* gewonnenem Mesencephalon von M. Parkinson-Patienten eine erhöhte Caspase-3-Expression gegenüber gesunden Kontrollen [Hartmann et al., 2000]. In einer anderen *post mortem* Studie konnte eine erhöhte Caspase-3- und Bcl-2-Immunoreaktivität in Hirngewebe von an M. Alzheimer erkrankten Personen im Vergleich zu

## Einleitung

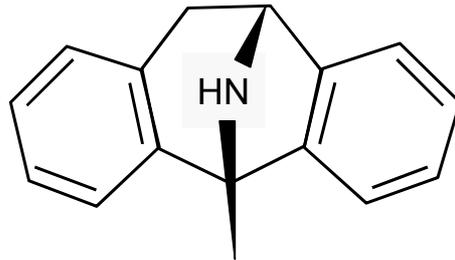
Kontrollpersonen gezeigt werden [Masliah et al., 1998]. Bei schizophrenen Patienten zeigte sich indessen keine signifikante Änderung der Caspase-3-Expression im temporalen Kortex [Jarskog et al., 2004]. Da die Caspase-3-Aktivierung als letzter gemeinsamer Schritt der verschiedenen Apoptosewege im ZNS angesehen wird [Krajewska et al., 1997], kann die unveränderte Caspase-3-Aktivität dahingehend interpretiert werden, dass die Apoptoserate im chronischen Stadium der Schizophrenie nicht erhöht war. Folglich, obwohl es scheint, dass der temporale Kortex gegenüber proapoptischen Reizen durch eine erhöhte Bax/Bcl-2-Ratio sowie eine absolute Reduktion an Bcl-2 eine erhöhte Anfälligkeit aufweist, ist die apoptotische Aktivität im Stadium der chronischen Schizophrenie nicht erhöht. Dies schließt jedoch nicht aus, dass es in einem früheren Stadium der Schizophrenie oder in der prodromalen Phase zu einer erhöhten apoptotischen Aktivität kommt. Jarskog et al [Jarskog et al., 2005] vermuten, dass apoptotische Mechanismen insbesondere im Prodromalstadium und bei Erstmanifestation der Psychose neurostrukturelle Veränderungen einleiten. Als Hauptsubstrat der apoptotischen Aktivität wird das kortikale Neuropil vermutet, weniger auch gliale Zellen und neuronale Subpopulationen. Die Autoren berufen sich hierbei auf die in Abschnitt 1.7.1 zitierten *post mortem* Studien.

### **1.11 Tiermodell der Schizophrenie**

Bei *post mortem* Untersuchungen an schizophrenen Patienten ist die Einhaltung identischer Vorbedingungen fast unmöglich. Zumeist sind die Patienten pharmakologisch behandelt gewesen, zudem ist der unterschiedliche Zeitraum zwischen Versterben der Patienten und Aufbewahrung bzw. Weiterverarbeitung der Gehirne höchst variabel. Um vergleichbare Ausgangsbedingungen zu haben, ist ein Tiermodell eine sinnvolle Alternative. Ein gutes Tiermodell der Schizophrenie sollte durch eine möglichst naturgetreue Abbildung der klinischen Symptome gekennzeichnet sein. Aus den in Abschnitt 1.6.2 aufgeführten Beobachtungen geht hervor, dass sich zu diesem Zweck ein NMDA-Rezeptor-Antagonist als geeignet erweisen könnte, da dieser sowohl Positiv- als auch Negativsymptome hervorruft. Der Vergleich der klinischen Symptomatik im Tiermodell mit der humanen Schizophrenie ist dabei natürlich nur eingeschränkt möglich. Dennoch werden bei Nagern und Primaten durch NMDA-Rezeptor-Antagonisten Verhaltensweisen ausgelöst, die als Äquivalent zu einer Schizophreniesymptomatik gewertet werden können. Hierzu zählen zum Beispiel sozialer Rückzug, motorische Hyperaktivität, Stereotypien und insbesondere eine Beeinträchtigung von Arbeitsgedächtnisleistungen [Jentsch and Roth, 1999; Rujescu et al., 2006]. Neben den Anomalien auf Verhaltensebene ähneln auch die strukturellen Veränderungen im dopaminergen sowie glutamatergen System den Befunden, die sich bei schizophrenen Patienten darstellen [Healy and Meador-Woodruff, 1996].

## Einleitung

MK-801 (Dizocilpin) ist wie Phencyclidin und das Anästhetikum Ketamin ein unkompetitiver NMDA-Rezeptor-Antagonist, der schizophreneytypische Veränderungen hervorzurufen vermag und sich durch eine besonders hohe Rezeptorspezifität auszeichnet. MK-801 bindet bei geöffnetem Ionenkanal an die Phencyclidin-Bindungsstelle und blockiert so den Ionenfluss [MacDonald et al., 1990].



*Abbildung 1.6: Strukturformel von Dizocilpin (MK-801).*

## **2 Fragestellung**

In den vergangenen Jahren wurde die Schizophrenieforschung um die Glutamathypothese der Schizophrenie erweitert. Gleichzeitig wurde in bildgebenden Studien die Frage aufgeworfen, ob die Schizophrenie zumindest in Teilaspekten in den Formenkreis der neurodegenerativen Erkrankungen zugeordnet werden kann, ob und inwieweit also Phänomene wie Nekrose oder Apoptose oder aber eine abnorme Proliferationsaktivität eine pathomechanisch relevante Rolle spielen.

Mit dem auf NMDA-Rezeptor-Antagonismus beruhenden Tiermodell werden in vielerlei Hinsicht schizophreientypische Veränderungen sowohl in klinischer als auch in hirnstruktureller und molekularbiologischer Hinsicht nachempfunden. Dies legt eine auch ätiopathogenetisch bedeutsame Rolle des glutamatergen Systems nahe. Glutamat ist einerseits an der Synaptogenese, an der Gedächtniskonsolidierung und an der Neuroneogenese beteiligt. Glutamat wirkt andererseits in hohen Dosen auch neurotoxisch und bewirkt die Auslösung des programmierten Zelltods. Auch gliale Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der glutamatergen Signalübertragung.

In dieser Arbeit soll in einem auf NMDA-Rezeptor-Antagonismus beruhenden Tiermodell der Schizophrenie untersucht werden, ob es durch experimentell induzierte Anomalien der glutamatergen Neurotransmission zu Alterationen der Neuroneogenese in der subgranulären Zone des Hippocampus kommt. Des Weiteren soll geprüft werden, ob unter diesen Bedingungen - äquivalent zu neurodegenerativen Erkrankungen- eine Zunahme von apoptotischen Ereignissen, eine veränderten Neuronenzahl oder eine reaktive Gliose auftreten. Zugleich soll die Wirkung einer gängigen, auf D2-Rezeptorantagonismus beruhenden neuroleptischen Therapie, auf die oben genannten Parameter beurteilt werden.

Die Fragen lauten im Einzelnen:

1. Beeinflusst die chronische Gabe von MK-801 im Tiermodell die Anzahl PCNA-positiver Zellen in der subgranulären Zone des Hippocampus als Maß für dort stattfindende Neurogenese? Wird die Expression des Nervenwachstumsfaktors BDNF und die neuronale Zellzahl im Hippocampus durch MK-801-Gabe verändert? Welchen Effekt hat bezüglich dieser beiden Fragestellungen die Gabe von Haloperidol?
2. Wird durch chronische Gabe von MK-801 die Anzahl Caspase-3-positiver Neurone erhöht bzw. die neuronale Zellzahl reduziert? Kommt es in diesem Tiermodell der

### Fragestellung

Schizophrenie zu einer reaktiven Gliose? Hat Haloperidol diesbezüglich einen modulierenden Effekt?

3. Wird die hippocampale Expression von Genen, die funktionell im Zusammenhang mit Neurogenese oder Apoptose stehen, durch die Applikation von MK-801, Haloperidol oder beider Substanzen verändert?
4. Korrelieren die (immun-) histologischen Daten mit Alterationen im Verhalten der Tiere?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Als Versuchstiere wurden 48 männliche Long-Evans-Ratten (Janvier Breeding Centre, Le Genest Saint Isle, F) eingesetzt. Bei Versuchsbeginn waren die Tiere  $35 \pm 1$  Tage alt und wogen 121 bis 148 Gramm. Die Ratten waren unter standardisierten Bedingungen bei einer Raumtemperatur von 23 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit zwischen 50 und 60 % sowie einem 12-stündigen Tag-Nacht-Beleuchtungsrythmus in isoliert ventilierten Käfigen (IVC) untergebracht. Während des gesamten Versuchs standen den Tieren Futter (Alleinfutterpellets „ssniff R/M-Haltung, 10 mm, nitrosaminarm“, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und Wasser ad libitum zur Verfügung. Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG i.d.F. vom 25.05.1998, BGBl I S. 1105) durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

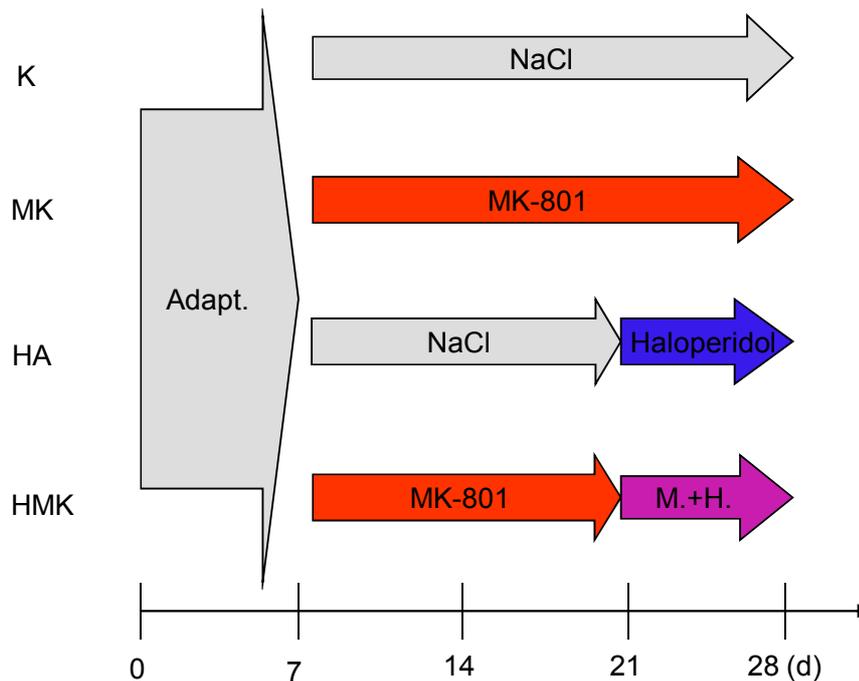
#### 3.2 Applikationsschema

Die Tiere wurden nach Körpergewicht gematcht und in Gruppenkäfigen (Makrolon IV) zu viert gehalten. Nach einer 7-tägigen Adaptationszeit folgte eine 3-wöchige Behandlungszeit. Das Applikationsschema ist in Abbildung 3.1 grafisch dargestellt. Die Injektion der Medikamente erfolgte mit einer 28 Gauge Kanüle täglich während der Hellphasen intraperitoneal (Wirkstoffe und Dosis s. Tabelle 3.1). Um eine gewichtsadaptierte Dosierung der Wirkstoffe zu gewährleisten, wurden die Tiere alle 3 Tage gewogen und die notwendige Menge und Konzentration der zu verabreichenden Lösung angepasst. Um intraperitoneale Druck- und Volumenunterschiede als Störgröße auszuschalten, wurde außerdem das verabreichte Volumen im Verhältnis zum Körpergewicht konstant gehalten (2ml/kgKG).

**Tabelle 3.1:** : verabreichte Wirkstoffe und Dosierung

Präparatename, Hersteller	chemischer Name des Wirkstoffs	Dosis ( pro kg KG)
MK-801, Sigma, Taufkirchen, D	Dizocilpin, (5R,10S)-(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo-[a,d]-cyclohepten-5,10-imin	0,02 mg
Haloperidol, TVG Generics, Kirchzarten, D	4-[4-(4-Chlorphenyl)-4-hydroxypiperidin-1-yl]-1-(4-fluorphenyl)butan-1-on	1 mg

## Material und Methoden



**Abbildung 3.1:** Applikationsschema; Nach einer einwöchigen Adaptationszeit wurden den Versuchstieren drei Wochen lang täglich je eine intraperitoneale Injektion verabreicht: die Tiere der Kontrollgruppe wurden über den gesamten Zeitraum mit NaCl behandelt. Den Tieren der MK-801-Gruppe wurde über drei Wochen MK-801 injiziert. Den Tieren der Haloperidolgruppe wurde in den ersten zwei Wochen NaCl und anschließend für eine Woche Haloperidol verabreicht. Die Versuchstiere, die eine MK-801- und Haloperidol-Koapplikation erhielten, wurden in den ersten zwei Wochen mit MK-801 und in der dritten Woche mit MK-801 und Haloperidol behandelt (Hersteller und Dosis der Wirkstoffe s. Tabelle 3.1). K = Kontrollgruppe, MK = MK-801-Gruppe, HA = Haloperidol-Gruppe, HMK = MK-801 und Haloperidol-Koapplikation; Adapt. = Adaptationszeit, H. = Haloperidol, M. = MK-801.

## **3.3 Verhaltenstests**

### **3.3.1 Y-Maze-Tests**

Das Y-Maze (aus eigener Fertigung) bestand aus 3 identischen, in 120° zueinander angeordneten Armen A, B und C (Plexiglas, jeweils 50 cm lang, 15 cm breit und 35 cm hoch). Der Zugang zu einzelnen Armen konnte durch Falltüren blockiert werden. Die Position des Y-Maze in Relation zu visuellen und akustischen Hinweisreizen blieb stets konstant. Vor jedem Versuchsbeginn wurden Kotballen entfernt und Duftmarken durch Auswaschen mit Essigwasser maskiert.

## Material und Methoden

### 3.3.1.1 Spontan alternierendes Verhalten im Y-Maze

Bei diesem Versuch wurde jeweils ein Tier in das Y-Maze gesetzt. Nach einer 2-minütigen Eingewöhnungsphase wurde sechs Minuten lang das spontane Betreten der Y-Maze-Arme A, B und C registriert. Das Aufsuchen eines Arms wurde dann als solches gewertet, wenn das Tier alle Pfoten in den Arm gesetzt hatte [Dellu et al., 1992]. Als alternierendes Verhalten wurde das nicht-repetitive Aufsuchen der Y-Maze-Arme in überlappenden Triplets gewertet:



**Abbildung 3.2:** exemplarische Auswertung der Armzugänge im Y-Maze. Gezählt wurden Triplets, bei denen in drei aufeinanderfolgenden Armzugängen jeder Arm einmal besucht wurde (durchgezogene Linie). Eine Abfolge, bei der mindestens ein Arm zweimal besucht wurde (gestrichelte Linie) wurde dagegen nicht gewertet.

Als Maß für das räumliche Arbeitsgedächtnis wurde der Anteil tatsächlich absolvierter Triplets an der Anzahl maximal möglicher Triplets (Gesamtzahl der Armzugänge minus 2) bestimmt. Hierzu wurde folgender Quotient gebildet:

$$\frac{\text{Anzahl alternierender Armzugänge (Anzahl Triplets)}}{\text{maximal mögliche Alternationen (Gesamtzahl der Armzugänge-2)}} \times 100$$

### 3.3.1.2 Zweizeitiger Y-Maze Test

Ein Arm des Y-Maze wurde durch eine Falltür blockiert. In einer 15-minütigen „Akquisitionsphase“ konnte die Ratte die verbleibenden zwei Arme des Y-Maze erkunden. Nach einem Intervall von 15 Minuten im „Heimatkäfig“ wurde der vormals blockierte Arm zugänglich gemacht und die Ratte erneut im Y-Maze ausgesetzt. Es wurde dann erfasst, ob das Tier als erstes den zuvor verschlossenen Arm betrat. Weitere Parameter waren die kumulative im „neuen“ Arm verbrachte Zeit und die Anzahl der Zugänge in diesen Arm in Relation zur Gesamtzahl der Armzugänge in einer 5-minütigen Untersuchungsperiode.

### 3.3.2 Tail Suspension Test

Die Versuchstiere wurden einzeln unter konstanten Umgebungsbedingungen für drei Minuten kopfüber hängend an der Schwanzwurzel gehalten. Gezählt wurden in dem 3-minütigen Tail Suspension Test die Anzahl der Rettungsversuche (Fassen nach dem Schwanz) und der Vokalisationen. Eine Verminderung der Rettungsversuche und der Vokalisationen wurde als Zeichen für Initiativverlust (Apathie) gewertet.

## **3.4 Gewebeaufbereitung**

Die Tiere wurden 24 Stunden nach der letzten Behandlung durch Dekapitierung in tiefer CO<sub>2</sub>-Narkose getötet. Nach Perforation der Schädelkalotte an der Sutura sagittalis wurde unter Vermeidung von kortikalen Läsionen zügig das Schädeldach entfernt und das nun freiliegende Gehirn vorsichtig mit einem Spatel entnommen. Ggf. wurden Reste der Meningen mit einer Dumont-Pinzette entfernt. Die beiden Hemisphären wurden mit einem Skalpell getrennt und unterschiedlich prozessiert. Aus den linken Hemisphären wurde das Material für die Genexpressionsanalyse gewonnen. Hierzu wurden die Hippocampi umgehend auf Eis präpariert, in Flüssigstickstoff gefroren und bis zum nächsten Arbeitsschritt, der RNA-Extraktion (s Abschnitt 3.4.1), bei -80°C gelagert. Die rechten Hemisphären hingegen wurden für die Immunhistologie wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben verarbeitet.

### 3.4.1 RNA-Extraktion und Genchip-Array

Die linken Hippocampi wurden mit dem Qiazol Lysis Reagenz (Qiagen, Hilden, Deutschland) homogenisiert. Anschließend erfolgte die RNA-Extraktion entsprechend der Herstellerangaben mit dem RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen). Die RNA-Menge und die RNA-Integrität wurden im Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo, CA, USA) mit dem RNA 6000 LabChip Kit (Agilent) untersucht. Es zeigte sich hierbei eine sehr gute RNA-Qualität aller Hippocampi. Nach Bestimmung der RNA-Menge in jeder Probe konnten für je eine Microarray-Untersuchung gleich große RNA-Mengen von je drei Versuchstieren einer Behandlungsgruppe gemischt werden. Von dieser gepoolten RNA wurden  $4,07 \pm 0,7 \mu\text{g}$  auf einen Microarray-Chip (16 GeneChip Rat Genome 230, version 2.0 arrays, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) gegeben.

Das Auslesen der Microarrays und alle weiteren hierzu vorbereitenden Schritte wurden im Kompetenzzentrum für Fluoreszenz Bioanalytik in Regensburg durchgeführt. Die Auslesung der Daten wurde mit der GeneChip Operating Software von Affymetrix (GCOS 1.2) vorge-

## Material und Methoden

nommen. Die weitere Datenanalyse erfolgte mit der TIGR Multi Experiment Viewer Software Version 3.1 (TMEV, <http://www.tigr.org>).

### 3.4.2 Gefrierdünnsschnitte

Aus den rechten Hemisphären wurden Gefrierdünnsschnitte angefertigt. Der erste Schritt bestand dabei im Fixieren der rechten Hemisphären. Hierzu wurden die Präparate bei 4°C über 48 Stunden in 4%ige phosphatgepufferte Formaldehyd-Lösung (Roth, Karlsruhe, D) gegeben. Nach gründlichem Abspülen der Präparate mit 0,01 M phosphatgepuffertes Kochsalzlösung (PBS (phosphate buffered saline); Zusammensetzung: 8,00 g NaCl, 0,20 g KCl, 1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,20 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ad. 1000 ml. Aqua bidest.; mit NaOH und HCl auf pH 7,4 eingestellt) folgte als zweiter Schritt die Kryoprotektion. Dabei wurden die Präparate in Sucroslösungen (Sigma, Taufkirchen, D) aufsteigender Konzentration (15% Sucrose in PBS für 12 Stunden, 30% Sucrose in PBS für 24 Stunden) gegeben, um dem Gewebe osmotisch Wasser zu entziehen und die Zellen so vor einer Schädigung durch den Einfrierprozess zu schützen. Nach erneutem Abspülen mit PBS wurden die Hemisphären in einer rechteckigen Aluminiummatrix in TissueTec (Sakara, Torrance, CA, USA) eingebettet und auf Trockeneis eingefroren. Die Aufbewahrung vor der weiteren Verarbeitung erfolgte bei -80°C.

Die so vorbereiteten rechten Hemisphären wurden im Kryostat (1720 digital, Leica, Bensheim, D) bei -14 °C mit einer Schichtdicke von 17µm in der Koronarebene geschnitten. Je drei aufeinanderfolgende Gewebeschnitte wurden auf einen positiv geladenen Objektträger aufgetragen (Superfrost Plus Objektträger, Erie Scientific Company, Portsmouth, NH, USA). Der Schnittwinkel wurde an den stereotaktischen Rattenhirnatlas angeglichen [Paxinos and Watson, 2004], um die Schnitte bei der späteren Arbeit anhand der stereotaktischen Koordinaten einordnen zu können und vergleichbar zu machen. Es wurden hierzu in regelmäßigen Abständen Färbungen der Schnitte durchgeführt und mit den Schnittebenen des Atlanten verglichen, um anschließend gegebenenfalls eine Winkelkorrektur durchzuführen. Die Färbungen bestanden aus einer Nissl-Färbung und einer Zellkernfärbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI). Außerdem wurde mit FluoroMyelin (Invitrogen, Karlsruhe, D) die Myelinstruktur dargestellt. Die Gefrierdünnsschnitte wurden 16 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und dann bei -80°C aufbewahrt.

### **3.5 Immunhistologie**

Zur anatomischen Einordnung der koronaren Gefrierdünnschnitte wurden von jedem 30. Präparat eines Tieres Nissl- und DAPI-Färbungen angefertigt. Diese wurden anhand des Paxinos Watson Rat Brain Atlas [Paxinos and Watson, 2004] den stereotaktischen Koordinaten zugeordnet. Für die histologischen Untersuchungen wurden korrespondierende Koronarschnitte 4,80 bis 3,00 mm dorsal des Bregma ausgesucht.

Um systematische Fehler zu vermeiden, wurden bei der Epitopdemaskierung und den Färbeprotokollen jeweils Präparate aus allen vier Untersuchungsgruppen in einer Serie behandelt. Außerdem wurden in jeder Serie Negativkontrollen mitgeführt, bei denen der Primär- oder der Sekundärantikörper weggelassen wurde. Alle nachfolgend aufgeführten Färbeprotokolle wurden abschließend mit einer Zellkernfärbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) ergänzt. Dies diente sowohl der Darstellung der anatomischen Strukturen als auch der Erfassung der Gesamtzellzahl.

#### **3.5.1 Immunfluoreszenzhistologie (PCNA, GFAP, NeuN, Caspase 3)**

Es wurden Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen von PCNA/ GFAP, NeuN/ GFAP sowie Caspase 3/ NeuN durchgeführt. Die optimale Konzentration der Primär- und Sekundärantikörper, sowie die notwendigen vorbereitenden Schritte wurden im Rahmen dieser Arbeit zu standardisierten Färbeprotokollen etabliert.

##### *3.5.1.1 Primäre Detektion*

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Färbungen und Kofärbungen war vor Auftragen der Primärantikörper eine standardisierte hitzebasierte Epitopdemaskierung (HIER, heat induced epitope retrieval) notwendig. Für die anschließende Darstellung von GFAP zeigte sich in den Etablierungen, dass die Anwendung von Hitze und gleichzeitiger Applikation einer auf pH 6 eingestellten Citratlösung (Zusammensetzung: 3,06g Citrat, 1000 ml Aqua dest., 0,5 ml Tween 20; mit NaOH und HCl auf pH 6 eingestellt) eine ideale Epitopdemaskierung versprach. Cleaved Caspase 3 dagegen konnte nur nach Epitopdemaskierung mit einem auf pH 9 eingestellten Tris-EDTA-Puffer (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Ethylendiamintetraacetat, Zusammensetzung: 1,21g Tris Base, 0,37g EDTA, 1000 ml Aqua dest., 0,5 ml Tween 20) anschließend fluoreszenzmikroskopisch gut dargestellt werden. Die Darstellung von NeuN gelang in der Doppelfärbung mit GFAP nach pH 6-Epitopdemaskierung ebenso gut wie in der Doppelfärbung mit Caspase 3 nach pH 9-Epitopdemaskierung.

## Material und Methoden

Für die oben genannte hitzebasierte Epitopdemaskierung wurden jeweils 8 Objektträger in einem Glasbehälter (Joplin Jar) mit entweder Citrat- oder Tris-EDTA-Lösung für 2 x 5 Minuten bei einer Leistung von 750 Watt in der Mikrowelle erhitzt. Um ein langsames Abkühlen ohne große Temperaturunterschiede zu gewährleisten, wurden die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur in o.g. Behältnis zusammen mit der Retrievallösung belassen. Nach vorsichtigem Herausnehmen der Objektträger aus der Retrievallösung wurde Rest-Flüssigkeit um die Präparate herum mit einem ausreichenden Sicherheitsabstand sorgfältig abgetupft. Um ein Vermischen der Antikörperlösungen zu vermeiden, wurden die einzelnen Hirnschnitte auf dem Objektträger mit einer hydrophoben Barriere (Immunopen, Calbiochem, Darmstadt, D) umrandet. Des Weiteren wurde zur Verblindung die Gruppenzugehörigkeit der Gewebepräparate unkenntlich gemacht. Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, wurden die Feinschnitte in einem weiteren vorbereitenden Schritt mit 4 % standardisiertem Ziegen Serum (in PBS-T (PBS mit 0,2% Triton X-100, (Roth)) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden jeweils 80µl der Primärantikörpermischung auf einen Gewebedünnschnitt appliziert. Die Primärantikörperlösung wurde mit PBS-T und einem Volumenprozent Ziegen Serum hergestellt. Die Konzentrationen der einzelnen Primärantikörper sind in Tabelle 3.2 aufgeführt. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht.

**Tabelle 3.2:** Spezifizierung und Konzentrationen der Primärantikörper

Antigen	Wirtsspezies	mono-/polyklonal	Konzentration	Hersteller
PCNA	Maus	monoklonal	1:1250	Chemicon International, Hampshire, UK
GFAP	Kaninchen	polyklonal	1:1000	DAKO Cytomation, Dänemark
NeuN	Maus	monoklonal	1:1000	Chemicon
Caspase-3 (Cleaved)	Kaninchen	polyklonal	1:100	Cell Signaling, MA, USA

### *3.5.1.2 Sekundäre Detektion*

Der Überstand der Primärantikörpermischung wurde am Folgetag vorsichtig abgeschüttet und die Schnitte fünf Mal für fünf Minuten in PBS-T (phosphatgepufferter Kochsalzlösung mit

## Material und Methoden

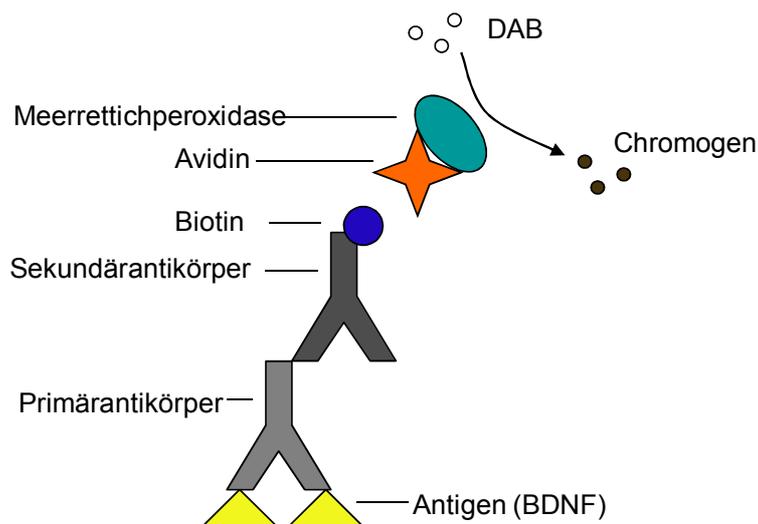
0,2% Triton X-100) gewaschen, ein sechster Waschschrift wurde mit PBS ohne Triton-X durchgeführt um die Funktionalität der hydrophoben Barrieren vor Applikation des Sekundärantikörpers wiederherzustellen. Dann wurde das Sekundär-Antikörper-Gemisch (Spezifizierung und Konzentrationen s. Tabelle 3.3) aufgetragen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Die Sekundär-Antikörper wurden mit PBS-T unter Zusatz von 1% Ziegen Serum gemischt. Ab Zugabe der Fluorochrom-markierten Sekundärantikörper erfolgten nun alle weiteren Schritte lichtgeschützt. Nach einem 5-minütigem Waschschrift in PBS-T wurde zusammen mit dem zweiten Waschschrift eine Zellkernfärbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) durchgeführt. Hierzu wurde DAPI mit einer Konzentration von 1:10.000 in PBS-T gelöst und die Schnitte darin für 10 Minuten inkubiert. Abschließend erfolgte je ein Waschschrift à 5 Minuten mit PBS und mit PBS-T. Um ein Ausbleichen der Präparate zu verhindern, wurden diese vor Aufbringen der Deckgläser (50 x 25 mm, Roth, Karlsruhe, D) in Pro Long Gold Antifade-Reagent (Invitrogen) eingebettet. Kontrollpräparate bei denen der Primär- oder der Sekundär-Antikörper nicht appliziert wurden, zeigten keine spezifische Färbung.

**Tabelle 3.3:** Spezifizierung und Konzentrationen der Sekundärantikörper

Detektion	Antigen	Wirtspezies	Konzentration	Hersteller	Markierung
PCNA	Maus	Esel	1:200	Jackson Immuno Research Laboratories, Westgrove, PA, USA	Cy3 (Carbocyanin)
GFAP (PCNA/GFAP Doppelfärbung)	Kaninchen	Esel	1:400	Jackson Immuno Research	Cy2 (Indocarbocyanin)
GFAP (NeuN/GFAP Doppelfärbung)	Kaninchen	Ziege	1:200	Molecular Probes, Eugene, OR, USA	Alexa Fluor 488
NeuN	Maus	Ziege	1:200	Molecular Probes	Alexa Fluor 546
Caspase 3 (Cleaved)	Kaninchen	Ziege	1:200	Molecular Probes	Alexa Fluor 488

### 3.5.2 Immunhistochemie (BDNF)

Als Primärantikörper wurde ein polyklonaler Kaninchen anti-BDNF-Antikörper (Chemicon) in der Konzentration 1: 100 verwandt. Die sekundäre Detektion erfolgte mit dem NOVADetect HRP/DAB Standard StreptAB System, Ziege anti-Kaninchen (Dianova, Hamburg, D). Hierbei handelt es sich um eine immunhistochemische Färbemethode. Der Sekundärantikörper liegt dabei in biotinylierter Form vor. Zur Sichtbarmachung des Sekundärantikörpers wird zunächst mit Meerrettichperoxidase markiertes Streptavidin hinzugegeben. Streptavidin ist ein Protein, das von Bakterien der Spezies *Streptomyces avidinii* produziert wird und eine hohe Affinität zu Biotin hat. Die Streptavidin-Biotin-Bindung ist eine der stärksten bekannten nicht kovalenten biologischen Bindungen. Im letzten Schritt wird für eine definierte Zeitspanne das Substrat Diaminobenzidin (DAB) hinzugegeben. Dieses wird von der Meerrettichperoxidase, die an das Streptavidin konjugiert ist, in ein nicht lösliches braunes Chromogen umgewandelt (s. Abbildung 3.3).



**Abbildung 3.3:** schematische Darstellung der immunhistochemischen Detektion von BDNF. Der Streptavidin-Peroxidase-Komplex bindet an den biotinylierten Sekundärantikörper. Das hinzugegebene Diaminobenzidin (DAB) wird von der Peroxidase zu einem unlöslichen braunen Farbstoff umgewandelt.

## Material und Methoden

### *3.5.2.1 Primäre Detektion*

Im Einzelnen war das Färbeprotokoll wie folgt: Auch zur Detektion von BDNF war vor Applikation des Primärantikörpers eine Epitopfreilegung erforderlich. Hierzu wurde wie in Abschnitt 3.5.1.1 für die Immunfluoreszenz beschrieben eine hitzebasierte Antigendemaskierung mit einer auf pH 6 eingestellten Citratlösung (Zusammensetzung: 3,06g Citrat, 1000 ml Aqua dest., 0,5 ml Tween 20; mit NaOH und HCl auf pH 6 eingestellt) durchgeführt. Für die vorbereitenden Blockierungsschritte und die sekundäre Detektion einschließlich des Sekundärantikörpers wurden Fertiglösungen verwendet, die Bestandteil des NOVADetect HRP/DAB Standard StreptAB Systems waren. Nach Abkühlen der Präparate und Auftragen der hydrophoben Barrieren wurde entsprechend den Herstellerangaben für 15 Minuten bei Raumtemperatur ein H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Block (Fertiglösung des NOVADetect HRP/DAB Standard StreptAB Systems) durchgeführt. Nach drei 5-minütigen Waschschritten (2 x PBS-T, 1 x PBS) wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur der Ultra-V-Block (Fertiglösung) einwirken gelassen. Danach erfolgte je ein 5-minütiger Waschschriff mit PBS-T und PBS. Nun wurde der Primärantikörper gegen BDNF aus Kaninchen in einer Konzentration von 1:100 auf die Präparate aufgetragen und bei 4°C über Nacht inkubiert. Der Primärantikörpermischung wurde mit PBS-T unter Zusatz von 1% Ziegen Serum hergestellt.

### *3.5.2.2 Sekundäre Detektion*

Am Folgetag wurden zunächst fünf 5-minütige Waschschriffe mit PBS-T und ein 5-minütiger Waschschriff mit PBS durchgeführt. Dann wurde der biotinylierte Sekundärantikörper für 10 Minuten bei Raumtemperatur einwirken gelassen. Nach vier 5-minütigen Waschschriffen (3 x PBS-T, 1 x PBS) wurde mit Peroxidase markiertes Streptavidin (Fertiglösung) für 10 Minuten aufgetragen. Es folgten erneut vier 5-minütige Waschschriffe (3 x PBS-T, 1 x PBS). Dann wurden 1000 µl Substrat mit 2 Tropfen Chromogen auf die Präparate gegeben und für 13,5 Minuten dort belassen. Die Dauer der Peroxidase-DAB-Reaktion bestimmt die Färbeintensität. Die Reaktionsdauer wurde daher für jeden einzelnen Objektträger eingehalten, indem die Reaktion in derselben Präparat-Reihenfolge beendet wurde, in der sie begonnen wurde. Es folgten vier 5-minütige Waschschriffe in PBS-T, davon der zweite mit gleichzeitiger Zellkernfärbung mit DAPI (s. Abschnitt 1.1.1.1). Anschließend wurden die Präparate in Mobi Glow (Mo Bi Tec, Göttingen, D) eingebettet und mit Objektträgern (50 x 25 mm, Roth, Karlsruhe, D) bedeckt. Auch in dieser immunhistochemischen Färbung wurden jeweils Kontrollpräparate mitgeführt, bei denen der Primär oder der Sekundär-Antikörper weggelassen wurden. Diese zeigten keine spezifische Färbung.

### 3.6 Bildanalyse

#### 3.6.1 Digitalisierung der Zielregionen

Nach abgeschlossenem Färbeprotokoll wurden die Präparate an einem Zeiss Axioplan 2 Mikroskop (Carl Zeiss, Jena, D) mit angeschlossener Digitalkamera (ProgRes C10+, Jenoptik, Jena, D) untersucht. Um ein Ausbleichen der Farbstoffe zu vermeiden, wurden die Präparate zunächst mit standardisierten Belichtungseinstellungen digital fotografiert und erst im Anschluss daran als digitale Bilddatei ausgewertet. Zum Aufsuchen der anatomischen Zielregion, wurde zunächst mit dem Blaufilter die DAPI-Zellkernfärbung des Präparats dargestellt und die betreffende Region eingestellt.

Die Erfassung der histochemischen BDNF-Färbung erfolgte im Hellfeld des Mikroskops unter sorgfältig konstant gehaltenen Belichtungsbedingungen. Dabei wurde das 5x-Objektiv verwendet. Anatomische Zielregionen waren die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus mit angrenzender polymorpher Zellschicht (Hilus), CA3 und CA1.

Die Fluoreszenzdarstellungen von PCNA/ GFAP, NeuN/ GFAP und Caspase 3/ NeuN wurden mit dem 10x-Objektiv aufgenommen. Der Ausschnitt wurde so gewählt, dass die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus, die polymorphe Zellschicht und die angrenzende CA3 dargestellt wurden. Pro Tier und Dreifachfärbung wurde von der Zielregion eine Serie von drei hochauflösenden Bildern angefertigt. Zur Darstellung der PCNA- bzw. NeuN-positiven Zellen wurde der Rotfilter verwendet, die GFAP- und Caspase 3-Färbung wurde mit dem Grünfilter und die DAPI-Zellkernfärbung mit dem Blaufilter erfasst. Die Eigenschaften der Fluorochrome sowie die verwendeten Filter sind in Tabelle 3.4 dargestellt.

**Tabelle 3.4:** Für die Fluoreszenzmikroskopie verwendete Farbstoffe und Filter

Farbstoff	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum	Anregungs-Sperr-Filter
DAPI	358 nm	454 nm	A (340 – 380 nm)
Cy2	489 nm	508 nm	I3 (450 – 490 nm)
Alexa Fluor 488	495 nm	519 nm	I3 (450 – 490 nm)
Cy3	549 nm	570 nm	Y3 (535 – 550 nm)
Alexa Fluor 546	556 nm	573 nm	Y3 (535 – 550 nm)

### 3.6.2 Auswertung der Färbungen

Für die Bildanalyse wurde das Programm NIH ImageJ Version 1.37c (Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) verwendet.

Mittels eines skalierten Objektträgers wurde ein Bild mit einem 100  $\mu\text{m}$ -Balken erstellt. Anhand dieses Balkens wurde in ImageJ die Relation Pixel zu  $\mu\text{m}$  gemessen und in die „Set Scale“-Funktion des Programms eingegeben. Anschließend konnte die Fläche des analysierten Zählareals (Region of Interest, ROI) in  $\mu\text{m}^2$  und die Zelldurchmesser in  $\mu\text{m}$  angegeben werden.

Als Maß für die Proliferationsrate in der subgranulären Schicht des Hippocampus wurden alle stark PCNA-positiven Zellen sowie alle Cluster PCNA-positiver Zellen in dieser Schicht gezählt in Relation zu der Länge der Körnerzellschicht gesetzt.

