

Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. P. Falkai

**Die muskarinerge in vitro Beeinflussung der
Neurogenese gezüchteter adulter neuronaler Stammzellen von
Mäusen mit Carbachol und Pirenzepin**

Dissertation
Zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Werner Georg Rauh
aus
München
2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dan Rujescu

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Jochen Herms

Priv. Doz. Dr. Steffen Berweck

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Jens Benninghoff

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

Tag der mündlichen Prüfung: 03.08.2015

Danksagung

Bei allen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben, möchte ich mich ganz besonders bedanken.

Herr Prof. Dr. med. Dan Rujescu ermöglichte mir die Arbeit in den Einrichtungen der Klinik und die Benutzung der benötigten Geräte.

Herr Dr. Jens Benninghoff danke ich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bis zur Fertigstellung der Arbeit.

Herr Tobias Koberg unterstützte mich bei der statistischen Auswertung.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. Annette Hartmann und Frau Dr. Marion Friedl bedanken, die mich sehr bei der Gestaltung des Manuskripts beraten und unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Zusammenfassung	XI
1 Einleitung	1
1.1 Historische Entwicklung der Theorie der Neurogenese.....	1
1.2 Neuronale und synaptische Plastizität	2
1.3 Adulte Neurogenese im Hippokampus.....	5
1.4 Zerebrales cholinerges System	9
1.5 Cholinerge Steuerung der adulten hippocampalen Neurogenese	11
1.6 Stammzellforschung zur adulten Neurogenese	15
1.7 Zielsetzung und Hypothese	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Auftauen und Kultivierung der ANSC.....	20
2.2 Passagieren und Bestimmung der Zellzahl.....	21
2.3 Langzeit-Proliferationsassay.....	23
2.4 ANSC-Migrationsassay	24
2.4.1 Boyden-Kammer	24
2.4.2 Versuchsablauf – Migrationsassay	25
2.4.3 Zellkernfärbung und -Zählung.....	27
2.5 Zelldifferenzierung	27
2.5.1 Versuchsdurchführung	28
2.5.2 Verwendete Antikörper	30
2.5.3 Zellmarkierung.....	30
2.6 Statistische Auswertung	32
2.7 Verwendete Geräte, Materialien, Chemikalien, Lösungen und Antikörper	34
3 Ergebnisse	39
3.1 Datenanalyse	39
3.2 Zellproliferation.....	40
3.3 Zellmigration.....	47
3.4 Zelldifferenzierung.....	51
3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse	56
4 Diskussion	59

4.1 Kultivierung von ANSC	59
4.2 Zellproliferation	61
4.3 Zellmigration	64
4.4 Zelldifferenzierung	66
5 Ausblick	70
Literaturverzeichnis	72
Lebenslauf	88
Eidesstattliche Erklärung	89

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Strukturformel Acetylcholin	14
Abb. 2:	Strukturformel Carbachol	14
Abb. 3:	4-Felderzählung in einer Neubauer-Kammer (Beckman Coulter, Krefeld, D)	22
Abb. 4:	Schematische Darstellung einer Boyden-Kammer mit matrigelbeschichteter Membran (mod. nach Woo et al., 2001)	25
Abb. 5:	Auswirkung einer cholinergen und sympathikomimetischen Wirkung auf die Zellproliferation; Signifikanz $p < 0,01$; CCh ** ;Signifikanz $p < 0,05$ * – Carbachol; PIR – Pirenzepin; Comp – Completo.....	42
Abb. 6:	Zuwachsraten der Proliferation in Mio. Zellen 4. bis 12. Tag nach Beginn der Kultivierung; $p < 0,05$ = *	44
Abb. 7:	Zuwachsraten der Proliferation in Mio. Zellen 16. bis 24. Tag nach Beginn der Kultivierung; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,03$ bis $0,01$	44
Abb. 8:	Kalkulierte Zellzahlen im Langzeit-Proliferationsassay bis 24 Tage nach Beginn der Kultur ■—■ CCh; ◆—◆ COMP; ▲—▲ PIR (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$)	45
Abb. 9:	Kalkulierte Zellzahlen im Langzeit-Proliferationsassay bis 24 Tage nach Beginn der Kultur; ■—■ CCh; ◆—◆ COMP; ▲—▲ PIR (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$)	47
Abb. 10:	Migrierte Zellzahlen der positiven Kontrollgruppe (COMP) von fünf differenten ANSC-Passagen 6, 8, 10, 12 und 14 ($p < 0,05$) *	49
Abb. 11:	Box-Plot-Grafik von drei Migrationsversuchen mit DMEM, CCh, PIR (A), Einzeldarstellung von fünf ANSC-Passagen (B), Einzelwerte der drei Versuchsgruppen, bezogen auf die fünf ANSC-Passagen (C)	50
Abb. 12:	Kernfärbung mit DAPI: A-COMP/ B-CCh/ C-PIR; DAPI mit TUJ1: D-COMP/ E-CCh/ F-PIR	52
Abb. 13:	Prozentualer Anteil differenzierter Neurone versus Kernzahl der Gruppen Comp, CCh und PIR ($p < 0,01$)	54
Abb. 14:	Prozentualer Anteil differenzierter Neurone für die drei Gruppen in Bezug auf die Passage (A) und für die fünf Passagen in Bezug auf die Versuchsgruppe (B)	55
Abb. 15:	Prozentualer Anteil differenzierter Neurone der Gruppen COMP, CCh und PIR mit eingefügten K-Werten ($p < 0,01$)	56

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Versuchsansätze für den Proliferationsassay.....	23
Tab. 2:	Differente Kulturmedien für die Zelldifferenzierung.....	28
Tab. 3:	Versuchsaufbau Zelldifferenzierung	29
Tab. 4:	Verwendete Geräte	34
Tab. 5:	Verwendete Materialien	35
Tab. 6:	Verwendete Reagenzien und Antikörper.....	36
Tab. 7:	Zusammensetzung des Zellkulturmediums COMP.....	37
Tab. 8:	Zusammensetzung des Kulturadjuvans „Hormonmix“ für COMP	38
Tab. 9:	Zellzählung von fünf Versuchsreihen Proliferationsassay der Kontrollgruppe COMP	40
Tab. 10:	Statistische Auswertung von je fünf Versuchsreihen Proliferationsassay nach Zugabe von Carbachol (CCh) in der Gruppe I und Pirenzepin (PIR) in Gruppe II; H = Wahrscheinlichkeitsgrad der Proliferation.....	41
Tab. 11:	Summation der Zellzahlen von fünf Versuchsreihen mit drei Versuchsgruppen COMP, CCh, PIR von der Startzahl 200.000 Zellen (0,2) am Beginn der Kultur (d ₀) bis zum 24. Tag der Kultur (d ₂₄); $p < 0,01 = **$; $p < 0,05 = *$	43
Tab. 12:	Kalkulation der hypothetischen Wachstumsrate COMP r/d4-24, CCh r/d4-24, PIR r/d4-24	46
Tab. 13:	Migration von ANSC in COMP und DMEM ohne Chemoattraktants von fünf ANSC-Passagen (6, 8, 10, 12, 14) und Migration von ANSC in DMEM mit Zusatz CCh bzw. PIR); H = Wahrscheinlichkeit für Migration.....	48
Tab. 14:	Differenzierte Neurone (n) ohne und mit Zusatz von CCh bzw. PIR versus COMP); H = Wahrscheinlichkeitsgrad für Differenzierung	53

Abkürzungsverzeichnis

Ach	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
ACh-R	Acetylcholinrezeptor
AD	Alzheimer Erkrankung
ANSC	Adulte neuronale Stammzellen
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
b-FGF	Basischer Fibroblastenwachstumsfaktor
BMP2	Bone morphogenetic protein 2
BrdU	Bromodeoxyuridin
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
ChAT	Cholin-Acetyltransferase
CCh	Carbachol
CP	Corticale Platte
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
COMP	Completo (DMEM + Ham's F12 Nutrient Mixture + Hormonmix)
DNS	Deoxyribonukleinsäure
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM/F12	DMEM + Ham's F12 Nutrient Mixture
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	Epidermal growth factor
ES	Embryonale Stammzellen
FCS	Fetales Kälberserum
FGF-2	Fibroblast growth factor 2

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GABA	γ -Aminobuttersäure
GD	Gyrus dentatus
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GZ	Granularzellen
HPA-axis	Hypothalamic-pituitary-adrenal-axis
IGF-I	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor I
IZ	Intermediaten Zone
KZS	Körnerzellschicht
LTP	Hippokampale long term potentiation
mAChR	M2-Muskarin-ACh-Rezeptoren
MSDB	Mediales Septum-Broca-Band
NeuN	Neuronenspezifischen Zellkernprotein
NG	Neurogenese
NGF	Nerve growth factor
NGS	Normal Goat Serum
NSC	Neuronale Stammzellen
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCPA	Parachlorphenylalanin
PDGF	Platelet-derived growth factor
PIR	Pirenzepin
PSA-NCAM	Polysialic acid- Neural Cell Adhesion Molecule
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SGZ	Subgranuläre Zone

SVZ	Subventrikuläre Zone
TGF- α	Transforming growth factor alpha
Tuj1	β III-Tubulin
TPH	Tryptophan-Hydroxylase
ZNS	Zentralnervenssystem
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden der Einfluss des Acetylcholinanalogon Carbachol (CCh) und des Parasympathikolytikums Pirenzepin (PIR) auf die Proliferation, Migration und Differenzierung von Zelllinien adulter neuronaler Stammzellen (ANSC) von Mäusen in vitro untersucht.

Bei der Durchführung eines Langzeitproliferationsassays kam es in der Versuchsgruppe unter Verwendung des Chemoattraktants CCh in DMEM/F12 (COMP) zu einer signifikanten Zunahme der Proliferation im Vergleich mit der Kontrollgruppe ohne Behandlung mit CCh.

In einem zweiten Versuchsansatz erfolgten in dieser Arbeit Untersuchungen zur Migration kultivierter ANSC durch eine permeable Membran mittels Zellkernzählung in zwei Kontrollgruppen (DMEM/F12 und DMEM ohne Chemoattraktants) und in zwei weiteren Gruppen Migrationsbestimmungen im Kulturmedium DMEM unter Zugabe der Chemoattraktants CCh oder PIR.

In der Kontrollgruppe DMEM/F12 wurden signifikante Unterschiede hinsichtlich der Anzahl migrierter ANSC und der eingesetzten Zellpassagen gefunden.

Gegenüber den Passagen 6 und 8 waren die Zahlen migrierter Zellen in den Passagen 10, 12 und 14 signifikant höher ($p < 0,05$).

Keine signifikanten Unterschiede fanden sich intergruppal in den drei Migrationsversuchen mit dem Kulturmedium DMEM, jedoch waren in allen drei DMEM-Gruppen die Zahlen der migrierten Zellen hochsignifikant geringer gegenüber der Kontrollgruppe DMEM/F12. Zur Überprüfung cholinerg und parasympathikolytischer Einflüsse auf die Differenzierung von ANSC erfolgte eine Kultivierung für insgesamt sieben Tage. Nach 24h Kultivierung im Medium DMEM/F12 mit den Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 wurde für den zweiten Tag COMP ohne EGF und nach 48h für die weiteren fünf Tage COMP ohne Wachstumsfaktoren eingesetzt.

Messungen differenzierter Neurone erfolgten in einer Kontrollgruppe COMP ohne Chemoattraktants und in zwei Gruppen mit Zusatz von CCh bzw. PIR.