Zur Auswertung der BDNF-Expression im Hippocampus wurden je mindestens zwei Messfelder in repräsentative Areale des Gyrus dentatus, der polymorphen Zellschicht sowie der CA3 und CA1 gelegt und der mittlere Grauwert in diesem Feld gemessen.

Zur Bestimmung der Astrozytendichte im Hippocampus wurden in die NeuN/ GFAP-Präparate je vier rechteckige Messfelder (50 x 200  $\mu\text{m}$ ) in die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus sowie in die subgranuläre Zone des Hippocampus gelegt. Das Bild wurde daraufhin binarisiert und mit einem „area fraction“-Algorithmus des Bildanalyseprogramms die GFAP-Flächendeckung innerhalb der Messfelder bestimmt. Außerdem wurde nach Einzeichnung der anatomischen Grenzen die Fläche der polymorphen Zellschicht mit einem Polygon-Zeichenwerkzeug definiert und ausgemessen. Auch in dieser Fläche wurde nach Binarisieren des Bildes die GFAP-Flächendeckung gemessen.

Bei der Caspase/ NeuN-Kofärbung kam neben einem automatisierten Zählalgorithmus auch eine manuelle Zellzählung zum Einsatz. Die Gruppenzugehörigkeit der Präparate wurde vor Zellzählung unkenntlich gemacht. Wie bei der NeuN/ GFAP-Färbung wurden anhand der Neuronenfärbung (NeuN) zunächst die anatomischen Zielregionen bestimmt. Diese waren die subgranuläre Zone des Gyrus dentatus und die polymorphe Zellschicht. Gezählt wurden die NeuN-positiven Zellen, die Caspase-3-positiven Zellen, die Zellen, die sowohl Caspase-3- als auch NeuN-positiv waren, sowie die Zellkerne insgesamt. Zusätzlich kam ein automatisierter Zählalgorithmus zum Einsatz, hierfür wurde jeweils das grüne (Caspase), rote (NeuN) und blaue (DAPI) Bild in ein binäres (schwarz-weiß) Bild umgewandelt. Mit einem Wasserscheidenalgorithmus konnte das Programm dann nah aneinanderliegende Zellen trennen und die Partikel automatisiert zählen. Nach mehrfachem Abgleich mit der manuellen Zählweise, wurde

## Material und Methoden

für die Zellkernzählung ein unterer Grenzwert von  $8\mu\text{m}^2$  und für die Neuronenzählung ein unterer Grenzwert von  $20\mu\text{m}^2$  eingestellt. Außerdem wurden automatisiert die durchschnittliche Größe der NeuN-positiven Zellen und der Zellkerne sowie die Fläche innerhalb der ROI in  $\mu\text{m}^2$  ausgemessen.

### **3.7 Statistik**

Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde mit dem Programm SPSS Version 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Für jeden Parameter wurden im Rahmen der deskriptiven Statistik der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts berechnet. Die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen und der Verhaltenstests wurden mit dem nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Test (Rangvarianzanalyse) auf Gruppenunterschiede untersucht. Dabei werden den Werten, die eine Variable in den Untersuchungsgruppen angenommen hat, Ränge zugeordnet. Getestet wird dann die Nullhypothese gleicher Grundgesamtheiten, d.h. die Rangplätze sind zufällig über alle Gruppen verteilt, gegen die Alternative, dass mindestens eine Gruppe nicht dieser Grundgesamtheit angehört, die Rangplätze also in mindestens einer Gruppe ungleich verteilt sind. Das Signifikanzniveau wurde für alle Untersuchungen bei  $\alpha = 0,05$  festgelegt. Um zwei Gruppen einzeln miteinander zu vergleichen, wurde anschließend der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Auch dieser Test basiert auf der Methode, den Werten Ränge zuzuordnen. Die Ergebnisse des Genarays wurden zunächst mit dem Levene's Test auf Varianzgleichheit untersucht. Im Anschluss erfolgte ein t-Test für unverbundene Stichproben, mit dem die Gruppen einzeln gegeneinander auf Gruppenunterschiede untersucht wurden. Außerdem wurde eine Korrelationsanalyse nach Spearman zwischen den Ergebnissen der Immunhistologie und denen der Verhaltenstests durchgeführt.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Immunhistologie**

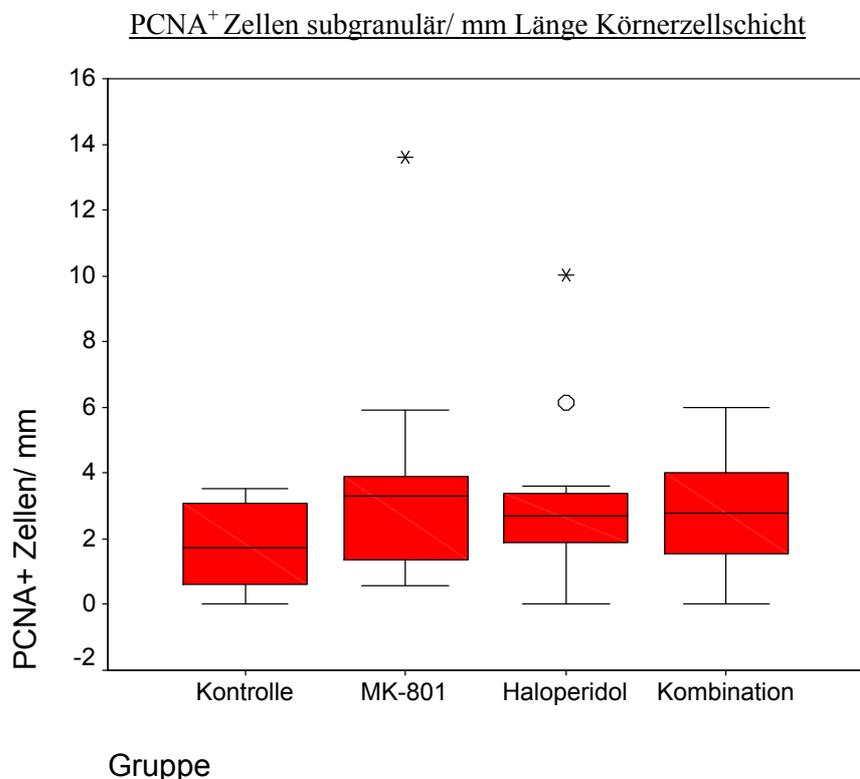
#### **4.1.1 Vermehrte Anzahl PCNA-positiver Zellen in der subgranulären Zone des Hippocampus der mit MK-801 behandelten Tiere**

Im Hippocampus befindet sich die große Mehrheit der PCNA-positiven Zellkerne in der Grenzzone zwischen Granularzellschicht und der polymorphen Zellschicht. Diese Zone wird auch als subgranuläre Zellschicht bezeichnet. Bei PCNA handelt es sich um ein Enzym des Replikationskomplexes. Das Vorliegen eines für PCNA positiven Signals zeigt an, dass die jeweilige Zelle im Begriff ist, in die Mitose einzutreten. Die PCNA-positiven Zellen als sich teilende Zellen traten entsprechend vor allem in Zellgruppen (Clustern) auf. In der CA1, CA2 und CA3-Zone wurden nur sporadisch PCNA-positive Zellen dargestellt. Einzelne, disseminierte PCNA-positive Zellen stellten sich in der polymorphen Zellschicht und sehr selten in der Granularzellschicht dar.

Gezählt wurde die Anzahl PCNA-positiver Zellen entlang der subgranulären Schicht, welche als ein Ursprungsort adulter Neurogenese bekannt ist. Die Maßeinheit war entsprechend „Zellzahl/ mm Länge der Körnerzellschicht“. Die Anzahl PCNA-positiver Zellen in der subgranulären Zone pro mm Körnerzellschicht betrug in allen untersuchten Tieren gemittelt 2,89 ( $\pm 2,51$ ;  $n=46$ ). In der Kontrollgruppe betrug die Anzahl PCNA-positiver Zellen subgranulär 1,83/mm ( $\pm 0,37$ ). In der Gruppe der mit MK-801 behandelten Tiere waren es hingegen doppelt so viele (3,68/mm  $\pm 1,01$ ). Vergleich man die MK-801-Gruppe mit der Kontrollgruppe mittels Mann-Whitney-U-Test, so zeigte sich mit  $p=0,038$  ein Gruppenunterschied. In der Haloperidolgruppe waren 3,26 Zellen/mm ( $\pm 0,82$ ) PCNA-positiv und in der Gruppe der MK-801- und Haloperidol-Koapplikation waren es 2,83 Zellen/mm ( $\pm 0,56$ ). Der Kruskal-Wallis-Test über alle vier Behandlungsgruppen blieb über dem Signifikanzniveau ( $p = 0,270$ ). Da ein möglicher und auch biologisch sinnvoller Versuchsaufbau mit allein der Kontroll- und der MK-801-Gruppe einen signifikanten Gruppenunterschied im Mann-Whitney-U-Test gezeigt hätte, wurde die unterschiedliche Verteilung der Werte zwischen MK-801- und Kontrollgruppe zumindest als starker Trend gewertet. In Abbildung 4.1 sind diese Ergebnisse mittels Boxplots (Box-and-whiskers-Plots) grafisch dargestellt. Eine beispielhafte immunfluoreszenzmikroskopische Dar-

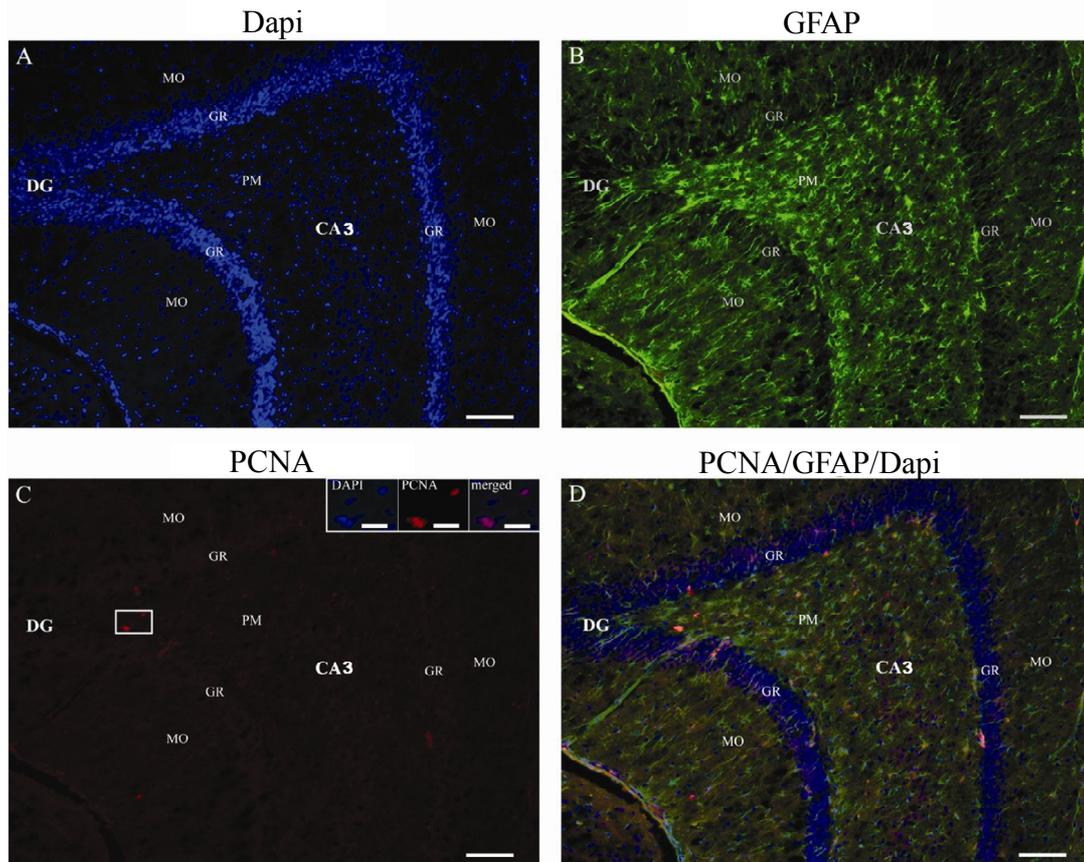
## Ergebnisse

stellung des Gyrus dentatus des Hippocampus mittels Dreifachfärbung (PCNA, GFAP und Zellkernfärbung) zeigt die Abbildung 4.2.



**Abbildung 4.1** Anzahl PCNA-positiver Zellen in der subgranulären Schicht des Gyrus dentatus pro mm Körnerzellschicht innerhalb der vier Versuchsgruppen; grafische Darstellung der Werte mittels Boxplots (Box-and-whiskers-Plots). Hierbei stellen die obere Begrenzung eines Kastens (Box) das 75%-Quantil und die untere Begrenzung das 25%-Quantil dar. Die Linie innerhalb des Kastens entspricht dem Median (50%-Quantil). Die Linien außerhalb der Box (Whiskers) repräsentieren die höchsten und die niedrigsten Werte, die noch nicht als Ausreißer (°) oder Extremwerte (\*) gelten. Nach nicht signifikantem Kruskal-Wallis-Test über alle Gruppen, zeigte sich im Mann-Whitney-U-Test eine tendenziell erhöhte Anzahl PCNA-positiver Zellen in der MK-801-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe ( $p_{(MK-801 \text{ vs Kontrolle})} = 0,038$ ).

## Ergebnisse



**Abbildung 4.2** beispielhafte immunfluoreszenzmikroskopische PCNA-Darstellung im Gyrus dentatus des Hippocampus: Zellkernfärbung mittels DAPI (A), GFAP (B), PCNA (C). In Bild D sind die mit dem Rot (PCNA)-, Blau (DAPI)- und Grün (GFAP)-Filter aufgenommenen Bilder überlagert (RGB-merge). GR= Körnerzellschicht des Gyrus dentatus (DG), MO = Molekularzellschicht des Gyrus dentatus, PM = Polymorphe Zellschicht des Gyrus dentatus. Die Messbalken in den Bildern A bis D entsprechen 100 $\mu$ m. Die Messbalken in den 3 Vergrößerungen in Bild C entsprechen 25 $\mu$ m.

### 4.1.2 Verminderte Dichte GFAP-positiver Zellen in der subgranulären Zone der mit MK-801- und Haloperidol-Koapplikation behandelten Tiere

GFAP kommt innerhalb des ZNS vor allem als Intermediärfilament im Zytoplasma von reifen Astrozyten vor, jedoch auch in einigen glialen Zellen, die Stammzeleigenschaften besitzen (radiale Glia). Das mit dem Grünfilter aufgenommene Bild des jeweiligen Präparats der NeuN-/GFAP-Färbung stellt daher reife Astrozyten und radiale Glia mit ihren Ausläufern dar. Die Astrozytdichte war in der polymorphen Zellschicht höher als in der Körnerzellschicht. Die höchste Dichte und GFAP-Intensität wiesen die Astrozyten in der subgranulären Zone auf. Die

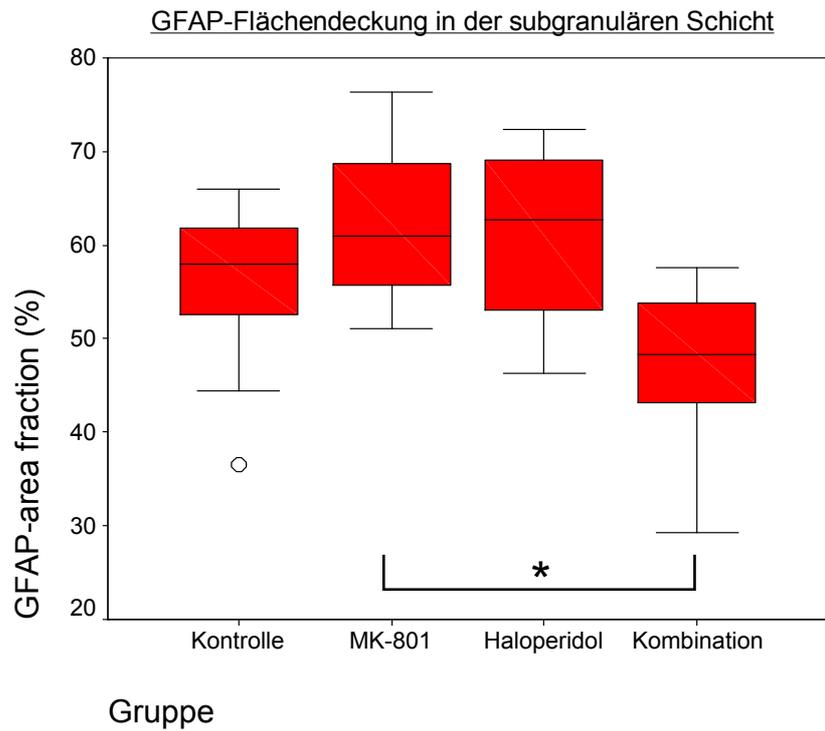
## Ergebnisse

Ausläufer der Astrozyten waren in der subgranulären Zone des Gyrus dentatus eher radiär angeordnet, dagegen in der Körnerzellschicht eher parallel zueinander und orthogonal zur Körnerzellschicht. Die mittlere Flächendeckung der Astrozyten betrug in der subgranulären Zone 55,86% (Standardabweichung 10,59), in der Körnerzellschicht 32,64% (Standardabweichung 8,75) und in der polymorphen Zellschicht 38,38% (Standardabweichung 7,92).

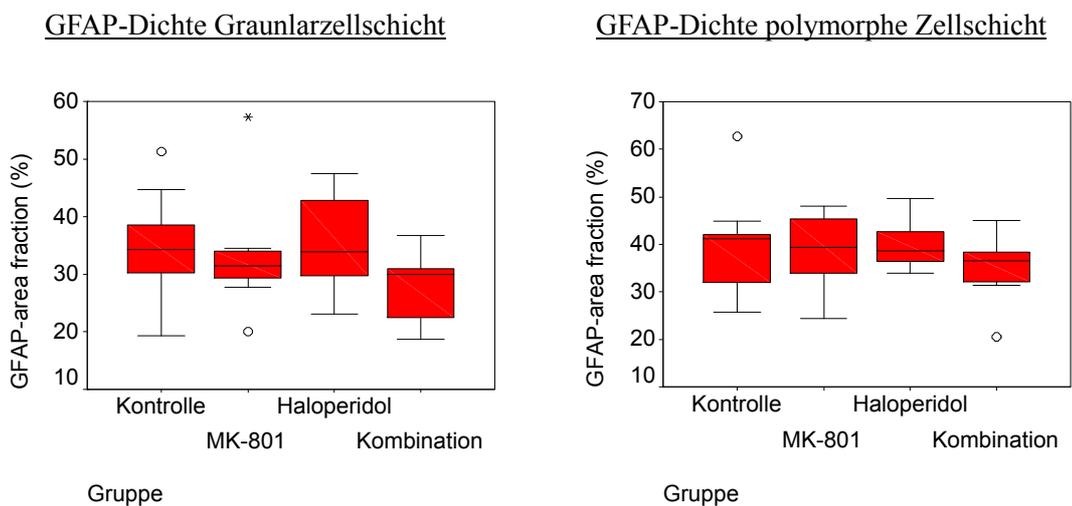
Der Mittelwert der GFAP-Flächendeckung in der Körnerzellschicht betrug in der Kontrollgruppe  $35,10\% \pm 8,95$  (n=10), in der mit MK-801 behandelten Gruppe  $33,35\% \pm 10,66$  (n=8), in der mit Haloperidol behandelten Gruppe  $35,44\% \pm 8,46$  (n=8) und in der Gruppe, die eine Koapplikation von MK-801 und Haloperidol erhalten hatte  $27,85\% \pm 5,99$  (n=11). Die Dichte GFAP-positiver Glia in der subgranulären Schicht betrug in der Kontrollgruppe  $55,69\% \pm 9,35$ , in der Gruppe der MK-801-Applikation  $62,27\% \pm 8,74$  und in der Gruppe der Haloperidol-Applikation  $61,06\% \pm 9,77$ . In der Gruppe, die eine MK-801- und Haloperidol-Koapplikation erhalten hatte, war die GFAP-Flächendeckung subgranulär nur bei  $47,58\% \pm 8,66$ . In der polymorphen Zellschicht betrug die GFAP-area fraction in der Kontrollgruppe  $40,21\% \pm 3,14$ , in der MK-801-Gruppe  $38,69\% \pm 2,89$ , in der Haloperidolgruppe  $40,03\% \pm 2,04$  und in der Gruppe der MK-801 und Haloperidol-Koapplikation  $34,76\% \pm 2,26$ . Die immunfluoreszenzmikroskopische GFAP-Darstellung im Gyrus dentatus des Hippocampus sowie die Anordnung der Messfelder werden beispielhaft in Abbildung 4.5 gezeigt.

Der Kruskal-Wallis-Test zeigte für die Parameter GFAP-Flächendeckung in der Körnerzellschicht und GFAP-Flächendeckung in der polymorphen Zellschicht keine Hinweise auf Unterschiede zwischen den vier Behandlungsgruppen (Körnerzellschicht  $p=0,140$ , polymorphe Zellschicht  $p=0,420$ ) (s. Abbildung 4.4). Für die Variable GFAP-Flächendeckung in der subgranulären Zone lag die Signifikanz jedoch mit  $p=0,009$  unterhalb des vorher festgelegten Signifikanzniveaus. Die Gruppen wurden anschließend für diese Variable einzeln mit dem Mann-Whitney-U-Test gegeneinander verglichen. Zwischen MK-801-Gruppe und Kontrollgruppe sowie zwischen Haloperidolgruppe und Kontrollgruppe bestanden keine signifikanten Unterschiede ( $p_{\text{MK-801 vs Kontrolle}} = 0,214$ ;  $p_{\text{Haloperidol vs Kontrolle}} = 0,248$ ). Auch der Vergleich zwischen Kontrollgruppe und der Gruppe, die eine MK-801- und Haloperidol-Koapplikation erhalten hatte, blieb mit  $p=0,057$  über dem Signifikanzniveau. Zwischen der allein mit MK-801 behandelten und der mit MK-801 und Haloperidol behandelten Gruppe bestand jedoch mit einer asymptotischen zweiseitigen Signifikanz von  $p=0,004$  ein Gruppenunterschied (s. Abbildung 4.3).

## Ergebnisse

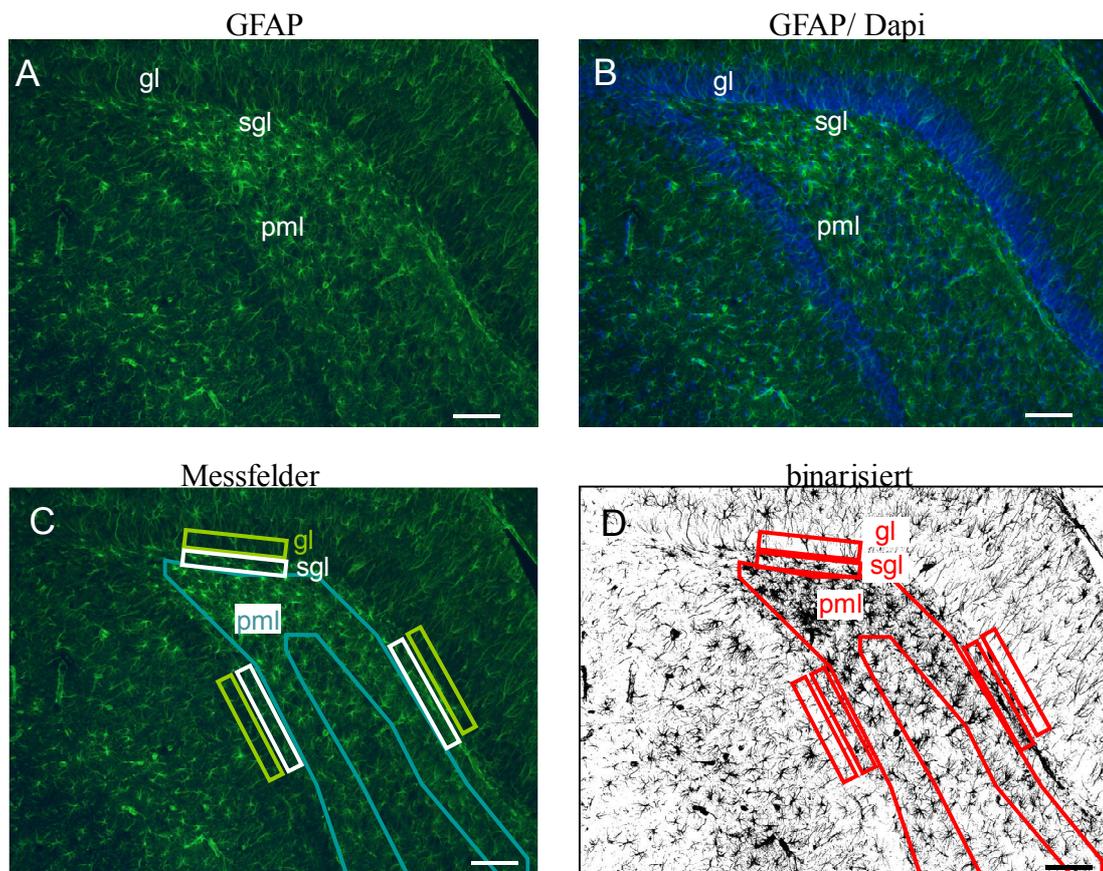


**Abbildung 4.3:** prozentuale GFAP-Flächendeckung in der subgranulären Schicht des Gyrus dentatus; grafische Darstellung der Werte mittels Boxplots. Die GFAP-Flächendeckung in der subgranulären Schicht des Hippocampus ist in der Gruppe der MK-801 und Haloperidol-Koapplikation gegenüber der Gruppe, welche eine alleinige MK-801-Applikation erhalten hatte, vermindert ( $p_{(MK \text{ vs } Kombination)} = 0,004^*$ ).



**Abbildung 4.4:** prozentuale GFAP-Flächendeckung in der Granularzellschicht und in der polymorphen Zellschicht des Gyrus dentatus. In beiden Regionen zeigen sich zwischen den Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede.

## Ergebnisse



**Abbildung 4.5:** Immunfluoreszenzmikroskopische GFAP-Darstellung im Gyrus dentatus des Hippocampus; A: GFAP (glial fibrillary acidic protein), B: Überlagerung von GFAP- und DAPI-(Zellkern)-Färbung; C: exemplarische Darstellung repräsentativer Messfelder in der Körnerzellschicht und in der subgranulären Zone. Die Grenzen der polymorphen Zellschicht wurden mit einem Polygonwerkzeug eingezeichnet; D: binarisiertes Bild als vorbereitender Schritt zur Bestimmung der GFAP-Flächendeckung (area fraction); gl = Körnerzellschicht des Gyrus dentatus, sgl = subgranuläre Zone des Gyrus dentatus, pml = polymorphe Zellschicht des Gyrus dentatus; die Messbalken entsprechen 100µm.

### 4.1.3 Behandlungseffekte auf die neuronale Zellzahl (NeuN) und die Gesamtzellzahl in der polymorphen Schicht des Hippocampus

Die neuronalen Somata waren in der Körnerzellschicht klein und dicht gepackt. In der polymorphen Zellschicht waren die neuronalen Somata dagegen groß und eher spärlich vertreten. Subgranulär und in der polymorphen Zellschicht stellten sich etwas mehr neuronale Zellen im oberen Blatt als im unteren Blatt des Gyrus dentatus dar. Unterschiede in der Verteilung oder Morphologie der Zellen zwischen den Gruppen fielen bei der Untersuchung nicht auf.

## Ergebnisse

In der polymorphen Zellschicht des Gyrus dentatus wurden im Mittel 357 Neurone pro mm<sup>2</sup> (n= 38, Standardabweichung 104,95) gezählt: Der Mittelwert der Gesamtzellzahl in der polymorphen Schicht betrug 1950 pro mm<sup>2</sup> (n=38, Standardabweichung 294,33). Nicht neuronale Zellen waren somit pro Quadratmillimeter im Schnitt mit 1593 Zellen vertreten (n=38, Standardabweichung 261,92). Außerdem wurde ein Neuronalitätsscore als Maß für den Anteil neuronaler Zellen an der Gesamtzellzahl gebildet. Dieser errechnete sich pro Tier aus Neuronenzahl absolut/ Gesamtzellzahl absolut x 100 und gab somit den prozentualen Anteil der Neuronenzahl an der Gesamtzellzahl wieder. Der Mittelwert des Neuronalitätsscores betrug  $18,38 \pm 4,80$ . Die NeuN-positiven Zellen waren durchschnittlich  $111,83\mu\text{m}^2$  groß. Zwischen allen Behandlungsgruppen gab es hinsichtlich der Größe keine Unterschiede (Kruskal-Wallis-Test,  $p=0,818$ ).

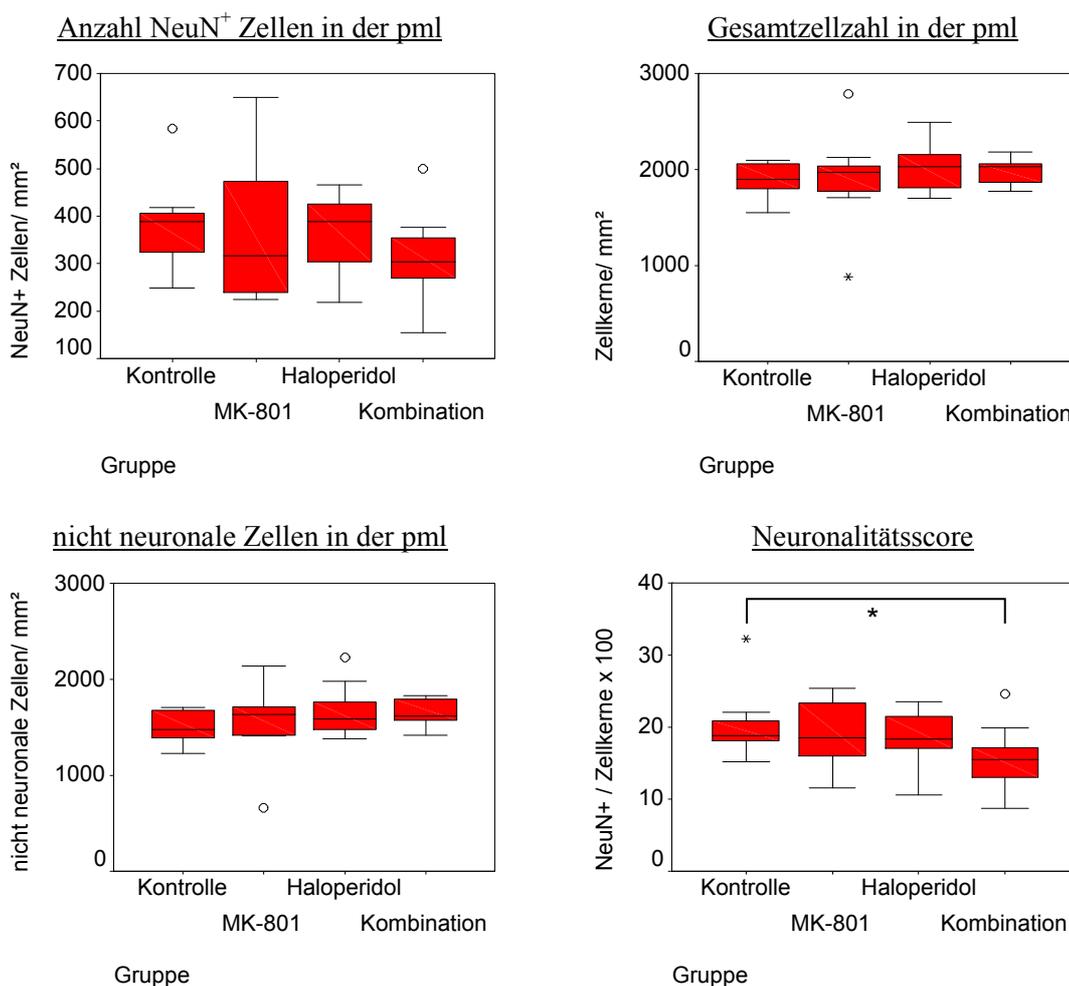
Die Neuronenzahl pro mm<sup>2</sup> betrug in der Kontrollgruppe  $382,41 \pm 31,05$  (n = 9), in der MK-801-Gruppe (MK)  $361,54 \pm 43,93$  (n = 10) und in der mit Haloperidol behandelten Gruppe (HA)  $369,95 \pm 29,58$  (n = 10). In der Gruppe, die mit MK-801 und anschließend mit MK-801 und Haloperidol behandelt wurde (HMK), war die Neuronendichte in der polymorphen Zellschicht gegenüber der Kontrollgruppe tendenziell vermindert ( $310,79 \pm 32,18$ ; n = 9), verfehlte jedoch die Signifikanz im direkten Gruppenvergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test ( $p_{(\text{HMK vs. K})} = 0,070$ ). Vergleich man alle Untersuchungsgruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test miteinander, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den vier Gruppen (Chi-Quadrat 2,790, Freiheitsgrade 3, asymptotische Signifikanz 0,425). Die Gesamtzellzahl pro mm<sup>2</sup> betrug in der Kontrollgruppe im Mittel  $1872,69 \pm 63,94$ , in der mit MK-801 behandelten Gruppe  $1916,98 \pm 147,73$ , in der Haloperidolgruppe  $2027,03 \pm 93,13$  und in der Gruppe nach MK-801 und Haloperidol-Koapplikation  $1967,06 \pm 48,56$ . Auch hier zeigte ein Gruppenvergleich mittels Kruskal-Wallis-Test keinen Unterschied zwischen den vier Behandlungsgruppen (Chi Quadrat 1,507, Freiheitsgrade 3, asymptotische Signifikanz 0,681).

Der Mittelwert nicht neuronaler Zellen war gegenüber der Kontrolle ( $1490,28 \pm 180,69$ ) in der MK-801-Gruppe ( $1555,45 \pm 377,48$ ;  $p_{(\text{MK vs. K})} = 0,288$ ), der Haloperidolgruppe ( $1667,82 \pm 263,19$ ;  $p_{(\text{HA vs. K})} = 0,165$ ) und der Gruppe der MK-801- und Haloperidol-Koapplikation ( $1656,26 \pm 145,82$ ;  $p_{(\text{HMK vs. K})} = 0,058$ ) leicht erhöht, wobei der Vergleich zwischen Koapplikationsgruppe und Kontrollgruppe im Mann-Whitney-U-Test das Signifikanzniveau nur knapp verfehlte ( $p_{(\text{HMK vs. K})} = 0,058$ ). Im Kruskal-Wallis-Test über alle vier Behandlungsgruppen zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,288$ ).

Die relative neuronale Zellzahl (100 x Anzahl Neurone/ Anzahl Zellkerne) nach chronischer MK-801 Gabe ( $18,98 \pm 5,05$ ) wich nicht von der relativen neuronalen Zellzahl unter Kontroll-

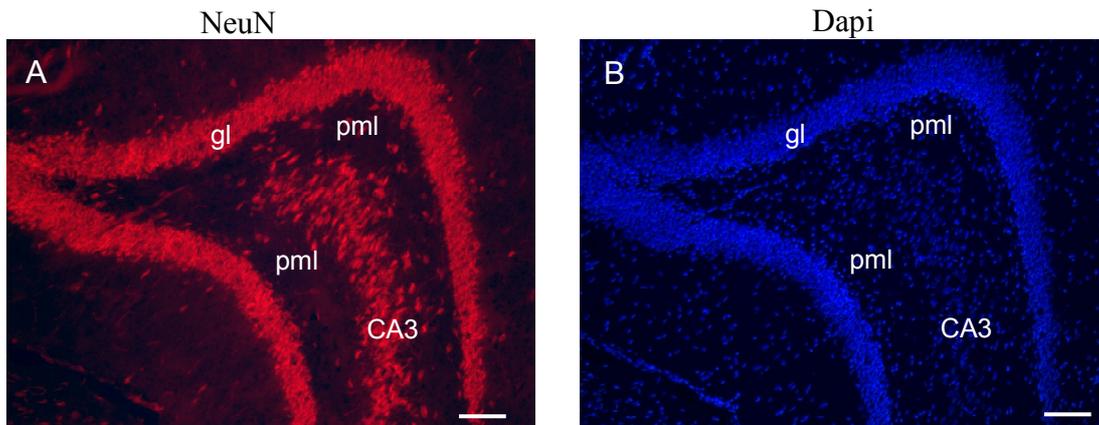
## Ergebnisse

bedingungen ( $20,43 \pm 4,83$ ,  $p = 0,683$  MK vs. Kontrolle) oder nach alleiniger Gabe von Haloperidol ( $18,27 \pm 4,14$ ,  $p = 0,514$  vs. Kontrolle) ab. Jedoch rief die gleichzeitige Verabreichung von MK-801 und Haloperidol eine Reduktion des Anteils neuronaler Zellen an der Gesamtzellzahl (Neuronalitätsscore) in der polymorphen Zellschicht des Gyrus dentatus im Vergleich zur Kontrollgruppe hervor ( $15,5 \pm 4,72$ ;  $p_{(\text{Kombination vs. Kontrolle})} = 0,017$ ). Eine Übersicht über die Verteilung der Werte für die o.g. Parameter geben die Boxplot-Darstellungen in Abbildung 4.6. Eine beispielhafte Immunfluoreszenzmikroskopie von NeuN und DAPI ist in Abbildung 4.7 dargestellt.



**Abbildung 4.6:** grafische Darstellung der Anzahl neuronaler und nicht neuronaler Zellen, der Gesamtzellzahl sowie des Anteils neuronaler Zellen an der Gesamtzellzahl in der polymorphen Zellschicht (pml) des Hippocampus mittels Boxplots. In der Gruppe, die eine MK-801- und Haloperidol-Koapplikation erhalten hatte, war der Anteil neuronaler Zellen an der Gesamtzellzahl (Neuronalitätsscore ( $100 \times \text{Anzahl Neurone} / \text{Anzahl Zellkerne}$ )) in der polymorphen Schicht des Hippocampus reduziert ( $p_{(\text{Kombination vs. Kontrolle})} = 0,017^*$ ).

## Ergebnisse



**Abbildung 4.7:** Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung NeuN-positiver Zellen im Gyrus dentatus des Hippocampus: NeuN (A) und Zellkernfärbung (DAPI, B). gl = Körnerzellschicht, pml = polymorphe Zellschicht; die Messbalken entsprechen 100µm

### 4.1.4 Keine Alterationen der BDNF-Expression innerhalb der untersuchten hippocampalen Strukturen zwischen den Behandlungsgruppen

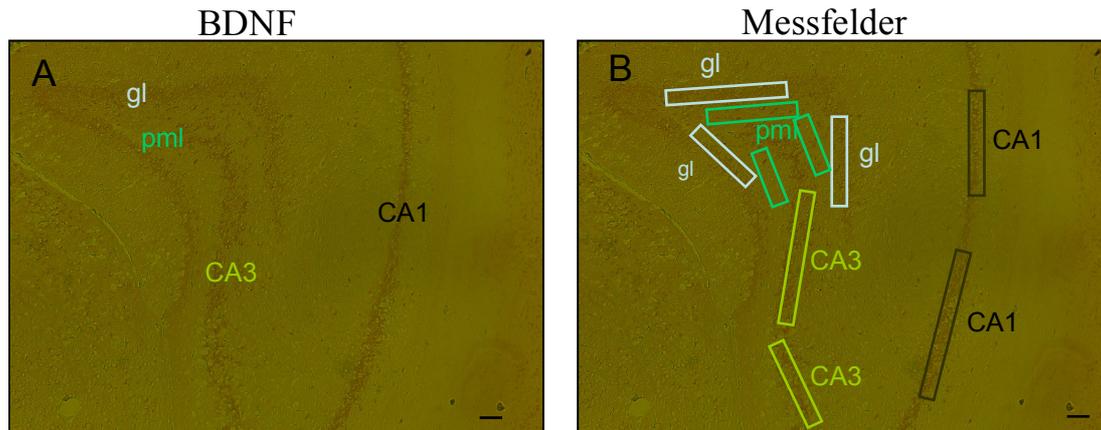
Die BDNF-Intensität war in der CA1 höher als in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus oder der CA3. Die geringste BDNF-Intensität zeigte sich in der polymorphen Zellschicht.

Aufgrund der besonderen Empfindlichkeit der „densitometrischen“ Messmethode, konnten einige Präparate mit Artefakten wie z.B. Faltenbildung im Gewebeschnitt nicht in die Auswertung einbezogen werden. Pro Untersuchungsgruppe wurden Präparate von 7 Tieren ausgewertet. Gemessen wurde der mittlere Grauwert in der Körnerschicht des Gyrus dentatus, der polymorphen Zellschicht sowie CA1 und CA3. Das digitalisierte Bild verfügt über 256 Grautöne, wobei schwarz dem Wert 0 und weiß dem Wert 255 entspricht. Eine intensivere Färbung resultiert daher in einem niedrigeren Grauwert. Zur besseren Anschaulichkeit wurde als Zielvariable der invertierte Grauwert der *regions of interest* (ROI) gewählt, so dass ein höherer Wert eine größere Färbintensität und somit eine höhere BDNF-Expression darstellt:

BDNF-Färbintensität  $B_F = 255 - \text{mittlerer Grauwert ROI}$

Eine beispielhafte immunhistochemische BDNF-Darstellung im Hippocampus sowie die Verteilung der Messfelder sind der Abbildung Abbildung 4.8 zu entnehmen.

## Ergebnisse

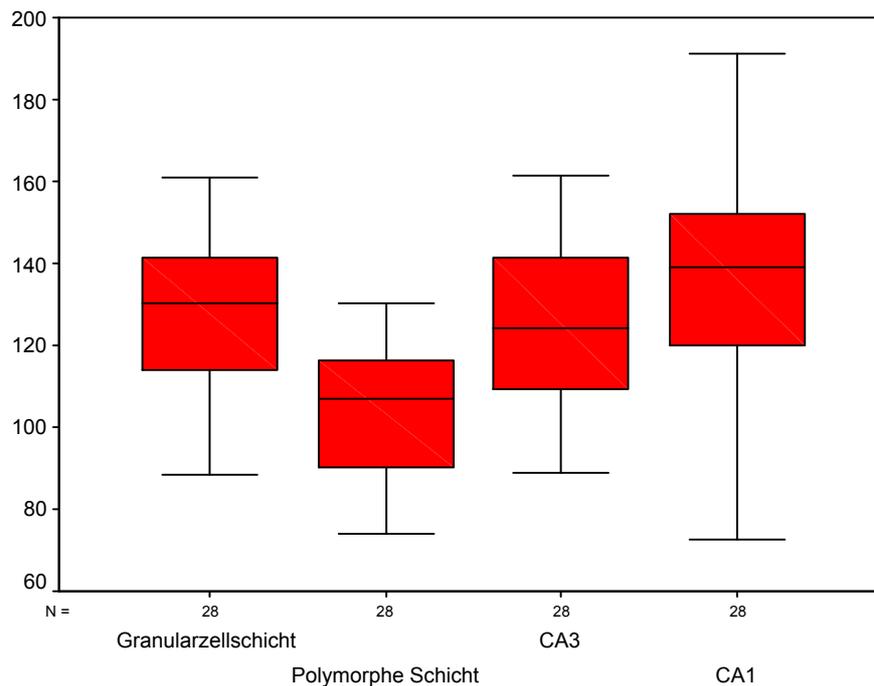


**Abbildung 4.8:** Immunhistochemische BDNF-Darstellung im Gyrus dentatus des Hippocampus in der Hellfeld-Mikroskopie (A und B), Zielparameter war die BDNF-Färbeintensität  $B_F$  (255 - mittlerer Grauwert ROI) in der Körnerzellschicht, der polymorphen Zellschicht, CA3 und CA1. Hierzu wurden mehrere Messfelder zur Bestimmung des mittleren Grauwerts in die jeweilige Region gelegt (B); gl = Körnerzellschicht des Gyrus dentatus, pml = polymorphe Zellschicht des Gyrus dentatus; die Messbalken entsprechen 100µm

Es fiel eine charakteristische Verteilung der BDNF-Färbeintensität  $B_F$  innerhalb der vier untersuchten Regionen (*regions of interest*, ROI) auf. Die BDNF-Färbeintensität war in der CA1 am höchsten (Mittelwert 136,95, Standardabweichung 26,66), dann folgten die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus (Mittelwert 126,36, Standardabweichung 18,78) und die CA3 (Mittelwert 123,52, Standardabweichung 19,22). Die geringste BDNF-Expression pro Fläche wurde in der polymorphen Zellschicht des Hippocampus gemessen (Mittelwert 102,87, Standardabweichung 16,30). Zur Veranschaulichung dieser regional unterschiedlichen BDNF-Intensität dient die grafische Darstellung mittels Boxplots in Abbildung 4.9.

## Ergebnisse

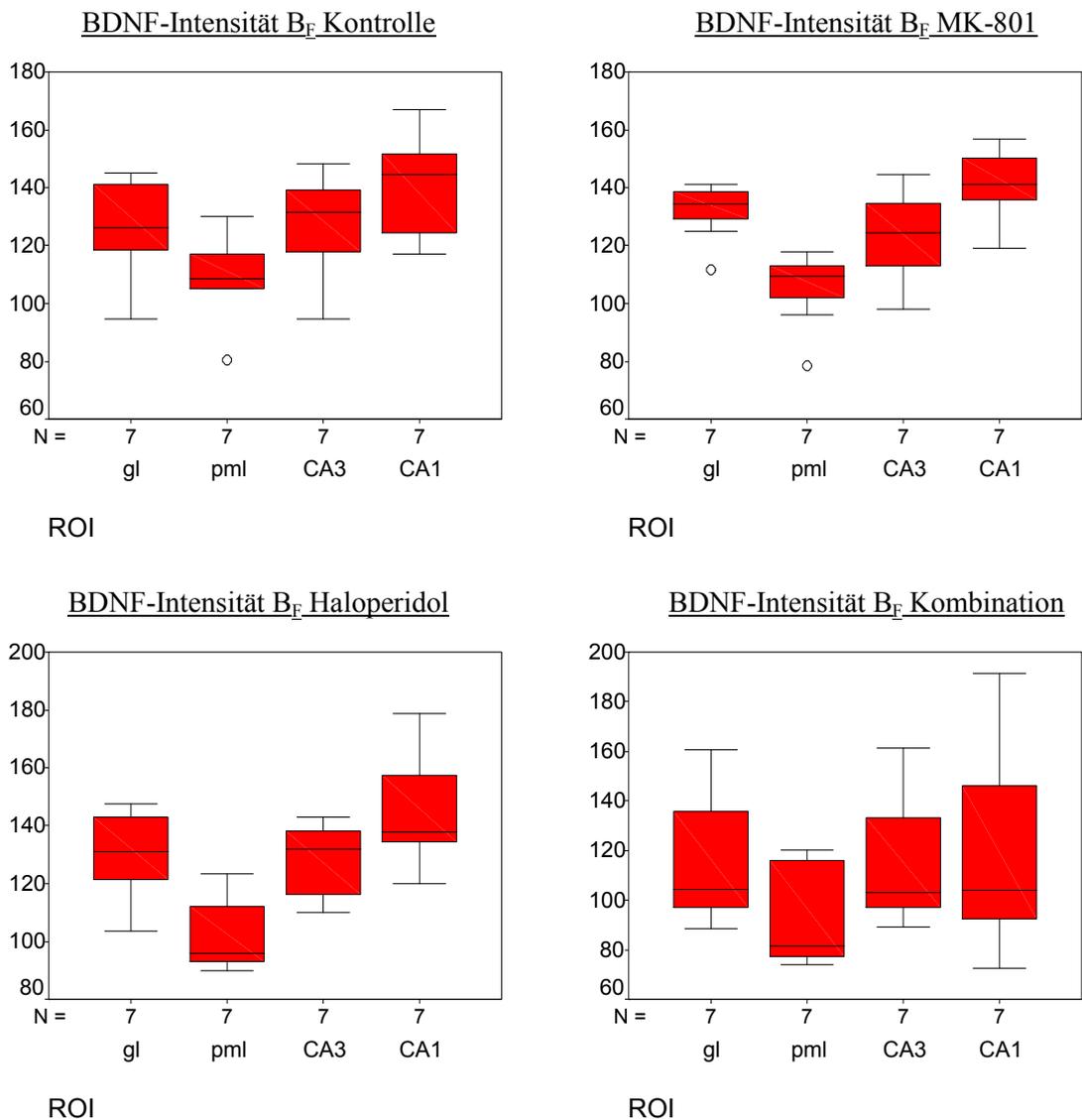
### BDNF-Färbeintensität $B_F$ aller Tiere nach anatom. Regionen



**Abbildung 4.9:** BDNF-Färbeintensität  $B_F$  (255 – Grauwert ROI (region of interest)) aller untersuchten Tiere in den hippocampalen Regionen: Granularzellschicht des Gyrus dentatus (gl), polymorphe Zellschicht pml), CA3 und CA1

Dieser Gradient in der BDNF-Färbeintensität zwischen den vier untersuchten hippocampalen Regionen war sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der mit MK-801 oder mit Haloperidol behandelten Gruppe ausgeprägt. Interessanterweise verlief dieser Gradient in der mit MK-801 und Haloperidol behandelten Gruppe dagegen deutlich flacher. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe ( $p=0,033$ ), zur MK-801-Gruppe ( $p=0,003$ ) oder zur Haloperidolgruppe ( $p=0,005$ ) unterschied sich die Färbeintensität zwischen den einzelnen anatomischen Regionen in der Gruppe der MK-801- und Haloperidol-Koapplikation im Kruskal-Wallis-Test nicht signifikant ( $p=0,358$ ) (s. Abbildung 4.10).

## Ergebnisse

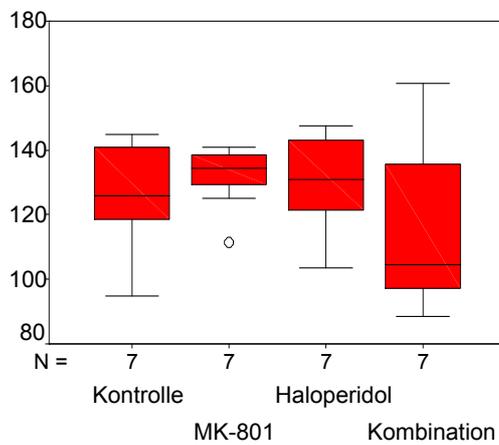


**Abbildung 4.10:** BDNF-Färbeintensität B<sub>F</sub> (255 – Grauwert ROI (region of interest)) innerhalb der Behandlungsgruppen in den hippocampalen Regionen (ROI): Körnerzellschicht des Gyrus dentatus (gl), polymorphe Zellschicht (pml), CA3 und CA1. Während in der Kontrollgruppe, der MK-801-Gruppe und der Haloperidolgruppe die Annahme einer identischen Verteilung der Färbeintensität in den untersuchten hippocampalen Regionen im Kruskal-Wallis-Test mit  $p_{\text{Kontrolle}} = 0,033$ ,  $p_{\text{MK-801}} = 0,003$  und  $p_{\text{Haloperidol}} = 0,005$  verworfen wird, zeigt sich diese unterschiedliche Färbeintensität in der mit MK-801 und Haloperidol behandelten Gruppe nicht signifikant ( $p_{\text{Kombination}} = 0,358$ ).

## Ergebnisse

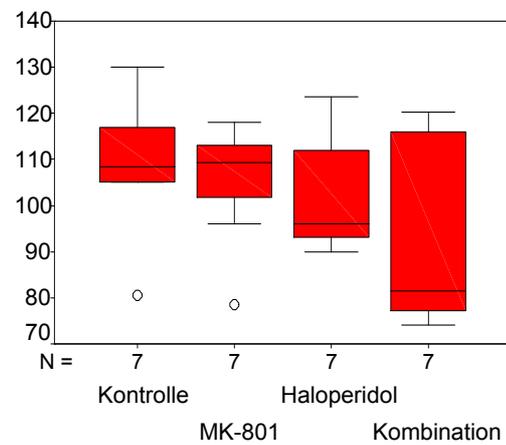
Die BDNF-Intensität  $B_F$  innerhalb der jeweils untersuchten hippocampalen Region differierte nicht signifikant zwischen den vier Behandlungsgruppen (s. Abbildung 4.11 und Tabelle 4.1).

BDNF-Intensität  $B_F$  Granularzellschicht



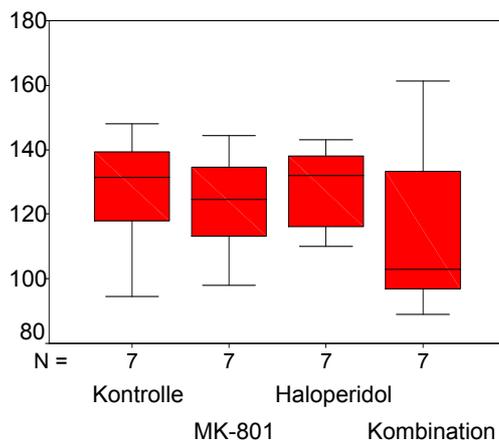
Gruppe

BDNF-Intensität  $B_F$  polymorphe Zellschicht



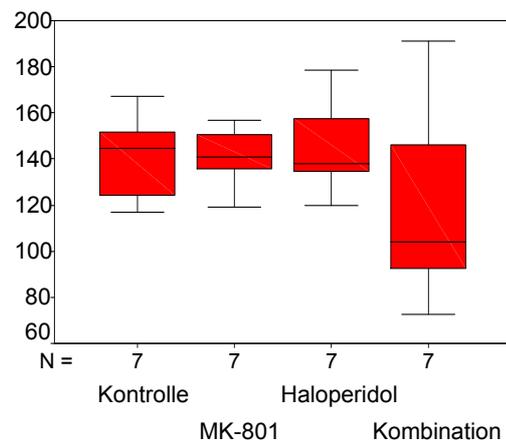
Gruppe

BDNF-Intensität  $B_F$  CA3



Gruppe

BDNF-Intensität  $B_F$  CA1



Gruppe

**Abbildung 4.11:** BDNF-Färbeintensität  $B_F$  (255 – Grauwert ROI (region of interest)) in den vier untersuchten hippocampalen Regionen Granularzellschicht, polymorphe Zellschicht, CA3 und CA1 aufgeschlüsselt nach Behandlungsgruppen. In keiner Region zeigten sich zwischen den Behandlungsgruppen signifikante Unterschiede in der BDNF-Intensität.

## Ergebnisse

**Tabelle 4.1:** BDNF-Färbeintensität  $B_F$  in der Granularzellschicht (gl), der polymorphen Zellschicht (pml), CA3 und CA1

*A Ergebnisse des Gruppenvergleichs mittels Kruskal-Wallis-Test (df = Freiheitsgrade, Chi Quadrat = Teststatistik)*

anatomische Region	df	Chi-Quadrat	p-Wert
Körnerzellschicht (gl)	3	1,869	0,600
polymorphe Zellschicht (pml)	3	1,701	0,637
CA3	3	1,593	0,661
CA1	3	2,236	0,525

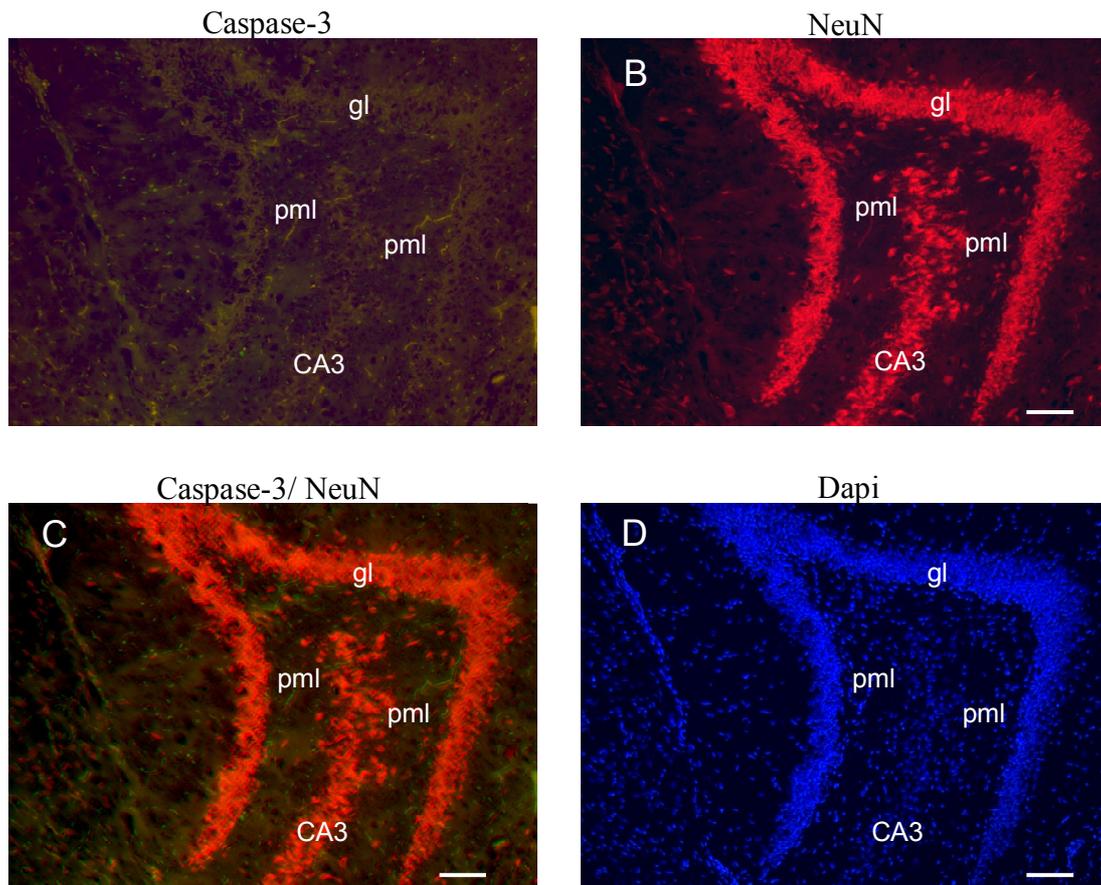
**B** Mittelwert (MW) und Standardabweichung (S.E.M.) der BDNF-Färbeintensität  $B_F$

	Kontrolle MW $\pm$ S.E.M.	MK-801 MW $\pm$ S.E.M.	Haloperidol MW $\pm$ S.E.M.	Kombination MW $\pm$ S.E.M.
gl	126,39 $\pm$ 17,84	131,81 $\pm$ 10,40	130,17 $\pm$ 16,12	117,06 $\pm$ 27,34
pml	109,00 $\pm$ 15,39	105,07 $\pm$ 13,58	102,79 $\pm$ 13,44	94,61 $\pm$ 21,56
CA3	126,96 $\pm$ 18,38	123,19 $\pm$ 17,05	127,67 $\pm$ 13,57	116,26 $\pm$ 27,47
CA1	140,03 $\pm$ 18,61	141,27 $\pm$ 12,98	145,81 $\pm$ 21,27	120,69 $\pm$ 42,40

### 4.1.5 Keine signifikanten Veränderungen der Apoptoserate zwischen den Gruppen

In allen vier Untersuchungsgruppen wurden Caspase-3-positive Zellen detektiert. Diese traten über den gesamten Koronarschnitt verteilt auf. Ein leicht erhöhtes Vorkommen zeigte sich in der Ependymschicht. Der mit dem 10x-Objektiv aufgenommene Bildausschnitt zeigte die Körnerschicht des Gyrus dentatus mit umgebendem Stratum moleculare und innenliegender polymorpher Zellschicht und CA3. Die Caspase-3-positiven Zellen in der polymorphen Zellschicht wurden manuell mit eingblendetem Gitternetz unter verblindeten Bedingungen gezählt. Beispielhaft wird die fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Caspase 3 und NeuN im Gyrus dentatus des Hippocampus in Abbildung 4.12 gezeigt.

## Ergebnisse



**Abbildung 4.12:** Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Caspase-3- und NeuN positiven Zellen im Gyrus dentatus des Hippocampus; mit dem Grünfilter dargestellte Caspase-3-Färbung (A), mit dem Rotfilter dargestellte NeuN-Färbung (B), Überlagerung von Caspase-3- und NeuN-Färbung (C), Zellkernfärbung mit DAPI (D); gl = Körnerzellschicht des Gyrus dentatus, pml = polymorphe Zellschicht des Gyrus dentatus; die Messbalken entsprechen 100 $\mu$ m.

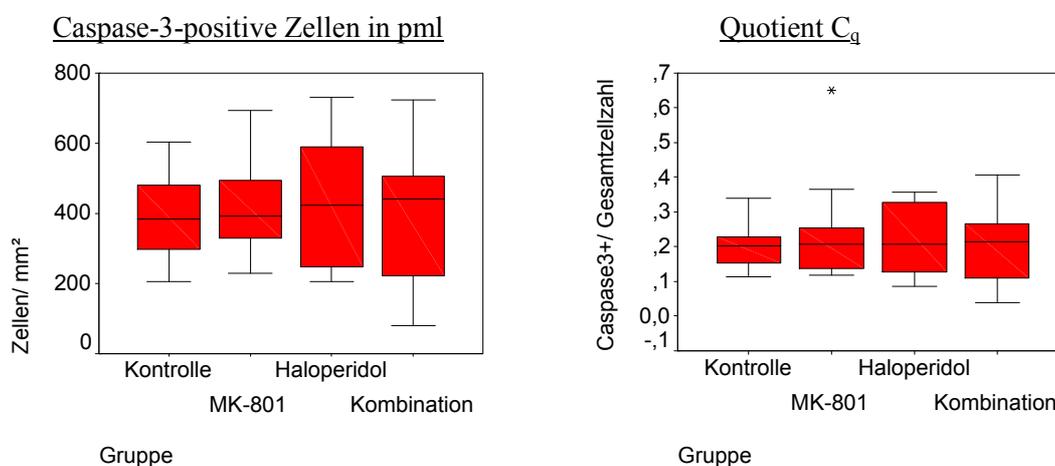
Der Mittelwert der Anzahl Caspase-3-positiven Zellen in allen untersuchten Tieren betrug 411,89 pro mm<sup>2</sup> (n=38, Minimum 80,15, Maximum 732,29, Standardabweichung 166,65). Der Anteil Caspase-3-positiver Zellen an der mit der DAPI-Zellkernfärbung erfassten Gesamtzellzahl (Quotient  $C_q = \text{Anzahl Caspase-3-positiver Zellen} / \text{Gesamtzellzahl}$ ) in der polymorphen Zellschicht betrug in allen Tieren gemittelt 0,221 (n=38, Minimum 0,04, Maximum 0,65, Standardabweichung 0,114). Die Mittelwerte der o.g. Variablen (Caspase/mm<sup>2</sup> und Quotient  $C_q$ ) innerhalb der Behandlungsgruppen sind in Tabelle 4.2 dargestellt.

## Ergebnisse

**Tabelle 4.2:** Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (S.E.M.) der Anzahl (aktivierte-) Caspase-3-positiver Zellen/mm<sup>2</sup> (Casp/mm<sup>2</sup>) sowie des Anteils Caspase-3-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl (Quotient<sub>C<sub>q</sub></sub>) in der polymorphen Zellschicht des Hippocampus

	Kontrolle MW ± S.E.M.	MK-801 MW ± S.E.M.	Haloperidol MW ± S.E.M.	Kombination MW ± S.E.M.
Casp/mm <sup>2</sup>	390,89 ± 132,63	416,59 ± 139,53	437,85 ± 191,04	398,82 ± 215,27
Quotient C <sub>q</sub>	0,209 ± 0,072	0,247 ± 0,161	0,22 ± 0,101	0,205 ± 0,115

Die Caspase-3-Zellzahl/ mm<sup>2</sup> sowie der Anteil Caspase-3-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl (Quotient C<sub>q</sub>) war zwischen den vier Untersuchungsgruppen nicht unterschiedlich: Im Kruskal-Wallis-Test für unverbundene Stichproben wurde für die Variable Caspase-3-Zellzahl/ mm<sup>2</sup> mit p=0,970 die Nullhypothese des Vorliegens gleicher Grundgesamtheiten angenommen. Mit p = 0,975 zeigte sich auch für den Anteil Caspase-3-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl in der polymorphen Zellschicht kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen (s. Abbildung 4.13).

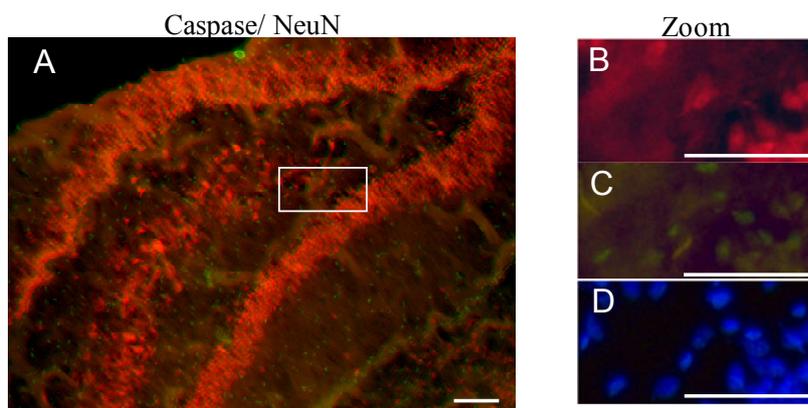


**Abbildung 4.13:** Darstellung der Anzahl aktivierter (Cleaved-) Caspase-3-positiver Zellen/mm<sup>2</sup> und des Anteils Cleaved-Caspase-3-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl (Quotient C<sub>q</sub> = Caspase-3-positive Zellen/ Gesamtzellzahl) in der polymorphen Zellschicht (pml); grafische Darstellung mittels Boxplots. Zwischen den Behandlungsgruppen zeigten sich hierbei keine signifikanten Unterschiede.

Insgesamt waren NeuN- und Caspase-Doppelsignale äußerst spärlich zu sehen. Um eine tatsächliche Koexpression von NeuN und Caspase zu detektieren, wurde die DAPI-Zellkernfärbung mit hinzugezogen. Im Abgleich dieser drei Färbungen konnte abgeschätzt

## Ergebnisse

werden, ob es sich bei den NeuN- und Caspase-Doppelsignalen um sehr nah beieinander bzw. übereinander liegende verschiedene Zellen handelt oder tatsächlich um eine neuronale Zelle, die gleichzeitig Caspase-3-positiv ist. Die Möglichkeit, dass es sich um zwei übereinanderliegende Zellen handelt, konnte jedoch bei den in Frage kommenden Zellen in der DAPI-Färbung nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden. Auf eine quantitative Untersuchung der vereinzelt fraglichen Doppelfärbungen wurde daher verzichtet. Eine fragliche NeuN-/Caspase-3-Doppelfärbung wurde in Abbildung 4.14 beispielhaft dargestellt.



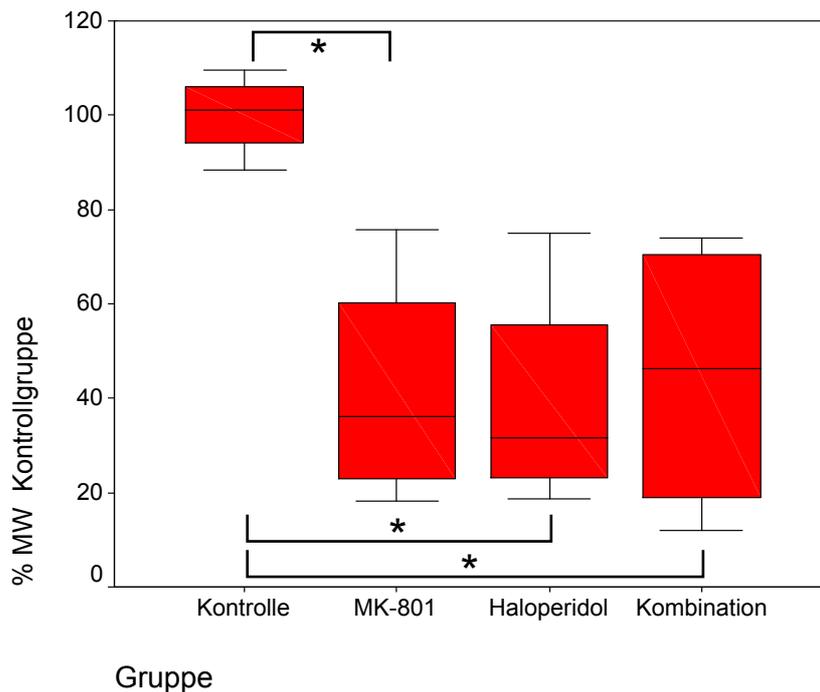
**Abbildung 4.14:** *Caspase-3-/ NeuN-Doppelfärbung (A), Vergrößerung eines Areals mit eng nebeneinander liegenden Caspase-3- und NeuN-positiven Zellen (B, Caspase; C, NeuN; D, DAPI). Die Messbalken entsprechen 100µm.*

## 4.2 Microarray

### 4.2.1 Behandlungseffekte auf die relative mRNA-Expression apoptoseassoziiierter Gene im Hippocampus

Im Hippocampus sowohl der mit MK-801 (Gruppe MK), als auch der mit Haloperidol (Gruppe HA) und der mit MK-801 und Haloperidol (Gruppe HMK) behandelten Tiere zeigte sich gegenüber der Kontrollgruppe (Gruppe K) eine um mehr als die Hälfte reduzierte mRNA-Expression des antiapoptotischen Bcl-2 (Kontrolle:  $0,096 \pm 0,0086$ ; MK:  $0,0398 \pm 0,0242$ ; HA  $0,0376 \pm 0,0238$ ; HMK  $0,0688 \pm 0,0372$ ;  $p_{(MK \text{ vs. } K)} = 0,0047$ ;  $p_{(HA \text{ vs. } K)} = 0,004$ ;  $p_{(HMK \text{ vs. } K)} = 0,013$ ). Hingegen war die Bcl-2-Expression der Koapplikations-Tiere verglichen mit den Tieren, die eine alleinige MK-801-Gabe erhalten hatten, nicht verändert ( $p_{(HMK \text{ vs. } MK)} = 0,881$ ). Haloperidol führte also weder zu einer Verstärkung der MK-801-Wirkung auf die Bcl-2-Expression noch wirkte es der durch MK-801 verursachten Reduktion der Bcl-2-Expression entgegen (s. Abbildung 4.15).

#### differenzielle Bcl-2-mRNA-Expression im Hippocampus

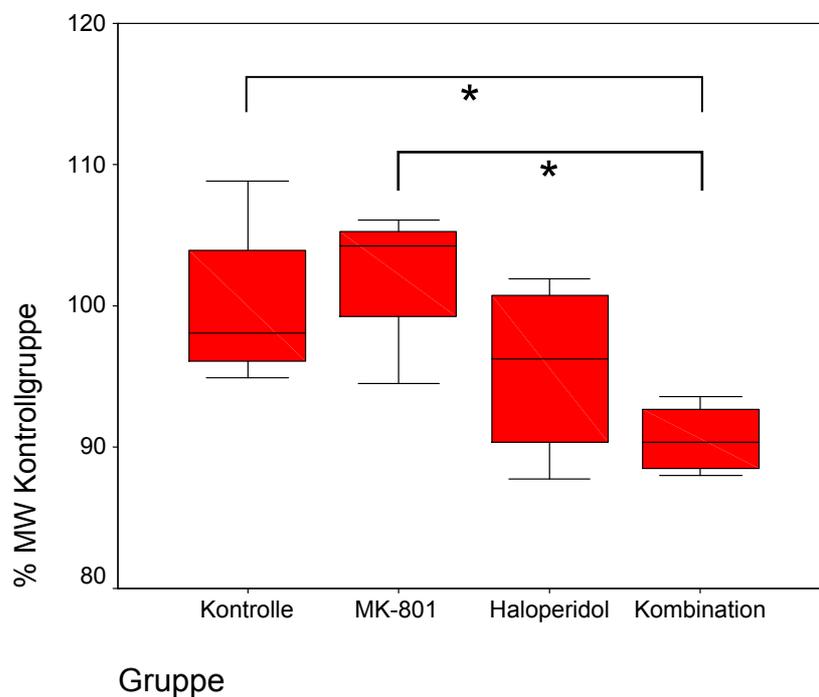


**Abbildung 4.15:** Die relative Bcl-2-mRNA-Expression im Hippocampus war in den mit MK-801, in den mit Haloperidol und in den mit einer MK-801- und Haloperidol-Koapplikation behandelten Tieren signifikant gegenüber der Kontrollgruppe vermindert ( $p_{(MK \text{ vs. } K)} = 0,0047^*$ ;  $p_{(HA \text{ vs. } K)} = 0,004^*$ ;  $p_{(HMK \text{ vs. } K)} = 0,013^*$ ).

## Ergebnisse

Die mRNA-Expression des proapoptotischen Bax war dagegen in der MK-801-Gruppe und in der Haloperidol-Gruppe nicht verändert ( $p_{(MK \text{ vs. } K)} = 0,599$ ;  $p_{(HA \text{ vs. } K)} = 0,356$ ). In den Hippocampi der Tiere, die eine MK-801- und Haloperidol-Koexpression erhalten hatten, war die Bax-mRNA-Menge jedoch gegenüber der Kontrollgruppe und gegenüber der MK-801-Gruppe um ca. 10 % vermindert (Kontrolle  $1,0245 \pm 0,0628$ , MK  $1,0474 \pm 0,0538$ , HA  $0,9788 \pm 0,0662$ , HMK  $0,9279 \pm 0,0263$ ;  $p_{(HMK \text{ vs. } K)} = 0,030$ ,  $p_{(HMK \text{ vs. } MK)} = 0,007$ ). Die Verteilung der Werte der relativen hippokampalen Bax-mRNA-Expression in den Behandlungsgruppen ist in Abbildung 4.16 mittels Boxplots grafisch aufgetragen.

### Differenzielle Bax-mRNA-Expression im Hippocampus

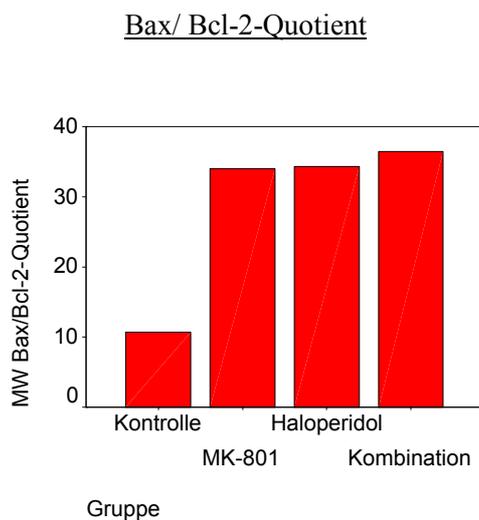


**Abbildung 4.16:** Das proapoptotische Bax war im Hippocampus der Koapplikations-Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe und im Vergleich zur MK-Gruppe auf mRNA-Ebene mindereprimiert ( $p_{(HMK \text{ vs. } K)} = 0,030^*$ ,  $p_{(HMK \text{ vs. } MK)} = 0,007^*$ ).

Der Bax/Bcl-2-Quotient betrug in der Kontrollgruppe  $10,71 \pm 0,2587$  und war in den übrigen Behandlungsgruppen jeweils ca. auf das 3-fache des Kontrollwertes erhöht: in der MK-Gruppe war das Verhältnis von Bax zu Bcl-2 auf mRNA-Ebene bei  $34,01 \pm 8,88$ , in der Haloperidol-Gruppe bei  $34,32 \pm 9,62$  und in der Gruppe der MK-801- und Haloperidol-Koapplikation bei  $36,51 \pm 15,93$  (s. Abbildung 4.17). Einschränkend muss zum Bax/Bcl-2-Quotienten gesagt werden, dass dieser aufgrund der Tatsache, dass die mRNA von jeweils drei Tieren gepoolt untersucht wurde, keinen intraindividuellen Quotienten darstellt. Die weiterführende statisti-

## Ergebnisse

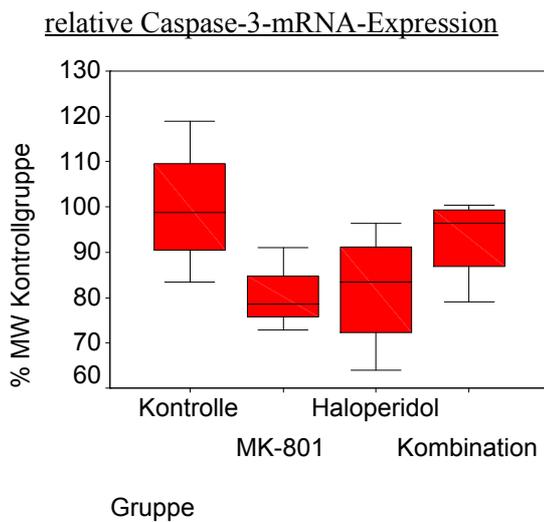
sche Auswertung des Bax/Bcl-2-Quotienten muss vor diesem Hintergrund kritisch betrachtet werden. Um grob orientierend tendenzielle Veränderungen zwischen den Behandlungsgruppen zu detektieren, wurde trotzdem eine Teststatistik erstellt. Aufgrund der unterschiedlichen Varianzen zwischen den Gruppen (Levene's Test auf Varianzgleichheit<sub>(Kontrolle vs. MK-801-Gruppe)</sub>:  $F = 13,473$ , Signifikanz 0,010), wurde der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test verwendet. Mit einer Signifikanz von  $p = 0,036$  zeigte sich darin ein Hinweis auf Gruppenunterschiede zwischen den vier Behandlungsgruppen. Im Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben war mit einer Signifikanz von  $p = 0,021$  ein Unterschied zwischen Kontroll- und MK-801-Gruppe anzunehmen. Auch nach alleiniger Haloperidolgabe oder MK-801- und Haloperidolkoapplikation war der bax/bcl-2-Quotient signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (jeweils  $p = 0,021$ ). Die Haloperidol-Koapplikation konnte den Bax/Bcl-2-Quotienten gegenüber einer alleinigen MK-801-Gabe nicht „normalisieren“ ( $p_{\text{(Kombination vs MK-801)}} = 0,564$ ).