Bei Zusatz von CCh zum Kulturmedium COMP erhöhte sich die Zahl der Neuronen signifikant ($p = 0,003$) im Vergleich mit der Kontrollgruppe ohne Chemoattraktant. Dagegen wurde nach Zugabe von PIR eine signifikant geringere Differenzierung ($p = 0,007$) gegenüber der Vergleichsgruppe ohne Chemoattraktant gefunden.

CCh verbesserte die de novo Differenzierung in Neuronen von bFGF- und EGF-armen Stammzellen erheblich, was sich aus dem prozentualen Anteil der TUJ1 positiven Zellen erkennen ließ.

Demgegenüber bewirkte der Zusatz von PIR, einem Muskarin M1 Rezeptorantagonist, weniger Neuronen.

Zusammenfassend haben die hier vorliegenden Untersuchungsergebnisse gezeigt, dass die cholinerge Stimulation mit CCh für die Neurogenese wachstumsregulatorisch auf die Proliferation, Migration und Differenzierung von ANSC einwirkt. Dies wird vorwiegend durch den Muskarin M1-Rezeptor-Subtyp gesteuert, wie die Ergebnisse nach M1-Rezeptorinaktivierung mit PIR beweisen konnten.

Die Ergebnisse haben demonstriert, dass die Kultivierung von ANSC im Kulturmedium DMEM/F12 als valides in vitro Modell zur Untersuchung möglicher Einflüsse von Neurotransmittern und Pharmaka auf die Neurogenese einsetzbar ist und experimentelle Grundlagen mit Relevanz für die Entwicklung therapeutischer Ansätze von neurodegenerativen Krankheiten liefern kann.

1 Einleitung

1.1 Historische Entwicklung der Theorie der Neurogenese

Der spanische Neuroanatom und Nobelpreisträger Ramón y Cajal stellte 1894 in einem Vortrag den Mitgliedern der Royal Society, London, folgende neue Hypothese vor:

„Lernen und jede Art der Sammlung von Erfahrungen fördern Ausdehnung, Wachstum und Funktion der Verbindungen zwischen den Nervenzellen“ (Ramón y Cajal, 1894, doi:10.1098/rspl.1894.0063). Er bezeichnete diese Verbindungen als „Protuberanzen“, die später durch Sherrington den heute allgemein akzeptierten Terminus Synapse erhielten (Sherrington, 1906).

Die Hypothese einer möglichen Plastizität von Synapsen von Ramón y Cajal enthielt eine Erklärung der Fähigkeit zum Erinnern, und daraus resultierend, bewusst agieren und reagieren zu können. Jede neue Erfahrung und jeder Lernprozess induziert die Bildung eines, immer wieder abrufbaren Substrats im synaptischen Bereich. Diese Inauguration der heute anerkannten Langzeitpotenzierung (LTP) blieb aber mangels eines wissenschaftlichen Nachweises bis 1966 spekulativ und eher unbeachtet.

Den experimentellen Beweis, dass Synapsen von adulten Tieren per Stimulationstraining eine LTP entwickeln können, wurde durch Lømo, Andersen, und Bliss in den Jahren 1966 bis 1973 erbracht (Lømo, 1966; Anderson und Lømo, 1967; Bliss und Lømo, 1973).

In tierexperimentellen Studien an Kaninchen konnte in diesen Untersuchungen nachgewiesen werden, dass ein Training mit kurzzeitigen, hochfrequenten Stimulierungen des sensiblen angulären Nervenbündels am temporalen Horn des lateralen Ventrikels, welches Informationen zum Hippokampus weiterleitet, die synaptische Funktion kurzzeitig, aber auch langfristig über Monate verbessert.

Nach mehreren Wiederholungen der Stimulationsblöcke (15 Impulse/sec.; Dauer 15-20 sec.) kam es zu immer rascheren, signifikanten Steigerungen der EEG-abgeleiteten evozierten Potentiale im Gyrus dentatus (GD) des Hippokampus.

Konträr zur Theorie und zur Beweisführung der LTP blieb das von Ramón y Cajal und Sherrington vertretene Neuronen-Dogma – „Neue Neurone werden im erwachsenen Gehirn nicht mehr gebildet“ – länger bestehen, und konnte erst in jüngerer Zeit widerlegt werden.

Erste Hinweise auf eine postnatale Neurogenese erbrachten Untersuchungen an adoleszenten Ratten, bei denen im GD mittels [^3H]-Thymidin-Markierung die Neubildung von Zellen nachgewiesen wurde (Altman und Das, 1965). Diese Ergebnisse blieben nicht unwidersprochen, da die Methode der Markierung nicht sicher genug zwischen Neuronen und Gliazellen differenzierte.

Zwei weitere Untersuchungsergebnisse, publiziert 1977 und 1983, führten allmählich zur Akzeptanz der Erkenntnis, dass sich auch bei adulten Tieren Neubildungen von Neuronen ereignen.

Bei adulten Ratten fanden sich 30 Tage nach intraperitonealer Instillation von [^3H]-Thymidin im GD des Hippokampus und Bulbus olfaktorius markierte Zellen, die elektronenmikroskopisch definitiv als Neurone identifiziert werden konnten und Synapsen enthielten (Kaplan und Hinds, 1977).

In einer weiteren Untersuchung an adulten weiblichen Kanarienvögeln konnte nicht nur nachgewiesen werden, dass eine Neurogenese stattfindet, sondern dass neugebildete Neurone die Fähigkeit zur Migration besitzen (Goldman und Nottebohm, 1983). Zwei Tage nach Applikation von Testosteron und [^3H]-Thymidin fanden sich zahlreiche markierte Neurone oberhalb des zerebralen Stimmzentrums, während fünf Wochen nach Versuchsbeginn 1,5 - 4% neugebildeter Neurone autoradiografisch ausschließlich im Stimmzentrum, der Pars kaudalis des Hyperstriatum ventrale, lokalisiert werden konnten.

Mit der Verwendung des Thymidinanalogs 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) zum autoradiografischen Nachweis proliferierender Zellen und neuronenspezifischer Marker (Neuronal nuclei – Antikörper, Calbindin – Antikörper, Neuronenspezifische Enolase) zum immunhistochemischen Nachweis neugebildeter Neurone (Soriano und Del Rio, 1991; Takahashi et al., 1992), gelang 1998 erstmalig der Beweis der Neurogenese im GD des Menschen (Eriksson et al., 1998).

1.2 Neuronale und synaptische Plastizität

Kortikale neuronale und synaptische Plastizität ist die Eigenschaft von Synapsen und Neuronen, sich als Folge psychologischer Einflüsse, Erfahrungen und Tätigkeiten morphologisch und funktionell, auch bis ins hohe Alter, zu verändern. In Abhängigkeit von der Struktur werden neuronale und synaptische Plastizität differenziert und stellen eine Anpassungsreaktion auf extrinsische und intrinsische Informationen dar (Kandel et al., 1996).

In die adaptiven Prozesse der kortikalen Plastizität sind systemische, zelluläre und molekulare Ebenen einbezogen und führen als *strukturelle Plastizität* zu Neurogenese und Reorganisation

von Axonen und Dendriten und als *molekulare Plastizität* zu Veränderungen von Membranproteinen (Zilles, 1996).

Dabei werden adaptive Veränderungen der Synapsen durch LTP auch als *funktionelle* und *molekulare Plastizität* differenziert (Kandel, 2001; Dityatev und Schachner, 2003).

Die durch neuronale Plastizität resultierende Neurogenese im menschlichen Gehirn ist ein komplexer Prozess der neuronalen und speziell der strukturellen Plastizität für physiologische Funktionen und pathophysiologische Veränderungen (Lledo et al., 2006; Deng et al., 2010).

Neubildungen von Neuronen beim Menschen wurden vorwiegend in der subgranulären Zone (SGZ) des GD des Hippokampus und der Seitenventrikularzone (SVZ) des anterolateralen Seitenventrikels (Bulbus olfactorius) nachgewiesen (Alvarez-Buylla und Garcia-Verdugo, 2002; Bruel-Jungerman et al., 2006; Alonso et al., 2006, Amrein und Lipp, 2009; Wenping et al., 2010).

Das adulte olfaktorische System gilt als intensivste Region für die Neurogenese (Luskin, 1998). Neuroblasten migrieren unter mehrfachen Zellteilungen aus der SVZ in Richtung der bulbi olfactorii und differenzieren sich in den Riechkolben zu granulären und periglomulären Interneuronen (Lois und Alvarez-Buylla, 1994; Pencea et al., 2001).

Eine zweite Hauptbildungsstätte, die SGZ des GD, proliferiert permanent adulte neuronale Vorläuferzellen und diese migrieren unter steter Zellteilung in die über der SGZ gelegene granuläre Zellschicht, wo sie zu funktionellen Granularzellen ausreifen und interzelluläre synaptische Kontakte ausbilden (Cameron und McKay, 2001; Kempermann et al., 2004; Schmidt-Hieber et al., 2004, Hu und Zhang, 2010).

Tierexperimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Neurogenese auch in anderen Hirnregionen erfolgt, so im Temporal- und Parietallappen von Primaten (Gould et al., 1999), in den Amygdalae und in der Substantia nigra von Primaten (Bernier et al., 2002; Zhao et al., 2003), im Nukleus kaudatus und Kleinhirn von Kaninchen (Luzzati F et al., 2006; Ponti et al., 2006), im Hypothalamus von Mäusen (Kokoeva et al., 2005) und im Rückenmark von Ratten (Yamamoto et al., 2001).

Diesen Ergebnissen stehen konträre Resultate entgegen, wobei in diesen Hirnregionen auch multipotente Vorläuferzellen nachgewiesen wurden, aber keine Neurogenese beobachtet werden konnte (Horner et al., 2000; Lie et al., 2002; Frielingsdorf et al., 2004).

Das Vorhandensein potenter Vorläuferzellen in bestimmten Hirnregionen, auch außerhalb der primär neurogenen Zonen SVZ und SGZ führte zur Hypothese, dass diese eine Bedeutung für reparative Vorgänge haben könnten. In tierexperimentellen Untersuchungen mit Induktion von Insulten am Kortex konnte diese Hypothese bestätigt werden (Magavi et al., 2000; Arvidsson et al., 2002; Nakatomi et al., 2002; Arlotta et al., 2003; Chen et al., 2004).

Aufbauend auf den grundlegenden Erkenntnissen der Neubildung, Migration und funktioneller Ausreifung adulter humaner Neurone fokussierten sich Untersuchungen seit ca. 15 Jahren auf pathophysiologische Auswirkungen von Störungen der Neurogenese.

Ergebnisse konnten zeigen, dass unter Stress (Huether et al., 1999), bei endogener Depression (Kempermann und Kronenberg, 2003; Malberg, 2004; Hack et al., 2005), Epilepsie (Nakagawa et al., 2004; Crespel et al., 2005; Huot et al., 2007), M. Parkinson (Braak et al., 2003; Winner et al., 2006) und neurodegenerativen Erkrankungen (Winner et al., 2011) eine Proliferation neurogener Vorläuferzellen im Hippokampus und Kortex erfolgt und Therapieansätze damit möglich sein können.