**Abbildung 4.17:** Mittelwerte des Bax/ Bcl-2-Quotienten innerhalb der Behandlungsgruppen; grafische Darstellung mittels Balkendiagramm. In den nicht-parametrischen Tests (Kruskal-Wallis und MWU) zeigte sich der Quotient in der MK-, HA- und HMK-Gruppe erhöht (je  $p = 0,021$ ). Die Interpretation dieses Quotienten ist jedoch kritisch, da die zugrundeliegenden Bax und Bcl-2-Werte lediglich die relative mRNA-Expression wiedergeben, welche aus der gepoolten RNA von je 3 Tieren bestimmt wurde.

Die Menge an Caspase-3-mRNA-Transkripten war in der Gruppe der mit MK-801 behandelten Tiere tendenziell vermindert (Kontrolle  $0,4659 \pm 0,0679$ , MK  $0,374 \pm 0,0357$ ), jedoch zeigte sich im t-Test kein signifikanter Gruppenunterschied ( $p_{\text{(MK vs. K)}} = 0,054$ ). Zwischen Haloperidol-Gruppe und Kontrolle sowie zwischen Koapplikationsgruppe und Kontrolle bestanden keine signifikanten Unterschiede ( $p_{\text{(HA vs. K)}} = 0,118$ ;  $p_{\text{(HMK vs. K)}} = 0,456$ ). Die relative Caspase-3-RNA-Expression innerhalb der vier Untersuchungsgruppen wird in Abbildung 4.18 in einer Boxplot-Grafik dargestellt.

## Ergebnisse



**Abbildung 4.18:** Die relative hippocampale Caspase-3-mRNA-Expression zeigte sich in der mit MK-801 behandelten Gruppe tendenziell vermindert. Das Signifikanzniveau wurde jedoch verfehlt ( $p_{(MK-801 \text{ vs. Kontrolle})} = 0,054$ ).

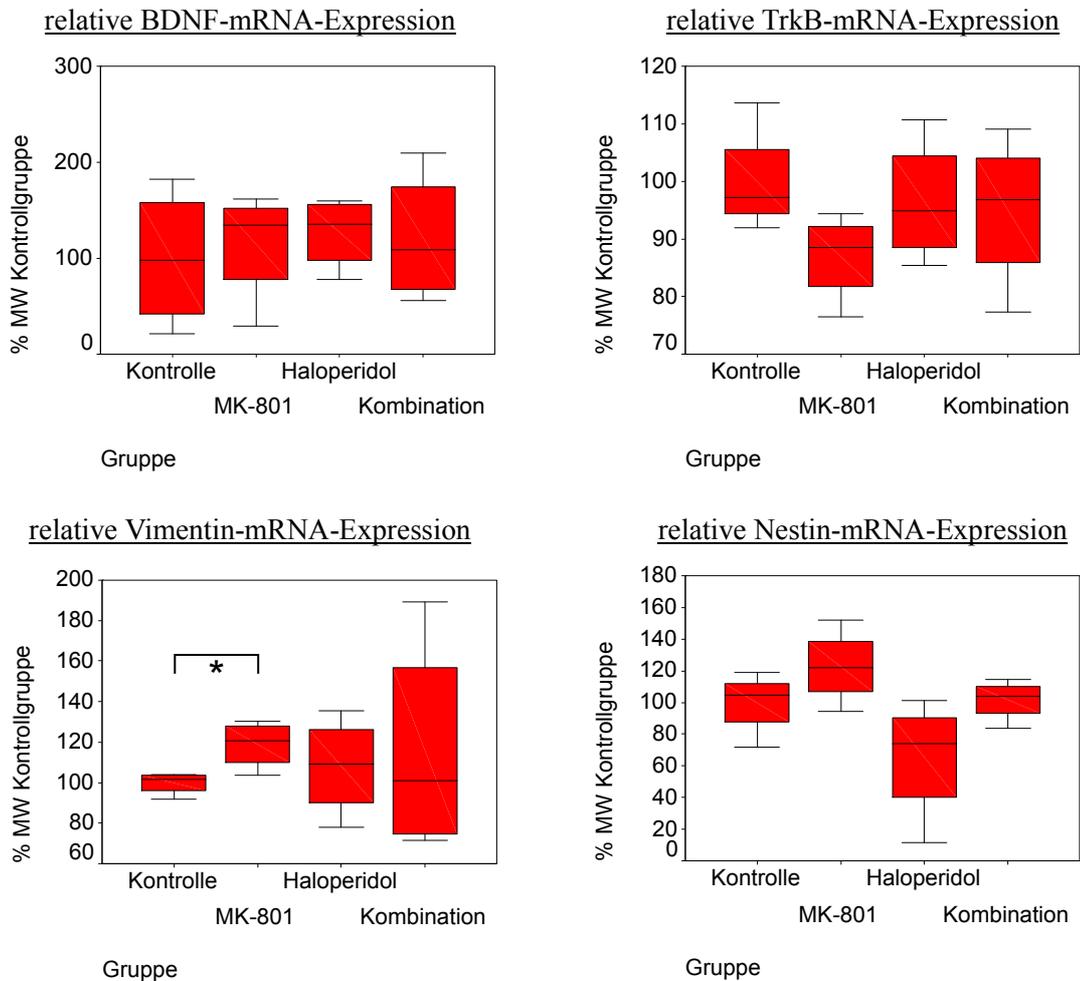
### 4.2.2 Behandlungseffekte auf die relative mRNA-Menge von proliferationsassoziierten Genen im Hippocampus

In der Expression von BDNF im gesamten rechten Hippocampus der Tiere zeigte sich kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen (Kontrolle  $0,1741 \pm 0,1251$ , MK  $0,1989 \pm 0,1021$ , Haloperidol  $0,219 \pm 0,0645$ , HMK  $0,2087 \pm 0,119$ ,  $p_{(MK \text{ vs. K})} = 0,756$ ;  $p_{(HA \text{ vs. K})} = 0,532$ ;  $p_{(HMK \text{ vs. K})} = 0,690$ ). Der Mittelwert der TrkB-Expression (neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2) war in den mit MK-801 behandelten Tieren niedriger als in der Kontrollgruppe (Kontrolle  $2,4542 \pm 0,232$ , MK  $2,1338 \pm 0,186$ , Haloperidol  $2,3682 \pm 0,2654$ , HMK  $2,3315 \pm 0,3252$ ). Der Gruppenvergleich mittels t-Test verfehlt jedoch das Signifikanzniveau ( $p_{(MK \text{ vs. K})} = 0,075$ ). In der HA- und der HMK-Gruppe wich die hippocampale TrkB-mRNA-Menge nicht von der Kontrollgruppe ab ( $p_{(HA \text{ vs. K})} = 0,643$ ;  $p_{(HMK \text{ vs. K})} = 0,562$ ).

Der Stammzellmarker Vimentin wurde in der mit MK-801 behandelten Gruppe stärker exprimiert als in der Kontrollgruppe (Kontrolle  $2,2028 \pm 0,1209$ ; MK  $2,6249 \pm 0,2579$ ;  $p_{(MK \text{ vs. K})} = 0,025$ ). In der HA- und der HMK-Gruppe war die Vimentin-Expression gegenüber der Kontrollgruppe nicht signifikant verändert (HA  $2,3860 \pm 0,5348$ ,  $p_{(HA \text{ vs. K})} = 0,529$ ; HMK  $2,5524 \pm 1,2004$ ,  $p_{(HMK \text{ vs. K})} = 0,583$ ). Nestin, ebenfalls ein Stammzellmarker, zeigte sich zwischen MK- und Kontrollgruppe nicht differenziell exprimiert. Auch zwischen HA- oder HMK-Gruppe und der Kontrollgruppe bestanden keine signifikanten Gruppenunterschiede bezüglich der Nestin-Expression (Kontrolle  $0,2253 \pm 0,045$ ; MK  $0,2766 \pm 0,053$ ; Haloperidol  $0,2066 \pm 0,0492$ ; HMK  $0,2289 \pm 0,0292$ ;  $p_{(MK \text{ vs. K})} = 0,191$ ;  $p_{(HA \text{ vs. K})} = 0,158$ ;  $p_{(HMK \text{ vs. K})} = 0,898$ ). Die Menge der PCNA-mRNA im gesamten Hippocampus war in der MK-Gruppe tendenziell vermindert, ein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen bestand jedoch nicht (Kontrolle

## Ergebnisse

$2,717 \pm 0,0847$ ; MK  $2,5947 \pm 0,0721$ ; Haloperidol  $2,7149 \pm 0,2983$ ; HMK  $2,87 \pm 0,409$ ;  $p_{(MK \text{ vs. } K)} = 0,070$ ;  $p_{(HA \text{ vs. } K)} = 0,147$ ;  $p_{(HMK \text{ vs. } K)} = 0,510$ ). Die relative mRNA-Expression der proliferationsassoziierten Gene BDNF, TrkB, Vimentin und Nestin innerhalb der Untersuchungsgruppen ist in Abbildung 4.19 mittels Boxplot-Grafik dargestellt.



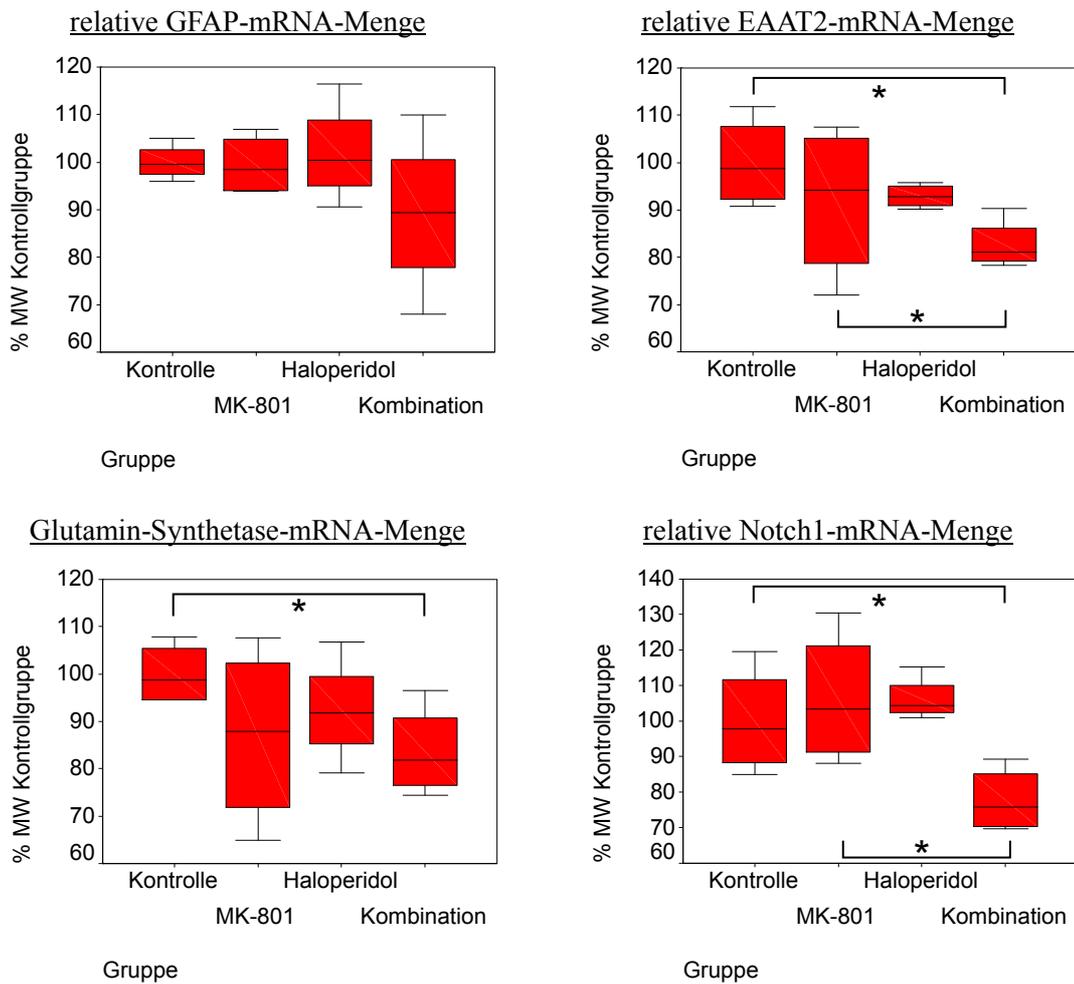
**Abbildung 4.19:** relative hippocampale mRNA-Menge von BDNF, TrkB, Vimentin und Nestin in den Behandlungsgruppen. Bezüglich der BDNF- und Nestin-RNA-Menge im Hippocampus zeigen sich im Microarray keine signifikanten Unterschiede. Die TrkB-Expression ist in der MK-801-Gruppe tendenziell vermindert, verfehlt jedoch das Signifikanzniveau. Die RNA des Stammzellmarkers Vimentin ist in der MK-Gruppe signifikant stärker exprimiert (TrkB  $p_{(MK-801 \text{ vs. } Kontrolle)} = 0,075$ ; Vimentin  $p_{(MK-801 \text{ vs. } Kontrolle)} = 0,025^*$ ).

## Ergebnisse

### 4.2.3 Behandlungseffekte auf die relative mRNA-Expression glialer Marker im Hippocampus

Die Expression von GFAP war analog zu den immunhistologischen Befunden in der mit MK-801 und Haloperidol behandelten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe leicht vermindert, jedoch ohne signifikanten Gruppenunterschied im t-Test (Kontrolle  $12,759 \pm 0,483$ ; MK  $12,691 \pm 0,827$ ; Haloperidol  $13,010 \pm 1,369$ ; Kombination  $11,376 \pm 2,194$ ;  $p_{(MK \text{ vs. } K)} = 0,893$ ;  $p_{(HA \text{ vs. } K)} = 0,741$ ;  $p_{(HMK \text{ vs. } K)} = 0,264$ ). Der gliale Glutamattransporter EAAT1 (GLAST) wurde im Hippocampus der Tiere im Gruppenvergleich nicht in unterschiedlichem Maße exprimiert (Kontrolle  $5,629 \pm 0,489$ , MK  $5,490 \pm 0,300$ , Haloperidol  $5,743 \pm 0,400$ , HMK  $5,608 \pm 0,600$ ;  $p_{(MK \text{ vs. } K)} = 0,644$ ;  $p_{(HA \text{ vs. } K)} = 0,731$ ;  $p_{(HMK \text{ vs. } K)} = 0,957$ ). Der gliale hochaffine Glutamattransporter 1 (GLT-1; EAAT2) wurde jedoch in der Gruppe der MK-801- und Haloperidol-Koapplikation vermindert exprimiert (Kontrolle  $0,694 \pm 0,066$ ; MK-801  $0,638 \pm 0,11$ ; Haloperidol  $0,645 \pm 0,018$ ; Kombination  $0,573 \pm 0,037$ ;  $p_{(MK \text{ vs. } K)} = 0,428$ ;  $p_{(HA \text{ vs. } K)} = 0,205$ ;  $p_{(HMK \text{ vs. } K)} = 0,020$ ). Die Glutamin-Synthetase, welche vorwiegend in Astrozyten exprimiert wird und zusammen mit den glialen Glutamattransportern eine herausragende Rolle für die Glutathomöostase spielt, war ebenfalls in der Gruppe, die eine Koapplikation von MK-801 und Haloperidol erhielt, signifikant vermindert (Kontrolle  $8,630 \pm 0,565$ ; MK  $7,514 \pm 1,638$ ; HA  $7,972 \pm 0,979$ ; HMK  $7,217 \pm 0,831$ ;  $p_{(MK \text{ vs. } K)} = 0,272$ ;  $p_{(HA \text{ vs. } K)} = 0,289$ ;  $p_{(HMK \text{ vs. } K)} = 0,031$ ). Notch1, das in radialer Glia mit Stammzeleigenschaften exprimiert wird, war in der HMK-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe und gegenüber der MK-Gruppe vermindert exprimiert (Kontrolle  $0,626 \pm 0,095$ , MK-801  $0,665 \pm 0,119$ , Haloperidol  $0,665 \pm 0,039$ , Kombination  $0,486 \pm 0,058$ ,  $p_{(HMK \text{ vs. } K)} = 0,046$ ,  $p_{(HMK \text{ vs. } MK)} = 0,035$ ). Die Verteilung der Werte, die die relative mRNA-Menge glialer Gene innerhalb der Behandlungsgruppen angenommen hat, ist mittels Boxplots in Abbildung 4.20 gezeigt.

## Ergebnisse

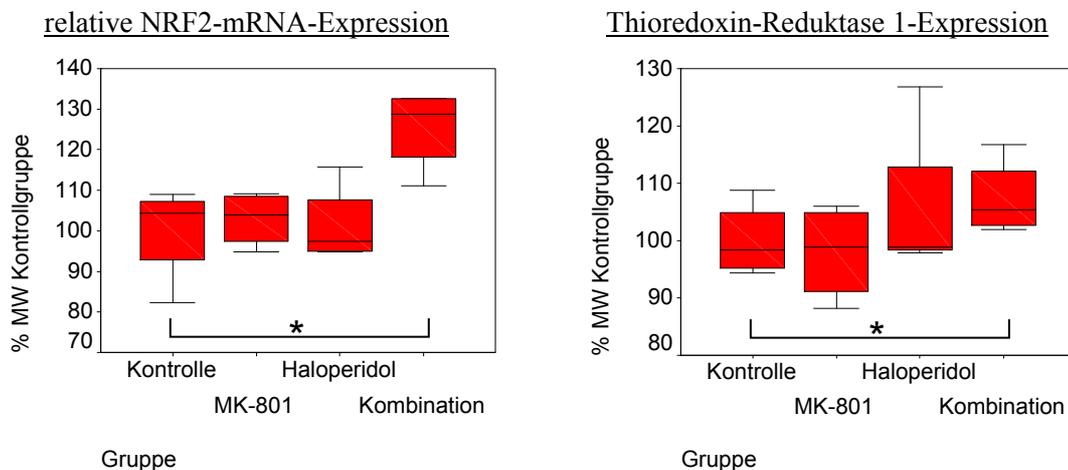


**Abbildung 4.20:** relative mRNA-Menge von GFAP und EAAT2 (GLT-1), Glutamin-Synthetase und Notch1 im Hippocampus der Tiere. Bezüglich der relativen GFAP-mRNA-Expression zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Der gliale Glutamattransporter EAAT2 wurde in der Gruppe der MK-801- und Haloperidol-Koapplikation im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur MK-Gruppe signifikant minderexprimiert ( $p_{(MK \text{ vs. } K)} = 0,046$ ;  $p_{(HMK \text{ vs. } K)} = 0,035$ ). Auch die vorwiegend in Astrozyten exprimierte Glutamin-Synthetase war in der Koapplikationsgruppe vermindert exprimiert ( $p_{(HMK \text{ vs. } K)} = 0,031^*$ ). Notch1, welches von radialer Glia exprimiert wird, war ebenfalls in der HMK-Gruppe weniger stark exprimiert ( $p_{(HMK \text{ vs. } K)} = 0,046$ ,  $p_{(HMK \text{ vs. } MK)} = 0,035$ ).

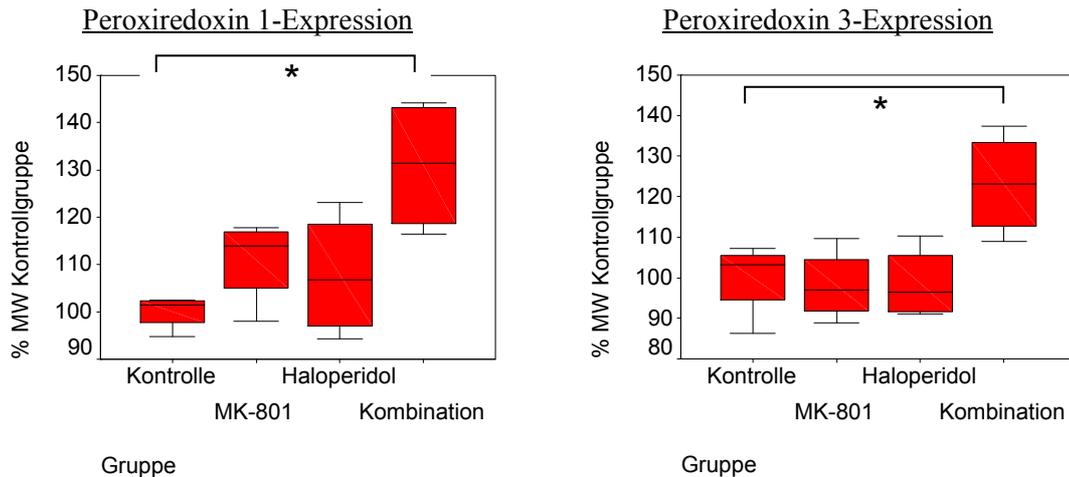
## Ergebnisse

### 4.2.4 Erhöhte Menge an mRNA-Transkripten von neuroprotektiven Proteinen in der Gruppe der MK-801- und Haloperidol-Koapplikation

In der Gruppe der MK-801- und Haloperidol-Koapplikation war gegenüber der Kontrollgruppe das Niveau von mRNA-Transkripten, die typischerweise nach oxidativem Stress eine neuroprotektive Wirkung entfalten, signifikant erhöht. Hierzu zählen der Transkriptionsfaktor NRF2 (Kontrolle  $0,791 \pm 0,095$ ; MK-801  $0,814 \pm 0,054$ ; Haloperidol  $0,801 \pm 0,078$ ; Kombination  $0,991 \pm 0,080$ ;  $p_{(\text{Kombination vs Kontrolle})} = 0,018$ ), die Thioredoxin-Reduktase 1 (Kontrolle  $0,916 \pm 0,060$ ; MK-801  $0,898 \pm 0,077$ ; Haloperidol  $0,967 \pm 0,129$ ; Kombination  $0,983 \pm 0,061$ ;  $p_{(\text{Kombination vs Kontrolle})} = 0,030$ ), Peroxiredoxin 1 (Kontrolle  $4,260 \pm 0,152$ ; MK-801  $4,724 \pm 0,379$ ; Haloperidol  $4,591 \pm 0,561$ ; Kombination  $5,576 \pm 0,609$ ;  $p_{(\text{Kombination vs Kontrolle})} = 0,020$ ) und Peroxiredoxin 3 (Kontrolle  $1,858 \pm 0,173$ ; MK-801  $1,823 \pm 0,163$ ; Haloperidol  $1,831 \pm 0,166$ ; Kombination  $2,287 \pm 0,236$ ;  $p_{(\text{Kombination vs Kontrolle})} = 0,026$ ). Zur Veranschaulichung ist die Verteilung der relativen mRNA-Mengen dieser neuroprotektiven Gene innerhalb der Behandlungsgruppen in Boxplots aufgetragen (s. Abbildung 4.21).



## Ergebnisse



**Abbildung 4.21:** relative hippocampale mRNA-Menge von NRF2, Thioredoxin-Reduktase 1, Peroxiredoxin 1 und Peroxiredoxin3 in den vier Behandlungsgruppen. In der Gruppe, die eine MK-801 und Haloperidol-Koapplikation erhalten hatte, war die mRNA-Menge dieser neuroprotektiven Faktoren gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (NRF2:  $p_{(Kombination\ vs\ Kontrolle)} = 0,018$ ; Thioredoxin-Reduktase 1:  $p_{(Kombination\ vs\ Kontrolle)} = 0,030$ ; Peroxiredoxin 1:  $p_{(Kombination\ vs\ Kontrolle)} = 0,020$ ; Peroxiredoxin 3:  $p_{(Kombination\ vs\ Kontrolle)} = 0,026$ ).

### 4.3 Verhaltenstests

#### 4.3.1 Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen

Es wurden insgesamt fünf Parameter bestimmt: Im Y-Maze-Test wurden als Parameter für das räumliche Arbeitsgedächtnis der Anteil alternierender Armzugänge an den aufgrund der Gesamt-Armzugänge möglichen Alternationen gemessen (Alternationen). Des Weiteren wurde erfasst, ob nach Öffnung eines zuvor blockierten Armes, dieser als erstes aufgesucht wird (erste Wahl) sowie die kumulative im „neuen“ Arm zugebrachte Zeit gemessen (Zeit neuer Arm). Im Tail Suspension Test wurden die Anzahl der Vokalisationen und die Anzahl der Selbststretungsversuche gezählt.

Im Kruskal-Wallis-Test zeigten sich Hinweise für Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen sowohl für die Anzahl der Vokalisationen (Chi-Quadrat 14,374,  $p = 0,002$ ) als auch für die Anzahl der Rettungsversuche (Chi-Quadrat 18,013,  $p < 0,001$ ) im Tail Suspension Test (s. Tabelle 4.3). Im anschließenden Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben zeigte sich zwischen Kontrollgruppe und MK-801-Gruppe kein Gruppenunterschied. Jedoch waren beide Parameter sowohl in der Haloperidolgruppe als auch in der Gruppe der MK-801- und Haloperidol-Koapplikation signifikant erniedrigt (s. Tabelle 4.4 und Abbildung 4.22).

## Ergebnisse

Bezüglich der im Y-Maze erhobenen Parameter für das räumliche Arbeitsgedächtnis zeigten sich zwischen den Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede (s. Tabelle 4.3).

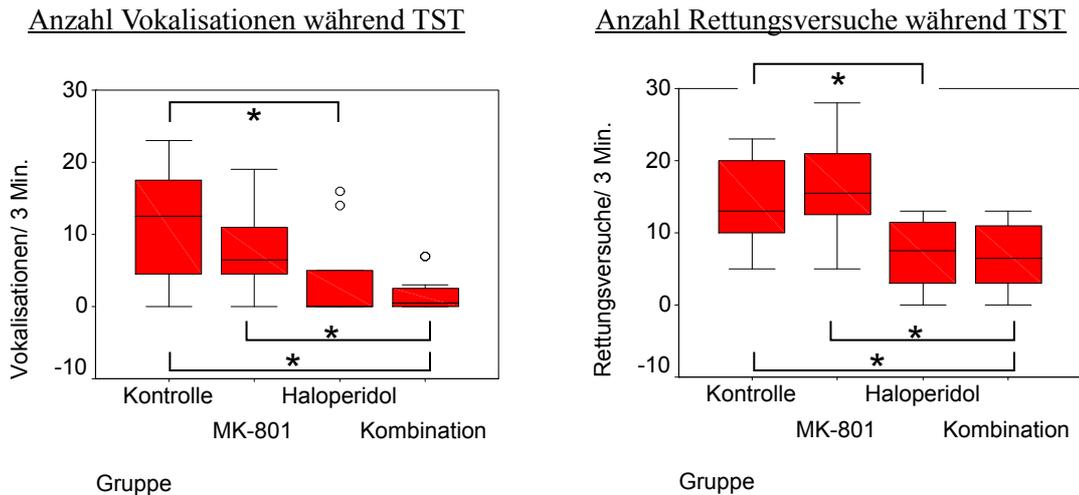
**Tabelle 4.3:** Gruppenvergleich für die Ergebnisse der Verhaltenstests im Kruskal-Wallis-Test; TST = Tail Suspension Test, df = Freiheitsgrade, Chi-Quadrat = Teststatistik

Verhaltenstest	Parameter	df	Chi-Quadrat	p-Wert
Y-Maze	Alternationen	3	3,368	0,338
	Erste Wahl neuer Arm	3	1,643	0,650
	Zeit im neuen Arm	3	3,584	0,310
TST	Vokalisationen	3	14,374	0,002
	Rettungsversu- che	3	18,013	<0,001

**Tabelle 4.4:** Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests für die Parameter, die im Kruskal-Wallis-Test mit  $p \leq 0,05$  einen Hinweis für signifikante Gruppenunterschiede aufwiesen; TST = Tail Suspension Test

Parameter	Kontrolle	MK-801	Haloperidol	Kombination
Vokalisationen im TST	11,42±8,12	7,83±5,46	3,42±5,74	1,75±2,63
		$p_{(vs K)} = 0,284$	$p_{(vs K)} = 0,018$	$p_{(vs K)} = 0,003$ $p_{(vs MK)} = 0,004$
Rettungsversu- che im TST	14,17±5,69	16,08±6,84	7,33±4,52	6,58±4,66
		$p_{(vs K)} = 0,386$	$p_{(vs K)} = 0,007$	$p_{(vs K)} = 0,005$ $p_{(vs MK)} = 0,001$

## Ergebnisse



**Abbildung 4.22:** Anzahl der Vokalisationen und der Rettungsversuche im Tail Suspension Test (TST); grafische Darstellung mittels Boxplots. Die Tiere der Haloperidol- und der Kombination-Gruppe unternehmen weniger Rettungsversuche ( $p_{(\text{Haloperidol vs K})} = 0,007^*$ ,  $p_{(\text{Kombination vs Kontrolle})} = 0,005^*$ ) und weniger Vokalisationen ( $p_{(\text{Haloperidol vs Kontrolle})} = 0,018^*$ ,  $p_{(\text{vs K})} = 0,003^*$ ) als die Kontrollgruppe. Gegenüber der mit MK-801 allein behandelten Gruppe leisten die mit MK-801 und Haloperidol behandelten Tiere weniger Rettungsversuche ( $p_{(\text{Kombination vs MK-801})} = 0,001^*$ ) und Vokalisationen ( $p_{(\text{Kombination vs MK-801})} = 0,004^*$ ) im Tail Suspension Test.

### 4.3.2 Korrelation zwischen hippokampalen ultrastrukturellen Veränderungen (Immunhistologie) und Verhaltenstests

Die Ergebnisse der Verhaltenstests wurden außerdem mittels nichtparametrischen Korrelationskoeffizienten  $\sigma$  nach Spearman auf Korrelation mit den Ergebnissen der immunhistologischen Untersuchungen überprüft (s. Tabelle 4.5).

#### 4.3.2.1 Korrelation zwischen proliferationsassoziierten Markern und Verhalten

Die Anzahl PCNA-positiver Zellen in der subgranulären Zellschicht und die BDNF-Intensität in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus sowie in CA3 und CA1 korrelierten nicht mit den Ergebnissen der Verhaltenstests. Die BDNF-Intensität in der polymorphen Zellschicht korrelierte negativ mit dem spontan alternierenden Verhalten im Y-Maze (Spearman's Koeffizient -0,388,  $p = 0,045$ ).

## Ergebnisse

### 4.3.2.2 Korrelation zwischen neuronaler Zelldichte und –größe in der polymorphen Zellschicht des Gyrus dentatus und Gedächtniscore/ Verhalten

Die durchschnittliche Größe der neuronalen Somata in der polymorphen Zellschicht korrelierte positiv mit dem „Erstbetreten“ des zuvor verschlossenen Arms im Y-Maze als Maß für das räumliche Arbeitsgedächtnis (Spearman’s Koeffizient 0,365, p= 0,024).

Der Anteil der neuronalen Zellen an der Gesamtzellzahl (Neuronalität) in der polymorphen Zellschicht des Hippocampus korrelierte positiv mit der Anzahl Rettungsversuche im Tail Suspension Test (Spearman’s Koeffizient 0,340, p= 0,037) als Maß für die Motivation der Tiere.

### 4.3.2.3 Korrelation zwischen glialer Dichte im Hippocampus und Verhalten

Die Dichte GFAP-positiver Zellen in der polymorphen Zellschicht korrelierte negativ mit den Parametern für das räumliche Gedächtnis: der Option des Erstbetretens des zuvor verschlossenen Y-Maze-Arms (Spearman’s Koeffizient -0,360, p= 0,036) sowie der in diesem Arm zugebrachten Zeit (Spearman’s Koeffizient -0,385, p= 0,025).

**Table 4.5:** Korrelation zwischen den immunhistologischen Parametern und den Ergebnissen der Verhaltenstests mittels Spearman’s Korrelationskoeffizient ( $\sigma$ ) mit zweiseitiger Signifikanz ( $p$ ), Signifikanzniveau  $* \leq 0,05$ ; *sgl* = subgranuläre Schicht des Gyrus dentatus, *gl* = Körnerschicht des Gyrus dentatus, *pml* = polymorphe Schicht des Gyrus dentatus

		räumliches Gedächtnis (Y-Maze)			Verhalten (TST)	
Immunhistologie		Alternationen	erste Wahl neuer Arm	Zeit im neuen Arm	Vokalisationen	Rettungsversuche
PCNA <sup>+</sup> -Zellen/ mm sgl	$\sigma$	0,048	0,102	-0,036	-0,079	-0,095
	p	0,758	0,502	0,811	0,601	0,531
BDNF-Intensität gl	$\sigma$	-0,245	-0,186	-0,159	0,153	0,084
	p	0,217	0,344	0,418	0,440	0,670
BDNF-Intensität pml	$\sigma$	-0,388	0,080	0,036	0,360	0,118
	p)	0,045*	0,687	0,855	0,060	0,550

## Ergebnisse

		räumliches Gedächtnis (Y-Maze)			Verhalten (TST)	
		Alternationen	erste Wahl neuer Arm	Zeit im neuen Arm	Vokalisationen	Rettungsversuche
BDNF-Intensität CA3	$\sigma$ p	-0,278 0,160	-0,080 0,687	-0,112 0,572	0,121 0,538	0,010 0,958
BDNF-Intensität CA1	$\sigma$ p	-0,264 0,184	-0,239 0,221	-0,261 0,179	0,028 0,889	-0,022 0,913
NeuN <sup>+</sup> -Zellen/mm <sup>2</sup> pml	$\sigma$ p)	-0,310 0,070	0,091 0,586	-0,019 0,908	0,286 0,081	0,195 0,242
Größe der NeuN <sup>+</sup> Somata	$\sigma$ p	0,054 0,756	0,365 0,024*	0,151 0,364	0,227 0,170	0,253 0,125
Zellkerne/ mm <sup>2</sup> pml	$\sigma$ p	-0,217 0,210	0,260 0,116	0,282 0,086	0,097 0,563	-0,260 0,114
Caspase-3 <sup>+</sup> -Zellen pml	$\sigma$ p	0,018 0,920	-0,053 0,753	-0,136 0,415	-0,110 0,511	-0,084 0,617
nicht neuronale Zellen pml	$\sigma$ p	-0,134 0,442	0,264 0,442	0,389 0,016*	-0,056 0,739	-0,411 0,010*
Neuronalitätsscore pml	$\sigma$ p	-0,084 0,630	-0,029 0,864	-0,166 0,319	0,310 0,058	0,340 0,037*
GFAP-area fraction dg	$\sigma$ p	-0,102 0,567	0,030 0,858	-0,214 0,204	0,070 0,683	0,081 0,632
GFAP-area fraction sgl	$\sigma$ p	-0,106 0,550	-0,020 0,905	-0,193 0,253	0,037 0,830	0,314 0,058
GFAP-area fraction pml	$\sigma$ p	0,025 0,895	-0,360 0,036*	-0,385 0,025*	-0,110 0,536	0,191 0,279

## **5 Diskussion**

### **5.1 Diskussion der Methode**

#### **5.1.1 Der tierexperimentelle Ansatz**

Im Gegensatz zu *post mortem*-Studien an schizophrenen Patienten erlaubt es das Tiermodell, tatsächlich vergleichbare Voraussetzungen innerhalb und zwischen den Untersuchungsgruppen herzustellen. Störgrößen, wie verschiedene Zeitdauer und Art der antipsychotischen Medikation oder unterschiedliche Zeitspannen zwischen Versterben und Entnahme des Hirngewebes, können hier durch einen einheitlichen Versuchsaufbau eliminiert werden. Im Gegensatz zu Versuchen in der Zellkultur lässt das Tiermodell jedoch auch die Beurteilung von Verhaltensänderungen sowie die Identifizierung von ultrastrukturellen Veränderungen innerhalb interessanter anatomischer Hirnregionen wie zum Beispiel dem Hippocampus zu.

#### **5.1.2 Tiermodell der Schizophrenie auf Grundlage eines NMDA-Rezeptorantagonismus**

Das in der vorliegenden Untersuchung angewandte Tiermodell der Schizophrenie auf Grundlage eines NMDA-Rezeptor-Antagonismus ist durch eine bemerkenswerte Vielzahl von Parallelen zum Krankheitsbild der Schizophrenie gekennzeichnet. Diese reichen von der molekularen Ebene bis zu typischen Verhaltensauffälligkeiten [Rujescu et al., 2006]. Um die chronische Natur der Schizophrenie nachzubilden, wurden MK-801-Dosen gewählt, die weit unterhalb der Schwelle lagen, die erforderlich ist, akute psychotische Symptome, neurologische Veränderungen oder gar eine Anästhesie hervorzurufen. In vorangegangenen Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass derart niedrige Dosen ausreichen, um Veränderungen in Genexpressionsmustern, elektrophysiologischen Parametern und ultrastrukturellen Eigenschaften zu bewirken [Grunze et al., 2000]. Außerdem zeigten sich in diesem Tiermodell in einer vorangegangenen Untersuchung unserer Arbeitsgruppe Defizite des Arbeitsgedächtnisses sowie Defizite des deklarativen Gedächtnisses, die zu jenen von schizophrenen Patienten analog sind [Rujescu et al., 2006]. Bei Menschen, die über einen längeren Zeitraum PCP konsumiert hatten, zeigten sich in einer Untersuchung von Jentsch und Roth [Jentsch and Roth, 1999] oft Verhaltensauffälligkeiten, Einschränkungen der Kognition und Veränderungen im zerebralen Blutfluss, wie sie typischerweise bei an Schizophrenie erkrankten Patienten beobachtet werden.