Synaptische Plastizität ist die Fähigkeit, auf neue und/oder wiederholte Erfahrungen und Eindrücke rascher und adäquat reagieren zu können. Die Wirkweise basiert auf einer Erhöhung der Effektivität der synaptischen Übertragung durch sukzessive Erhöhung der Menge des freigesetzten bzw. synthetisierten Botenstoffes (Neurotransmitter) oder der Rezeptordichte auf der Empfängerzelle (Citri und Malenka, 2008). Die Vermutung, dass synaptische Informationsübertragungen einen strukturellen oder funktionalen *Rebound* induzieren, der kurzzeitig oder permanent abrufbar ist, wurde 1949 postuliert (Hebb et al., 1949) und später tierexperimentell nachgewiesen (Lømo, 1966; Anderson und Lømo, 1967; Bliss und Lømo, 1973).

Untersuchungen zur Art der strukturellen synaptischen Plastizität haben ergeben, dass bestimmte Wachstumsfaktoren, wie *Epidermal growth factor* (EGF), *Fibroblast growth factor-2* (FGF-2) und *Transforming growth factor alpha* (TGF- α) Wachstum und morphologische Veränderungen an dendritischen Dornfortsätzen, dem Sitz der Synapsen, induzieren (Fischer et al., 1992; Bansal et al., 2000; Ben-Ari et al., 2002; Ambrogini et al., 2004; Dori und Sorq, 2006; Aimone et al., 2009). Diese morphologische Plastizität führt zur Bildung neuer Dornfortsätze und damit funktionell zu einer Verstärkung der interneuronalen Informationsübermittlung (Nikonenko et al., 2002; Abraham und Williams, 2003; Matsuzaki et al., 2004; Nagerl et al., 2004).

Neben strukturellen Adaptationen konnten bei Untersuchungen der synaptischen Plastizität Veränderungen der Membranpotentiale und der biophysikalischen Eigenschaften der Ionenka-

näle von Neuronen nachgewiesen werden, für die der Terminus *intrinsische Plastizität* geprägt wurde (Daoudal und Debanne, 2003; Frick et al., 2005; Zhang et al., 2003).

Während durch intrinsische Plastizität verursachte Membranpotentialänderungen und Ionenverschiebungen eine kurzzeitige Intensitätsänderung der synaptischen Übertragung bewirken, ist die strukturelle Plastizität von langanhaltender Dauer und für Lernprozesse und Gedächtnistraining von eminenter Bedeutung (Turrigiano et al., 1998; Desai et al., 1999; Aptowicz et al., 2004; Karmarkar und Buonomano, 2006).

Synaptische Informationsübertragungen erfolgen hauptsächlich und lokalisations-abhängig über Freisetzung und intersynaptischen Austausch von Neurotransmittern. Zu den wichtigsten Neurotransmittersystemen zählen cholinerge, serotonerge und dopaminerge Transmitter und bei den meisten erregenden oder exzitatorischen Synapsen sind Glutamat und bei inhibitorischen Synapsen γ -Aminobuttersäure (GABA) oder Glycin die Überträger der Information (Kempermann, 2008a).

Physiologische Bedeutung besitzt die synaptische Aktivierung der Hirnrinde durch cholinerge Fasern des basalen Vorderhirns für die Regulierung des zerebralen Blutflusses (Sato et al., 2004) und für den Schlaf-Wachrhythmus (Lee et al., 2005). Weiterhin ist dieser Stimulationsweg von großer Bedeutung für die kortikale Aktivität (Lucas-Meunier et al., 2003), die kognitiven Fähigkeiten des Menschen und für die kortikale Plastizität (McKinney, 2005).

Ausgehend von diesen vielfältigen und wichtigen Funktionen, die über das cholinerge Transmittersystem im Kortex gesteuert werden, sind weitere Forschungen auf diesem Gebiet und unter besonderer Berücksichtigung der neuronalen Plastizität von hoher physiologischer und pathophysiologischer Relevanz.

1.3 Adulte Neurogenese im Hippokampus

Neben dem Bulbus olfactorius zählt der GD des Hippokampus zu den *primären neurogenen Zonen* mit einer intensiven, einflussbezogenen Neurogenese und besitzt damit für die Forschung auf diesem Gebiet einen "Modellcharakter" (Kempermann, 2008; Truche et al., 2009).

Die adulte Neurogenese im Hippokampus wurde 1965 und 1977 bei Nagetieren mit radioaktiver Thymidinmarkierung (Altman und Das, 1965) und elektronenmikroskopischer Identifikation neugebildeter Neuronen (Kaplan und Hinds, 1977) entdeckt. Obwohl weitere Bestätigungen dieser Untersuchungsergebnisse bei Stimulation des Singverhaltens von Kanarienvögeln folgten (Nottebohm, 1981), konnten diese Befunde bei Primaten nicht bestätigt werden und wurden daher

als artspezifisch klassifiziert (Rakic, 1985). Es zeigte sich aber, dass dies methodisch bedingt war und nach Adaptation der BrdU für die zerebrale Neurogeneseforschung und Kombination mit konfokaler Mikroskopie (Soriano und Del Rio, 1991; Kuhn et al., 1996), konnte die hippocampale Neurogenese zuerst beim Menschen (Eriksson et al., 1998) und später auch bei anderen Primaten bewiesen werden (Gould et al., 1999; Kornack und Rakic, 1999).

Die Neurogenese im Hippokampus findet in der SGZ des GD statt, in der die Stamm- und Vorläuferzellen lokalisiert sind, und durch asymmetrische Teilung erfolgt eine Differenzierung in Neurone oder Gliazellen (Cameron et al., 2001). Die Mehrheit der neugebildeten Zellen wird apoptotisch eliminiert (Biebl et al., 2000), wobei dieser Zelltod aktivitätsabhängig ist und durch Aktivitätsstimulation reduziert bzw. ganz unterdrückt werden kann (Kempermann und Gage, 1999; Young et al., 1999).

Die adulte hippocampale Neurogenese, von der Zellteilung adulter hippocampaler Stammzellen bis zum synaptischen Verbund neugebildeter Neurone, wird in fünf Phasen untergliedert (Ming und Song, 2002; Kempermann et al., 2004):

◆ Phase I (Proliferationsphase)

In der Proliferationsphase I werden durch asymmetrische Teilung neben neuen Stammzellen Vorläuferzellen gebildet, die charakteristische Merkmale embryonaler Radialgliazellen aufweisen (Levitt und Rakic, 1980, Eckenhoff und Rakic, 1984, Hartfuss et al., 2001) und zelltypische Marker, wie GFAP (glial fibrillary acidic protein) und Nestin exprimieren und zu identifizieren sind (Fukuda et al. 2003, Filippov et al. 2003).

◆ Phase II (Differenzierungsphase)

In der Differenzierungsphase entstehen zunächst Nestin-positive und GFAP-negative, neurogenenähnliche Zellen (Kronenberg et al. 2003). Noch in dieser Phase II verlieren diese Zellen die Nestin-Expression und exprimieren das mikrotubulärgebundene Protein Doublecortin (DCX) und das membrangebundene Neural Cell Adhesion Molecule PSA-NCAM (Fukuda et al., 2003).

◆ Phase III (Migrationsphase)

Ein Teil der neugebildeten Zellen migriert aus der SGZ in die Granularzone (GZ) des GD und differenziert sich hier zu neuronalen Granularzellen. Diese neugebildeten Neurone können in der GZ mit den neuronalen Markern β III-Tubulin (Tuj1) und NCAM identifiziert werden (Seki, 2002; Bruel-Jungerman et al., 2007; Zhao et al., 2008; Amrein et al., 2009; Lucassen et al., 2010).

◆ Phase IV (Aussprossungsphase)

Von diesen neugebildeten Neuronen sprossen Axone und Dendriten entlang des Moosfasertrakts zu den Cornu ammonis, speziell zur Cornu-Region CA-3 (Stanfield und Trice 1988; Hastings und Gould, 1999), wobei ein stimulierender Einfluss des astrozytär freigesetzten fibroblastischen Wachstumsfaktors 2 (FGF-2) nachgewiesen werden konnte (Zhao et al., 2003).

Neben der Expression von DCX und PSA-NCAM produzieren die noch unreifen Neurone das neuronenspezifische Zellkernprotein NeuN (Brandt et al., 2003).

◆ Phase V (Synaptische Phase)

In der synaptischen Phase bilden die neuen Granularzellen dentritische Synapsen für den Input aus dem entorhinalen Kortex und axonale Synapsen zur Signaltransmission an die CA-3 Region und den hilären Hippokampus und die jetzt voll ausgereiften Neurone exprimieren die Zellmarker NeuN und Tuj1 (Kuhn et al. 1996; Seki, 2002; Van Praag et al., 2002).

Quantitative Messungen der Neurogenese im GD haben ergeben, dass bei adoleszenten Ratten innerhalb von vier Wochen eine Zuwachsrate von 6% neugebildeter Neurone in der Granularzone stattfand (Cameron und McKay, 2001).

Mit Hilfe dieser Phaseneinteilung können Entstehung und Entwicklung neugebildeter Neurone im Hippokampus zellspezifisch untersucht werden und suppressive oder stimulierende Einflüsse überprüft werden (Kempermann, 2008; Benninghoff et al., 2010).

Erst nach Abschluss der vollständigen morphologischen Integration der neuralen Neogenese in die hippokampale Funktion über „Stammzelle (SGZ) bis Synapsen-bildung“, die im Ablauf mit der embryonalen Entwicklung identisch ist (Ambrogini et al., 2004; Esposito et al., 2005), erfolgt keine apoptotische Eliminierung der neugebildeten Körnerzellen mehr (Kempermann et al., 1997; Gould et al., 1999; Bruel-Jungerman et al., 2006, 2007).

Embryonal entstandene adulte hippokampale Neurone und durch adulte Neurogenese gebildete Neurone im GD weisen differente synaptische Transmittersysteme auf, wobei diese Thematik gegenwärtig noch kontrovers diskutiert wird (Lara et al., 2012).

Es gibt Konsens, dass adulte Granularzellen aus embryonaler Entwicklung in den ersten postnatalen Wochen die GABA-erge Transmission verlieren und bei Stimulation eine ausschließlich glutamerge synaptische Übertragung aufweisen (Lamas et al., 2001; Gómez-Lira et al., 2002; Gutiérrez et al., 2003; Safiulina et al., 2006; Ge et al., 2006). Während einerseits Untersuchungen gezeigt haben, dass diese embryonal entstandene synaptische Transmission

auch für durch adulte Neurogenese gebildete Körnerzellen zutrifft (Toni et al., 2008), zeigten andere tierexperimentell erhobene Ergebnisse eine synaptische Expression von GABA-Transmittern (Gritti et al., 1998; Ramírez und Gutiérrez, 2001; Gutiérrez et al., 2003; Ge et al., 2008).

Neben Forschungsergebnissen, dass eine adulte hippocampale Neurogenese stattfindet und wie diese physiologisch, in Abhängigkeit vom Alter, Geschlecht, Aktivitäts- und Lernprozessen reguliert wird, enthält diese Thematik aus pathophysiologischer Sicht klinische Relevanz für Aktivitäts-, Verhaltens-, Gedächtnis- und Lernstörungen, insbesondere bei schwerwiegenden Störungen wie M. Alzheimer (Jin et al., 2004; Abrous und Wojtowicz, 2008), Epilepsie (Parent, 2006), Schädel-Hirn-Trauma (Parent, 2003) und ischämisch bedingten Neuronenverlust (Liu et al., 1998, Parent et al., 2002; Wiltout et al., 2007).