## Diskussion

Die niedrig dosierte Verabreichung eines NMDA-Rezeptor-Antagonisten stellt derzeit eines der am besten akzeptierten Tiermodelle der Schizophrenie dar [Jentsch and Roth, 1999]. In der hier vorliegenden Arbeit wurde der NMDA-Rezeptor-Antagonist MK-801 verwandt. Dieser ist im Gegensatz zu PCP und Ketamin selektiver [Crosby et al., 2002; Ellison, 1995; Wong et al., 1986]. Die Verabreichung von 0,02 mg/ kg Körpergewicht intraperitoneal stellte sich in vorangegangenen Untersuchungen als ausreichend dar, um eine NMDA-Rezeptor-Unterfunktion bei jungen Ratten zu induzieren ohne dabei akut neurotoxische Effekte zu verursachen [Rujescu et al., 2006].

In *post mortem*-Studien stellt sich zumeist das Problem, der Schizophrenie zugrunde liegende Veränderungen von den Behandlungseffekten einer antipsychotischen Medikation zu unterscheiden. Zur genaueren Beurteilung der Wirkung von Neuroleptika auf die untersuchten Parameter wurde daher eine Gruppe mit Haloperidol als Monotherapie und eine Gruppe sequenziell mit MK-801 und dann mit MK-801 und Haloperidol behandelt. Letzteres sollte die übliche Situation imitieren, in der die neuroleptische Medikation auf eine gestörte glutamaterge Transmission trifft, wie sie bei schizophrenen Patienten vermutet wird [Olney et al., 1999]. Für das klassische Neuroleptikum Haloperidol wurde eine Dosierung von 1 mg/ kg Körpergewicht intraperitoneal gewählt. In einer Studie von Farber et al. konnte gezeigt werden, dass diese Dosis bei Nagern ausreicht, um D2-Rezeptoren zu blockieren [Farber et al., 2006].

### 5.1.3 Prinzip der neuronalen (pyramidalen) Disinhibition

Im Wesentlichen basiert der experimentelle Ansatz auf einer Disinhibition von Pyramidenzellen durch NMDA-Rezeptorantagonismus. Dieser Effekt wird über GABAerge ( $\gamma$ -Aminobuttersäure) Interneurone vermittelt, die zehn Mal so sensitiv für NMDA-Rezeptor-Antagonisten sind wie Pyramidenzellen [Grunze et al., 1996]. Der NMDA-Rezeptorantagonismus wirkt sich somit in der Bilanz weniger direkt auf die Pyramidenzellen aus, als vielmehr indirekt über die GABA-ergen Interneurone. Diese üben über rekurrente inhibitorische Projektionen eine hemmende Funktion auf exzitatorische Neurone aus. Die Inhibition GABAerger Interneurone führt somit zu einer verstärkten exzitatorischen Aktivität von Pyramidenzellen (s. Abbildung 1.3).

Da AMPA- ( $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropion) und Kainatrezeptoren weitestgehend unempfindlich für die inhibitorische Wirkung von MK-801 sind, kommt es zu verstärkter Glutamatfreisetzung und umfassenden nachgeschalteten Effekten durch die glutamatvermittelte Exzitotoxizität mit Folgen für Verhalten und Wahrnehmung. Mit dem Modell der pyramidalen Disinhibition wurde angestrebt, die Wirkung einer gestörten glutamatergen Neu-

## Diskussion

rotransmission, wie sie bei der Schizophrenie vermutet wird, auf das empfindliche Gleichgewicht von Neurogenese und Apoptose zu bewerten, die mögliche Ausbildung psychotischer Eigenschaften zu erkennen und diese Parameter miteinander zu korrelieren.

### 5.1.4 Die immunhistologische Färbung

Das Prinzip der indirekten immunhistologischen Darstellung von Proteinen ist ein weitläufig angewandtes Verfahren. Hierbei wird zunächst ein Primärantikörper appliziert, der spezifisch gegen das darzustellende Antigen gerichtet ist. Zur „Sichtbarmachung“ wird dann ein zweiter in irgendeiner Form markierter Antikörper verwendet, der spezifisch gegen den ersten Antikörper gerichtet ist. Die Markierung erfolgte bei den hier dargestellten Versuchen zum einen über Fluorochrome, die anschließend im Fluoreszenzmikroskop analysiert werden konnten. Außerdem kam das Prinzip der Meerrettichperoxidase-Reaktion zum Einsatz. Hierbei ist der Zweitantikörper biotinyliert. In einem weiteren Schritt wird mit Meerrettichperoxidase markiertes Streptavidin hinzugefügt, welches eine hohe Affinität zu Biotin aufweist. Im letzten Schritt wird Diaminobenzidin hinzugegeben, welches von der Meerrettichperoxidase in Gegenwart von  $H_2O_2$  in einen unlöslichen braunen Farbstoff umgewandelt wird. Auch dieses System wird häufig angewendet und ist gut etabliert. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper waren laut Herstellerangaben jeweils für das zu detektierende Antigen spezifisch. Jedoch ergab sich in der immunhistologischen Caspase-3-Detektion der Verdacht auf unspezifische Zellfärbungen:

In der Caspase-3-Färbung fiel auf, dass der Anteil Caspase-3-positiver Zellen in allen Untersuchungsgruppen mit 22% sehr hoch war. Die Caspase-3-positiven Zellen waren zumeist ovalär und maßen etwa  $7 \times 4 \mu m$ . Insbesondere in der Kontrollgruppe war das gehäufte Vorkommen apoptotischer Zellen nicht zu erwarten. Für die Positivkontrollen wurde Thymusgewebe von juvenilen Ratten, welches der Involution unterliegt, entsprechend dem Standardprotokoll gefärbt, für die Negativkontrollen wurden Thymuspräparate entsprechend Standardprotokoll gefärbt, jedoch wurde dabei der Primär- und/ oder der Sekundärantikörper weggelassen. In den Positivkontrollen zeigten sich zahlreiche Caspase-3-positive Zellen, in den Negativkontrollen wurden keine Zellen angefärbt.

In einer aus dem Institut für Pathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover stammenden Dissertation wird ebenfalls von der immunhistologischen Detektion von Caspase-3-positiven Zellen in Hirnschnitten von Mäusen der Kontrollgruppe berichtet [Schaudien, 2007]. Der verwendete Primärantikörper stammte wie in der hier vorliegenden Arbeit von Cell Signaling, USA. Auch in der immunhistologischen Färbung dieser Arbeitsgruppe wurden kleine, rundli-

## Diskussion

che, etwa 7µm durchmessende Caspase-3-positiven Zellen gesehen. Anhand der Morphologie dieser Zellen in der Hämalaun-Gegenfärbung vermuteten die Autoren, dass es sich entweder um Lymphozyten oder Oligodendrozyten handeln könnte. Zur Erkennung um welche Zelltypen es sich tatsächlich handelte, führte diese Arbeitsgruppe anschließend eine Doppelfärbung Caspase mit CD-3 (Lymphozyten) und CNPase (Oligodendrozyten) durch. Hierbei stellte sich heraus, dass die Caspase-3-positiven Zellen zu jeweils 50% Lymphozyten oder Oligodendrozyten waren. Eine weitere Dissertationsarbeit, die am Institut für Tierpathologie der Ludwigs-Maximilians-Universität München vorgelegt wurde, beinhaltet eine methodische Evaluierung der immunhistochemischen Detektion aktivierter Caspase 3 im Hippocampus als Apoptoseparameter nach inkompletter zerebraler Ischämie bei der Ratte [Matz, 2003]. Es wurden immunhistochemische Darstellungen von gesunden und von ischämisch geschädigten Rattenhirnen mit polyklonalen Antikörpern gegen aktivierte Caspase 3 verschiedener Hersteller durchgeführt. Dabei zeigte sich bei allen Herstellern eine in Abhängigkeit von der Charge mehr oder weniger auftretende Anfärbung von Zellen auch in den gesunden Tieren. Die Negativkontrollen waren auch hier jederzeit negativ.

Zusammenfassend scheint es bei den kommerziell erhältlichen Aktivierte-Caspase-3-Antikörpern bei der immunhistologischen Untersuchung von Hirnpräparaten zu einer unspezifischen Detektion –ggf. von Lymphozyten oder Oligodendrozyten- zu kommen. Eine ausgeprägte Zunahme der Apoptoserate wie sie nach einer cerebralen Ischämie auftritt wurde dabei jedoch trotz der unspezifischen Färbung erkannt.

### 5.1.5 Interpretation von immunhistologischen Färbungen

Eine allgemeine Einschränkung immunhistologischer Befunde besteht darin, dass nicht beurteilt werden kann, ob es sich bei eventuell festgestellten Veränderungen um Änderungen der Zellzahl im Sinne von Proliferation und Zelltod der Antigen-exprimierenden Zellen handelt oder ob es sich um Änderungen in der Expression der untersuchten Antigene handelt. Für die in dieser Arbeit untersuchten Marker sowie für die Fragestellung spielt dies jedoch nur eine untergeordnete Rolle. Insbesondere für die proliferations- und apoptoseassoziierten Proteine ist bekannt, dass diese nur innerhalb einer bestimmten Phase der Zellteilung (PCNA) oder des programmierten Zelltods bzw. der synaptischen Apoptose (aktivierte Caspase 3) exprimiert werden [Paunesku et al., 2001; van Diest et al., 1998; Yuan and Yankner, 2000]. Veränderungen von NeuN-exprimierenden Zellpopulationen sollten überwiegend auf Proliferation und Zelltod beruhen. Eine Um- oder Entdifferenzierung reifer Neurone in eine andere Zellklasse als Grundlage für numerische Veränderungen scheint unwahrscheinlich.

## Diskussion

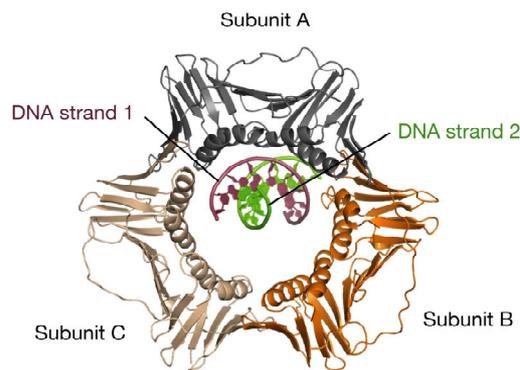
Einzig GFAP nimmt hier eine Sonderposition ein, da dieses nicht nur von reifen Astrozyten sondern auch von neuronalen Stammzellen in der subgranulären Zone des Hippocampus exprimiert wird (radiale Glia). Somit ist eine Unterscheidung zwischen ausdifferenzierten Astrozyten und GFAP-positiven Stammzellen mit der GFAP-Färbung allein nicht möglich. Ein grundlegendes Problem hierbei ist, dass es für neuronale Stammzellen im Gegensatz zu anderen Stammzellen keine spezifischen Marker gibt [Maurer, 2005]. Durch die Wahl der Zählareale kann jedoch indirekt ein Hinweis für Änderungen der Zellpopulation der radialen Glia oder der reifen Astrozyten erlangt werden. Je eine *region of interest* (ROI) waren die polymorphe Zellschicht und die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus. Dagegen wurde als weiteres Messareal ganz umschrieben die subgranuläre Zellschicht des Hippocampus gewählt. Die GFAP-positiven Zellen zeigten in der subgranulären Zellschicht überwiegend eine strahlenförmige Anordnung der Zellausläufer, wie für die radiale Glia beschrieben. Änderungen der GFAP-Dichte, die ausschließlich auf die subgranuläre Zellschicht beschränkt sind, könnten somit möglicherweise insbesondere durch Änderungen in der Zellpopulation der radialen Glia hervorgerufen worden sein.

Die GFAP-Flächendeckung pro Messfeld wird sowohl durch die Anzahl GFAP-positiver Zellen als auch durch das Ausmaß der glialen Verästelungen beeinflusst. Daher lässt sich anhand der Messung der GFAP-Flächendeckung nicht differenzieren, in welchem Ausmaß eine numerische Abweichung der Zellzahl oder eine unterschiedlich intensive Verästelung der glialen Zellen zugrunde liegen. Auch der mittlere Grauwert zur Bestimmung der BDNF-Intensität wird sowohl durch die Anzahl der BDNF-exprimierenden Zellen pro Messfeld als auch durch die Intensität der BDNF-Expression beeinflusst.

Zur Untersuchung der Proliferationsrate in der subgranulären Zone wurde der immunhistologische Marker PCNA (proliferating cell nuclear antigen) gewählt. Dieser wird Zellzyklus-abhängig exprimiert und wird in der Immunhistologie als etablierter Marker für proliferierende Zellen eingesetzt [Paunesku et al., 2001; van Diest et al., 1998]. PCNA hat im Gegensatz zu dem Mitosemarker BrdU, welcher bereits während des Versuchs verabreicht werden muss, den Vorteil, dass auch retrospektive Studien möglich sind, z.B. *post mortem*-Studien. BrdU dagegen wird als Thymidinanalogon während der S-Phase in proliferierende Zellen eingebaut und dient somit ebenfalls als Marker für proliferierende Zellen, muss jedoch in noch vitales Gewebe injiziert werden. Somit besteht mit dem Marker PCNA die Option, die in dem Tierversuch erhobenen Daten mit *post mortem*-Daten von schizophrenen Patienten zu vergleichen.

## Diskussion

Das PCNA-Protein ist ein Kofaktor der DNA-Polymerase  $\delta$ . Es liegt als homotrimeres Protein vor und befindet sich im Zellkern eukaryoter Zellen. Bei der DNA-Replikation umschließt es ringförmig den DNA-Strang und verhindert eine Dissoziation der DNA-Polymerase  $\delta$  von der DNA-Matrize (s. Abbildung 5.1). PCNA gehört in dieser Funktion zu der Gruppe der DNA-clamp-Proteine, die die DNA-Replikation unterstützen indem sie sich wie eine Klammer um den DNA-Strang legen [Tan et al., 1986; Tan et al., 1987].



**Abbildung 5.1:** Das homotrimere PCNA-Ringmolekül mit den Untereinheiten A –C umschließt den DNA-Strang während des Replikationsvorgangs und verhindert dadurch eine Dissoziation der DNA-Polymerase  $\delta$  von der DNA-Matrize [McNally et al., 2010]).

Das mitotische und frühe postmitotische Stadium, in dem Zellen PCNA-positiv sind, geht der Expression von Markern differenzierter Neurone oder Astrozyten voraus. Daher ist es zu diesem Zeitpunkt nicht möglich zu bestimmen, ob die PCNA-positiven Zellen zu glialen oder neuronalen Zellen heranreifen werden. Andere Marker wie zum Beispiel Ki-67 oder Doublecortin sind in dieser Hinsicht ebenfalls nicht überlegen. In der Literatur wird beschrieben, dass die Mehrzahl dieser Progenitorzellen zu Granularzellen heranreift [Gould et al., 1997; Kempermann et al., 2004a].

### 5.1.6 Verhaltenstests

Um Effekte auf Verhalten und Gedächtnisleistung zu überprüfen, wurden Tests im Y-Maze sowie der Tail Suspension Test angewandt. Die im Y-Maze durchgeführten Versuche ließen Aussagen über das räumliche Gedächtnis und den allgemeinen Erkundungstrieb der Tiere zu: Ein Test analysierte das spontan alternierende Verhalten im Y-Maze. In dem zweiten (zweizeitigen) Test wurde ein im ersten Teil des Tests blockierter Arm für den zweiten Teil des Tests geöffnet und die Anzahl der Zugänge in den neuen Arm sowie die im neuen Arm zugebrachte

## Diskussion

Zeit gemessen. Außerdem wurde erfasst, ob sich das Tier nach Öffnen des zuvor verschlossenen Arms als erstes in den neuen Arm begab, oder zunächst einen bereits bekannten Arm betrat. Beide Tests basieren auf der Neigung von Ratten, eine für sie unbekannte Umgebung zu erkunden [Lalonde, 2002] und sind gängige Verfahren zur Erfassung der räumlichen Arbeitsgedächtnisleistung bei Nagern [Brito et al., 1983; Dellsu et al., 1992; Dellsu et al., 2000; Mandillo et al., 2008].

Dagegen wurden im Tail Suspension Test die Anzahl der versuchten Selbststretungen und die Anzahl der Vokalisationen gezählt. Es ist beschrieben, dass die Dauer der Immobilität mit der Ausprägung depressiver Symptome korreliert [Hayase, 2008; Hayase, 2011; Varty et al., 2003]. Analog hierzu wurden eine Verringerung der versuchten Selbststretungen oder der Vokalisationen als Zeichen für Apathie (Negativsymptomatik) gewertet. Unterstützend für die Annahme, dass die Anzahl der Vokalisationen und die Anzahl der Selbststretungen in ähnlicher Weise zu interpretieren sind, zeigte sich, dass die Parameter hoch signifikant miteinander korrelierten (Spearman's Koeffizient 0,491;  $p < 0,001$ ).

### 5.1.7 Genexpressionsanalyse

Microarrays sind eine gängige Methode um die Expression von mehreren Tausend Genen parallel zu erfassen. Es handelt sich hierbei um ein semi-quantitatives Verfahren, das, wie z.B. der Northern Blot, auf dem Prinzip der DNA-Hybridisierung basiert [Lockhart et al., 1996]. Die aus dem zu untersuchenden Gewebe extrahierte mRNA wird zunächst mittels der reversen Transkriptase in einzelsträngige cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben. Diese cDNA wird mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden hergestellt und kann dadurch anschließend sichtbar gemacht werden. Auf dem Raster des Microarray-Chips sind in jedem Feld einzelsträngige Sequenzen der Gene, deren Expression untersucht werden soll, immobilisiert. Die cDNA-Mischung wird auf den Chip gegeben, hierbei verbinden sich spezifisch die komplementären DNA-Stränge (Hybridisierung). Nach Abwaschen des Überstandes wird die Fluoreszenzintensität in den Rastern des Chips erfasst [Nedeljka Tatarovic, 2007].

Technische Fehlerquellen der Microarray-Analyse sind unter anderem Unterschiede in der mRNA-Qualität zwischen den Proben, ungleiches Auftragen der cDNA-Mischung, unterschiedliche Mengen an DNA-Sonden in den Feldern des Chips, unspezifische DNA-Bindungen, unspezifische Hintergrundstrahlung und Streustrahlung aus Nachbarfeldern sowie technische Einschränkungen der Fluoreszenzanalyse durch nicht lineare Transmission und Sättigungseffekte [Yevhen Vainshtein, 2010]. Ein anderes grundsätzliches Problem ist durch die Erfassung der Expression einer besonders großen Anzahl von Genen bedingt und die damit

## Diskussion

einhergehende Möglichkeit von falsch-positiven Ergebnissen selbst bei einer insgesamt niedrigen Fehlerrate. Des Weiteren werden in diesem semi-quantitativen Verfahren nur Unterschiede in der relativen Genexpression erfasst. Geeignet ist der Microarray somit zum Erkennen möglicher Kandidatengene innerhalb eines zu erforschenden Pathomechanismus. Zur Validierung der Ergebnisse sollten die biologisch interessanten Gene, welche im Microarray differenziell exprimiert werden, mit weiteren Verfahren untersucht werden. Hierzu bietet sich klassischerweise die quantitative PCR (polymerase chain reaction) an. Des Weiteren könnten z.B. mittels Western Blot die Proteine der differenziell exprimierten Gene untersucht werden, um nachzuweisen, dass sich eine Veränderung der mRNA-Menge auch tatsächlich auf Proteinebene widerspiegelt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA der rechten Hippocampi der Versuchstiere extrahiert. Im Microarray wurden davon ca. 30.000 Sequenzen erfasst. Auf differenzielle mRNA-Expression untersucht wurden hiervon die Gene, die in Zusammenhang mit der wissenschaftlichen Fragestellung dieser Arbeit stehen. Hierzu zählen gliale und neuronale Marker, Rezeptoren und Transporter des glutamatergen Systems sowie apoptotisch oder neuroprotektiv wirkende Proteine. Da die mRNA aus dem Gesamthippocampus gewonnen wurde, werden potentielle Genexpressionsänderungen innerhalb umschriebener hippocampaler Zellverbände möglicherweise nicht durch diese Untersuchung abgebildet.

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.2.1 Änderungen der hippocampalen Neuronen- und Gesamtzellzahl (Immunhistologie) in der vorliegenden Arbeit und in der Literatur**

Beim Vergleich der Neuronenzahl oder der Gesamtzellzahl pro Fläche in der polymorphen Zellschicht des Hippocampus fielen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen auf. Es zeigte sich lediglich ein Trend zu verminderter Neuronenzahl pro Fläche in den Tieren, die eine Koapplikation von MK-801 und Haloperidol erhalten hatten ( $p_{(\text{HMK vs. K})} = 0,070$  im Mann-Whitney-U-Test), sowie ein Trend zu einer vermehrten Anzahl nicht neuronaler Zellen (Anzahl Zellkerne minus Anzahl NeuN<sup>+</sup> Zellen;  $p_{(\text{HMK vs. K})} = 0,058$ ). Berechnete man jedoch den Anteil neuronaler Zellen an der Gesamtzellzahl (Neuronalität), zeigte sich eine Reduktion desselben in den Tieren, die eine MK-801- und Haloperidol-Koapplikation erhalten hatten ( $p_{(\text{HMK vs. K})} = 0,017$ ).

## Diskussion

Das tendenziell zahlenmäßig erhöhte Vorkommen von nicht neuronalen Zellen in der polymorphen Zellschicht des Hippocampus in der Gruppe der MK-801 und Haloperidol-Koapplikation könnte auf eine Zunahme der Population der Mikroglia zurückzuführen sein. Hierfür spricht, dass die GFAP-Dichte in der polymorphen Zellschicht unverändert war, somit eine Vergrößerung der zahlenmäßig stärksten Zellpopulation im ZNS, der Astroglia, nicht ursächlich zu sein scheint. Eine Zunahme der Neuronenzahl in der polymorphen Zellschicht wurde mit der NeuN-Immunhistologie ausgeschlossen. Außerdem ist die Neuronenzahl bereits negativ in dem berechneten Wert der „nicht-neuronalen“ Zellen enthalten (Anzahl Zellkerne/mm<sup>2</sup> minus Anzahl Neurone/mm<sup>2</sup>). Nachdem Ependymzellen ausschließlich die inneren Nervenwasserräume auskleiden, bleiben als mögliches Substrat der zahlenmäßigen Zunahme einer nicht-neuronalen und nicht-astrozytären Zellpopulation im Hippocampus nur noch zwei im ZNS bekannte Zellpopulationen übrig: die Oligodendrozyten und die Mikroglia. Am wahrscheinlichsten scheint eine reaktive Zunahme der immunkompetenten Zellen zu sein (Mikroglia oder eingewanderte Lymphozyten/ Monozyten). Diese kommen z.B. nach exzitotoxischem Stress vermehrt vor. Diese Interpretation wird auch durch Befunde des Microarrays gestützt, in dem sich in der HMK-Gruppe eine Zunahme der mRNA-Menge von neuroprotektiven Faktoren zeigte, die üblicherweise nach exzitotoxischem Stress vermehrt exprimiert werden (s. Abschnitt 5.2.3).

In bildgebenden Studien an schizophrenen Patienten wurden häufig Volumenverluste in hippocampalen und kortikalen Hirnregionen gefunden [Ebdrup et al., 2010; Venkatasubramanian, 2010]. Ein weiteres Indiz für die Beteiligung des Hippocampus an der Pathogenese der Schizophrenie erbrachte eine MRT-Studie an jungen Verwandten von schizophrenen Patienten. Diese wiesen einen kleineren Hippocampus verglichen mit Personen ohne positive Familienanamnese auf [Ho and Magnotta, 2010].

Die in *post mortem*-Studien an schizophrenen Patienten erhobenen Daten bezüglich Veränderungen neuronaler und glialer Zytoarchitektur zeigen ebenfalls häufig Volumenverluste in kortikalen oder hippocampalen Arealen, bleiben aber insgesamt uneinheitlich. So wurde auch von einer kompletten Abwesenheit zahlenmäßiger Veränderungen im gesamten Kortex [Pakkenberg, 1993] oder im präfrontalen Kortex berichtet [Akbarian et al., 1995; Thune and Pakkenberg, 2000]. Auch eine erhöhte neuronale Dichte im präfrontalen und okzipitalen Kortex kam vor; dies wird von verschiedenen Autoren als sekundärer Effekt durch Rückgang des Neuropil erklärt [Selemon et al., 1998; Selemon, 2004]. Ebenso wurde gezeigt, dass in Gehirnen schizophrener Patienten eine reduzierte Expression synaptischer Markerproteine vorlag [Eastwood and Harrison, 1995; Mirnics et al., 2000; Thompson et al., 1998; Young et al.,

## Diskussion

1998]. In der hier vorliegenden Arbeit wurde keine veränderte neuronale Gesamtzellzahl in der polymorphen Schicht der mit MK-801 behandelten Tiere gefunden. Effekte auf bestimmte Interneuronenpopulationen konnten hingegen nachgewiesen werden. Zum Beispiel zeigte sich in der mit MK-801 behandelten Gruppe eine deutliche Reduktion der Anzahl Parvalbumin-positiver Interneurone im Hippocampus [Braun et al., 2007]. Des Weiteren muss einschränkend erwähnt werden, dass eine Zählung der dicht gepackten Neurone in der Körnerzellschicht in der vorliegenden Untersuchung nicht erfolgte. Der Großteil der im Rahmen der adulten Neurogenese entstandenen Neurone entwickelt sich zu Körnerzellen, so dass ein quantitativer Effekt durch Änderungen der Neurogenese zuerst in der Körnerzellschicht zur Darstellung kommen sollte.

### 5.2.2 Gliale Alterationen in der subgranulären Schicht und differenzielle Expression glialer Gene im Gesamthippocampus nach MK-801- und Haloperidol-Koapplikation

In der Gruppe, die eine MK-801- und Haloperidol-Koapplikation erhalten hatte, zeigte sich mittels der Funktion „area fraction“ in der Bildanalyse eine verminderte Dichte GFAP-positiver Zellen bzw. Verästelungen in der subgranulären Zellschicht. In den anderen untersuchten Regionen zeigten sich zwischen den Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede in der GFAP-Dichte. Auch bei der Untersuchung der GFAP-mRNA des gesamten Hippocampus zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Dagegen fiel auf mRNA-Ebene eine signifikant verminderte Expression des glialen hochaffinen Glutamattransporters EAAT2 (GLT-1) in der MK-801- und Haloperidol-Koapplikations-Gruppe auf. Dieser spielt zusammen mit der Glutamin-Synthetase, die die Reaktion von Glutamat zu Glutamin katalysiert, eine wesentliche Rolle im zerebralen Glutamatstoffwechsel. Über die glialen Glutamattransporter wird das extrazelluläre Glutamat in die Astrozyten transportiert, wo es mittels Glutamin-Synthetase zu Glutamin deaminiert wird. Zum Schutz vor glutamaterger Exzitotoxizität sind EAAT2 und die Glutamin-Synthetase daher unerlässlich. Auch die Glutamin-Synthetase wurde in den Hippocampi der HMK-Tiere minderexprimiert. Zusammen ergibt sich hierdurch ein erhöhtes Risiko für Zellschädigungen durch hohe extrazelluläre Glutamatlevel (Exzitotoxizität). Die Befunde des Microarrays könnten somit möglicherweise eine pathomechanische Erklärung für die verminderte GFAP-Dichte in der subgranulären Zone und für die tendenziell verminderte Neuronenzahl in der polymorphen Schicht der HMK-Tiere liefern.

Eine eindeutige Differenzierung, welcher Anteil an der verminderten GFAP-Dichte in der subgranulären Zone durch einen Rückgang radialer Glia mit Stammzeleigenschaften bedingt ist und welcher Anteil durch eine Reduktion ausdifferenzierter Astrozyten ohne Stammzelei-

## Diskussion

genschaften, kann mit der alleinigen GFAP-Färbung nicht erfolgen. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, gibt es keinen einheitlichen Marker für neuronale Stammzellen bzw. radiale Glia [Maurer, 2005]. Radiale Glia kann GFAP-positiv oder GFAP-negativ sein. In Abhängigkeit von Zellzyklus und Subpopulation können unter anderem die Intermediärfilamente Vimentin oder Nestin exprimiert werden [Dahl et al., 1982; Doetsch et al., 1999; Lendahl et al., 1990].

Vieles spricht jedoch dafür, dass der Verlust GFAP-positiver Zellen in der Gruppe, die eine MK-801- und Haloperidol-Koapplikation erhielt, zum großen Teil durch einen Verlust an radialer Glia bedingt sein könnte, die zum einen selbst Stammzeleigenschaften besitzt und zum anderen als Leitstruktur für die neuronale Migration dient: Einerseits handelt es sich um einen ausschließlich auf die subgranuläre Zone beschränkten Rückgang der GFAP-positiven Zellen, der Ort an dem im Hippocampus Neurogenese stattfindet und für den bekannt ist, dass sich hier radiale Glia mit Stammzeleigenschaften befindet. Andererseits zeigte sich im Microarray eine signifikant niedrigere mRNA-Expression von Notch1. Notch1 ist ein Transmembranprotein, das in radialer Glia exprimiert wird [Tokunaga et al., 2004]. Astrozyten in der subgranulären Schicht, der proliferativen Zone des Hippocampus, exprimieren deutlich mehr Notch1 als Astrozyten in der Molekularschicht oder den Regionen CA1 bis CA3 [Sibbe et al., 2009]. Hohe Notch1-Level führen zur Aufrechterhaltung der radialen-Glia-Identität und begünstigen somit neuronale und gliale Proliferation [Breunig et al., 2007; Li et al., 2008]. In der Zellkultur trägt Notch1 zur Aufrechterhaltung von Stammzeleigenschaften neuronaler Progenitorzellen bei [Woo et al., 2009]. Die Reduktion der Notch1-Expression in der Gruppe der Koapplikation zusammen mit der verminderten Dichte GFAP-positiver Zellen in der subgranulären Zellschicht, kann somit auf eine Notch1-abhängige Reduktion der radialen Glia in der subgranulären Zellschicht hindeuten.

Bezüglich glialer Alterationen nach Haloperidolapplikation konnte in einer Untersuchung an Ratten nach 6-monatiger Haloperidolapplikation (1,5 mg/ kg Körpergewicht) gezeigt werden, dass die Expression des glialen Glutamattransporters 1 (GLT-1, EAAT2) signifikant vermindert war [Schmitt et al., 2003]. An Makaken wurde nach chronischer Haloperidolgabe mit immunhistologischen Methoden eine reduzierte Astrozytenzahl festgestellt [Konopaske et al., 2008]. Untersuchungen über den Effekt einer Haloperidolmedikation bei glutamaterger Dysfunktion auf gliale Alterationen konnten bei der Literaturrecherche nicht gefunden werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die alleinige Haloperidolapplikation über eine Woche keinen Effekt auf die gliale Ultrastruktur des Hippocampus hatte. Jedoch kam es bei Aufeinandertreffen dieses Neuroleptikums auf eine durch NMDA-Rezeptorantagonismus be-

## Diskussion

stehende glutamaterge Dysfunktion, wie sie bei der Schizophrenie vermutet wird, zu einer Rarefizierung von glialen Zellen in der subgranulären Schicht. Diese Schicht ist von besonderem Interesse, da in ihr neue Neurone entstehen, die –sofern sie überleben- in das hippocampale Netzwerk integriert werden.

### 5.2.3 Hinweise für einen neurotoxischen Effekt von Haloperidol bei glutamaterger Dysfunktion durch NMDA-Rezeptor-Blockade

Interessant ist der Trend zu verminderter Neuronenzahl pro Fläche und der signifikante Rückgang der Neuronalität in der polymorphen Zellschicht der mit MK-801 und Haloperidol behandelten Gruppe. Dies wirft Fragen bezüglich einer möglichen Neurotoxizität von Haloperidol bei schizophrenen Patienten auf. Neuere bildgebende Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen Haloperidolapplikation und Volumenreduktion der grauen Substanz:

In einem systematischen Review von 26 MRT-Studien zeigte sich in den Studien, welche neuroleptisch behandelte Patienten eingeschlossen hatten, eine einheitlichere Volumenreduktion der grauen Substanz als in solchen Studien, in denen keine neuroleptisch behandelten Patienten eingeschlossen waren. Die Autoren folgern hieraus, dass einige der volumetrischen Veränderungen, die der Schizophrenie zugeschrieben werden, auch Effekte einer neuroleptischen Medikation sein könnten [Moncrieff and Leo, 2010]. Eine weitere bildgebende Studie verglich nach Erstmanifestation einer Schizophrenie volumetrische Veränderungen der grauen Substanz unter Haloperidol- oder Olanzapintherapie. Die Haloperidoltherapie war im Gegensatz zur Olanzapintherapie signifikant mit einer Volumenreduktion von grauer Substanz vergesellschaftet [Lieberman et al., 2005]. Untersuchungen zur Wirkungsweise von Haloperidol zeigten einerseits, dass dieses Neuroleptikum vor NMDA-induzierter Neurotoxizität schützt [Ilyin et al., 1996; Nishikawa et al., 2000]. Andererseits gibt es aber auch Hinweise, dass Haloperidol in hippocampalen Neuronen oxidative Toxizität über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) induziert [Post et al., 1998]. Diese oxidative Toxizität wird unter anderem für die extrapyramidalen Nebenwirkungen wie z.B. die tardive Dyskinesie verantwortlich gemacht [Diederich and Goetz, 1998; Marsden and Jenner, 1980]. Haloperidol kann außerdem über die Mitogen-aktivierte Proteinkinase p38 neuronale Apoptose induzieren [Noh et al., 2000]. Dies konnte durch Applikation eines NMDA-Rezeptorantagonisten nicht verhindert werden [Noh et al., 2000]. Somit gibt es auch in der Literatur Hinweise auf eine mögliche neurotoxische Komponente von Haloperidol bzw. auf einen durch Haloperidol induzierten Volumenverlust in bildgebenden Studien, die die vorliegenden im Tiermodell erhobenen Daten stützen.

## Diskussion

### 5.2.4 Mögliche zugrundeliegende Mechanismen der neuronalen und glialen Veränderungen in der Gruppe der MK- und Haloperidol-Koapplikation

Die mit einer Haloperidol- und MK-801-Koapplikation behandelten Tiere zeigten jedoch nicht nur einen reduzierten Anteil neuronaler Zellen an der Gesamtzellzahl im Hilus des Gyrus dentatus, es zeigte sich auch eine Verminderung der GFAP-Dichte in der subgranulären Zone des Hippocampus. Hierbei handelt es sich um eine Zellnische, in der sich neuronale Stammzellen befinden, die in Abhängigkeit des Zellzyklus auch GFAP-positiv sind (radiale Glia) und die auch im Erwachsenenalter noch neue Neurone generieren. Unterstützend für die Annahme, dass die selektiv in der subgranulären Zone bestehende Verminderung der GFAP-Dichte unter anderem auf eine Reduktion der dort lokalisierten radialen Glia mit Stammzeleigenschaften zurückzuführen sein könnte, zeigte sich im Microarray des Gesamthippocampus in derselben Behandlungsgruppe eine Reduktion von Notch1. Notch1 wird von radialer Glia exprimiert und trägt zum Erhalt der radialen-Glia-Identität sowie zur Selbsterneuerung der neuronalen Stammzellen bei [Aguirre et al., 2010; Gaiano et al., 2000; Mizutani et al., 2007].

Trotz einer möglichen Reduktion der Population der radialen Glia in der subgranulären Zone des Hippocampus, gab es immunhistologisch in der PCNA-Färbung keine Hinweise für eine verminderte Mitoserate in der subgranulären Zone in der Gruppe der MK-801- und Haloperidol-Koapplikation. Somit scheint eine verminderte Neurogenese als Ursache für die tendenziell verminderte Neuronenzahl in der polymorphen Zellschicht unwahrscheinlich. Ein weiterer interessanter Ansatz, die Reduktion der glialen Dichte in der subgranulären Zone des Hippocampus mit dem tendenziellen Rückgang der Neuronenzahl in der polymorphen Zellschicht kausal zu verknüpfen, ergibt sich aus einer Studie von Song et al., in der gezeigt wurde, dass gliale Zellen in der Zellkultur in der Lage sind, Stammzellen in Richtung einer neuronalen Differenzierung zu instruieren [Song et al., 2002]. Eine Reduktion der glialen Zelldichte in der subgranulären Schicht könnte somit eine verminderte neuronale Differenzierung der neu gebildeten Progenitorzellen nach sich gezogen haben. Dagegen spricht jedoch, dass die subgranulär entstehenden Neurone überwiegend zu Körnerzellen heranreifen und nicht zu hilären Neuronen [Gould et al., 1997], welche in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Somit sollte eine Änderung des Anteils an Progenitorzellen, welche sich zu Neuronen differenzieren, keinen wesentlichen Einfluss auf die Neuronendichte in der polymorphen Zellschicht haben.