Klinisch relevant für therapeutische Ansätze sind Untersuchungsergebnisse, die eine funktionelle Integration der hippocampalen Neurogenese durch Verbesserung des Lernverhaltens mit Ausbildung einer LTP bei Trainingsversuchen an Mäusen nachgewiesen haben (Van Praag und Christie, 1999; Van Praag et al., 2002).

Im Gegensatz zu diesem positiven Effekt konnte durch Auslösen epileptischer Konvulsionen eine starke Proliferation von neuronalen Stamm- und Precursorzellen in der SGZ des GD mit nachfolgender Zunahme von Körnerzellen in der granulären Zone induziert werden (Parent und Lowenstein, 2002).

Daher lässt sich beim gegenwärtigen Kenntnisstand nicht automatisch die Konsequenz ableiten, dass eine Suppression der Neurogenese eine gesicherte Therapieoption für die Epilepsie bedeutet, und eine Fragestellung bezieht sich darauf, ob aus der Induktion einer neurogenen Permission ein klinischer Nutzen resultiert (Kempermann, 2008).

Diese Aussage betrifft auch die klinische Relevanz und mögliche Therapieoptionen von Störungen der acetylcholinergen, GABA-ergen und glutamatergen Transmission bei Depression (Beblo et al., 2006) und die Bedeutung der Relation hoher adrenaler Kortikoidspiegel bzw. starker Stress auf die Minderung der hippocampalen Neurogenese mit kognitiven Störungen (Cameron und Gould, 1994; Gould et al., 1997). Konträr dazu hat sich gezeigt, dass milder Stress die Lernfähigkeit erhöht (Mineur et al., 2007).

Mehrere Untersuchungen an Mäusen und Ratten haben gezeigt, dass die adulte Neurogenese im Hippokampus eine eminente Bedeutung für die Ausbildung des Langzeitgedächtnisses und der Fähigkeit zur Erkennung und Wiedererkennung der Umwelt besitzt, und dass diese Fähig-

keiten durch artifizielle Hemmung der Neurogenese beeinträchtigt wird bzw. komplett verloren geht (Dupret et al., 2007; Imayoshi et al., 2008; Clelland et al., 2009; Garthe et al., 2009; Jessberger et al., 2009).

1.4 Zerebrales cholinerges System

Das cholinerge Transmittersystem war auf Grund des tierexperimentell einfachen Zugangs zum peripheren Nerv-Muskel-Modell das am frühesten erforschte System der synaptischen Informationsweiterleitung mit Acetylcholin (ACh) als Botenstoff (Loewi, 1921). Loewi postulierte einen chemischen Botenstoff für die Anregung der Herzkontraktion, nachdem er entdeckt hatte, dass ein in Kochsalzlösung befindliches, nichtstimuliertes Froschherz in Gegenwart anderer Herzen, die vorher durch vagale Stimulation angeregt worden waren, dieselbe Erregungssteigerung zeigte. Dieser Botenstoff erwies sich als das von Dale aus Pilzen isolierte ACh (Dale, 1914) und spielte ab Mitte des 19. Jhd. neben der Entdeckung weiterer Transmitter eine zentrale Rolle (Carlsson und Lindqvist, 1963; Kandel und Spencer, 1968; Grengaard und McAfee, 1972).

Cholinerge Systeme des Gehirns befinden sich überwiegend im basalen Vorderhirn (Großhirn, Diencephalon) und im Hirnstamm (Trepel, 2011):

- Vorderhirn: Die Lokalisationen im Vorderhirn betreffen besonders die Area septi medialis (Nukleus diagonalis) und den Nukleus basalis, über die Funktionen wie Schlaf-Wachrhythmus, Bewegungsverhalten, Aggression, Lernen, Gedächtnis und Motivation gesteuert werden. Projektionen erfolgen von diesen Regionen in den Hippokampus, Bulbus olfaktorius, in die Amygdalae und in den Kortex (Cobb et al., 2005).
- Hirnstamm: Hier befinden sich cholinerge Zentren in der pontomesenzephalen Formatio reticularis, insbesondere im Nukleus pedunculo-pontinus, lateral des Nucleus ruber und dorsal des Lemniscus medialis. Das Projektionsgebiet für Informationsweiterleitung ist der Thalamus mit Aktivierung oder Deaktivierung von Thalamuskernen und dementsprechenden Auswirkungen auf den kortikopetalen Informationsfluss (Mesulam et al., 1996; Mufson et al., 2000; Schliebs et al., 2006).

Cholinerge Zellen lassen sich mit Hilfe eines Markers, dem Enzym Cholin-Acetyltransferase (ChAT) lokalisieren, das für die Synthese von ACh von Bedeutung ist (Aquilonius et al., 1981; Kish und Olivier, 1988; Wozniak et al., 1989).

ACh wird in cholinergen Neuronen in Gegenwart von Acetyl-Coenzym A aus Cholin mit dem Enzym ChAT katalysiert. Zunächst erfolgt in den Neuronen die Bildung von Cholin aus in der

Leber synthetisiertem Phosphatidyl-Serin, und der axonale Transport von Cholin zu den präsynaptischen Axonendigungen durch ein Na^+ -abhängiges Transportsystem (High affinity choline uptake, HACU) (Forth et al., 2001). Im terminalen Axon erfolgt durch Acetyl-Coenzym A die ACh-Bildung mittels Bindung einer Acetylgruppe an Cholin (Stryer et al., 1994).

ACh wird präsynaptisch in Vesikeln gespeichert, die bei Aktivierung von Aktionspotentialen in intensitätsabhängiger Anzahl in den synaptischen Spalt zwischen prä- und postsynaptischer Membran transportiert werden. Dieses Transportsystem wird durch Depolarisation induziert und ist Ca^{2+} -Ionen abhängig (Reynolds et al., 1986; Feuerstein et al., 1990).

ACh dockt nach Freigabe aus den Vesikeln an nikotinerge und muskarinerge Rezeptoren der postsynaptischen Membran des zugehörigen Neurons an und projiziert Verhaltensänderungen, Erkenntnisänderungen und Lernfähigkeiten.

Nikotinrezeptoren für Acetylcholin (nAChR) sind ionotrope Rezeptoren mit einer pentameren Struktur, die entsprechend dem differenten Aufbau in fünf Gruppen (α , β , γ , σ , ε) eingeteilt wurden (Oddo et al., 2006).

Muskarinrezeptoren (mAChR) sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Guanintriphosphat bindende Proteine, GTP bindende Proteine, GTPasen) und bisher wurden fünf Subtypen klassifiziert (Koch et al., 2005).

Nach ACh-induzierter Anregung des Zielneurons erfolgt die ACh-Katabolie durch Acetylcholinesterase (AChE) zu Cholin und Ethansäure und nachfolgender präsynaptischer ACh-Restitution.

Störungen im neonatalen, adoleszenten und adulten cholinergen System haben nicht nur garvierende Auswirkungen auf die synaptische Plastizität mit negativem Stressverhalten, Depression und Gedächtnisstörungen, wie M. Alzheimer (McKinney, 2005;), sondern auch auf die neuronale Entwicklung und neurogene Plastizität (Bruehl-Jungman et al., 2007).

Untersuchungen zur neonatalen Kortexentwicklung bei Ratten haben gezeigt, dass es eine zeitlich differenzierte cholinerge Wachstumsstimulation, ausgehend von den cholinergen Zentren gibt (Aubert et al., 1996). Während nAChR und HACU bereits zum Ende der embryonalen Phase ausgeprägt waren, konnten mAChR-Rezeptoren erst ab der fünften postnatalen Woche nachgewiesen werden.

Eine gestörte cholinerge Innervierung während des kortikalen Wachstums bewirkt eine Verminderung der Schichtdicke des Kortex und führt zu dendritischen Aberrationen (Cameron und McKay, 2001).

Auch konnte nachgewiesen werden, dass eine induzierte Läsion des Nukleus diagonalis zu einer verminderten Proliferation von adulten neuronalen Stammzellen (ANSC) führt (Cooper-Kuhn et al., 2004; Mohapel et al., 2005).

Therapeutische Relevanz besitzen Ergebnisse von Untersuchungen, bei denen die Applikation von Inhibitoren für das Enzym ACh-Esterase (AChE-I) die ANSC-Proliferation verstärkte (Mohapel et al., 2005; Narimatsu et al., 2009).

Diesen Ergebnissen vorausgegangen waren Studien am somatosensorischen Whisker-Barrel-Kortex von Ratten (Bear et al., 1986; Dykes et al., 1990). Stimulationstrains des N. infraorbitalis, der die Whiskerstimulation zum Barrel-Kortex weiterleitet, führten nicht nur zu einer synaptischen Plastizität, sondern auch zu einer Neurogenese und damit zu der Vermutung, dass ein synergistischer Effekt zwischen synaptischer und neuronaler Plastizität existiert.

1.5 Cholinerge Steuerung der adulten hippocampalen Neurogenese

Das cholinerge System besitzt für die Modulation der adulten hippocampalen Neurogenese eine große Bedeutung und wurde in den letzten Jahren zunehmend bei zerebralen Erkrankungen und hinsichtlich einer möglichen klinischen Relevanz von stimulierender und suppressiver Beeinflussung untersucht (Gritti et al., 2002; Ming und Song, 2005; Cobb et al., 2005; Deng et al., 2010; Benninghoff et al., 2010; Bruel-Jungerman et al., 2011; Itou et al., 2011; Veena et al., 2011; Benninghoff et al., 2013; Islam et al., 2014).

Im Ergebnis dieser Untersuchungen konnte eine Reduktion an cholinergen Mediatoren im Hippokampus, wie der ACh-Transferase, die für die Synthese von ACh essentiell ist, bei M. Alzheimer nachgewiesen werden (Minger et al., 2000). In diesen biochemischen Untersuchungen konnte ein Abfall der ACh-Transferaseaktivität an Autopsiepräparaten der Frontal- und Temporallappen von Patienten mit M. Alzheimer aufgezeigt werden.

Desweiteren wurde bei M. Alzheimer eine Abnahme cholinergischer Neuronen in der Region CA-1 des GD festgestellt und die Applikation von ACh-Agonisten wie Rivastigmin und Talsaclidin stimulieren die Neurogenese in CA-1 (Schaeffer et al., 2009; van Kampen et al., 2010).

Die Implantation von ACh-ergen Neuronen in den Hippokampus von adulten Ratten führte eine Woche nach dem Eingriff gegenüber dem Verhalten vor Implantation und von nichtbehandelten

Kontrolltieren zu einer besseren Orientierung und Wiedererkennung in einem Testlabyrinth (Dickinson et al., 2003). Zu denselben Ergebnissen führte die Injektion des muskarinergen Cholinergikums Skopolamin in den Hippokampus (Gale et al., 2001).

Die Modulationen der adulten hippocampalen Neurogenese erfolgen über verschiedene stimulierende Faktoren. Dazu zählen die Wachstumsfaktoren EGF (Kuhn et al., 1997), FGF-2 (Gritti et al., 1995, 1996, 1999) und TGF- α (Weickert und Blum, 1995; Tropepe et al., 1997).

Da neuronale Stammzellen auf Grund ihrer Multipotenz zur Produktion aller Hirnzellen fähig sind, gelingt die Beeinflussung der adulten Neurogenese auch durch weitere stimulierende Faktoren, wie den ziliären neurotrophischen Faktor, den Thrombozyten-Wachstumsfaktor, das knochenmorphogenetische Protein-2 (Gross et al., 1996), den Brain-derived neurotrophic-Wachstumsfaktor (BDNF) (Benoit et al., 2001) und das Protein wingless-Interleukin-1 (WNT), die das Differenzierungsverhalten von Precursorzellen beeinflussen (Lie et al., 2005, Jagasia et al., 2006).