Stattdessen zeigten sich im Microarray Hinweise für eine erhöhte glutamaterge Exzitotoxizität in der Gruppe, die MK-801 und Haloperidol erhielt: Zum einen zeigte sich auf mRNA-Ebene ein Anstieg von Transkripten, die typischerweise nach exzitotoxischem/ oxidativem Stress

## Diskussion

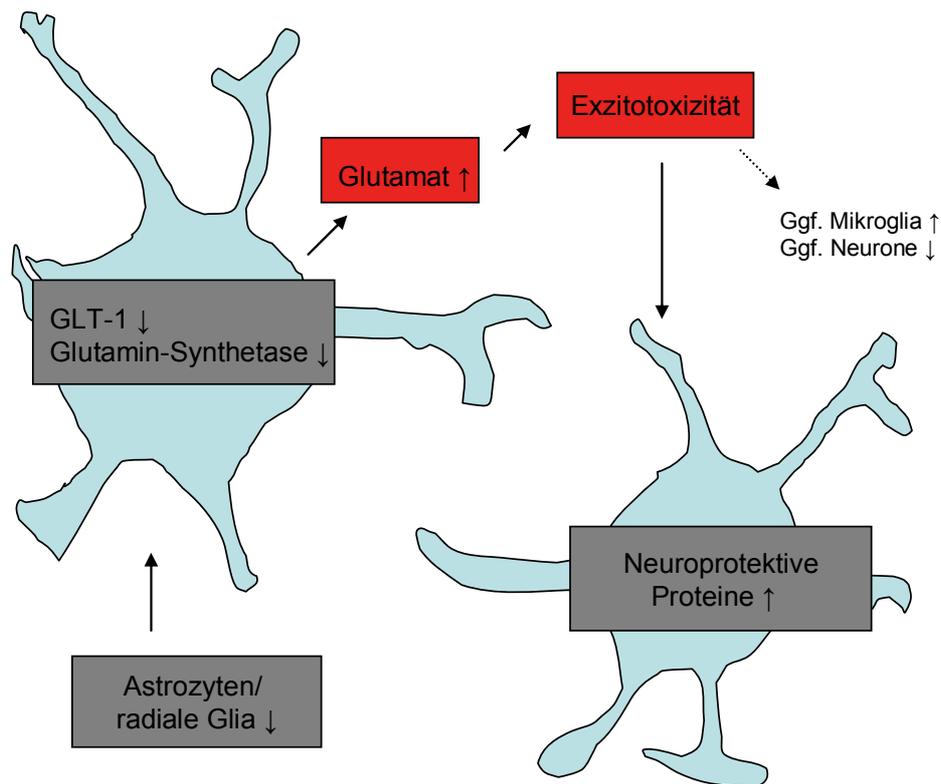
vermehrt gebildet werden. Hierzu gehören der Transkriptionsfaktor NRF2 (NF-E2-related factor 2), die Thioredoxin-Reduktase und Peroxiredoxin 1 und -3 [Johnson et al., 2008; Kraft et al., 2006; Lee et al., 2003a; Lee et al., 2003b; Vargas et al., 2008]. Zum anderen zeigte sich in der HMK-Gruppe im Microarray eine Verminderung des für die Glutamatclearance aus dem Extrazellulärraum äußerst wichtigen glialen Glutamattransporters EAAT2 (GLT-1) sowie der ebenfalls zur Glutamathomöostase unabdingbaren Glutamin-Synthetase. Diese katalysiert in Gliazellen die Reaktion von Glutamat zu Glutamin und schützt somit vor glutamaterger Neurotoxizität.

Insgesamt weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf eine möglicherweise erhöhte Neurotoxizität von Haloperidol hin, wenn dieses auf eine glutamaterge Dysfunktion trifft, wie sie bei der Schizophrenie vermutet wird. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach alleiniger Haloperidolapplikation bei gesunden Ratten (Gruppe HA) weder ein Trend zu einer reduzierten neuronalen Zellzahl im Hippocampus, noch wurden Veränderungen der glialen Ultrastruktur oder eine differenzielle RNA-Expression glialer Marker detektiert. Auch die RNA-Expression von neuroprotektiven Proteinen, die nach oxidativem Stress vermehrt gebildet werden, war in den Hippocampi der Tiere, die ausschließlich Haloperidol erhalten hatten, nicht erhöht.

Zusammenfassend weisen die immunhistologischen Veränderungen und die differenzielle RNA-Expression im Hippocampus der HMK-Tiere auf eine erhöhte glutamaterge Exzitotoxizität aufgrund glialer Veränderungen nach Haloperidolmedikation bei NMDA-Rezeptorunterfunktion hin. Der tendenzielle Rückgang der Neuronenzahl zusammen mit dem Trend zu einer zahlenmäßig größeren Population an nicht neuronalen Zellen, die immunkompetente Zellen darstellen könnten, steht somit möglicherweise in Einklang mit den im Microarray gefundenen Hinweisen für eine erhöhte glutamaterge Exzitotoxizität in der Gruppe der MK-801- und Haloperidol-Koapplikation. Eine Übersicht über die immunhistologischen Veränderungen und die Veränderungen in der relativen RNA-Expression nach MK-801- und Haloperidol-Koapplikation gibt die Abbildung 5.2 wieder.

Dass die signifikant verminderte GLT-1-RNA-Expression im Gesamthippocampus jedoch einzig auf die selektive Reduktion der glialen Zellen in der subgranulären Schicht zurückzuführen ist, scheint unwahrscheinlich. Möglicherweise könnte es sich zusätzlich um eine direkte Interaktion zwischen den Pharmaka und GLT-1 handeln. Nach Deaktivierung des für den *metabotropen* Glutamatrezeptor 3 codierenden Gens (GRM3) ist beispielsweise eine verminderte GLT-1-Expression auf Proteinebene beschrieben [Lyon et al., 2008].

## Diskussion



**Abbildung 5.2:** Mögliche kausale Verknüpfung der hippocampalen Veränderungen in der Gruppe der MK-801 und Haloperidol-Koapplikation. Es zeigte sich ein Rückgang der GFAP-positiven Zellfraktion in der subgranulären Zellschicht (Astrozyten und/ oder radiale Glia). Im gesamten Hippocampus war die mRNA-Expression des glialen Glutamattransporters GLT-1 und der vorwiegend in Gliazellen exprimierten Glutamin-Synthetase signifikant vermindert (Microarray). Hierdurch ist eine erschwerte Glutamatclearance aus dem Extrazellularraum zu erwarten. Hinweise auf tatsächlich stattgehabte Exzitotoxizität gibt der Anstieg der mRNA-Expression von neuroprotektiven Proteinen (NRF2, Thioredoxin-Reduktase 1, Peroxiredoxin 1 und 3 im Hippocampus der HMK-Gruppe), welche üblicherweise nach oxidativem/ glutamatergen Stress vermehrt exprimiert werden.

### 5.2.5 hippocampale BDNF-Expression (Immunhistologie und Microarray) in diesem Versuch und in der Literatur

In den untersuchten Regionen Körnerzellschicht, polymorphe Zellschicht, CA3 und CA1 konnten zwischen den Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede der BDNF-Intensität festgestellt werden. Es fiel jedoch auf, dass ein in der Kontrollgruppe bestehender Gradient in der BDNF-Expression zwischen den untersuchten anatomischen Regionen (CA1 > Körnerzellschicht > CA3 > polymorphe Zellschicht) sich auch in der MK-801- und in der Haloperidolgruppe, jedoch nicht in der Gruppe der MK-801- und Haloperidol-Koapplikation dar-

## Diskussion

stellte. In dieser Gruppe war die BDNF-Expression in der CA1 in Relation zu den anderen drei Regionen nicht mehr signifikant erhöht. In der Genexpressionsanalyse zeigte sich auf mRNA-Ebene kein Unterschied in der BDNF-Expression zwischen den Behandlungsgruppen. Die relative Menge der TrkB-mRNA-Transkripte war in der MK-801-Gruppe tendenziell -jedoch nicht signifikant- verringert.

Übereinstimmend mit der Tendenz zu niedrigerer TrkB-Expression im Hippocampus auf mRNA-Ebene in dem hier angewandten tierexperimentellen Ansatz fanden Takahashi et al. in einer *post mortem*-Studie mittels ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) bei schizophrenen Patienten eine reduzierte Expression von TrkB im Hippocampus sowie im präfrontalen Kortex im Vergleich zu gesunden Personen. Dagegen war die BDNF-Expression im Hippocampus und im anterioren Cingulum erhöht [Takahashi et al., 2000]. In einer immunhistochemischen *post mortem*-Untersuchung zeigte sich dagegen eine intensivere BDNF- und TrkB-Färbung in der hippocampalen Formation schizophrener Patienten [Iritani et al., 2003]. Außerdem fielen in dieser Untersuchung morphologische Unterschiede der TrkB-exprimierenden Neurone auf, die die Autoren als Hinweis für eine Dysfunktion von TrkB bei schizophrenen Patienten werteten [Iritani et al., 2003]. In einer weiteren *post mortem*-Untersuchung mittels ELISA zeigte sich eine erhöhte BDNF-Expression in Kortexarealen schizophrener Patienten, in hippocampalen Arealen jedoch eine verringerte BDNF-Expression [Durany et al., 2001].

Das BDNF-Gen gilt außerdem als Kandidatengen der Schizophrenie, da der Valin/ Methionin-Polymorphismus im Codon 66 (Val66Met) im BDNF-Gen die Wahrscheinlichkeit, eine Schizophrenie zu entwickeln, erhöht. Menschen, die den Val/Met-Polymorphismus tragen, weisen verglichen mit Menschen, die die Val/Val-Variante tragen, ein schlechteres räumliches Arbeitsgedächtnis auf [Egan et al., 2003; Hariri et al., 2003]. Außerdem zeigten sich in MRT-Studien bei Trägern der Val/Met-Variante kleinere hippocampale Volumina als bei Menschen, die die Val/Val-Variante tragen [Pezawas et al., 2004; Szeszko et al., 2005]. Den Zusammenhang zwischen dem Val66Met-Polymorphismus und der Entwicklung einer Schizophrenie wurde von Hong et al an 93 schizophrenen Patienten und 198 gesunden Personen untersucht. Bei den schizophrenen Patienten kam der Val66Met-Polymorphismus tendenziell häufiger vor. Das Signifikanzniveau wurde jedoch verfehlt ( $p = 0,055$ ). Vergleich man jedoch nur die schizophrenen Patienten, die gut auf eine Clozapintherapie reagierten mit den gesunden Personen, so kam in der Gruppe der Erkrankten der Val66Met-Polymorphismus häufiger vor ( $p = 0,023$ ) [Hong et al., 2003]. Numata et al. konnten in einer Studie an 159 Patienten zeigen, dass der Val66Met-Polymorphismus einen Effekt auf das Alter der Erstmanifestation hatte. Das mittlere

## Diskussion

Alter der Erstmanifestation waren 27,5 Jahre bei Vorliegen der Val/Val-Variante und 22,9 Jahre bei Vorliegen der Met/Met-Variante [Numata et al., 2006]. Der Val66Met-Polymorphismus scheint außerdem die Anfälligkeit für andere neuropsychiatrische Erkrankungen wie M. Alzheimer [Ventriglia et al., 2002], Depression [Sen et al., 2003] und bipolare Störungen [Neves-Pereira et al., 2002] zu erhöhen.

Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass es nach hoch dosierter MK-801-Gabe (3 mg/ kg Körpergewicht) zu einer Reduktion der BDNF-mRNA-Expression im Hippocampus von Ratten kam [Castren et al., 1993]. In einer weiteren Studie konnten Fumagalli et al. zeigen, dass es zwei Stunden nach MK-801-Gabe (1 mg/ kg Körpergewicht) zu einer Reduktion der BDNF-mRNA-Level im Hippocampus von Ratten kam [Fumagalli et al., 2003]. Wurden die Versuchstiere jedoch erst sechs Stunden nach Verabreichung von 1 mg/ kg Körpergewicht MK-801 getötet, war die nach zwei Stunden noch vorhandene BDNF-Reduktion bereits nicht mehr nachzuweisen [Fumagalli et al., 2003]. In derselben Studie wurde auch eine niedrigere MK-801-Dosis gewählt (0,1 mg/ kg Körpergewicht). Nach Verabreichung dieser niedrigeren Dosis waren weder nach zwei noch nach sechs Stunden Veränderungen des BDNF-mRNA-Levels zu objektivieren. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich weder immunhistologisch noch auf mRNA-Ebene eine Veränderung der BDNF-Expression im Hippocampus der Versuchstiere, die MK-801 verabreicht bekommen hatten. Berücksichtigt man die von Fumagalli gewonnenen Ergebnisse, so mag dies sowohl an der deutlich niedrigeren MK-801-Dosis als auch an dem längeren Zeitraum (24 Stunden) zwischen letzter Medikamentengabe und Tötung der Tiere liegen. In der vorliegenden Arbeit wurde über einen Zeitraum von drei Wochen eine subanästhetische MK-801-Dosis von 0,02 mg/ kg Körpergewicht verabreicht. MK-801 in dieser Dosis vermag keine akuten psychotischen Symptome oder neurologische Veränderungen auszulösen. Die niedrige Dosis sowie die Verabreichung über drei Wochen sollten die chronische Natur der Schizophrenie nachbilden.

In der o.g. Studie von Fumagalli et al. wurde außerdem die Wirkung einer Koapplikation von MK-801 (1 mg/ kg Körpergewicht) und Haloperidol (1 mg/ kg Körpergewicht) auf die BDNF-Expression im Hippocampus untersucht. Nach MK-801- und Haloperidol-Koapplikation kam es zu einer um 61 Prozent stärkeren BDNF-mRNA-Reduktion im Hippocampus der Versuchstiere als nach alleiniger MK-801-Gabe [Fumagalli et al., 2003]. Dagegen waren nach Haloperidolgabe alleine keine Veränderungen der BDNF-mRNA-Expression im Hippocampus zu beobachten. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden sowohl Haloperidol alleine als auch eine Koapplikation von MK-801 und Haloperidol verabreicht, um das Aufeinandertreffen eines Neuroleptikums auf einen gestörten Glutamatstoffwechsel durch NMDA-Rezeptor-

## Diskussion

Dysfunktion zu imitieren, wie es bei der Schizophrenie vermutet wird. Hier zeigte sich weder nach ausschließlicher Haloperidolgabe noch nach MK-801- und Haloperidol-Koapplikation eine Veränderung der BDNF-Expression auf mRNA-Ebene (Microarray) oder auf Proteinebene (Immunhistologie). Die fehlende Beeinflussung der hippocampalen BDNF-Expression nach alleiniger Haloperidolgabe steht mit den Ergebnissen von Fumagalli et al. in Einklang. Im Gegensatz zu den Untersuchungsbefunden von Fumagalli et al. kommt es in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht zu einer Reduktion der BDNF-Expression nach MK-801- und Haloperidol-Koapplikation. Als mögliche Ursache kommt hierfür ebenfalls wie bereits oben in diesem Abschnitt beschrieben die deutlich niedrigere MK-801-Dosis sowie die längere Latenzzeit zwischen letzter Medikamentenapplikation und Tötung in Frage.

BDNF wird außerdem eine wichtige Rolle bei der Langzeitpotenzierung zugeschrieben [Aicardi et al., 2004; Thoenen, 1995]. Interessanterweise zeigte sich in der Zellkultur hippocampaler Neurone, dass akute BDNF-Stimulation zu einer Heraufregulierung der Menge an NMDA-Rezeptoruntereinheiten (NR) 1, 2a und 2b auf mRNA und auf Proteinebene führte. Dies war außerdem mit einer erhöhten Aktivität der NMDA-Rezeptoren vergesellschaftet [Caldeira et al., 2007]. Möglicherweise wird durch eine erhöhte BDNF-Expression nach niedrig dosierter MK-801-Gabe oder bei schizophrenen Patienten somit zumindest zum Teil eine vermutete glutamaterge Dysfunktion kompensiert.

Die Datenlage in *post mortem*-Studien bleibt widersprüchlich. BDNF und TrkB bleiben unter anderem aufgrund ihrer engen Verknüpfung mit Mechanismen neuronaler Plastizität wie Langzeitpotenzierung und Neurogenese und ihrer Beeinflussung der glutamatergen Transmission auf Basis des NMDA-Rezeptor-Systems weiter interessante Kandidaten zur Erklärung der Pathogenese der Schizophrenie und zur Entdeckung neuer therapeutischer Möglichkeiten.

### 5.2.6 Neurodegenerative Veränderungen und programmierter Zelltod in der vorliegenden Arbeit und in der Literatur (Immunhistologie und Microarray)

In der immunhistologischen Fluoreszenzdarstellung aktivierter Caspase-3-positiver Zellen stellten sich keinerlei Unterschiede in der relativen Zellzahl pro Fläche in der polymorphen Zellschicht zwischen den Behandlungsgruppen dar. Da apoptotische Zellen schnell aus dem Gewebeverband entfernt werden ohne Spuren zu hinterlassen, werden mit der cleaved-Caspase-3 Färbung nur Zellen dargestellt, die im Moment der Fixierung die Apoptosekaskade durchlaufen. Mit einer Doppelfärbung von NeuN und Caspase sollten dementsprechend neuronale Zellen dargestellt werden, die in ein apoptotisches Stadium eingetreten sind. Der hohe

## Diskussion

Anteil Caspase-3-positiver Zellen in der vorliegenden Untersuchung entspricht im Vergleich mit den Funden der in Abschnitt 5.1.4 genannten Arbeitsgruppen am ehesten einer unspezifischen Färbung, die den polyklonalen Caspase-3-Antikörpern offensichtlich zueigen ist. Möglich ist auch, dass es sich um tatsächlich apoptotische Lymphozyten handelt, die im Rahmen des natürlichen Turn-overs Apoptose durchlaufen. Es ist davon auszugehen, dass aufgrund der unspezifischen Färbung möglicherweise bestehende Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen nicht detektiert werden konnten. Jedoch zeigte sich in der Arbeit von Schaudien auch, dass eine deutlich erhöhte Anzahl Caspase-3-positiver Zellen, wie sie nach einer Bornavirus-Infektion auftritt, trotz der unspezifischen Färbung erkannt werden konnte [Schaudien, 2007]. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich zwischen den Behandlungsgruppen keine Unterschiede in der Intensität der Färbung, in der Größe und Lokalisation der angefärbten Zellen oder in der Anzahl der Caspase-3-positiven Zellen.

Im Microarray zeigte sich ein Trend zu einer verminderten relativen Konzentration von Caspase-3-mRNA-Transkripten in den MK-801-Tieren ( $p=0,054$ ), somit wäre tendenziell eine niedrigere Caspase 3 induzierte Apoptoserate anzunehmen. Jedoch war die mRNA der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-w signifikant vermindert exprimiert und der Bax/Bcl-2-Quotient erhöht, was auf eine proapoptotische Stoffwechsellage hindeutet. Auch aus einer anderen *post mortem* Studie ergaben sich Hinweise, dass die tatsächliche Apoptoserate bei schizophrenen Patienten reduziert sein könnte. Benes et al. konnten beispielsweise eine Verminderung TUNEL-positiver, also apoptotischer Zellen im anterioren Cingulum schizophrener Patienten zeigen [Benes et al., 2003]. In Analogie zu den Ergebnissen dieser Arbeit, fanden auch Jarskog et al. in einer *post mortem*-Studie einen erhöhten Bax/Bcl-2-Quotienten als Hinweis für eine proapoptotische Stoffwechsellage ohne eine signifikante Erhöhung der Caspase-3-Expression im Temporallappen von schizophrenen Menschen, stattdessen zeigte sich ein Trend zu einer leichten Reduktion der Caspase-3-Expression [Jarskog et al., 2004].

Übereinstimmend mit der überwiegenden Anzahl *post mortem*-Studien [Rajkowska et al., 2002; Stark et al., 2004] konnten auch in der vorliegenden Arbeit in der mit MK-801 behandelten Gruppe in den untersuchten anatomischen Regionen keine Veränderungen hinsichtlich einer reaktiven Gliose, wie sie bei klassischen neurodegenerativen Erkrankungen auftritt, objektiviert werden. Eine weitere Unterstützung der Glutamathypothese der Schizophrenie und auch eine Untermauerung der Validität des hier zur Anwendung gekommenen Tiermodells ergibt sich aus der Tatsache, dass analog zu den *post mortem*-Befunden an schizophrenen Patienten von Jarskog et al. in der vorliegenden Arbeit eine proapoptotische Stoffwechsellage im Sinne eines erhöhten Bax/Bcl-2-Quotienten bei den mit MK-801 behandelten Tieren bestand

## Diskussion

[Jarskog et al., 2004]. Auch Wang et al. fanden nach NMDA-Rezeptor-Antagonismus eine erhöhte Bax/Bcl-X-Ratio [Wang et al., 2000]. Bcl-X ist ebenfalls ein antiapoptotisches Protein der Bcl-Familie, somit ist die Bax/Bcl-X-Ratio, wie auch die Bax/Bcl-2-Ratio, ein Indikator für eine proapoptotische Stoffwechsellage.

### 5.2.7 Veränderungen der adulten Neurogenese nach chronischem NMDA-Rezeptorantagonismus in diesem Versuch (Immunhistologie und Microarray) und in der Literatur

In der Gruppe der mit MK-801 behandelten Tiere wurden in der subgranulären Schicht des Gyrus dentatus doppelt so viele PCNA-positive Zellen in Relation zur Länge der Körnerzellschicht detektiert wie in der Kontrollgruppe. Im direkten Gruppenvergleich zwischen Kontroll- und MK-801-Gruppe mittels Mann-Whitney-U-Test betrug der p-Wert 0,038. Wie in der Diskussion der Methoden beschrieben, ist PCNA ein etablierter Marker für mitotische Zellen. Ein vermehrtes Vorkommen PCNA-positiver Zellen ist somit als Maß für eine erhöhte Proliferationsrate zu werten. Da sich die Zählung der PCNA-positiven Zellen auf die subgranuläre Zellschicht beschränkte, die sich durch ihre Eigenschaft als Stammzellnische und Ort der adulten Neurogenese definiert, sollte die Anzahl PCNA-positiver Zellen in dieser Schicht mit dem Ausmaß der Neurogenese korrelieren. Die relative PCNA-mRNA-Expression im gesamten Hippocampus differierte dagegen nicht signifikant zwischen den Gruppen. Mit der Frage nach Änderungen in der Stammzell-Proliferation wurde im Microarray auch die relative mRNA-Expression der in neuronalen Stammzellen (in Abhängigkeit von Zellzyklus und Subpopulation) exprimierten Intermediärfilamente Vimentin und Nestin untersucht. In den Hippocampi der mit MK-801 behandelten Gruppe war die relative mRNA-Expression von Vimentin signifikant erhöht. Dagegen zeigte sich in den mit Haloperidol oder einer MK-801- und Haloperidol-Koapplikation behandelten Tieren keine Veränderung der relativen mRNA-Expression von Vimentin im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Nestin-Expression auf mRNA-Ebene unterschied sich nicht zwischen den Behandlungsgruppen. Die erhöhte relative Vimentin-mRNA-Expression in den mit MK-801 behandelten Tieren kann zusammen mit der erhöhten Anzahl PCNA-positiver Zellen in der subgranulären Zellschicht des Hippocampus als Hinweis für eine erhöhte hippocampale Neurogenese bei den mit MK-801 behandelten Tieren gewertet werden.

Die Beobachtung, dass die chronische subanästhetische Gabe eines NMDA-Rezeptorantagonisten zu einer gesteigerten Neurogenese im Hippocampus führt, steht in Einklang mit einer Arbeit von Keilhoff et al [Keilhoff et al., 2004]. Sie konnten mit der BrdU-

## Diskussion

Methode zeigen, dass die intraperitoneale Verabreichung von Ketamin in einer Konzentration von 30 mg/ kg Körpergewicht an 5 aufeinanderfolgenden Tagen bei 8 Wochen alten Ratten zu einer erhöhten Anzahl sich teilender Zellen im Hippocampus führt. Dass die Gabe von Haloperidol dagegen nicht zu einer erhöhten Zellteilung im Hippocampus führt, steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Schmitt et al. [Schmitt et al., 2004]. In dieser Arbeitsgruppe wurde nach Verabreichung von entweder Clozapin oder Haloperidol mit der BrdU-Methode (siehe Abschnitt 1.8.2) keine Zunahme der Mitoserate im Hippocampus gesehen.. Auch in der vorliegenden Arbeit war die hippokampale Proliferationsrate in der Haloperidolgruppe nicht erhöht.

Über die Rolle einer möglicherweise veränderten Neurogenese im Krankheitsbild der Schizophrenie ist bislang wenig bekannt. Am intensivsten erforscht ist der Zusammenhang zwischen einer gestörten adulten Neurogenese und der Depression. Dieser Zusammenhang wurde vermutet, nachdem tierexperimentell gezeigt werden konnte, dass Stress, ein der Depression oftmals vorausgehender Faktor, die Neurogenese im Hippocampus reduziert [Gould et al., 1997] und dass eine antidepressive Therapie die Neurogenese erhöht [Malberg et al., 2000]

### 5.2.8 Hinweise für eine gesteigerte hippokampale Neurogenese mit proapoptotischer Stoffwechsellage ohne erhöhte Apoptoserate in der MK-801-Gruppe in dieser Arbeit

Die aus der vorliegenden Arbeit abgeleiteten Hinweise für das gleichzeitige Auftreten einer gesteigerten Neurogenese (erhöhte Anzahl PCNA-positiver Zellen in der subgranulären Zone des Hippocampus) und einer proapoptotischen Stoffwechsellage (erhöhter Bax/Bcl-2-Quotient auf mRNA-Ebene) bei den mit MK-801 behandelten Tieren stehen in Einklang mit einer Studie von Biebl et al., in der tierexperimentell der Zusammenhang zwischen Neurogenese und programmiertem Zelltod untersucht wurde. In den Zonen, in denen Neurogenese stattfand (BrdU-Methode), stellten sich auch viele apoptotische Zellen dar (TUNEL-Methode) [Biebl et al., 2000]. Die Autoren folgern, dass der Apoptose eine regulatorische Funktion zukomme indem durch sie überflüssige neu gebildete Neurone wieder eliminiert werden und der Mechanismus der Apoptose somit der Selbst-Erneuerung neuronaler Netzwerke diene. Die gesteigerte Neurogenese bei gleichzeitig bestehender proapoptotischer Stoffwechsellage deutet somit zunächst auf ein erhöhtes „Turn-over“, also eine vermehrte Neubildung und Eliminierung von (neuronalen) Zellen im Hippocampus.

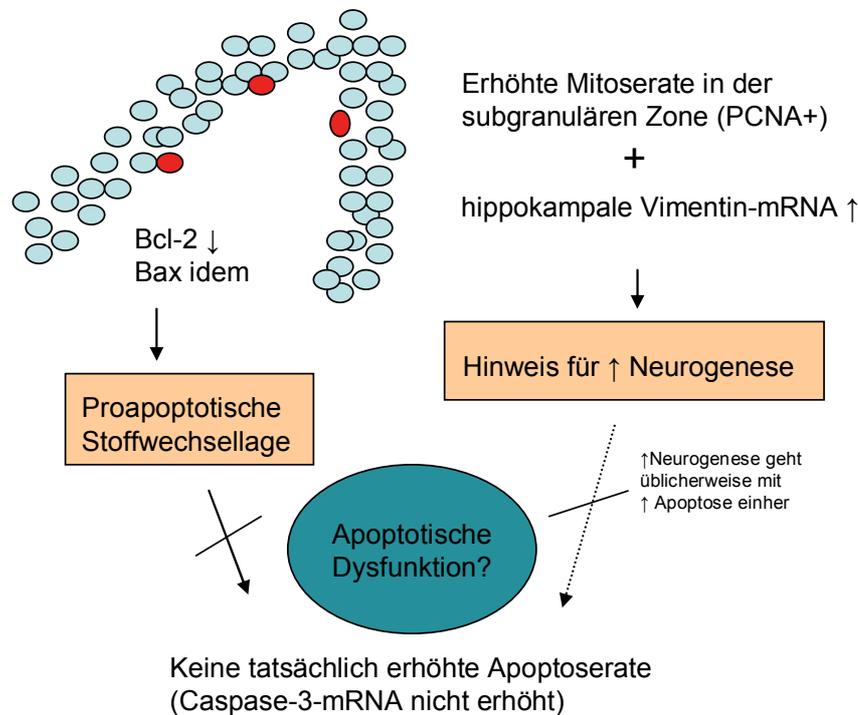
## Diskussion

Im Gegensatz zu der Untersuchung von Biebl et al., die am gesunden Rattenorganismus das zahlenmäßige Verhältnis von Neurogenese und Apoptose im Hippocampus untersuchten, ergaben sich in der vorliegenden Untersuchung am pharmakologischen Tiermodell der Schizophrenie jedoch auf mRNA-Ebene keine Hinweise für eine erhöhte Apoptoserate in den Tieren, die eine gesteigerte Neurogenese aufwiesen. Sowohl immunhistologisch als auch auf mRNA-Ebene war die Caspase-3-Expression im Hippocampus nicht erhöht. Im Microarray zeigte sich sogar ein Trend zu einer verminderten Synthese von Caspase-3-mRNA. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit *post mortem*-Untersuchungen an schizophrenen Patienten: Benes et al. konnten beispielsweise eine Verminderung TUNEL-positiver, also apoptotischer Zellen im anterioren Cingulum schizophrener Patienten zeigen [Benes et al., 2003]. Jarskog et al. fanden trotz proapoptotischer Stoffwechsellage mit erhöhtem Bax/Bcl-2-Quotienten einen Trend zu verminderter Caspase-3-Expression im Temporallappen schizophrener Menschen [Jarskog et al., 2004]. Zusammenfassend zeigen sich also in der MK-801-Gruppe Hinweise für eine gesteigerte hippocampale Neurogenese mit einhergehender proapoptotischer Stoffwechsellage im Sinne eines erhöhten Bax/Bcl-2-Quotienten. Es scheint dabei jedoch nicht zu einer tatsächlich erhöhten Apoptoserate zu kommen. Eine Übersicht über die differenzielle mRNA-Expression und immunhistologische Veränderungen in der MK-801-Gruppe ist der Abbildung 5.3 zu entnehmen.

Ein Zusammenhang zwischen dem NMDA-Rezeptor-System und adulter hippocampaler Neurogenese wurde bereits in vorangegangenen Studien gezeigt [Nacher et al., 2003]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass chronischer NMDA-Rezeptorantagonismus mit MK-801 die Neurogenese in der subgranulären Zone des Gyrus dentatus erhöht. Diese Daten stehen auf den ersten Blick im Widerspruch dazu, dass in funktionellen MRT-Studien und *post mortem*-Studien wiederholt ein Verlust von hippocampalem Volumen in schizophrenen Patienten gefunden wurde. Somit könnte man bei schizophrenen Patienten scheinbar eine verminderte Neurogenese erwarten. Für die Nettoneurogenese ist jedoch ein weiterer entscheidender Vorgang wichtig: die Selektion. Wie während der embryofetalen und der frühen postnatalen Hirnentwicklung, werden auch die in der adulten Neurogenese entstandenen Neurone zu einem großen Teil durch Apoptose wieder eliminiert [Biebl et al., 2000; Kuhn et al., 2005]. Die Elimination findet direkt nach Abschluss des Zellzyklus und innerhalb der ersten 2 Wochen statt, also in einem Stadium, in dem die Zellen Doublecortin (DCX) und Calretinin exprimieren [Ehninger and Kempermann, 2008]. Neugebildete Neurone erhalten zuerst funktionelle Synapsen des GABAergen Systems [Wang et al., 2005]. Die frühe GABAerge Innervation ist essentiell für die Integration der neuen Neurone in bestehende Netzwerke [Ge et al., 2006]. Die

## Diskussion

Aktivierung von NMDA-Rezeptoren der sich entwickelnden Neurone spielt eine Rolle bei der Regulierung des Zellüberlebens [Tashiro et al., 2006].



**Abbildung 5.3:** Übersicht über die Befunde in der MK-Gruppe: in der PCNA-Färbung zeigte sich ein Trend zu einer erhöhten Mitoserate in der subgranulären Schicht, in welcher neuronale Stammzellen zeitlebens neue Nervenzellen generieren. Zusammen mit einer erhöhten mRNA-Expression von in Stammzellen exprimiertem Vimentin und Notch1 ergeben sich hieraus Hinweise für eine erhöhte adulte Neurogenese im Hippocampus der Tiere nach chronischem NMDA-Rezeptorantagonismus mit MK-801. Im Microarray zeigte sich eine deutliche Reduktion des antiapoptotischen Bcl-2 im Gegensatz zum proapoptotischen Bax, das nicht vermindert exprimiert wurde. Hieraus ergibt sich eine Stoffwechsellage, die Apoptose begünstigt. Jedoch war die Caspase-3-Expression im Microarray nicht erhöht, sogar tendenziell eher vermindert. Hieraus ergibt sich die Hypothese einer möglicherweise gestörten Apoptoseantwort auf proapoptische Reize nach NMDA-Rezeptorantagonismus.

Eine interessante Studie von Ge et al. identifizierte über retrovirale Markierung neu entstandene Granularzellen in verschiedenen Reifestadien. Es zeigte sich eine kritische Periode in einem Zellalter von 1 bis 1,5 Monaten, in der die Zellen für Langzeitpotenzierung besonders empfänglich sind [Ge et al., 2007]. Das heißt, sie weisen eine gesteigerte Potenzierungsamplitude und eine verminderte Auslösungsschwelle auf. Nach 1,5 Monaten hatte sich diese gesteigerte Empfindlichkeit komplett zurückgebildet. Somit zeigen die im Erwachsenenalter neu entstandenen Neurone bezüglich der Langzeitpotenzierung die gleichen Eigenschaften wie die Neu-

## Diskussion

rone im sich entwickelnden Hirn. Dass die gesteigerte neuronale Plastizität der im Rahmen der adulten Neurogenese neu entstandenen Nervenzellen vorübergehend ist, soll dem reifen hippocampalen System erlauben, Stabilität zu wahren und trotzdem durch neue Erfahrungen getriggerte neuronale Plastizität durch die neu gebildeten Neurone möglich zu machen [Ge et al., 2007].

### 5.2.9 Hypothese eines gestörten Gleichgewichts zwischen hippocampaler Neurogenese und Selektion der neugebildeten Neurone als Grundlage limbischer Funktionseinschränkungen nach NMDA-Rezeptorantagonismus

Zellproliferation und Apoptose befinden sich unter normalen Umständen in einem Gleichgewicht mit leichter physiologischer Tendenz Richtung Degeneration. Neue Neurone werden in bestehende neuronale Netzwerke integriert und tragen zusammen mit apoptotischen Mechanismen zu einer Art Homöostase und neuronaler Plastizität bei [Biebl et al., 2000; Lledo et al., 2006; Song et al., 2002; van Praag et al., 2002]. Unter physiologischen Bedingungen besteht Neurogenese im Erwachsenenalter in bestimmten Hirnregionen fort [Eriksson et al., 1998]. Dies wurde inzwischen bei allen diesbezüglich untersuchten Säugetieren nachgewiesen. Jedoch sind die genauen Funktionen dieser adulten Neurogenese noch nicht gesichert. Verschiedene Hypothesen werden in diesem Zusammenhang diskutiert. Gould et al. stellten die These auf, dass die neuen Neurone direkt an der Konsolidierung von Informationen im hippocampalen Kurzzeitgedächtnis beteiligt sind. Hier werden Informationen vorübergehend gespeichert bis sie ggf. in einem anderen Hirnareal z.B. dem Neokortex dauerhaft gespeichert werden [Gould et al., 1999c]. Kempermann et al. dagegen sind der Auffassung, dass die neu entstandenen Neurone nicht direkt für das Kurzzeitgedächtnis gebraucht werden, sondern dass das Hinzufügen neuer Neurone in den Gyrus dentatus einen adaptiven Mechanismus als Antwort auf funktionelle Anforderungen darstellt und eine langfristig angelegte Optimierung der hippocampalen Informationsprozessierung gewährleistet [Kempermann, 2002b]. Aimone et al. postulieren, dass sich die in der adulten Neurogenese gebildeten Neurone direkt an der Bildung hippocampaler Gedächtnisspuren beteiligen und ihnen eine Funktion bei der Herstellung zeitlicher Zusammenhänge zukommt [Aimone et al., 2006].

Entsprechend Wiskott et al. braucht das neuronale Netzwerk der hippocampalen Formation mit zunehmender Erfahrung und Abspeicherung von Informationen neue Zellen, um eine „Überkonnektivität“ bzw. einen von den Autoren als „katastrophale Interferenz“ bezeichneten Zustand zu vermeiden [Wiskott et al., 2006]. Die katastrophale Interferenz ist ein Begriff aus der

## Diskussion

Neuroinformatik und beschreibt die Eigenschaft künstlicher neuronaler Netzwerke, beim Lernen neuer Muster, die vorher gelernten Muster wieder zu „vergessen“, da nun alle Synapsen anders geschaltet sind. Wiskott et al. sehen in der hippocampalen Formation ein Netzwerk mit der Funktion eines Autoencoders. Ein Autoencoder bezeichnet in der Neuroinformatik ein Netzwerk, das in der Lage ist, Codierungen zu lernen und Datensätze komprimiert zu repräsentieren. Es besteht aus drei Schichten: einer Eingabeschicht, einer oder mehrerer mittlerer Schichten, die für das „Encoding“ zuständig sind, und einer Ausgabeschicht. Die mittlere Schicht hat dabei eine kleinere Anzahl Zellen als die Eingangs- und die Ausgangsschicht. Wiskott et al. vermuten, dass dem Gyrus dentatus die Funktion der mittleren Schicht zukommt. Mit Versuchen an künstlichen neuronalen Netzwerken konnte gezeigt werden, dass ein Encoder-Netzwerk tatsächlich neue Muster lernen kann ohne alte zu vergessen, wenn der mittleren Schicht neue „Zellen“ zugeführt wurden. Dadurch, dass im erwachsenen Gyrus dentatus neue Neurone nachwachsen, könnten hier neue Muster gelernt werden ohne dabei alte Muster zu verlernen [Wiskott et al., 2006]. Für diese Theorie spricht, dass Kempermann et al. zeigen konnten, dass neu entstandene Neurone im Gyrus dentatus in das bestehende Netzwerk integriert werden ohne dabei alte Neurone zu ersetzen [Kempermann et al., 2003].

Der Anteil der neuen Neurone, die in das bestehende hippocampale Netzwerk eingebaut werden, ist variabel. Im Allgemeinen wird jedoch ein großer Überschuss an Progenitoren produziert und nur ein kleiner Anteil dieser Zellen zum langfristigen Überleben ausgewählt [Kempermann et al., 2003]. Das Überleben der neuen Neurone wird durch stimulierende kognitive Faktoren positiv beeinflusst. Zum Beispiel konnte dies für den Aufenthalt in einer an neuen Reizen reichhaltigen Umgebung nachgewiesen werden [Kempermann et al., 1997]. In anderen Studien zeigte sich ein positiver Einfluss auf das Überleben hippocampaler neu gebildeter Neurone durch kurzzeitiges Verhaltenstraining, das spezielle Anforderungen an die hippocampale Funktion stellte [Dobrossy et al., 2003; Gould et al., 1999a]. Somit ist die proliferative Aktivität der Vorläuferzellen ein schwacher Prädiktor der Nettoneurogenese. Der Großteil der Variabilität in der Gesamtneurogenese kann durch unterschiedlich starke Selektion zum Überleben erklärt werden [Kempermann et al., 2006]. Die neuen Neurone werden zum Gyrus dentatus hinzugefügt ohne schon vorhandene Granularzellen zu ersetzen und führen insgesamt zu einem Wachstum dieser Struktur mit der Zeit [Crespo et al., 1986]. Das hippocampale Wachstum ist im ersten Lebensjahr eines Nagetiers maximal und lässt im Alter nach aufgrund eines altersabhängigen Rückgangs hippocampaler Neurogenese [Bizon and Gallagher, 2003]. Der genaue Mechanismus, über den chronischer NMDA-Rezeptorantagonismus die Neurogenese stimuliert, bedarf weiterer Abklärung, z.B. mittels *in vitro*-Versuchen mit Stammzellen.

## Diskussion

Die Konstellation aus gesteigerter Neurogenese ohne gleichzeitige Erhöhung der Apoptoserate könnte auf eine gestörte Selektion der neu gebildeten Neurone durch eine erschwerte Antwort auf proapoptotische Reize hinweisen. Eine mutmaßliche reduzierte oder verzögerte apoptotische Selektion von neu gebildeten Neuronen könnte zu bestimmten Symptomen der Schizophrenie führen, ohne dass sich dies letztendlich morphologisch in einem vergrößerten Hirnvolumen bzw. einer höheren Neuronendichte darstellt. Möglicherweise entspricht dies einem Zustand der Überkonnektivität, die von Wiskott et al. als „katastrophale Interferenz“ bezeichnet wird [Wiskott et al., 2006]. Dieses vermutete erschwerte Entfernen von Neuronen aus dem Hippocampus, die in einem gesunden Organismus durch Apoptose eliminiert werden würden, z.B. weil sie ungenügend oder fehlerhaft vernetzt sind, könnte eine Ursache für die vielfältigen Einschränkungen limbischer Funktionen bei schizophrenen Patienten sein.

### 5.2.10 Änderung des Verhaltens und der Gedächtnisleistung

Die Versuchstiere wurden auf Änderungen des Verhaltens und der Gedächtnisleistung untersucht, die typischerweise im Rahmen einer Schizophrenie Einschränkungen erfahren können. Hierzu zählen zum einen das räumliche Arbeitsgedächtnis [Lee et al., 2008; O'Keefe and Black, 1977], dessen regelrechte Funktionsweise eng mit der hippocampalen Formation verknüpft ist. Das räumliche Arbeitsgedächtnis wurde anhand zweier Tests im Y-Käfig untersucht. Zum anderen wurden die Tiere im Tail Suspension Test auf Anzeichen für einen Initiativverlust untersucht. Der Initiativverlust wird als Zeichen einer Apathie gewertet, welche ebenfalls im Rahmen einer Schizophrenie häufig auftritt. Die Apathie gehört nach Andreasen zu den Negativsymptomen der Schizophrenie [Andreasen, 1982]. Im Tail Suspension Test wurde eine Reduktion an Rettungsversuchen oder Vokalisationen als Initiativverlust interpretiert. In dieser Arbeit zeigten sich weder Unterschiede im Tail Suspension Test (Initiativverlust) noch im Y-Maze-Test (räumliches Arbeitsgedächtnis) zwischen den mit MK-801 behandelten Tieren und den Tieren der Kontrollgruppe. Jedoch kam es sowohl bei den mit Haloperidol als auch bei den mit einer MK-801- und Haloperidol-Koapplikation behandelten Tieren zu Veränderungen gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe: Im Tail Suspension Test waren sowohl die Anzahl der versuchten Selbstrettungen als auch der Vokalisationen gegenüber den Kontrollen vermindert.

Während in diesem Versuch in den mit MK-801 behandelten Tieren keine Auffälligkeiten hinsichtlich Apathie oder Einschränkungen des räumlichen Gedächtnisses zu verzeichnen waren, konnte in einer vorangehenden Studie unserer Arbeitsgruppe in differenzierteren Tests gezeigt werden, dass NMDA-Rezeptorantagonismus in subanästhetischer Dosis im Tiermodell der Ratte Verhaltensänderungen analog sowohl einer Positiv- als auch einer Negativsymptomatik zu induzieren vermag [Rujescu et al., 2006].

## Diskussion

Interessant in der vorliegenden Untersuchung ist jedoch die Tatsache, dass die mit Haloperidol und die mit einer MK-801- und Haloperidol-Koapplikation behandelten Tiere zwar keine Einschränkungen des räumlichen Gedächtnisses boten, jedoch im Tail Suspension Test Verhaltensänderungen in Richtung Apathie (Negativsymptomatik) boten. Dies passt in gewissem Maß zu der Tatsache, dass Haloperidol insgesamt die Negativsymptome schlechter beeinflusst [Möller and Deistler, 2002; Tollefson and Sanger, 1997]. Von den Negativsymptomen wiederum am wenigsten wurden in einer Studie Aufmerksamkeitsstörungen und Apathie verbessert [Labarca et al., 1993]. Zur Verbesserung der Negativsymptomatik wird daher zunehmend auf eine zusätzlich zur neuroleptischen Medikation adjuvante Therapie mit NMDA-Rezeptor-Agonisten wie Glycin oder D-Serin gesetzt [Heresco-Levy et al., 1996; Heresco-Levy and Javitt, 2004]. Über die übereinstimmenden Befunde hinaus, dass Haloperidol Negativsymptome kaum positiv beeinflusst, geben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auch Hinweise darauf, dass Haloperidol Negativsymptome sogar zu induzieren vermag. Und zwar sowohl in gesunden Tieren (Haloperidol-Gruppe) als auch in Tieren, die eine glutamaterge Dysfunktion aufweisen (Gruppe der MK-801- und Haloperidol-Koapplikation), wie sie im Krankheitsbild der Schizophrenie vermutet wird. Übereinstimmend mit diesem Befund, induzierte Haloperidol in einer randomisierten Doppelblind-Studie an gesunden Probanden tatsächlich Negativsymptome [Artaloytia et al., 2006].

Des Weiteren wurden in der vorliegenden Arbeit die Parameter der Verhaltenstests und die hippokampalen immunhistologischen Befunde auf Korrelationen untersucht. Es fanden sich statistische Zusammenhänge zwischen der BDNF-Intensität in der polymorphen Zellschicht des Hippocampus und dem spontan alternierenden Verhalten im Y-Maze und zwischen der durchschnittlichen Größe der neuronalen Somata in der polymorphen Zellschicht des Hippocampus und dem Erstbetreten des zuvor verschlossenen Arms im Y-Maze als Maß für das räumliche Arbeitsgedächtnis. Der Anteil neuronaler Zellen an der Gesamtzellzahl in der polymorphen Zellschicht korrelierte positiv mit der Anzahl Rettungsversuche im Tail Suspension Test. Die GFAP-Flächendeckung in der polymorphen Zellschicht korrelierte mit zwei Parametern des räumlichen Arbeitsgedächtnisses im Y-Maze.

BDNF stimuliert die Langzeitpotenzierung (LTP) im Hippocampus und scheint einen positiven Einfluss auf das räumliche Arbeitsgedächtnis auszuüben [Figurov et al., 1996]. An BDNF-Knock-out-Mäusen konnten im Water-Maze-Test Einschränkungen im räumlichen Lernen gezeigt werden [Linnarsson et al., 1997]. Mizuno et al. zeigten an Mäusen, die eine kontinuierliche intraventrikuläre Infusion mit BDNF-Antisense-Oligonukleotiden erhielten, Defizite des räumlichen Arbeitsgedächtnisses im Radial-Arm-Maze [Mizuno et al., 2000]. In der vorliegen-

## Diskussion

den Arbeit korrelierte ein Parameter des Y-Maze-Tests negativ mit der immunhistochemischen BDNF-Intensität in der polymorphen Zellschicht des Hippocampus. Dies stimmt nicht mit den überwiegenden Befunden in der Literatur überein. Die in der Literatur mehrfach replizierte positive Korrelation zwischen BDNF-Expression im Hippocampus und räumlichem Arbeitsgedächtnis steht somit der hier gezeigten negativen Korrelation entgegen. Einschränkend zu dem hier erhobenen Befund muss gesagt werden, dass die Fallzahl bei der immunhistochemischen BDNF-Untersuchung klein war ( $n=28$ ), da einige Präparate aufgrund von Artefaktbildung nicht in die störanfällige Messung des Grauwerts einbezogen werden konnten. Die Validität dieser signifikanten Korrelation wird des Weiteren dadurch eingeschränkt, dass von den drei erfassten Parametern für die Leistungsfähigkeit des räumlichen Arbeitsgedächtnisses lediglich einer mit der BDNF-Intensität der polymorphen Zellschicht des Hippocampus korrelierte.

Die durchschnittliche Größe der neuronalen Somata im Hilus des Hippocampus korrelierte positiv mit dem Erstbetreten des zuvor verschlossenen Armes als Parameter für das räumliche Arbeitsgedächtnis. Auch zu dieser Korrelation muss einschränkend gesagt werden, dass bei einer umfassenden Auswirkung der neuronalen Zellgröße auf das Arbeitsgedächtnis und einer ausreichend großen Fallzahl auch signifikante Korrelationen mit den anderen beiden Parametern des räumlichen Arbeitsgedächtnisses im Y-Maze-Test zu erwarten gewesen wären. In der Literatur ist ein Zusammenhang zwischen der Größe der neuronalen Somata und dem räumlichen Arbeitsgedächtnis vorbeschrieben: Isgor und Sengelaub fanden in einer tierexperimentellen Studie zu pränataler Exposition mit Sexualhormonen eine positive Korrelation zwischen der Größe neuronaler Somata in der CA3 und CA1 und dem Abschneiden im water maze-Test als Parameter für das räumliche Arbeitsgedächtnis [Isgor and Sengelaub, 1998].

Die GFAP-Dichte im Hilus des Gyrus dentatus korrelierte in diesem Versuch negativ mit gleich zwei Parametern des räumlichen Gedächtnisses im Y-Maze-Test. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Korrelationen von BDNF oder der neuronalen Somagröße mit einem Parameter des Y-Maze-Tests, scheint die Korrelation der GFAP-Dichte in der polymorphen Zellschicht mit dem räumlichen Arbeitsgedächtnis valider zu sein. Zum einen war die Fallzahl der immunhistologischen GFAP-Untersuchung größer ( $n=37$ ), zum anderen besteht eine gleich gerichtete Korrelation mit zwei Parametern für das räumliche Arbeitsgedächtnis. In einer anderen tierexperimentellen Studie ging eine postischämisch erhöhte GFAP-Expression im Hippocampus ebenfalls mit einer Dysfunktion des räumlichen Arbeitsgedächtnisses einher [Vicente et al., 2009]. Nach repetitiven Fieberkrämpfen kam es ebenfalls gleichzeitig zu einem Anstieg der GFAP-Intensität als auch zu Einschränkungen des räumlichen Gedächtnisses [Yang et al.,

## Diskussion

2009]. Zur Bestätigung eines Zusammenhangs zwischen astrozytärer Dichte und schlechterer Performance im Morris Water Maze verabreichten Yang et al. anschließend den Astrozytenmodulator Propentofylline. Zusammen mit einer verringerten Astrozytendichte, zeigten die Ratten nun eine bessere Leistung des räumlichen Arbeitsgedächtnisses [Yang et al., 2009].

## 6 Schlussfolgerung

In dieser Untersuchung am Tiermodell der Schizophrenie, das auf einen chronischen NMDA-Rezeptorantagonismus basiert, konnte gezeigt werden, dass es zu einigen hippocampalen Veränderungen analog zu *post mortem*-Studien an schizophrenen Patienten kommt. Insbesondere konnte immunhistologisch mittels PCNA-Färbung tendenziell eine erhöhte Mitoserate in der subgranulären Schicht des Hippocampus als Hinweis für eine erhöhte Neurogenese nach NMDA-Rezeptorantagonismus gezeigt werden. Des Weiteren zeigten sich im Microarray Hinweise für eine proapoptotische Stoffwechsellaage im Hippocampus ohne jedoch gleichzeitig erhöhte Caspase-3-Expression, d.h. offensichtlich ohne tatsächlich erhöhte Apoptoserate. Auch dieser Befund steht im Einklang mit *post mortem*-Studien an schizophrenen Patienten. Die immunhistologischen Befunde stützen somit die Validität des angewandten Tiermodells der Schizophrenie und untermauern des Weiteren die These einer glutamatergen Dysfunktion im Krankheitsbild der Schizophrenie. Veränderungen, wie sie bei klassischen neurodegenerativen Erkrankungen gefunden werden, zeigten sich in der vorliegenden Arbeit nicht. Es zeigten sich im Hippocampus weder eine Gliose noch waren immunhistologisch oder auf mRNA-Ebene eine erhöhte Caspase-3-Expression zu verzeichnen. Die erhöhte adulte hippocampale Neurogenese zusammen mit einer proapoptotischen Stoffwechsellaage, jedoch ohne relevante Erhöhung der Apoptoserate, könnte auf eine apoptotische Dysfunktion hinweisen, bei der z.B. die Selektion der neu gebildeten Neurone erschwert ist. In Abhängigkeit von der Stabilität der Verbindungen der neu entstandenen Neurone werden physiologischerweise ca. die Hälfte davon durch Apoptose wieder eliminiert. Eine hypothetische erschwerte Selektion von neu gebildeten Neuronen im Gyrus dentatus könnte zu den vielfältigen limbischen Funktionseinschränkungen bei NMDA-Rezeptor-Unterfunktion, wie sie auch im Krankheitsbild der Schizophrenie vermutet wird, führen

In der Behandlungsgruppe, die zunächst den NMDA-Rezeptorantagonisten MK-801 und anschließend eine Kombination aus Haloperidol und MK-801 erhielt (HMK-Gruppe), sollten Wirkungen der neuroleptischen Medikation auf einen gestörten Glutamatstoffwechsel, wie er bei der Schizophrenie vermutet wird, untersucht werden. Hierbei zeigten sich auf mehreren Ebenen Hinweise für eine erhöhte Toxizität der Haloperidolmedikation, wenn diese auf eine NMDA-Rezeptor-Dysfunktion trifft, im Gegensatz zur Haloperidolwirkung im gesunden Gehirn. Zum einen war in der Koapplikationsgruppe immunhistologisch die Dichte der GFAP-positiven Zellen und Zellausläufer ganz umschrieben in der subgranulären Zone vermindert. Ausgehend von dieser Zone findet auch im erwachsenen Gehirn kontinuierlich in geringem Ausmaß Neurogenese statt. Bekannt ist, dass an der adulten Neurogenese GFAP-positive Glia-

### Schlussfolgerung

zellen, die Stammzeleigenschaften besitzen (radiale Glia), maßgeblich beteiligt sind. Eine mögliche Reduktion der radialen Glia ist aufgrund der selektiv auf die subgranuläre Zellschicht begrenzten Verminderung der GFAP-Dichte in der HMK-Gruppe wahrscheinlich. Ein reduzierter Anteil neuronaler Zellen an der Gesamtzellzahl sowie ein Trend zu einer verminderten Neuronenzahl in der polymorphen Zellschicht und zu einem erhöhten Anteil nicht-neuronaler Zellen, die möglicherweise Mikroglia entsprechen, in der HMK-Gruppe gaben Hinweise auf eine mögliche Neurotoxizität. Des Weiteren war in der Gruppe, die sowohl MK-801 als auch Haloperidol erhalten hatte, im Genarray die mRNA-Menge von neuroprotektiven Faktoren, die üblicherweise nach oxidativem Stress auftreten, signifikant erhöht. Viel spricht daher für eine erhöhte glutamaterge Exzitotoxizität in der Gruppe der MK-801- und Haloperidol-Koapplikation, welche z.B. durch den Rückgang der Gliazellen, die im ZNS hauptverantwortlich für die Glutamateclearance sind, mitbedingt bzw. verstärkt sein könnte. Die Hinweise für eine erhöhte Exzitotoxizität durch Haloperidolgabe bei NMDA-Rezeptor-Unterfunktion, wie sie auch bei schizophrenen Patienten vermutet wird, lassen weiterführende Studien zur Arzneimittelsicherheit und zur Erkundung der zugrundeliegenden Pathomechanismen wünschenswert erscheinen.

## **7 Zusammenfassung**

Volumetrische Studien, *post mortem*-Studien und klinische Veränderungen im Rahmen einer Schizophrenie legen nahe, dass die hippocampale Formation eine zentrale Rolle bei der Entstehung und im Verlauf dieser Erkrankung spielen könnte. Nachdem 1998 erstmalig adulte hippocampale Neurogenese beim Menschen nachgewiesen wurde, sind nun vollkommen neue Forschungszweige entstanden, die die physiologische Bedeutung sowie mögliche pathologische Veränderungen in verschiedenen Krankheitsbildern untersuchen. Gleichzeitig wurde der Formenkreis der neurodegenerativen Krankheiten beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde an einem auf chronischen NMDA-Rezeptorantagonismus mit MK-801 basierenden Tiermodell der Schizophrenie an juvenilen Ratten untersucht, ob es zu Veränderungen der hippocampalen Neurogenese oder zu neurodegenerativen Mechanismen kommt. Hierzu wurden immunhistologische Färbungen des Mitosemarkers PCNA, des glialen Markers GFAP, des Nervenwachstumsfaktors BDNF, des neuronalen Markers NeuN und der Effektorcaspase 3 durchgeführt. Im Microarray wurde die relative mRNA-Expression von Genen, die im Zusammenhang mit Neurogenese, Apoptose und dem Glutamatstoffwechsel stehen, untersucht. Neben der Kontrollgruppe und der mit MK-801 behandelten Gruppe (MK) erhielten zwei weitere Behandlungsgruppen entweder Haloperidol allein (HA) oder eine Kombination aus MK-801 und Haloperidol (HMK). Hierdurch sollte die Wirkung eines klassischen Neuroleptikums bei einem gestörten Glutamathaushalt, wie er bei der Schizophrenie vermutet wird, überprüft werden. In der MK-801-Gruppe (MK) zeigte sich tendenziell eine höhere Anzahl mitotischer Zellen in der subgranulären Zone des Hippocampus -eine Nische, in der noch im Erwachsenenalter Neurogenese stattfindet. Im Microarray zeigte sich außerdem die RNA-Menge von Vimentin, einem Intermediärfilament, das auch in Stammzellen exprimiert wird, erhöht. Die relative mRNA-Menge des antiapoptotischen Bcl-2, nicht aber des proapoptotischen Bax, war in der MK-Gruppe deutlich vermindert, was auf eine proapoptotische Stoffwechsellage hindeutet. Weder im Microarray noch in der Immunhistologie konnten jedoch Hinweise für eine tatsächlich erhöhte Apoptoserate gefunden werden. Die hippocampale BDNF-Expression war zwischen den Behandlungsgruppen nicht verändert. Insgesamt ergaben sich in der MK-801-Gruppe somit Hinweise für eine gesteigerte hippocampale Neurogenese und eine proapoptotische Stoffwechsellage ohne jedoch tatsächlich erhöhte Apoptoserate. Dies könnte auf eine gestörte Selektion der neu gebildeten hippocampalen Neurone bei NMDA-Rezeptorunterfunktion, wie er bei der Schizophrenie vermutet wird, hinweisen und gleichzeitig Substrat der vielfältigen limbischen Funktionseinschränkungen im Krankheitsbild der Schizophrenie sein.

## Zusammenfassung

In der HMK-Gruppe kam es zu einer Verminderung der GFAP-Dichte selektiv in der subgranulären Zone des Hippocampus sowie im Microarray zu einer Verminderung des in radialer Glia exprimierten Notch1. GFAP wird sowohl von reifen Astrozyten als auch von radialer Glia exprimiert, die Stammzeleigenschaften besitzt. In Zusammenschau des rein auf die subgranuläre Zone begrenzten Rückgangs der GFAP-Dichte sowie der gleichzeitig verminderten hippocampalen Notch1-RNA-Expression könnte eine Reduktion insbesondere der radialen Glia diese Befunden zugrunde liegen. Des Weiteren zeigte sich eine vermehrte mRNA-Expression neuroprotektiver Gene, die üblicherweise nach oxidativem Stress auftreten, sowie eine geringere mRNA-Menge der für die Glutathomöostase außerordentlich wichtigen Glutaminsynthetase und des Glutamattransporters EAAT2. Beide werden hauptsächlich von Gliazellen exprimiert. Insgesamt scheint es in der Gruppe der Haloperidol und MK-801-Koapplikation somit zu einer erhöhten glutamatergen Exzitotoxizität durch Störungen des glialen Glutamatstoffwechsels gekommen zu sein. Die Koapplikation von Haloperidol und MK-801 entspricht einer Haloperidolmedikation bei NMDA-Rezeptorunterfunktion, wie sie bei der Schizophrenie vermutet wird. Daher sollten die Hinweise für eine erhöhte glutamaterge Exzitotoxizität in dieser Behandlungsgruppe Anlass zu weiteren differenzierenden Studien bezüglich der zugrundeliegenden Pathomechanismen und bezüglich der Arzneimittelsicherheit geben.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

AMPA	.....	$\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazol-4-Propionat
Aqua bidest.	.....	Zweifach destilliertes Wasser (aqua bidestillata)
Aqua dest.	.....	Destilliertes Wasser (aqua destillata)
Bax	.....	Bcl-2 associated X Protein; proapoptotisches Protein der Bcl-2-Familie
Bcl-2	.....	antiapoptotisches Protein (B-cell lymphoma 2)
Bcl-w	.....	antiapoptotisches Protein der Bcl-2-Familie
Bcl-X	.....	antiapoptotisches Protein der Bcl-2-Familie
BDNF	.....	brain derived neurotrophic factor
BrdU	.....	Bromdesoxyuridin
CA	.....	Ammonshorn (Cornu ammonis)
Ca <sup>++</sup>	.....	Calciumion
cAMP	.....	zyklisches Adenosinmonophosphat
Caspase	.....	cysteiny-l-aspartate specific protease
cDNA	.....	complementary DNA
CNPase	.....	2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase
D2-Rezeptor	.....	Dopaminrezeptor der D2-Gruppe
DAB	.....	Diaminobenzidin
DAPI	.....	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DCX	.....	Doublecortin
df	.....	Freiheitsgrade (degrees of freedom)
DNA	.....	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
EAAT	.....	Excitatory amino acid transporter
EDTA	.....	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	.....	enzyme linked immunosorbent assay
F	.....	Teststatistik
GABA	.....	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GFAP	.....	glial fibrillary acidic protein
GLAST	.....	glial glutamate and aspartate transporter
GLT	.....	glialer Glutamattransporter
G-Protein	.....	Guaninnucleotid bindendes Protein
Gruppe HA	.....	Gruppe der mit Haloperidol behandelten Tiere
Gruppe HMK	.....	Gruppe der mit MK-801 und Haloperidol behandelten Tiere
Gruppe K	.....	Kontrollgruppe
Gruppe MK	.....	Gruppe der mit MK-801 behandelten Tiere
HCl	.....	Chlorwasserstoffsäure, Salzsäure
HIER	.....	hitzebasierte Epitopdemaskierung (heat induced epitopic retrieval)
HRP	.....	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)

## Abkürzungsverzeichnis

ISEL	.....	in situ end-labeling
K <sup>+</sup>	.....	Kaliumion
LTP	.....	Langzeitpotenzierung (long term potentiation)
Met	.....	Methionin
Mg <sup>++</sup>	.....	Magnesiumion
MK-801	.....	Dizocilpin
MPI	.....	Max-Planck-Institut
mRNA	.....	Boten-RNA (messenger ribonucleic acid)
MRT	.....	Magnetresonanztomographie
mV	.....	Millivolt
Na <sup>+</sup>	.....	Natriumion
NaCl	.....	Natriumchlorid
NaOH	.....	Natriumhydroxid, Natronlauge
NeuN	.....	neuronal nuclear protein
NF-κB	.....	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NMDA	.....	N-Methyl-D-Aspartat
NR	.....	NMDA-Rezeptoruntereinheit
NRF2	.....	NF-E2-related factor 2
NSE	.....	Neuronenspezifische Enolase
PBS	.....	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Phosphate buffered Saline)
PBS-T	.....	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit 0.05% Triton-X100
PCNA	.....	Proliferating cell nuclear antigen, DNA polymerase δ processivity factor, cyclin
PCP	.....	Phencyclidin
PCR	.....	polymerase chain reaction
pH	.....	potentia hydrogenii
RFC	.....	Replikationsfaktor C
RNA	.....	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
ROI	.....	region of interest
Tris	.....	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TrkB	.....	Tyrosinkinase B
TST	.....	Tail Suspension Test
TUNEL	.....	TdT-mediated-dUTP-nick end-labeling
Val	.....	Valin
WHO	.....	World Health Organization
ZNS	.....	zentrales Nervensystem

## 9 Literaturverzeichnis

Abrous DN, Koehl M, Le Moal M (2005) Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev* 85: 523-569

Aguirre A, Rubio ME, Gallo V (2010) Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal. *Nature* 467: 323-327

Aicardi G, Argilli E, Cappello S, Santi S, Riccio M, Thoenen H, Canossa M (2004) Induction of long-term potentiation and depression is reflected by corresponding changes in secretion of endogenous brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 15788-15792

Aimone JB, Wiles J, Gage FH (2006) Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nat Neurosci* 9: 723-727

Akbarian S, Kim JJ, Potkin SG, Hagman JO, Tafazzoli A, Bunney WE, Jr., Jones EG (1995) Gene expression for glutamic acid decarboxylase is reduced without loss of neurons in prefrontal cortex of schizophrenics. *Arch Gen Psychiatry* 52: 258-266

Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124: 319-335

Amaral DG, Witter M.P. (1995) Hippocampal Formation. In *The Rat Nervous System*, pp 443-493. Academic Press:

Andreasen NC (1982) Negative symptoms in schizophrenia. Definition and reliability. *Arch Gen Psychiatry* 39: 784-788

Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermod JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R, Martinou JC (1997) Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 277: 370-372

Araque A, Carmignoto G, Haydon PG (2001) Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol* 63: 795-813

Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22: 208-215

## Literaturverzeichnis

- Arnold SE, Franz BR, Trojanowski JQ, Moberg PJ, Gur RE (1996) Glial fibrillary acidic protein-immunoreactive astrocytosis in elderly patients with schizophrenia and dementia. *Acta Neuropathol* 91: 269-277
- Artaloytia JF, Arango C, Lahti A, Sanz J, Pascual A, Cubero P, Prieto D, Palomo T (2006) Negative signs and symptoms secondary to antipsychotics: a double-blind, randomized trial of a single dose of placebo, haloperidol, and risperidone in healthy volunteers. *Am J Psychiatry* 163: 488-493
- Barde YA, Davies AM, Johnson JE, Lindsay RM, Thoenen H (1987) Brain derived neurotrophic factor. *Prog Brain Res* 71: 185-189
- Benes FM, Kwok EW, Vincent SL, Todtenkopf MS (1998) A reduction of nonpyramidal cells in sector CA2 of schizophrenics and manic depressives. *Biol Psychiatry* 44: 88-97
- Benes FM, McSparren J, Bird ED, SanGiovanni JP, Vincent SL (1991) Deficits in small interneurons in prefrontal and cingulate cortices of schizophrenic and schizoaffective patients. *Arch Gen Psychiatry* 48: 996-1001
- Benes FM, Vincent SL, Todtenkopf M (2001) The density of pyramidal and nonpyramidal neurons in anterior cingulate cortex of schizophrenic and bipolar subjects. *Biol Psychiatry* 50: 395-406
- Benes FM, Walsh J, Bhattacharyya S, Sheth A, Berretta S (2003) DNA fragmentation decreased in schizophrenia but not bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry* 60: 359-364
- Berger GE, Wood S, McGorry PD (2003) Incipient neurovulnerability and neuroprotection in early psychosis. *Psychopharmacol Bull* 37: 79-101
- Bessis A, Bechade C, Bernard D, Roumier A (2007) Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* 55: 233-238
- Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG (2000) Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 291: 17-20
- Bizon JL, Gallagher M (2003) Production of new cells in the rat dentate gyrus over the lifespan: relation to cognitive decline. *Eur J Neurosci* 18: 215-219
- Black JE, Kodish IM, Grossman AW, Klintsova AY, Orlovskaya D, Vostrikov V, Uranova N, Greenough WT (2004) Pathology of layer V pyramidal neurons in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 161: 742-744

## Literaturverzeichnis

Bleicken, S. W. Strukturelle Untersuchungen der Konformationsänderungen im proapoptotischen Protein Bax und der räumlichen Anordnung des membranständigen Baxoligomers. 2008. Ref Type: Thesis/Dissertation

Bleuler E (1914) Die Kritiken der Schizophrenien. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* 22: 19-44

Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232: 331-356

Bogerts B (1997) The temporolimbic system theory of positive schizophrenic symptoms. *Schizophr Bull* 23: 423-435

Braun I, Genius J, Grunze H, Bender A, Moller HJ, Rujescu D (2007) Alterations of hippocampal and prefrontal GABAergic interneurons in an animal model of psychosis induced by NMDA receptor antagonism. *Schizophr Res* 97: 254-263

Bredesen DE (1995) Neural apoptosis. *Ann Neurol* 38: 839-851

Breunig JJ, Silbereis J, Vaccarino FM, Sestan N, Rakic P (2007) Notch regulates cell fate and dendrite morphology of newborn neurons in the postnatal dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 20558-20563

Brito GN, Davis BJ, Stopp LC, Stanton ME (1983) Memory and the septo-hippocampal cholinergic system in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 81: 315-320

Broer S, Brookes N (2001) Transfer of glutamine between astrocytes and neurons. *J Neurochem* 77: 705-719

Brown AS (2006) Prenatal infection as a risk factor for schizophrenia. *Schizophr Bull* 32: 200-202

Brown AS, Cohen P, Harkavy-Friedman J, Babulas V, Malaspina D, Gorman JM, Susser ES (2001) A.E. Bennett Research Award. Prenatal rubella, premorbid abnormalities, and adult schizophrenia. *Biol Psychiatry* 49: 473-486

Buka SL, Cannon TD, Torrey EF, Yolken RH (2008) Maternal exposure to herpes simplex virus and risk of psychosis among adult offspring. *Biol Psychiatry* 63: 809-815

Burek MJ, Oppenheim RW (1996) Programmed cell death in the developing nervous system. *Brain Pathol* 6: 427-446

## Literaturverzeichnis

Cahn W, Hulshoff Pol HE, Lems EB, van Haren NE, Schnack HG, van der Linden JA, Schothorst PF, van Engeland H, Kahn RS (2002) Brain volume changes in first-episode schizophrenia: a 1-year follow-up study. *Arch Gen Psychiatry* 59: 1002-1010

Caldeira MV, Melo CV, Pereira DB, Carvalho RF, Carvalho AL, Duarte CB (2007) BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 35: 208-219

Callicott JH, Straub RE, Pezawas L, Egan MF, Mattay VS, Hariri AR, Verchinski BA, Meyer-Lindenberg A, Balkissoon R, Kolachana B, Goldberg TE, Weinberger DR (2005) Variation in DISC1 affects hippocampal structure and function and increases risk for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 8627-8632

Cannon TD, Yolken R, Buka S, Torrey EF (2008) Decreased neurotrophic response to birth hypoxia in the etiology of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 64: 797-802

Carlsson ALM (1963) Effect of chlorpromazine or haloperidol on formation of 3-methoxytyramine and normetanephrine in mouse brain. *Acta Pharmacologica et Toxicologica* 140-144

Carmignoto G (2000) Reciprocal communication systems between astrocytes and neurones. *Prog Neurobiol* 62: 561-581

Casanova MF, Stevens JR, Kleinman JE (1990) Astrocytosis in the molecular layer of the dentate gyrus: a study in Alzheimer's disease and schizophrenia. *Psychiatry Res* 35: 149-166

Castren E, da Penha BM, Lindholm D, Thoenen H (1993) Differential effects of MK-801 on brain-derived neurotrophic factor mRNA levels in different regions of the rat brain. *Exp Neurol* 122: 244-252

Chen DF, Schneider GE, Martinou JC, Tonegawa S (1997) Bcl-2 promotes regeneration of severed axons in mammalian CNS. *Nature* 385: 434-439

Citri A, Malenka RC (2008) Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33: 18-41

CNSforum.com. NMDA receptor, showing different subtypes. [http://www.cnsforum.com/imagebank/item/hrl\\_rcpt\\_sys\\_NMDA/default.aspx](http://www.cnsforum.com/imagebank/item/hrl_rcpt_sys_NMDA/default.aspx) . 2002. Ref Type: Electronic Citation

Coyle JT (1996) The glutamatergic dysfunction hypothesis for schizophrenia. *Harv Rev Psychiatry* 3: 241-253

## Literaturverzeichnis

- Crespo D, Stanfield BB, Cowan WM (1986) Evidence that late-generated granule cells do not simply replace earlier formed neurons in the rat dentate gyrus. *Exp Brain Res* 62: 541-548
- Crosby MJ, Hanson JE, Fleckenstein AE, Hanson GR (2002) Phencyclidine increases vesicular dopamine uptake. *Eur J Pharmacol* 438: 75-78
- Dahl D, Strocchi P, Bignami A (1982) Vimentin in the central nervous system. A study of the mesenchymal-type intermediate filament-protein in Wallerian degeneration and in postnatal rat development by two-dimensional gel electrophoresis. *Differentiation* 22: 185-190
- Dalman C, Allebeck P, Cullberg J, Grunewald C, Koster M (1999) Obstetric complications and the risk of schizophrenia: a longitudinal study of a national birth cohort. *Arch Gen Psychiatry* 56: 234-240
- Dellu F, Contarino A, Simon H, Koob GF, Gold LH (2000) Genetic differences in response to novelty and spatial memory using a two-trial recognition task in mice. *Neurobiol Learn Mem* 73: 31-48
- Dellu F, Mayo W, Cherkaoui J, Le Moal M, Simon H (1992) A two-trial memory task with automated recording: study in young and aged rats. *Brain Res* 588: 132-139
- Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie und Nervenheilkunde DGPPN. Behandlungsleitlinie Schizophrenie. S3 Praxisleitlinien Psychiatrie und Psychotherapie Band 1. 2005. Steinkopff-Verlag, Darmstadt. Ref Type: Generic
- Diederich NJ, Goetz CG (1998) Drug-induced movement disorders. *Neurol Clin* 16: 125-139
- Dobrossy MD, Drapeau E, Aurousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN (2003) Differential effects of learning on neurogenesis: learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date. *Mol Psychiatry* 8: 974-982
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97: 703-716
- Du J, Feng L, Yang F, Lu B (2000) Activity- and Ca(2+)-dependent modulation of surface expression of brain-derived neurotrophic factor receptors in hippocampal neurons. *J Cell Biol* 150: 1423-1434
- Durany N, Michel T, Zochling R, Boissl KW, Cruz-Sanchez FF, Riederer P, Thome J (2001) Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 3 in schizophrenic psychoses. *Schizophr Res* 52: 79-86
- Eastwood SL, Burnet PW, Harrison PJ (1995) Altered synaptophysin expression as a marker of synaptic pathology in schizophrenia. *Neuroscience* 66: 309-319

## Literaturverzeichnis

- Eastwood SL, Harrison PJ (1995) Decreased synaptophysin in the medial temporal lobe in schizophrenia demonstrated using immunoautoradiography. *Neuroscience* 69: 339-343
- Ebdrup BH, Glenthøj B, Rasmussen H, Aggernaes B, Langkilde AR, Paulson OB, Lublin H, Skimminge A, Baare W (2010) Hippocampal and caudate volume reductions in antipsychotic-naïve first-episode schizophrenia. *J Psychiatry Neurosci* 35: 95-104
- Edmond J, Robbins RA, Bergstrom JD, Cole RA, de Vellis J (1987) Capacity for substrate utilization in oxidative metabolism by neurons, astrocytes, and oligodendrocytes from developing brain in primary culture. *J Neurosci Res* 18: 551-561
- Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR (2003) The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112: 257-269
- Egan MF, Straub RE, Goldberg TE, Yakub I, Callicott JH, Hariri AR, Mattay VS, Bertolino A, Hyde TM, Shannon-Weickert C, Akil M, Crook J, Vakkalanka RK, Balkissoon R, Gibbs RA, Kleinman JE, Weinberger DR (2004) Variation in GRM3 affects cognition, prefrontal glutamate, and risk for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 12604-12609
- Ehninger D, Kempermann G (2008) Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cell Tissue Res* 331: 243-250
- Eisch AJ, Cameron HA, Encinas JM, Meltzer LA, Ming GL, Overstreet-Wadiche LS (2008) Adult neurogenesis, mental health, and mental illness: hope or hype? *J Neurosci* 28: 11785-11791
- Ellison G (1995) The N-methyl-D-aspartate antagonists phencyclidine, ketamine and dizocilpine as both behavioral and anatomical models of the dementias. *Brain Res Brain Res Rev* 20: 250-267
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4: 1313-1317
- Farber NB, Nemmers B, Noguchi KK (2006) Acute D2/D3 dopaminergic agonism but chronic D2/D3 antagonism prevents NMDA antagonist neurotoxicity. *Biol Psychiatry* 60: 630-638
- Figurov A, Pozzo-Miller LD, Olafsson P, Wang T, Lu B (1996) Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature* 381: 706-709

## Literaturverzeichnis

- Fumagalli F, Molteni R, Roceri M, Bedogni F, Santero R, Fossati C, Gennarelli M, Racagni G, Riva MA (2003) Effect of antipsychotic drugs on brain-derived neurotrophic factor expression under reduced N-methyl-D-aspartate receptor activity. *J Neurosci Res* 72: 622-628
- Gadea A, Lopez-Colome AM (2001) Glial transporters for glutamate, glycine and GABA I. Glutamate transporters. *J Neurosci Res* 63: 453-460
- Gaiano N, Nye JS, Fishell G (2000) Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron* 26: 395-404
- Garden GA, Budd SL, Tsai E, Hanson L, Kaul M, D'Emilia DM, Friedlander RM, Yuan J, Masliah E, Lipton SA (2002) Caspase cascades in human immunodeficiency virus-associated neurodegeneration. *J Neurosci* 22: 4015-4024
- Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL, Song H (2006) GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439: 589-593
- Ge S, Yang CH, Hsu KS, Ming GL, Song H (2007) A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron* 54: 559-566
- Geddes JR, Verdoux H, Takei N, Lawrie SM, Bovet P, Eagles JM, Heun R, McCreadie RG, McNeil TF, O'Callaghan E, Stoher G, Willinger U, Murray RM (1999) Schizophrenia and complications of pregnancy and labor: an individual patient data meta-analysis. *Schizophr Bull* 25: 413-423
- Gilman CP, Mattson MP (2002) Do apoptotic mechanisms regulate synaptic plasticity and growth-cone motility? *Neuromolecular Med* 2: 197-214
- Goldman SA, Nottebohm F (1983) Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 2390-2394
- Gonzalez-Maeso J, Sealfon SC (2009) Psychedelics and schizophrenia. *Trends Neurosci* 32: 225-232
- Gottesman, I. I. Schizophrenia Genesis: The Origins of Madness. 1991. New York: Freeman.  
Ref Type: Generic
- Gottesman II, Shields J (1966) Contributions of twin studies to perspectives on schizophrenia. *Prog Exp Pers Res* 3: 1-84
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ (1999a) Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 2: 260-265