Neben diesen Einflussfaktoren gibt es weitere Untersuchungsergebnisse zur ACh-Regulierung der hippocampalen Neurogenese.

Es konnte gezeigt werden, dass durch eine selektive Läsion des cholinergen medialen Septumsystems bei adulten Ratten mit dem Immuntoxin 192 IgG-Saporin die Proliferation von adulten neuronalen Stammzellen (ANSC) im Hippokampus gehemmt wird (Book et al., 1992; Cooper-Kuhn et al., 2004; Mohapel et al., 2005). Dagegen fördert die Applikation von Inhibitoren der Acetylcholinesterase (AChE-I) die Proliferation von ANSC (Mohapel et al., 2005; Narimatsu et al., 2009).

Für die Funktion hippocampaler ANSC spielt das cholinerge System durch Förderung des Ca^{2+} -Einstroms in die neugebildeten Neuronen eine wichtige Rolle, wie nach muskariner cholinergischer Stimulation an frischen hippocampalen Schnitten gezeigt werden konnte. Dass der Ca^{2+} -Einstrom die dendritische und axonale Aussprossung der ANSC stimuliert, haben auch Untersuchungen an retinalen neugebildeten Neuronen demonstriert (Lohmann et al., 2002).

Die Förderung der ANSC-Bildung nach Applikation von AChE-Inhibitoren (Physiostigmin und Donepezil) ist nicht altersabhängig, wie Versuche an acht bis zwölf Wochen alten und zwei Jahre alten Mäusen bewiesen haben (Itou et al., 2011).

Hippokampale Stammzellen besitzen einen Rezeptorsubtyp (5-HT_{1A}) mit dem aminen Neurotransmitter Serotonin und weitere muskarinerge M1- und M2-Rezeptoren (mAChR) mit induk-

tiver proliferativer Stimulationswirkung auf die Zellteilung (Mohapel, 2005; Guizzetti et al., 2008; Itou et al., 2011).

Zhou et al. konnten in vitro an kultivierten hippocampalen Stammzellen nachweisen, dass Proliferation und Differenzierung durch Stimulation von mAChR angeregt wurden, und dass durch Zugabe von Atropin, einem mAChR-Antagonisten, die Zellteilung und Differenzierung der neuronalen Stammzellen gehemmt wurde (Zhou et al., 2004).

Untersuchungen an kultivierten hippocampalen Stammzellen von Mäusen haben gezeigt, dass es unter Zusatz von EGF und FGF-2 zur Expression von Tryptophan-Hydroxylase (TPH) und Serotonin mit Proliferation der Stammzellen kam. Nach Hemmung der Serotoninfreisetzung und Blockade der TPH-Funktion mit Parachlorophenylalanin (PCPA) und Inaktivierung des Rezeptors 5-HT_{1A} wurde die Proliferation von ANSC und die Fähigkeit zur Migration supprimiert (Benninghoff et al., 2010).

Chemotaxis ist ein wichtiges funktionales Merkmal von undifferenzierten neuronalen Stammzellen und die Stimulation dieser migratorischen Eigenschaften könnte eine therapeutische Option durch neuropharmakologische Intervention oder durch eine de novo Generierung neuer Neurone bei gestörter hippocampaler Neurogenese bedeuten (Prestoz et al., 2001, Seki, 2002; Corti et al., 2005; Ikegami et al., 2005; Shan et al., 2006).

Desweiteren konnte aber auch nachgewiesen werden, dass körperliche Aktivität und Lerntraining die Proliferations- und Überlebensrate hippocampaler Neurone steigern (van Praag und Christie, 1999; Gould et al., 1999; Gold, 2003; Power et al., 2003; Hasselmo et al., 2006; Bruehl-Jungerman et al., 2011) und zu einer vermehrten Expression von ACh im Hippokampus führen (Ragozzino et al., 1996). Daraus können medikamentöse und funktionelle therapeutische Ansätze für depressive Erkrankungen und negative Stressverarbeitung resultieren (Kempermann, 2008b).

Therapeutische Relevanz besitzt heute bereits der ACh-ergotrope AChE-Inhibitor Donepezil, welcher in Frühstadien des M. Alzheimer angewendet wird, da Studien einen positiven Effekt auf die Überlebensrate neugebildeter hippocampaler Neurone bewiesen haben (Kaneko et al., 2006; Kotani et al., 2006).

Für in vitro Untersuchungen zur hippocampalen ACh-modulierten adulten Neurogenese wurden vorrangig als ACh-Agonist das parasympathikomimetische Analogon Carbachol (CCh) und als ACh-Antagonist Pirenzepin (PIR) eingesetzt (Kempermann, 2008a; Benninghoff et al., 2010, 2011; Itou, 2011).

Gegenüber ACh (Abb.1) besitzt Carbachol statt der Acetylgruppe eine Carbamoylgruppe (Abb.2). Da sich mit dieser Struktur eine erhöhte Resistenz gegenüber AChE ergibt, besitzt das Analogon Carbachol gegenüber ACh eine längere Halbwertszeit.

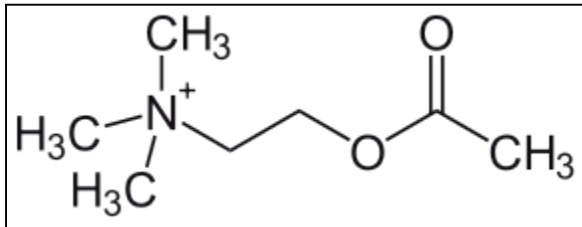


Abb. 1: Strukturformel Acetylcholin

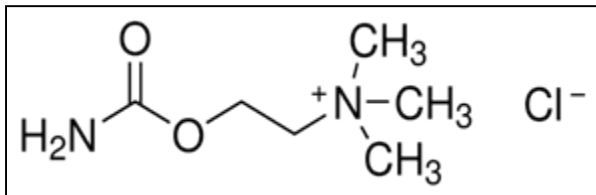


Abb. 2: Strukturformel Carbachol

Pirenzepin (PIR) ist eine parasymphatholytische Substanz, die auf Grund seiner kompetitiven Hemmung von ACh an muskarinergen M1- und M2-ACh-Rezeptoren hemmend auf die adulte Neurogenese wirkt.

In vitro Untersuchungen kultivierter hippocampaler Stammzellen von Mäusen haben gezeigt, dass eine cholinerge Stimulation mit Carbachol die Anzahl der aus den ANSC de novo generierten Neuronen deutlich erhöhte, was durch die Immunocytochemie mit dem monoklonalen Antikörper TUJ1 demonstriert werden konnte (Benninghoff et al., 2010).

Mit diesen Resultaten wurden Untersuchungen bestätigt, dass Neurosphären von ANSC als valide in vitro Modelle zur Überprüfung möglicher Einflüsse von Neurotransmittern und Medikamenten auf die Neurogenese geeignet sind (Ma et al., 2000; Li et al., 2001; Zhou et al., 2004; Mohapel et al., 2005).

Gleichzeitig bieten die Ergebnisse eine empirische Unterstützung für eine mögliche potenzielle Relevanz bei der Entwicklung therapeutischer Ansätze zur Behandlung neurodegenerativer Störungen (Kempermann und Kronenberg, 2003; Dranovsky und Hen, 2006; Warner-Schmidt und Duman, 2006).

Auf Grund der in der Literatur bisher vorliegenden Ergebnisse wurden Carbachol und Pirenzepin in der vorliegenden Arbeit zur Überprüfung stimulierender und depressiver Wirkungen auf die Proliferation kultivierter hippocampaler Stammzellen eingesetzt.

1.6 Stammzellforschung zur adulten Neurogenese

Mesenchymale fibroblastische Stammzellen von Meerschweinchen wurden erstmals 1970 identifiziert und kultiviert (Friedenstein et al., 1970) und sechs Jahre später gelang die erste Kultivierung hämopoetischer Stammzellen (Dexter und Testa, 1976).

Stammzellen besitzen die besondere Fähigkeit zur Selbstteilung in identische Zellkopien mit der Entstehung von zwei gleichen Stammzellen (symmetrische Teilung). Desweiteren können sie sich differenzieren und es entstehen bei der Stammzellteilung eine neue Stammzelle und eine gewebespezifische Zelle (asymetrische Teilung) und damit die Fähigkeit zur Bildung verschiedener Gewebearten (Amaral et al., 1985; Wommer, 2003; Ambrogini et al., 2004). Vorläuferzellen, die nach asymetrischer Teilung entstehen, können ihre Fähigkeit zur Teilung und Bildung gewebespezifischer Zellen permanent oder zeitlich begrenzt beibehalten (Amrein et al., 2009).

In Abhängigkeit der genetisch festgelegten Gewebespezifität von Stammzellen wird zwischen *Totipotenz* (Eizelle), *Pluripotenz* (embryonale Stammzellen, Stammzellen der Hämatopoese) und *Multipotenz* (gewebespezifische Stammzellen) differenziert (Kempermann, 2008).

Während die neuronale Plastizität mit neugebildeten Neuronen als Ergebnis der Teilung von neuronalen Stammzellen bereits 1965 und 1977 nachgewiesen werden konnte (Altman und Das, 1965; Kaplan und Hinds, 1977), wurden adulte neurale Vorderhirn-Stammzellen erstmals 1992 in der SVZ der Seitenventrikel des Gehirns von Mäusen identifiziert und kultiviert. Nach Applikation von EGF gelang der Nachweis einer Proliferation von Neuronen und Astrozyten, die eine Expression von Nestin (neurofilamentärer Marker für neurale Precursorzellen), GABA und Substanz-P aufwiesen (Reynolds et al., 1992).

Die neurale Stammzelle ist als eine multipotente Gehirnzelle definiert, die durch asymmetrische Zellteilung zur Selbsterneuerung und Bildung neuraler Zellen fähig ist (Temple, 2001).

Diese Multipotenz impliziert die Fähigkeit zur Differenzierung in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten und die in vitro Identifikation dieser neugebildeten Zellen gelingt immunohistochemisch mit monoklonalen Antikörpern gegen Markerproteine, wie:

- NeuN (neuron-specific nuclear protein) oder das neuronenspezifische Protein β -Tubulin (Tuj1) für Neurone (Mullen et al., 1992; Lee et al., 1990),
- GFAP (glial fibrillary acidic protein) oder S100 β (Kalzium-bindendes Protein) für Astrozyten (Roessmann et al., 1980; Boyes et al., 1986),

- RIP (receptor interacting protein) oder Glykosphingolipide für Oligodendrozyten (Sommer und Schachner, 1981; Palmer et al., 1995).

Gegenüber der Identifizierung von neuronalen Stammzellen und Vorläuferzellen in vitro mit spezifischen Markern (GABA, Nestin), gelingt bis heute eine Differenzierung in vivo nur indirekt mit dem Thymidinanalogon BrdU, das mit Thymidin in der S-Phase des Zellzyklus im Einbau in die DNS konkurriert (Takahshi et al., 1992).

Mit einem monoklonalen Antikörper gegen BrdU lässt der immuno-fluoreszenzmikroskopische Nachweis bei gleichzeitiger Markierung von Neuronen mit dem Marker NeuN und Astrozyten mit dem Marker GFAP, für in vivo Untersuchungen die Schlussfolgerung zu, dass die markierten Zellen von neurogenen Stammzellen bzw. Precursoren gebildet wurden (Kempermann, 2008).

Tierexperimentell konnte nachgewiesen werden, dass der alleinige Bezug der Multipotenz neuronaler Stamm- und Vorläuferzellen auf neuronale Zellen unvollständig ist. In einer Studie an adulten Mäusen wurde der Beweis erbracht, dass sich neurale Stammzellen bei der Teilung selbst regenerieren, aber als Zweitzellen auch funktionale Blutzellen bilden können (Bjornson et al., 1999).

Desweiteren haben Untersuchungen gezeigt, dass die Injektion mesenchymaler Stammzellen in die Seitenventrikel neonataler Mäuse die Neubildung von Astrozyten und nestinhaltigen Zellen induziert (Kopen et al., 1999). Diese Multipotenz konnte auch für adulte kultivierte mesenchymale Stammzellen (Knochenmark) vom Menschen und von Ratten für die Neogenese von Neuronen bestätigt werden (Woodbury et al., 2000).

Hinsichtlich des Ursprungs neuraler Stammzellen wurde in den letzten Jahren die vorher bestehende Annahme, dass Gliazellen wie Astrozyten, Oligodendrozyten, Ependymzellen und Plexusepithelzellen definitive Finalprodukte der neuralen Differenzierung sind, widerlegt. In zahlreichen Untersuchungen konnte der Beweis erbracht werden, dass hochdifferenzierte Zellen in der SGZ des GD, wie radiale Astrozyten und Oligodendrozyten zur Neurogenese fähig sind (Kondo et al., 2000; Seri et al., 2001; Fukuda et al., 2003; Garcia et al., 2004; Steiner et al., 2004).

Da gegenwärtig keine direkten Methoden für eine in vivo Forschung existieren, werden neurale Stammzellen in vitro in Stammzellkulturen (Neurosphären) für Untersuchungen zur Proliferation und Beeinflussbarkeit durch Stimulation bzw. Suppression untersucht. Überwiegend konzentrierte sich die neurobiologische Stammzellforschung in den letzten Jahren auf die Zellkultur zur Gewinnung und Konservierung von NSC, und die Zielstellungen für derartige Versuche bestan-

den in der Überprüfung der Möglichkeit, embryonale oder adulte Stammzellen für neue Therapieformen, primär für die Transplantation von neuronalen Stammzellen in das erkrankte Gehirn zu nutzen.

Embryonale oder adulte neuronale Stammzellen lassen sich aus verschiedenen Regionen des Gehirns isolieren und zeitlich nahezu unbegrenzt in Kultur propagieren (Gage, 2000).

Erste Untersuchungen zur Kultivierung von adulten neuronalen Vorderhirn-Stammzellen aus der SVZ des Seitenventrikels des Gehirns von Mäusen erfolgten 1992 (Reynolds et al., 1992). In diesen Kulturen gelang nach Applikation von EGF der Nachweis einer Proliferation von Neuronen und Astrozyten, die eine Expression von Nestin (neurofilamentärer Marker für neurale Präkursorzellen), GABA und Substanz P aufwiesen.

Die Intention für neuronale Stammzellforschung ergibt sich heute zunehmend durch eine mögliche klinische Relevanz der in vivo Induktion von synaptischer und neuronalen Plastizität (Kempermann, 2012).

In mehreren tierexperimentellen Studien konnte nachgewiesen werden, dass es nach artifiziell ausgelöstem Zelltod von corticalen und spinalen Neuronen und intakten umgebenden Strukturen zur Neogenese von Neuronen kommt (Magavi et al., 2000; Parent et al., 2002; Cao et al., 2002; Chen et al., 2004; Emsley et al., 2005).

1.7 Zielsetzung und Hypothese

Die Stimulierung der Neurogenese durch Beeinflussung der Proliferations-, Migrations- und Differenzierungsrate von Stammzellen als Grundlage zukünftiger neurologischer Therapie ist mit großen Erwartungen verknüpft. Den Verlust von Neuronen durch Aktivierung von Neurogenese mittels stimulierender Substanzen korrigieren zu können, käme einem kausalen Therapieansatz sehr nahe.

Anknüpfend an diese Konzeption bestand das Ziel der vorliegenden Arbeit darin, adulte neuronale Stammzellen aus dem Seitenventrikel des Hippokampus von Mäusen während einer Zellkultur auf ihre neuroplastischen Eigenschaften wie Proliferation, Migration und Differenzierung unter den Einflüssen einer M1-Rezeptor-Stimulation und M1-Rezeptor-Depression zu überprüfen. Damit wurde erstmals an hippokampalen ANSC unter in vitro Bedingungen einer Zellkultur, die in vivo nachgewiesene adulte hippokampale Neurogenese auf ihre parasympathische und sympathische Beeinflussung untersucht.

Für die cholinerge M1-Rezeptor-Stimulation wurde das parasympathisch wirkende ACh-Analogon CCh und für die Blockierung des ACh-Rezeptors M1, der parasympathikolytisch wirkende ACh-Antagonist PIR verwendet, da die agonistische und antagonistische Wirksamkeit dieser Substanzen bei in vitro Untersuchungen zur adulten Neurogenese in mehreren Untersuchungen nachgewiesen wurde (Kempermann, 2008a; Benninghoff et al., 2010, 2011; Itou, 2011).

Folgende Hypothesen wurden für die in vitro Untersuchungen formuliert:

Hypothese 1

Während der Kultivierung von ANSC kommt es bei Zusatz des cholinerg wirkenden ACh-Analogons CCh zu einer Steigerung der Proliferationsrate von ANSC und der Zusatz des parasympathikolytisch wirkenden PIR hemmt die Proliferationsrate im Vergleich zu einem Kulturmedium ohne Chemoattraktants.

Hypothese 2

Der Zusatz der Chemoattraktants CCh und PIR beeinflusst die Rate migrierender ANSC in einem Kulturmedium ohne Wachstumsfaktoren (DMEM) mit Anstieg der Migrationsrate durch CCh und Verminderung durch PIR.

Hypothese 3

Die Differenzierungsrate von ANSC zu Neuronen während einer sieben tägigen Kultivierung bei sukzessivem Entzug der Wachstumsfaktoren EGF und FGF im Kulturmedium Completo ist bei Zugabe von CCh gegenüber einer Kontrollgruppe ohne Chemoattraktants erhöht und bei Zugabe von PIR kommt es zu einer Hemmung der Differenzierung.

2 Material und Methoden

Die Gesetzeslage in Deutschland gestattet seit dem 28. Juni 2002 die Forschung mit und an adulten Stammzellen und ist als Methode unter den üblichen Bedingungen der Forschung ethisch unproblematisch (Bundesministerium für Bildung und Forschung, 2002).

Für die in vitro Versuche in dieser Arbeit wurden neuronale Stammzellen von sechs Wochen alten weiblichen C57BL/6 Wild-typ Mäusen (*Charles River*) verwendet.

Die Züchtung der ANSC, gewonnen aus der SVZ des Seitenventrikels, begann am 14. Februar 2003 am Institut für Experimentelle Neurologie der Vita-Salute San Raffaele Universität in Mailand und der Langzeitproliferationsassay für Zellzüchtung und -charakterisierung wurde detailliert publiziert (Gritti et al., 1996).

Für die Lagerung der kultivierten ANSC erfolgte eine Kryokonservierung über flüssigem Stickstoff bei -196°C und die Kühlung während des Transports erfolgte mit Trockeneis.

Die importierten ANSC stammten von fünf Zelllinien (Passage 4) ab und diese wurden im Folgenden in dieser Arbeit mit den Abkürzungen Mi2 bis 6 deklariert.

Die ANSC befanden sich vor Versuchsbeginn in Stickstofftanks (Taylor-Wharton, Mildstedt, D), und die Kryoröhrchen enthielten eine Zellsuspension mit Vollmedium DMEM/F12 (COMP), das einen Anteil von 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) enthielt. DMSO verhindert die Bildung zellschädigender Eiskristalle, neutralisiert Radikale und wirkt damit protektiv einer Schädigung der Zellmembranen entgegen.

Für die geplanten Versuche in dieser Arbeit wurden die kryokonservierten ANSC auf Raumtemperatur erwärmt, die protektive Substanz DMSO aus der Zellsuspension durch Zentrifugation entfernt und die Zellen wurden im Kulturmedium COMP (Tab.7; S.37) kultiviert.

Die Untersuchungen an ANSC wurden in drei Versuchsmodellen vorgenommen:

- Etablierung der Zellkultur mit dem Vollmedium COMP zur Überprüfung der Proliferationsrate, Migrationsfähigkeit und Grad der Differenzierung
- Überprüfung des Einflusses des gegenüber ACh-Analogons CCh auf die Proliferation, Migration und Differenzierung der ANSC (Behandlungsgruppe I).
- Überprüfung von Proliferation, Migration und Differenzierung der ANSC nach Inaktivierung des Muskarin-M1-Rezeptors durch PIR (Behandlungsgruppe II).

Die im Folgenden aufgeführten Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten in einem Labor der Sicherheitsstufe I an einer Sicherheitswerkbank Hera Safe, HSP 12 (Haereus GmbH, Mannheim, D) mit sterilisierten Geräten und Materialien bzw. sterilfiltrierenden Filtereinheiten (Nunc International Corp, Rochester, USA) der Porengröße 0,5µm. Die Kultivierung wurde in einem CO₂-Inkubator CB210 (Binder GmbH, Tuttlingen D) in einem offenen System mit 5% CO₂ bei 37°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% vorgenommen.

Täglich wurden die Zellkulturen phasenkontrastmikroskopisch mit einem Invert-Mikroskop (Axiocvert 120, Zeiss AG, Oberkochen D) untersucht, und die Dokumentation erfolgte mit einer PC-gesteuerten Videokamera (ProgResC10plus, Zeiss AG, Oberkochen, D) mit gekoppelter Bildverarbeitungssoftware (ProgRes CapturePro 2.5, Zeiss AG, Oberkochen, D).

2.1 Auftauen und Kultivierung der ANSC

Die Kryoröhrchen mit tiefgefrorenen ANSC (Brand GmbH & CoKG, Wertheim, D) wurden in Vorbereitung auf die Zellkultur aus dem Stickstofftank, in dem sie gelagert waren, entnommen.

Anschließend erfolgte das Auftauen der Probenröhrchen bei Raumtemperatur, so dass es nicht zu Zellschädigungen kommt.

Nach Zentrifugation bei 500rpm und 24°C für 10min (Rotixa 120R, Hettich GmbH, Tuttlingen, D) und Abpipettieren des flüssigen Überstandes erfolgte das Ablösen des Zellpellets durch Schütteln mit einem Vortexgerät für 3min (Vortex-Genie 2®, Bender und Hobein AG, Zürich, Schweiz) und danach die Überführung der Zellen in eine Kulturflasche, in die zuvor als Auswaschmedium 9ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) instilliert worden waren, um das bei Raumtemperatur zellschädigende DMSO zu verdünnen. Diese zelltoxische Wirkung setzt bei 0°C ein und erforderte ab dieser Temperaturschwelle ein besonders zügiges Arbeiten.