## Literaturverzeichnis

- Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E (1997) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci* 17: 2492-2498
- Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG (1999b) Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 286: 548-552
- Gould E, Tanapat P, Hastings NB, Shors TJ (1999c) Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. *Trends Cogn Sci* 3: 186-192
- Gould E, Woolley CS, McEwen BS (1991) Adrenal steroids regulate postnatal development of the rat dentate gyrus: I. Effects of glucocorticoids on cell death. *J Comp Neurol* 313: 479-485
- Gourion D, Goldberger C, Bourdel MC, Jean BF, Loo H, Krebs MO (2004) Minor physical anomalies in patients with schizophrenia and their parents: prevalence and pattern of craniofacial abnormalities. *Psychiatry Res* 125: 21-28
- Gratzner HG (1982) Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218: 474-475
- Gross CG (2000) Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci* 1: 67-73
- Grunze H, Bender A, Wendhof S., Schäfer M., Rujescu D. (2000) Neurotoxicity of NMDA antagonists: a glutamatergic theory of schizophrenia based on selective impairment of local inhibitory feedback circuits. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 2: 287-298
- Grunze HC, Rainnie DG, Hasselmo ME, Barkai E, Hearn EF, McCarley RW, Greene RW (1996) NMDA-dependent modulation of CA1 local circuit inhibition. *J Neurosci* 16: 2034-2043
- Gur RE, Cowell P, Turetsky BI, Gallacher F, Cannon T, Bilker W, Gur RC (1998) A follow-up magnetic resonance imaging study of schizophrenia. Relationship of neuroanatomical changes to clinical and neurobehavioral measures. *Arch Gen Psychiatry* 55: 145-152
- Guzman M, Blazquez C (2001) Is there an astrocyte-neuron ketone body shuttle? *Trends Endocrinol Metab* 12: 169-173
- Gyls KH, Fein JA, Cole GM (2002) Caspase inhibition protects nerve terminals from in vitro degradation. *Neurochem Res* 27: 465-472

## Literaturverzeichnis

Hariri AR, Goldberg TE, Mattay VS, Kolachana BS, Callicott JH, Egan MF, Weinberger DR (2003) Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance. *J Neurosci* 23: 6690-6694

Harrison PJ, Weinberger DR (2005) Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry* 10: 40-68

Hartmann A, Hunot S, Michel PP, Muriel MP, Vyas S, Faucheux BA, Mouatt-Prigent A, Turmel H, Srinivasan A, Ruberg M, Evan GI, Agid Y, Hirsch EC (2000) Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 2875-2880

Harzsch S, Dawirs RR (1996) Neurogenesis in the developing crab brain: postembryonic generation of neurons persists beyond metamorphosis. *J Neurobiol* 29: 384-398

Hayase T (2008) Nicotine (NC)-induced "depressive" behavioral symptoms and effects of antidepressants including cannabinoids (CBs). *J Toxicol Sci* 33: 555-564

Hayase T (2011) Depression-related anhedonic behaviors caused by immobilization stress: a comparison with nicotine-induced depression-like behavioral alterations and effects of nicotine and/or "antidepressant" drugs. *J Toxicol Sci* 36: 31-41

Hayashi-Takagi A, Takaki M, Graziane N, Seshadri S, Murdoch H, Dunlop AJ, Makino Y, Seshadri AJ, Ishizuka K, Srivastava DP, Xie Z, Baraban JM, Houslay MD, Tomoda T, Brandon NJ, Kamiya A, Yan Z, Penzes P, Sawa A (2010) Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) regulates spines of the glutamate synapse via Rac1. *Nat Neurosci* 13: 327-332

Haydon PG (2001) GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2: 185-193

Healy DJ, Meador-Woodruff JH (1996) Differential regulation, by MK-801, of dopamine receptor gene expression in rat nigrostriatal and mesocorticolimbic systems. *Brain Res* 708: 38-44

Heresco-Levy U, Javitt DC (2004) Comparative effects of glycine and D-cycloserine on persistent negative symptoms in schizophrenia: a retrospective analysis. *Schizophr Res* 66: 89-96

Heresco-Levy U, Javitt DC, Ermilov M, Mordel C, Horowitz A, Kelly D (1996) Double-blind, placebo-controlled, crossover trial of glycine adjuvant therapy for treatment-resistant schizophrenia. *Br J Psychiatry* 169: 610-617

## Literaturverzeichnis

- Ho BC, Magnotta V (2010) Hippocampal volume deficits and shape deformities in young biological relatives of schizophrenia probands. *Neuroimage* 49: 3385-3393
- Hof PR, Haroutunian V, Friedrich VL, Jr., Byne W, Buitron C, Perl DP, Davis KL (2003) Loss and altered spatial distribution of oligodendrocytes in the superior frontal gyrus in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 53: 1075-1085
- Hong CJ, Yu YW, Lin CH, Tsai SJ (2003) An association study of a brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and clozapine response of schizophrenic patients. *Neurosci Lett* 349: 206-208
- Hulshoff Pol HE, Kahn RS (2008) What happens after the first episode? A review of progressive brain changes in chronically ill patients with schizophrenia. *Schizophr Bull* 34: 354-366
- Hulshoff Pol HE, Schnack HG, Bertens MG, van Haren NE, van dT, I, Staal WG, Baare WF, Kahn RS (2002) Volume changes in gray matter in patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 159: 244-250
- Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vockler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovskaja V, Turski L, Olney JW (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 283: 70-74
- Ilyin VI, Whittemore ER, Guastella J, Weber E, Woodward RM (1996) Subtype-selective inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors by haloperidol. *Mol Pharmacol* 50: 1541-1550
- Iritani S, Niizato K, Nawa H, Ikeda K, Emson PC (2003) Immunohistochemical study of brain-derived neurotrophic factor and its receptor, TrkB, in the hippocampal formation of schizophrenic brains. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27: 801-807
- Isgor C, Sengelaub DR (1998) Prenatal gonadal steroids affect adult spatial behavior, CA1 and CA3 pyramidal cell morphology in rats. *Horm Behav* 34: 183-198
- Ishizuka K, Paek M, Kamiya A, Sawa A (2006) A review of Disrupted-In-Schizophrenia-1 (DISC1): neurodevelopment, cognition, and mental conditions. *Biol Psychiatry* 59: 1189-1197
- Itil T, Keskiner A, Kiremitci N, Holden JM (1967) Effect of phencyclidine in chronic schizophrenics. *Can Psychiatr Assoc J* 12: 209-212
- Jacobsen LK, Giedd JN, Castellanos FX, Vaituzis AC, Hamburger SD, Kumra S, Lenane MC, Rapoport JL (1998) Progressive reduction of temporal lobe structures in childhood-onset schizophrenia. *Am J Psychiatry* 155: 678-685

## Literaturverzeichnis

- Jarskog LF, Gilmore JH, Selinger ES, Lieberman JA (2000) Cortical bcl-2 protein expression and apoptotic regulation in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 48: 641-650
- Jarskog LF, Glantz LA, Gilmore JH, Lieberman JA (2005) Apoptotic mechanisms in the pathophysiology of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29: 846-858
- Jarskog LF, Selinger ES, Lieberman JA, Gilmore JH (2004) Apoptotic proteins in the temporal cortex in schizophrenia: high Bax/Bcl-2 ratio without caspase-3 activation. *Am J Psychiatry* 161: 109-115
- Javitt DC, Zukin SR (1991) Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 148: 1301-1308
- Jentsch JD, Roth RH (1999) The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 20: 201-225
- Johnson JA, Johnson DA, Kraft AD, Calkins MJ, Jakel RJ, Vargas MR, Chen PC (2008) The Nrf2-ARE pathway: an indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 1147: 61-69
- Kacem K, Lacombe P, Seylaz J, Bonvento G (1998) Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia* 23: 1-10
- Kane JM (1999) Pharmacologic treatment of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 46: 1396-1408
- Kaplan MS, Hinds JW (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197: 1092-1094
- Kasai K, Shenton ME, Salisbury DF, Hirayasu Y, Lee CU, Ciszewski AA, Yurgelun-Todd D, Kikinis R, Jolesz FA, McCarley RW (2003) Progressive decrease of left superior temporal gyrus gray matter volume in patients with first-episode schizophrenia. *Am J Psychiatry* 160: 156-164
- Kegeles LS, Abi-Dargham A, Zea-Ponce Y, Rodenhiser-Hill J, Mann JJ, Van Heertum RL, Cooper TB, Carlsson A, Laruelle M (2000) Modulation of amphetamine-induced striatal dopamine release by ketamine in humans: implications for schizophrenia. *Biol Psychiatry* 48: 627-640
- Keilhoff G, Bernstein HG, Becker A, Grecksch G, Wolf G (2004) Increased neurogenesis in a rat ketamine model of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 56: 317-322

## Literaturverzeichnis

- Keller A, Castellanos FX, Vaituzis AC, Jeffries NO, Giedd JN, Rapoport JL (2003) Progressive loss of cerebellar volume in childhood-onset schizophrenia. *Am J Psychiatry* 160: 128-133
- Kempermann, G. Aktivitätsabhängige Regulation von Neurogenese im erwachsenen Hippocampus. 2002a.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Kempermann G (2002b) Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 22: 635-638
- Kempermann G, Chesler EJ, Lu L, Williams RW, Gage FH (2006) Natural variation and genetic covariance in adult hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 780-785
- Kempermann G, Gage FH (1998) Closer to neurogenesis in adult humans. *Nat Med* 4: 555-557
- Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH (2003) Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* 130: 391-399
- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G (2004a) Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27: 447-452
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386: 493-495
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1998) Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci* 18: 3206-3212
- Kempermann G, Wiskott L, Gage FH (2004b) Functional significance of adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 14: 186-191
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257
- Keshavan MS, Diwadkar VA, Montrose DM, Rajarethinam R, Sweeney JA (2005) Premorbid indicators and risk for schizophrenia: a selective review and update. *Schizophr Res* 79: 45-57
- Kilbourne AM, Morden NE, Austin K, Ilgen M, McCarthy JF, Dalack G, Blow FC (2009) Excess heart-disease-related mortality in a national study of patients with mental disorders: identifying modifiable risk factors. *Gen Hosp Psychiatry* 31: 555-563

## Literaturverzeichnis

- Kim JS, Kornhuber HH, Schmid-Burgk W, Holzmüller B (1980) Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neurosci Lett* 20: 379-382
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275: 1132-1136
- Knable MB, Weinberger DR (1997) Dopamine, the prefrontal cortex and schizophrenia. *J Psychopharmacol* 11: 123-131
- Kompetenznetz Schizophrenie. KNS-Forschung gestern-heute-morgen. <http://www.kns.kompetenznetz-schizophrenie.info/?q=node/43> . 2009.  
Ref Type: Electronic Citation
- Konopaske GT, Dorph-Petersen KA, Sweet RA, Pierri JN, Zhang W, Sampson AR, Lewis DA (2008) Effect of chronic antipsychotic exposure on astrocyte and oligodendrocyte numbers in macaque monkeys. *Biol Psychiatry* 63: 759-765
- Konradi C, Heckers S (2003) Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment. *Pharmacol Ther* 97: 153-179
- Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T (1995) Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8856-8860
- Kraft AD, Lee JM, Johnson DA, Kan YW, Johnson JA (2006) Neuronal sensitivity to kainic acid is dependent on the Nrf2-mediated actions of the antioxidant response element. *J Neurochem* 98: 1852-1865
- Krajewska M, Wang HG, Krajewski S, Zapata JM, Shabaik A, Gascoyne R, Reed JC (1997) Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res* 57: 1605-1613
- Kriegstein A, Alvarez-Buylla A (2009) The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 32: 149-184
- Kuhn HG, Biebl M, Wilhelm D, Li M, Friedlander RM, Winkler J (2005) Increased generation of granule cells in adult Bcl-2-overexpressing mice: a role for cell death during continued hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 22: 1907-1915

## Literaturverzeichnis

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

Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F, Gray J, Tan EM (1986) Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Exp Cell Res* 166: 209-219

Labarca R, Silva H, Jerez S, Ruiz A, Forray MI, Gysling K, Andres ME, Bustos G, Castillo Y, Hono J (1993) Differential effects of haloperidol on negative symptoms in drug-naive schizophrenic patients: effects on plasma homovanillic acid. *Schizophr Res* 9: 29-34

Lalonde R (2002) The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neurosci Biobehav Rev* 26: 91-104

Laruelle M, Abi-Dargham A, van Dyck CH, Gil R, D'Souza CD, Erdos J, McCance E, Rosenblatt W, Fingado C, Zoghbi SS, Baldwin RM, Seibyl JP, Krystal JH, Charney DS, Innis RB (1996) Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9235-9240

Lawrence MS, Ho DY, Sun GH, Steinberg GK, Sapolsky RM (1996) Overexpression of Bcl-2 with herpes simplex virus vectors protects CNS neurons against neurological insults in vitro and in vivo. *J Neurosci* 16: 486-496

Lawrie SM, McIntosh AM, Hall J, Owens DG, Johnstone EC (2008) Brain structure and function changes during the development of schizophrenia: the evidence from studies of subjects at increased genetic risk. *Schizophr Bull* 34: 330-340

Lee J, Folley BS, Gore J, Park S (2008) Origins of spatial working memory deficits in schizophrenia: an event-related fMRI and near-infrared spectroscopy study. *PLoS One* 3: e1760

Lee JM, Calkins MJ, Chan K, Kan YW, Johnson JA (2003a) Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *J Biol Chem* 278: 12029-12038

Lee JM, Shih AY, Murphy TH, Johnson JA (2003b) NF-E2-related factor-2 mediates neuroprotection against mitochondrial complex I inhibitors and increased concentrations of intracellular calcium in primary cortical neurons. *J Biol Chem* 278: 37948-37956

Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60: 585-595

## Literaturverzeichnis

- Lewis DA, Cruz DA, Melchitzky DS, Pierri JN (2001) Lamina-specific deficits in parvalbumin-immunoreactive varicosities in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia: evidence for fewer projections from the thalamus. *Am J Psychiatry* 158: 1411-1422
- Lewis DA, Lieberman JA (2000) Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron* 28: 325-334
- Li H, Chang YW, Mohan K, Su HW, Ricupero CL, Baridi A, Hart RP, Grumet M (2008) Activated Notch1 maintains the phenotype of radial glial cells and promotes their adhesion to laminin by upregulating nidogen. *Glia* 56: 646-658
- Lieberman J, Chakos M, Wu H, Alvir J, Hoffman E, Robinson D, Bilder R (2001) Longitudinal study of brain morphology in first episode schizophrenia. *Biol Psychiatry* 49: 487-499
- Lieberman JA, Tollefson GD, Charles C, Zipursky R, Sharma T, Kahn RS, Keefe RS, Green AI, Gur RE, McEvoy J, Perkins D, Hamer RM, Gu H, Tohen M (2005) Antipsychotic drug effects on brain morphology in first-episode psychosis. *Arch Gen Psychiatry* 62: 361-370
- Linnarsson S, Bjorklund A, Ernfors P (1997) Learning deficit in BDNF mutant mice. *Eur J Neurosci* 9: 2581-2587
- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS (2006) Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 7: 179-193
- Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, Brown EL (1996) Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 14: 1675-1680
- Luby ED, Cohen BD, Rosenbaum G, Gottlieb JS, Kelley R (1959) Study of a new schizophrenomimetic drug; sernyl. *AMA Arch Neurol Psychiatry* 81: 363-369
- Lyon L, Kew JN, Corti C, Harrison PJ, Burnet PW (2008) Altered hippocampal expression of glutamate receptors and transporters in GRM2 and GRM3 knockout mice. *Synapse* 62: 842-850
- MacDonald JF, Bartlett MC, Mody I, Reynolds JN, Salter MW (1990) The PCP site of the NMDA receptor complex. *Adv Exp Med Biol* 268: 27-34
- Madeddu F, Naska S, Bozzi Y (2004) BDNF down-regulates the caspase 3 pathway in injured geniculocortical neurones. *Neuroreport* 15: 2045-2049

## Literaturverzeichnis

- Malatesta P, Hartfuss E, Gotz M (2000) Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 127: 5253-5263
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS (2000) Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20: 9104-9110
- Mandillo S, Tucci V, Holter SM, Meziane H, Banchaabouchi MA, Kallnik M, Lad HV, Nolan PM, Ouagazzal AM, Coghill EL, Gale K, Golini E, Jacquot S, Krezel W, Parker A, Riet F, Schneider I, Marazziti D, Auwerx J, Brown SD, Chambon P, Rosenthal N, Tocchini-Valentini G, Wurst W (2008) Reliability, robustness, and reproducibility in mouse behavioral phenotyping: a cross-laboratory study. *Physiol Genomics* 34: 243-255
- Margolis RL, Chuang DM, Post RM (1994) Programmed cell death: implications for neuropsychiatric disorders. *Biol Psychiatry* 35: 946-956
- Marsden CD, Jenner P (1980) The pathophysiology of extrapyramidal side-effects of neuroleptic drugs. *Psychol Med* 10: 55-72
- Masliah E, Mallory M, Alford M, Tanaka S, Hansen LA (1998) Caspase dependent DNA fragmentation might be associated with excitotoxicity in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 57: 1041-1052
- Mattson MP (2008) Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann NY Acad Sci* 1144: 97-112
- Mattson MP, Duan W (1999) "Apoptotic" biochemical cascades in synaptic compartments: roles in adaptive plasticity and neurodegenerative disorders. *J Neurosci Res* 58: 152-166
- Mattson MP, Keller JN, Begley JG (1998) Evidence for synaptic apoptosis. *Exp Neurol* 153: 35-48
- Matz, S. Methodische Evaluierung der immunhistochemischen Detektion aktivierter Caspase-3 im Hippokampus als Apoptoseparameter nach inkompletter zerebraler Ischämie bei der Ratte. 2003. Institut für Tierpathologie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München. Ref Type: Thesis/Dissertation
- Maurer, M. H. Proteomanalyse neuronaler Stammzellen. 2005. Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Medizinischen Fakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg. Ref Type: Thesis/Dissertation
- McDonald C, Murray RM (2000) Early and late environmental risk factors for schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev* 31: 130-137

## Literaturverzeichnis

- McGuffin P, Farmer A, Gottesman II (1987) Is there really a split in schizophrenia? The genetic evidence. *Br J Psychiatry* 150: 581-592
- McKay R (1997) Stem cells in the central nervous system. *Science* 276: 66-71
- McNally R, Bowman GD, Goedken ER, O'Donnell M, Kuriyan J (2010) Analysis of the role of PCNA-DNA contacts during clamp loading. *BMC Struct Biol* 10: 3
- Mirnic K, Middleton FA, Marquez A, Lewis DA, Levitt P (2000) Molecular characterization of schizophrenia viewed by microarray analysis of gene expression in prefrontal cortex. *Neuron* 28: 53-67
- Miyamoto S, Duncan GE, Marx CE, Lieberman JA (2005) Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Mol Psychiatry* 10: 79-104
- Mizuno M, Yamada K, Olariu A, Nawa H, Nabeshima T (2000) Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. *J Neurosci* 20: 7116-7121
- Mizutani K, Yoon K, Dang L, Tokunaga A, Gaiano N (2007) Differential Notch signalling distinguishes neural stem cells from intermediate progenitors. *Nature* 449: 351-355
- Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D (1997) Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J Neurosci* 17: 2921-2927
- Möller H-J, Deistler A (2002) Schizophrenie. In *Psychiatrie & Psychotherapie*, Möller H-JLKGHP (ed) Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York:
- Moncrieff J, Leo J (2010) A systematic review of the effects of antipsychotic drugs on brain volume. *Psychol Med* 1-14
- Morris RG (2006) Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. *Eur J Neurosci* 23: 2829-2846
- Murphy AN, Bredesen DE, Cortopassi G, Wang E, Fiskum G (1996) Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9893-9898
- Nacher J, Alonso-Llosa G, Rosell DR, McEwen BS (2003) NMDA receptor antagonist treatment increases the production of new neurons in the aged rat hippocampus. *Neurobiol Aging* 24: 273-284

## Literaturverzeichnis

- Nedeljka Tatarovic. DNA-Microarrays. [http://web.uni-frankfurt.de/fb14/engels/Lehre/biotech/Biotechkurs0607\\_DNA\\_microarrays.pdf](http://web.uni-frankfurt.de/fb14/engels/Lehre/biotech/Biotechkurs0607_DNA_microarrays.pdf). 2007. Ref Type: Electronic Citation
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26: 523-530
- Neves-Pereira M, Mundo E, Muglia P, King N, Macciardi F, Kennedy JL (2002) The brain-derived neurotrophic factor gene confers susceptibility to bipolar disorder: evidence from a family-based association study. *Am J Hum Genet* 71: 651-655
- Nishikawa H, Hashino A, Kume T, Katsuki H, Kaneko S, Akaike A (2000) Involvement of direct inhibition of NMDA receptors in the effects of sigma-receptor ligands on glutamate neurotoxicity in vitro. *Eur J Pharmacol* 404: 41-48
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR (2001) Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409: 714-720
- Noh JS, Kang HJ, Kim EY, Sohn S, Chung YK, Kim SU, Gwag BJ (2000) Haloperidol-induced neuronal apoptosis: role of p38 and c-Jun-NH(2)-terminal protein kinase. *J Neurochem* 75: 2327-2334
- Numata S, Ueno S, Iga J, Yamauchi K, Hongwei S, Ohta K, Kinouchi S, Shibuya-Tayoshi S, Tayoshi S, Aono M, Kameoka N, Sumitani S, Tomotake M, Kaneda Y, Taniguchi T, Ishimoto Y, Ohmori T (2006) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met polymorphism in schizophrenia is associated with age at onset and symptoms. *Neurosci Lett* 401: 1-5
- O'Callaghan E, Sham P, Takei N, Glover G, Murray RM (1991) Schizophrenia after prenatal exposure to 1957 A2 influenza epidemic. *Lancet* 337: 1248-1250
- O'Keefe J, Black AH (1977) Single unit and lesion experiments on the sensory inputs to the hippocampal cognitive map. *Ciba Found Symp* 179-198
- O'Shea RD (2002) Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29: 1018-1023
- Oh YJ, Swarzenski BC, O'Malley KL (1996) Overexpression of Bcl-2 in a murine dopaminergic neuronal cell line leads to neurite outgrowth. *Neurosci Lett* 202: 161-164
- Olney JW, Farber NB (1995) Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 52: 998-1007

## Literaturverzeichnis

Olney JW, Labruyere J, Price MT (1989) Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs. *Science* 244: 1360-1362

Olney JW, Newcomer JW, Farber NB (1999) NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *J Psychiatr Res* 33: 523-533

Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-619

Pakkenberg B (1993) Total nerve cell number in neocortex in chronic schizophrenics and controls estimated using optical disectors. *Biol Psychiatry* 34: 768-772

Palmer BA, Pankratz VS, Bostwick JM (2005) The lifetime risk of suicide in schizophrenia: a reexamination. *Arch Gen Psychiatry* 62: 247-253

Palmer TD, Schwartz PH, Taupin P, Kaspar B, Stein SA, Gage FH (2001) Cell culture. Progenitor cells from human brain after death. *Nature* 411: 42-43

Pantelis C, Velakoulis D, McGorry PD, Wood SJ, Suckling J, Phillips LJ, Yung AR, Bullmore ET, Brewer W, Soulsby B, Desmond P, McGuire PK (2003) Neuroanatomical abnormalities before and after onset of psychosis: a cross-sectional and longitudinal MRI comparison. *Lancet* 361: 281-288

Paunesku T, Mittal S, Protic M, Oryhon J, Korolev SV, Joachimiak A, Woloschak GE (2001) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int J Radiat Biol* 77: 1007-1021

Paxinos G, Watson C (2004) *The rat brain in stereotactic coordinates*. Academic Press:

Pezawas L, Verchinski BA, Mattay VS, Callicott JH, Kolachana BS, Straub RE, Egan MF, Meyer-Lindenberg A, Weinberger DR (2004) The brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism and variation in human cortical morphology. *J Neurosci* 24: 10099-10102

Phillips MR, Yang G, Li S, Li Y (2004) Suicide and the unique prevalence pattern of schizophrenia in mainland China: a retrospective observational study. *Lancet* 364: 1062-1068

Post A, Holsboer F, Behl C (1998) Induction of NF-kappaB activity during haloperidol-induced oxidative toxicity in clonal hippocampal cells: suppression of NF-kappaB and neuroprotection by antioxidants. *J Neurosci* 18: 8236-8246

## Literaturverzeichnis

Prelich G, Tan CK, Kostura M, Mathews MB, So AG, Downey KM, Stillman B (1987) Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein. *Nature* 326: 517-520

Rainey JM, Jr., Crowder MK (1975) Prolonged psychosis attributed to phencyclidine: report of three cases. *Am J Psychiatry* 132: 1076-1078

Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ, Makkos Z, Meltzer H, Overholser J, Stockmeier C (2002) Layer-specific reductions in GFAP-reactive astroglia in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. *Schizophr Res* 57: 127-138

Rakic P (1971) Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain Res* 33: 471-476

Ramón y Cajal, S. Degeneration and regeneration of the nervous system. 1928. Hafner, New York. Ref Type: Generic

Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE (2004) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* 11: 372-380

Rapoport JL, Giedd J, Kumra S, Jacobsen L, Smith A, Lee P, Nelson J, Hamburger S (1997) Childhood-onset schizophrenia. Progressive ventricular change during adolescence. *Arch Gen Psychiatry* 54: 897-903

Rapoport JL, Giedd JN, Blumenthal J, Hamburger S, Jeffries N, Fernandez T, Nicolson R, Bedwell J, Lenane M, Zijdenbos A, Paus T, Evans A (1999) Progressive cortical change during adolescence in childhood-onset schizophrenia. A longitudinal magnetic resonance imaging study. *Arch Gen Psychiatry* 56: 649-654

Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255: 1707-1710

Rice J, Gottesman II, Suarez BK, O'Rourke DH, Reich T (1982) Ascertainment bias for non-twin relatives in twin proband studies. *Hum Hered* 32: 202-207

Roberts GW, Colter N, Lofthouse R, Bogerts B, Zech M, Crow TJ (1986) Gliosis in schizophrenia: a survey. *Biol Psychiatry* 21: 1043-1050

Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16: 675-686

## Literaturverzeichnis

Rujescu D, Bender A, Keck M, Hartmann AM, Ohl F, Raeder H, Giegling I, Genius J, McCarley RW, Moller HJ, Grunze H (2006) A pharmacological model for psychosis based on N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction: molecular, cellular, functional and behavioral abnormalities. *Biol Psychiatry* 59: 721-729

Satou T, Cummings BJ, Cotman CW (1995) Immunoreactivity for Bcl-2 protein within neurons in the Alzheimer's disease brain increases with disease severity. *Brain Res* 697: 35-43

Schaudien, D. Experimentelle Infektion von TNF-transgenen Mäusen mit dem Virus der Bornaschen Krankheit - Einfluss auf Zytokinprofil, Neurodegeneration und Neuroprotektion. 2007. Institut für Pathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover .  
Ref Type: Thesis/Dissertation

Schlaepfer TE, Harris GJ, Tien AY, Peng LW, Lee S, Federman EB, Chase GA, Barta PE, Pearlson GD (1994) Decreased regional cortical gray matter volume in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 151: 842-848

Schmitt A, Weber S, Jatzko A, Braus DF, Henn FA (2004) Hippocampal volume and cell proliferation after acute and chronic clozapine or haloperidol treatment. *J Neural Transm* 111: 91-100

Schmitt A, Zink M, Petroianu G, May B, Braus DF, Henn FA (2003) Decreased gene expression of glial and neuronal glutamate transporters after chronic antipsychotic treatment in rat brain. *Neurosci Lett* 347: 81-84

Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20: 11-21

Selemon LD (2004) Increased cortical neuronal density in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 161: 1564

Selemon LD, Rajkowska G, Goldman-Rakic PS (1995) Abnormally high neuronal density in the schizophrenic cortex. A morphometric analysis of prefrontal area 9 and occipital area 17. *Arch Gen Psychiatry* 52: 805-818

Selemon LD, Rajkowska G, Goldman-Rakic PS (1998) Elevated neuronal density in prefrontal area 46 in brains from schizophrenic patients: application of a three-dimensional, stereologic counting method. *J Comp Neurol* 392: 402-412

Sen S, Nesse RM, Stoltenberg SF, Li S, Gleiberman L, Chakravarti A, Weder AB, Burmeister M (2003) A BDNF coding variant is associated with the NEO personality inventory domain neuroticism, a risk factor for depression. *Neuropsychopharmacology* 28: 397-401

## Literaturverzeichnis

- Sibbe M, Forster E, Basak O, Taylor V, Frotscher M (2009) Reelin and Notch1 cooperate in the development of the dentate gyrus. *J Neurosci* 29: 8578-8585
- Song H, Stevens CF, Gage FH (2002) Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417: 39-44
- Squire LR (1992) Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev* 99: 195-231
- St Clair D, Blackwood D, Muir W, Carothers A, Walker M, Spowart G, Gosden C, Evans HJ (1990) Association within a family of a balanced autosomal translocation with major mental illness. *Lancet* 336: 13-16
- Stark AK, Uylings HB, Sanz-Arigita E, Pakkenberg B (2004) Glial cell loss in the anterior cingulate cortex, a subregion of the prefrontal cortex, in subjects with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 161: 882-888
- Stevens CD, Altshuler LL, Bogerts B, Falkai P (1988) Quantitative study of gliosis in schizophrenia and Huntington's chorea. *Biol Psychiatry* 24: 697-700
- Stevens JR (1982) Neuropathology of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 39: 1131-1139
- Sun W, Gould TW, Vinsant S, Prevet D, Oppenheim RW (2003) Neuromuscular development after the prevention of naturally occurring neuronal death by Bax deletion. *J Neurosci* 23: 7298-7310
- Szeszko PR, Lipsky R, Mentschel C, Robinson D, Gunduz-Bruce H, Sevy S, Ashtari M, Napolitano B, Bilder RM, Kane JM, Goldman D, Malhotra AK (2005) Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism and volume of the hippocampal formation. *Mol Psychiatry* 10: 631-636
- Takahashi M, Shirakawa O, Toyooka K, Kitamura N, Hashimoto T, Maeda K, Koizumi S, Wakabayashi K, Takahashi H, Someya T, Nawa H (2000) Abnormal expression of brain-derived neurotrophic factor and its receptor in the corticolimbic system of schizophrenic patients. *Mol Psychiatry* 5: 293-300
- Tan CK, Castillo C, So AG, Downey KM (1986) An auxiliary protein for DNA polymerase-delta from fetal calf thymus. *J Biol Chem* 261: 12310-12316
- Tan CK, Sullivan K, Li XY, Tan EM, Downey KM, So AG (1987) Autoantibody to the proliferating cell nuclear antigen neutralizes the activity of the auxiliary protein for DNA polymerase delta. *Nucleic Acids Res* 15: 9299-9308

## Literaturverzeichnis

- Tashiro A, Sandler VM, Toni N, Zhao C, Gage FH (2006) NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature* 442: 929-933
- Thoenen H (1995) Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 270: 593-598
- Thompson PM, Sower AC, Perrone-Bizzozero NI (1998) Altered levels of the synaptosomal associated protein SNAP-25 in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 43: 239-243
- Thune JJ, Pakkenberg B (2000) Stereological studies of the schizophrenic brain. *Brain Res Brain Res Rev* 31: 200-204
- Tokunaga A, Kohyama J, Yoshida T, Nakao K, Sawamoto K, Okano H (2004) Mapping spatio-temporal activation of Notch signaling during neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse brain. *J Neurochem* 90: 142-154
- Tollefson GD, Sanger TM (1997) Negative symptoms: a path analytic approach to a double-blind, placebo- and haloperidol-controlled clinical trial with olanzapine. *Am J Psychiatry* 154: 466-474
- van Diest PJ, Brugal G, Baak JP (1998) Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J Clin Pathol* 51: 716-724
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415: 1030-1034
- Vargas MR, Johnson DA, Sirkis DW, Messing A, Johnson JA (2008) Nrf2 activation in astrocytes protects against neurodegeneration in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 28: 13574-13581
- Varty GB, Cohen-Williams ME, Hunter JC (2003) The antidepressant-like effects of neurokinin NK1 receptor antagonists in a gerbil tail suspension test. *Behav Pharmacol* 14: 87-95
- Venkatasubramanian G (2010) Neuroanatomical correlates of psychopathology in antipsychotic-naive schizophrenia. *Indian J Psychiatry* 52: 28-36
- Ventriglia M, Bocchio CL, Benussi L, Binetti G, Zanetti O, Riva MA, Gennarelli M (2002) Association between the BDNF 196 A/G polymorphism and sporadic Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* 7: 136-137
- Verma A, Moghaddam B (1998) Regulation of striatal dopamine release by metabotropic glutamate receptors. *Synapse* 28: 220-226

## Literaturverzeichnis

Vicente E, Degerone D, Bohn L, Scornavaca F, Pimentel A, Leite MC, Swarowsky A, Rodrigues L, Nardin P, de Almeida LM, Gottfried C, Souza DO, Netto CA, Goncalves CA (2009) Astroglial and cognitive effects of chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Brain Res* 1251: 204-212

Voutsinos-Porche B, Bonvento G, Tanaka K, Steiner P, Welker E, Chatton JY, Magistretti PJ, Pellerin L (2003) Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. *Neuron* 37: 275-286

Wang C, Kaufmann JA, Sanchez-Ross MG, Johnson KM (2000) Mechanisms of N-methyl-D-aspartate-induced apoptosis in phencyclidine-treated cultured forebrain neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 294: 287-295

Wang C, McInnis J, Ross-Sanchez M, Shinnick-Gallagher P, Wiley JL, Johnson KM (2001) Long-term behavioral and neurodegenerative effects of perinatal phencyclidine administration: implications for schizophrenia. *Neuroscience* 107: 535-550

Wang LP, Kempermann G, Kettenmann H (2005) A subpopulation of precursor cells in the mouse dentate gyrus receives synaptic GABAergic input. *Mol Cell Neurosci* 29: 181-189

Willner P (1997) The dopamine hypothesis of schizophrenia: current status, future prospects. *Int Clin Psychopharmacol* 12: 297-308

Winner B, Cooper-Kuhn CM, Aigner R, Winkler J, Kuhn HG (2002) Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 16: 1681-1689

Wiskott L, Rasch MJ, Kempermann G (2006) A functional hypothesis for adult hippocampal neurogenesis: avoidance of catastrophic interference in the dentate gyrus. *Hippocampus* 16: 329-343

Wong EH, Kemp JA, Priestley T, Knight AR, Woodruff GN, Iversen LL (1986) The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 7104-7108

Woo SM, Kim J, Han HW, Chae JI, Son MY, Cho S, Chung HM, Han YM, Kang YK (2009) Notch signaling is required for maintaining stem-cell features of neuroprogenitor cells derived from human embryonic stem cells. *BMC Neurosci* 10: 97

Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275: 1129-1132

Yang L, Li F, Zhang H, Ge W, Mi C, Sun R, Liu C (2009) Astrocyte activation and memory impairment in the repetitive febrile seizures model. *Epilepsy Res* 86: 209-220

## Literaturverzeichnis

Yevhen Vainshtein. Applying microarray-based techniques to study gene expression patterns: a bio-computational approach. 10-12. 2010. Ref Type: Thesis/Dissertation

Young CE, Arima K, Xie J, Hu L, Beach TG, Falkai P, Honer WG (1998) SNAP-25 deficit and hippocampal connectivity in schizophrenia. *Cereb Cortex* 8: 261-268

Yuan J, Yankner BA (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407: 802-809

Zhang KZ, Westberg JA, Holtta E, Andersson LC (1996) BCL2 regulates neural differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 4504-4508

Zhang Z, Sun J, Reynolds GP (2002) A selective reduction in the relative density of parvalbumin-immunoreactive neurons in the hippocampus in schizophrenia patients. *Chin Med J (Engl )* 115: 819-823

Zhong LT, Kane DJ, Bredesen DE (1993a) BCL-2 blocks glutamate toxicity in neural cell lines. *Brain Res Mol Brain Res* 19: 353-355

Zhong LT, Sarafian T, Kane DJ, Charles AC, Mah SP, Edwards RH, Bredesen DE (1993b) bcl-2 inhibits death of central neural cells induced by multiple agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 4533-4537

Zipursky RB, Lim KO, Sullivan EV, Brown BW, Pfefferbaum A (1992) Widespread cerebral gray matter volume deficits in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 49: 195-205

Zornberg GL, Buka SL, Tsuang MT (2000) Hypoxic-ischemia-related fetal/neonatal complications and risk of schizophrenia and other nonaffective psychoses: a 19-year longitudinal study. *Am J Psychiatry* 157: 196-202

Zubin J, Spring B (1977) Vulnerability--a new view of schizophrenia. *J Abnorm Psychol* 86: 103-126

## **10 Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Dan Rujescu danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung der vorliegenden Arbeit, für seine wissenschaftliche Förderung und seine großzügige und kompetente Unterstützung. Durch die Mitarbeit in seiner Arbeitsgruppe Molekulare Neurobiologie wurde mein Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten und insbesondere an der Neurobiologie vertieft.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Just Genius für seine engagierte und zuverlässige Betreuung. Er war in allen Phasen dieser Arbeit ein kompetenter und geduldiger Ansprechpartner.

Bei Frau Dr. Annette Hartmann möchte ich mich für ihre freundschaftliche und konstruktive Unterstützung dieser Arbeit bedanken.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Molekulare Neurobiologie möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die gegenseitige Hilfsbereitschaft bedanken. Besonderer Dank geht dabei an Frau Dr. Johanna Geiger, Frau Dr. Heike Pflanz und Frau Dr. Stefanie Robel.

Für geduldige und konstruktive mathematisch-statistische Beratung danke ich Herrn Prof. Dr. Peter Augat und Herrn Dr. Wolfgang Wülling.

Für vorausschauende Ratschläge zum Verfassen einer Doktorarbeit sowie für das Vorleben einer ehrlichen Begeisterung für Forschung und Wissenschaft möchte ich mich bei Herrn Dr. Oliver Schnell bedanken.

Meiner Familie danke ich von Herzen für ihre liebevolle Unterstützung und für das Interesse an meiner Arbeit. In besonderem Maße möchte ich meinen Eltern danken, die durch ihre zuverlässige und großzügige Unterstützung während des Studiums und darüber hinaus den Grundstein nicht nur für diese Arbeit gelegt haben. Mein innigster Dank gilt meinen Kindern Gustav und Luisa. Sie haben mir allein durch ihr Dasein und ihre lebenswürdige Art viel Kraft gegeben. Auch den Freunden, die für die entbehrungsreiche Zeit Verständnis aufbrachten, gilt mein großer Dank.