Vor dem Ansetzen der Zellkultur wurde das Kulturmedium COMP (Tab.7/8) durch eine Filtereinheit mit einer Porengröße von 0,2µm geleitet (Nunc International Corp. Rochester, USA), wodurch eventuell vorhandene Bakterien und Viren eliminiert werden konnten.

Die Zellsuspensionen kamen anschließend in ein 50ml Zentrifugenröhrchen und wurden bei 500rpm und 24°C für 10min abzentrifugiert (Rotixa 120R). Nach Abpipettieren des Überstandes erfolgten weitere drei identische Auswaschvorgänge.

Das Zellpellet wurde dafür in 200µl Completo viermal resuspendiert und zentrifugiert und danach waren die Vorbereitungen für die Kultivierung der ANSC abgeschlossen.

Für die Durchführung der Zellkultur wurde das ANSC-Pellet nach der letzten Waschung und Zentrifugation in einer Kulturflasche (T25; Sarstedt Inc., Newton, USA) in 10ml COMP resuspendiert und kultiviert.

Die Kontrolle des Wachstums erfolgte täglich mit einem Auflichtmikroskop (Zeiss AG, Oberkochen, D).

Im Abstand von vier Tagen erfolgte der Austausch des Kulturmediums, um die für die Proliferation, Neurosphärenbildung und Differenzierung erforderlichen Nährstoffe und Wachstumsfaktoren (EGF, FGF) ausreichend zur Verfügung zu stellen.

Nachdem die Zellen auf dem Boden der Kulturflasche einen Monolayer-Zellrasen bzw. Zellsphären mit einer Konfluenzrate von 70–90% gebildet hatten, wurden sie passagiert und erneut in Zellkulturflaschen kultiviert oder für die geplanten Versuche verwendet.

2.2 Passagieren und Bestimmung der Zellzahl

Die weiteren Passagen der Zellen erfolgten im Abstand von vier Tagen unter sterilen Bedingungen auf einer Laminar-Flow-Werkbank (Hera Safe, HSP 12, Haereus, Mannheim, D).

Die Zellen wurden vor jeder Passage unter einem Auflichtmikroskop (Zeiss AG, Oberkochen, D) auf ihre Proliferationsrate (Zellzahlmessung) und Morphologie überprüft. Dazu wurden die am Boden der Zellkulturflasche adhärenen Zellen mit dem Vortex-Gerät gelöst und die entstandene Zellsuspension mehrmals über den Kulturflaschenboden pipettiert, um möglichst alle Zellen abzulösen.

Nach Überführung der Suspension in Zentrifugenröhrchen erfolgte eine Zentrifugation mit Pelletbildung für 10min bei 800rpm und 24°C. Der Überstand wurde abpipettiert und das Zellpellet erneut in 1ml COMP suspendiert. Dabei musste besondere Sorgfalt darauf gerichtet werden, dass bei Bildung von Neurosphären die Auflösung der Zellverbände durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren bis auf das Niveau von Monolayer erreicht wurde, um einen vollständigen Kontakt mit Wachstumsfaktoren (EGF, FGF) und Prüfsubstanzen (CCh, PIR) zu garantieren.

Für die Zellzählung wurden 10µl der in COMP suspendierten Zellverbände für die Vitalitätsbestimmung mit 5µl 10%igem Trypanblau im Verhältnis 2:1 gemischt.

Avitale, aber auch morphologisch und funktionell geschädigte Zellen färbten sich unter dieser Färbetechnik blau an, da der Farbstoff nur für geschädigte Zellmembranen permeabel ist (Walford et al., 1964).

Die Bestimmung der vitalen, nicht nekrotischen Zellen erfolgte durch Auszählen der ungefärbten, und damit der vitalen Zellen unter 20-facher Vergrößerung in einer Neubauer- Zählkammer (Abb.3).

Die Anzahl der vitalen Zellen wurde durch Multiplikation der ausgezählten Zellen mit dem Kammer- und dem Verdünnungsfaktor ermittelt. Durch Multiplikation der Zellzahl mit dem Kammerfaktor 10⁴ und dem Verdünnungsfaktor 1:2 konnte die Zellzahl pro ml berechnet werden.

Da die exakte Bestimmung der Zellzahlen für die späteren Migrations- und Differenzierungsversuche von essentieller Bedeutung waren, wurde immer eine Zweitbestimmung mit der Zählkammer Coulter Counter Accuvette ST. 25 x 25ml (Beckman Coulter, Krefeld, D) durchgeführt.

Für diese Messung erfolgte die Pipettierung von 10ml eines Zählpuffers (Coulter Isoton II Diluent, Krefeld, D) in ein dafür vorgesehenen Behältnis der Zählkammer.

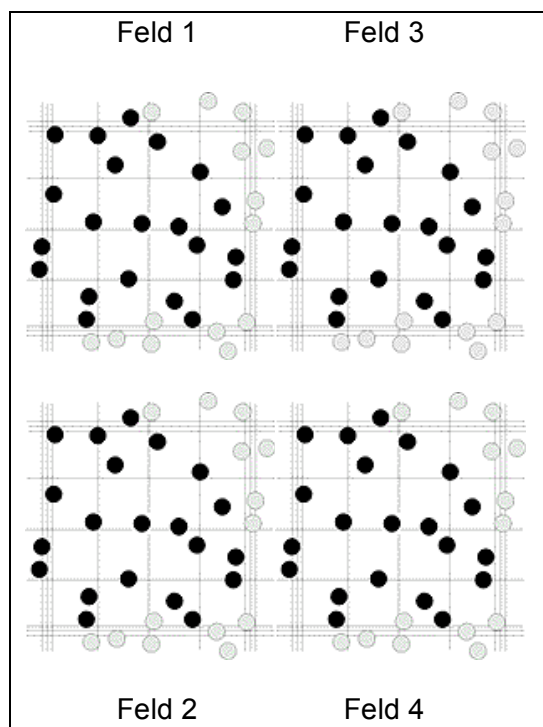


Abb. 3: 4-Felderzählung in einer Neubauer-Kammer (Beckman Coulter, Krefeld, D)

In diese Kammer wurden je 10µl der Zellsuspension beigelegt und danach im Zählpuffer suspendiert. Der Messbereich für den Zelldurchmesser betrug 8 – 19µm.

Mit den Ergebnissen dieser Messungen war eine Berechnung der für die weiteren Kultivierungen und Experimente zu verwendenden Menge an Zellsuspension möglich.

Nach Messung der Gesamtzellzahl der 1. Passage wurden für die Fortführung der Kultivierung jeweils 800.000 der gezählten vitalen Zellen (Neubauer Zählkammer und Coulter Counter Accuvette ST) aus der Zellsuspension in einen Plastikkolben für Zellkultur (T-25, Sarstedt, Newton, USA), gefüllt mit 10ml COMP-Vollmedium, überführt.

2.3 Langzeit-Proliferationsassay

Für die Bestimmung des Proliferationsverhaltens der ANSC unter Kulturbedingungen und dessen Beeinflussung durch CCh und PIR wurde der von Gritti et al. beschriebene Langzeit-Proliferationsassay eingesetzt (Gritti et al., 1996).

Zur Durchführung des Tests wurden die Kulturflaschen T-25 mit je 200.000 ANSC, suspendiert in 4ml COMP ohne und mit Zusatz von CCh oder PIR beschickt (Tab.1).

Tab. 1: Versuchsansätze für den Proliferationsassay

Versuchsgruppe	Kulturmedium
Kontrollgruppe	COMP
Behandlungsgruppe I	COMP + 100µM CCh
Behandlungsgruppe II	COMP + 50µM PIR

Für jede Versuchsgruppe wurden drei Zellkulturen im CO₂-Inkubator (CB 210) unter Wasserdampfsättigung (95% rel. Luftfeuchtigkeit) und 5% CO₂ bei 37°C angesetzt.

Vier Tage nach Beginn der Zellkultur erfolgte die erste Bestimmung der Zellzahl und nach Zentrifugation, Abpipettierung und Suspension in COMP erfolgte die Umsetzung der kultivierten Zellen der drei Versuchsgruppen in Kulturflaschen T-25 mit den entsprechenden Zusätzen für die Behandlungsgruppen I und II.

Diese Kulturerneuerung mit Zellzählung erfolgte bei allen Versuchsgruppen in einem viertägigen Abstand bis zum 24. Tag nach Versuchsbeginn, so dass insgesamt sechs Proliferationsassays in jeder Gruppe mit je fünf Kulturen vorgenommen wurden und für jede Gruppe Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt werden konnten.

Aus den Messergebnissen konnten die kalkulierten Wachstumsraten der Proliferation (N) für die Zeitpunkte 4 bis 24 Tage nach folgender Formel berechnet werden, ausgehend davon, dass die Zellkultur fortlaufend erfolgt wäre:

$$N = \frac{N_{dx} \cdot N_{dx-1}}{200.000}$$

N_{dx} : Zellzahlen (N) an den Tagen 4, 8, 12, 16, 20 und 24 nach Beginn der Kultur.

N_{dx-1} : Zellzahlen 4 Tage vor N_{dx}.

2.4 ANSC-Migrationsassay

Mit der Bestimmung der Migrationsrate während der Kultivierung von ANSC wurde der Einfluss von CCh und PIR als mögliche Steuerungsmechanismen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe auf die Chemotaxis der ANSC quantitativ überprüft.

Anhand der Anzahl der migrierten Zellen konnte eine Aussage über die Chemoattraktivität einer verwendeten Substanz erfolgen.

Der Versuchsablauf für die Bestimmung der Migrationsrate entsprach der von Palumbo et al. publizierten Methodik (Palumbo et al., 1998).

Vitale ANSC mit einem Zelldurchmesser von ca. 16µm können in einem Kulturmedium zielgerichtet und aktiv durch semipermeable Polycarbonatmembranen mit einem Porendurchmesser von 8µm migrieren (Wachs et al., 2003).

Stammzellen besitzen, wie auch Zellen des Immunsystems und des Bindegewebes die Fähigkeit zu einer aktiven Streckung des Zellkörpers, und damit zu einer Verkleinerung des Zelldurchmessers.

Diese Eigenschaft ist abhängig von einer ungestörten Zellfunktion und von intakten Zellwandrezeptoren, da die Migration rezeptorbezogen durch ein Chemoattractant ausgelöst wird (Levison et al., 1993).

2.4.1 Boyden-Kammer

In den Versuchen zur transmembranösen Migration kultivierter ANSC wurde eine Boyden-Kammer (Boyden, 1962) verwendet (Abb.4).

Die Boyden-Kammer (N.T.G. – Biotech, Mailand, Italien) besteht aus zwei übereinander liegenden, durch eine Polycarbonatmembran (GE Water&Process Technologies, Trevose, USA) separierten Kammern.

In der unteren, zylindrischen Kammer befindet sich am Boden eine zentrale, schüsselförmige Aussparung, die der Aufnahme des entsprechenden Chemo-attractants (CCh, PIR) bzw. der Kontrollsubstanz COMP dient.

Nach Befüllung der unteren Kammer wird eine Polycarbonatmembran oberhalb der Vertiefung horizontal so fixiert, dass sie Kontakt zum Füllmedium der unteren Kammer hat. Danach wird die obere Kammer mit der unteren Kammer verschraubt.

Der Durchmesser der oberen zylindrischen Kammer entspricht dem Durchmesser der Membran, so dass die Migration durch die komplette Polycarbonatmembran erfolgen kann.

Vor jedem neuen Versuchsansatz erfolgten Reinigung und Desinfektion der Boyden-Kammern mit 70%igem 2-Propanol. Nach Entfernung des Alkohols mit steriler 0,9%-iger Kochsalzlösung (Serumwerk Bernburg AG, D) wurden die Kammern sorgfältig mit einer sterilen Kompresse (Fa. Hartmann, Heidenheim, D) getrocknet.

Voraussetzung für den Migrationsassay ist die Adhäsion der ANSC an die Polycarbonatmembran. Dafür erfolgte vor Versuchsbeginn eine Beschichtung der Membranen mit Matrigel, das als Matrix für die Entstehung einer dreidimensionalen Zellkultur dient (BD-Biosciences, San José, USA).

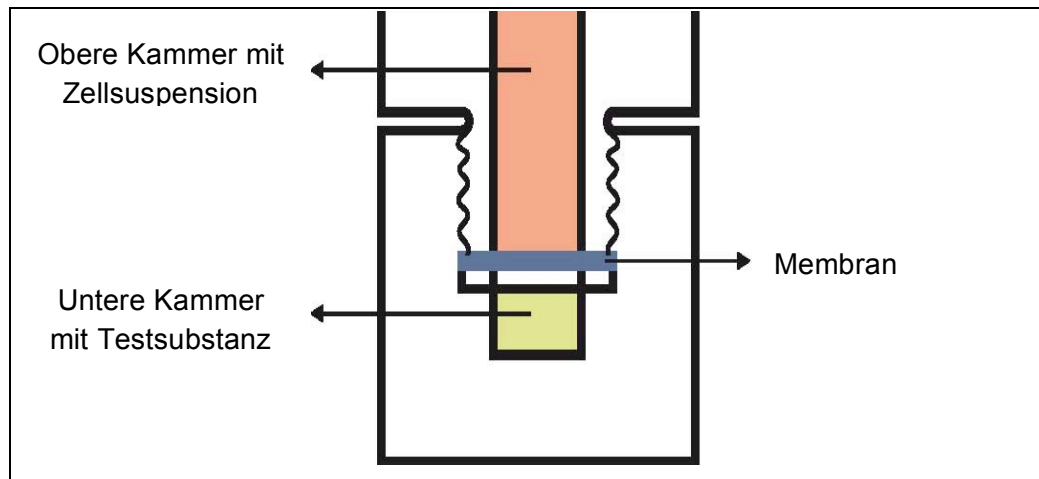


Abb. 4: Schematische Darstellung einer Boyden-Kammer mit matrigelbeschichteter Membran (mod. nach Woo et al., 2001)

Um die Membranen mit Matrigel zu benetzen, wurden diese in einem Glasgefäß, in dem sich 12ml einer Mischung von Matrigel und DMEM im Verhältnis 1:1000 befanden, mehrfach gewendet, so dass die Membran komplett mit Matrigel-Lösung umschlossen war. Eine komplette Benetzung ist erforderlich, da die unzureichende Matrigel-Beschichtung zu falschen Untersuchungsergebnissen führt.

2.4.2 Versuchsablauf – Migrationsassay

Für den Migrationsassay in der Boyden-Chamber wurden hinsichtlich der verwendeten Chemoattraktants vier Versuchsansätze mit je 15 Versuchen gewählt, wobei pro Versuchsansatz je drei parallel eingesetzten ANSC aus fünf Passagen (Passage 6; 8; 10; 12; 14) stammten:

- 3 x 5 Kontrollversuche mit DMEM (Kontrollgruppe I),
- 3 x 5 Kontrollversuche mit COMP (Kontrollgruppe II),
- 3 x 5 Versuche mit je 100µM Chemoattraktant CCh, gelöst in DMEM (Behandlungsgruppe I),
- 3 x 5 Versuche mit je 50µM Chemoattraktant PIR, gelöst in DMEM (Behandlungsgruppe II).

Insgesamt waren dafür 2640µl Zellsuspension mit 600.000 kultivierten ANSC aus den regulären Zellpassagen erforderlich.

Die nach Zentrifugation und Abpipettierung des Kulturmediums COMP verwendeten Zellpellets wurden im Gegensatz zu üblichen Zellpassagen nicht in COMP-Vollmedium, sondern in DMEM suspendiert, um für die Migrationsversuche der Behandlungsgruppen I und II den wachstumsfördernden Einfluss von EGF und FGF zu eliminieren und den Migrationseffekt durch CCh oder PIR zu erfassen.

In die zentrale Vertiefung der unteren Boyden Kammer wurden für die 15 Versuche der Behandlungsgruppe I je 100µM CCh und der Behandlungsgruppe II je 50µM PIR, gelöst in je 50µl DMEM pipettiert.

Für die Kontrollgruppen wurde die halbkugelige Vertiefung mit 50µl DMEM und für die positive Kontrollgruppe mit 50µl COMP (EGF, FGF) aufgefüllt.

Nach horizontaler Fixierung der matrigelbeschichteten Membran zwischen unterer und oberer Kammer wurden je 50.000, in 220µl DMEM suspendierter kultivierter ANSC auf die poröse Membran pipettiert.

Die mit Matrigel benetzten Membranen mussten zwischen oberer und unterer Kammer derart fixiert werden, dass es einen direkten Kontakt zwischen der Unterseite der Membran und dem Medium in der unteren Kammer gab und sich keine Lufteinschlüsse dazwischen befanden.

Die komplett mit dem Chemoattraktant / Medien und der Zellsuspension beschickte Boyden-Kammer wurde für die Migrationsinduktion für 6h in einem CO₂-Inkubator (CB210) unter Wasserdampfsättigung (95% rel. Luftfeuchtigkeit) und 5% CO₂ bei 37°C inkubiert.

Nach 6h Inkubation wurden die Membranen entnommen und die an den Unterseiten der Membran befindlichen, migrierten Zellen nach Abhebung durch Auswaschung mit DMEM fixiert und gefärbt.

Die gefärbten Zellen konnten mit einem Auflichtmikroskop (Zeiss AG, Oberkochen, D) morphologisch beurteilt und gezählt werden.

2.4.3 Zellkernfärbung und -Zählung

Nach der Inkubation wurde die in der oberen Kammer befindliche Suspension mit den verbliebenen Zellen abpipettiert und die Membranen bei Raumtemperatur auf einer mit Wachs ausgekleidete Petrischale derart platziert und mit Nadeln fixiert, dass sich die Fläche, die Kontakt mit dem Medium der unteren Kammer gehabt hatte, oben befand.

Anschließend wurden die Zellen auf der Membranfläche mit 70%igem 2-Propanol für eine Minute in Vorbereitung auf die Färbung fixiert.

Danach erfolgte die Entfernung des Alkohols auf der Membran durch Spülung mit Aqua bidest. und die Färbung der darauf befindlichen migrierten Zellen für 20min mit Giemsalösung (Zellkernfärbung; 1:20 in Aqua bidest., Merck AG, Darmstadt, D).

Nach erneuter Spülung mit Aqua bidest. und Lufttrocknung für 1min wurden die Membranen mit DPX (Distyren, Plasticizer, Xylen) auf Objektträgern für 24h eingebettet. Danach konnten die mit Giemsaefärbung erkennbaren migrierten Zellen anhand der gefärbten Zellkerne unter 200-facher Vergrößerung mit einem binokularen Lichtmikroskop (Zeiss AG, Oberkochen, D) ausgewertet und gezählt werden.

Die Zählung der Zellkerne erfolgte bei untersucherbezogener Verblindung und gezählt wurden fünf zufällig ausgewählte Gesichtsfelder und die ermittelte Gesamtzahl dieser fünf Zählungen war die Bezugsgröße für den intergruppalen Vergleich der vier Versuchsgruppen.

2.5 Zelldifferenzierung

Die Versuche zur Zelldifferenzierung an kultivierten ANSC erfolgten an den Zellpassagen 5, 6, 8, 10, 19, wobei diese Passagen per Los zufällig ausgewählt wurden.

Als Kontrollgruppe diente die Kultivierung in COMP-Medium ohne Chemoattraktant. In den Behandlungsgruppen I und II erfolgte ein Zusatz von CCh (100µM) bzw. PIR (50µM).

Um die differenzierenden Zellen zum intensiven Wachstum anzuregen, wurde die Zellkultur für alle drei Versuchsgruppen und für die ersten 24h mit COMP-EF* (Tab.2) angesetzt, das die Wachstumsfaktoren EGF und FGF enthält.

Nach 24h Kultur und nach Zentrifugation der Zellsuspensionen wurde das Kulturmedium in allen drei Versuchsgruppen gewechselt und die erneute Zellsuspension erfolgte im Kulturmedium COMP-F*, das den Wachstumsfaktor FGF ohne EGF enthält.

Nach weiteren 24h Kultur erfolgte erneut ein Wechsel des Kulturmediums (COMP-pur) und dieses Medium enthielt keine Wachstumsfaktoren. Danach erfolgte die Kultivierung unter Beobachtung der Differenzierung für fünf weitere Tage.

Tab. 2: Differente Kulturmedien für die Zelldifferenzierung

COMP-EF*	COMP mit 3% fetalem Kälberserum (FCS) und EGF und FGF
COMP-F*	COMP mit 3% fetalem Kälberserum mit FGF, aber ohne EGF
COMP-pur	COMP mit 3% fetalem Kälberserum ohne FGF und EGF

Der differenzierte Einsatz von Kulturmedium wurde vorgenommen, da Untersuchungen gezeigt haben, dass der komplette Wegfall der Wachstumsfaktoren nach zwei Tagen Kultur die Zellen zu einem verstärkten Differenzierungsprozess anregen (Palumbo et al., 1998).

Vor Beginn der Versuche zur Zelldifferenzierung wurden autoklavierte Deckgläser (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, D) in einer Petrischale mit 200µl einer Mischung aus Matrigel und DMEM im Verhältnis 1:1000 benetzt.

Diese Benetzung mit Matrigel diente der notwendigen Adhäsion der kultivierten Zellen an den Deckgläsern.

2.5.1 Versuchsdurchführung

Die Zellzahl der über die regulären Zellpassagen gewonnen kultivierten ANSC wurde in einer Zählkammer (Coulter Counter Accuvette, ST. 25 x 25m) ermittelt.

Auf die in den Vertiefungen der 24-Multiwell Zellkulturplatte (Fa. Nunc™) befindlichen Deckgläschen wurde eine Zellsuspension, bestehend aus 0,5ml des entsprechenden Testmediums und je 160.000 Zellen (A - 6x Kontrolle; B - 6x CCh; C - 6x PIR), pipettiert (Tab.3).

Während des Differenzierungsprozesses wurden die Wachstumsfaktoren FGF und EGF aus dem jeweiligen Medium durch Zusatz von 3%igem fetalem Kälberserum (FCS) unter Beibehaltung der Eingangskonzentration der Testsubstanzen (CCh 100µM; PIR 50µM) sukzessive entfernt.

Die Zellsuspensionen wurden anschließend für 24h in einem CO₂-Inkubator bei 37°C und 95%iger Wasserdampfsättigung kultiviert.

In einem ersten Schritt erfolgte nach 24h die Abpipettierung von 450µl der jeweiligen Medien aus der 24-Multiwell Zellkulturplatte und die Auffüllung mit 0,5ml des jeweiligen Mediums mit FGF und CCh bzw. PIR, jedoch ohne den Wachstumsfaktor EGF.

Tab. 3: Versuchsaufbau Zelldifferenzierung

Medium	1	2	3	4	5	6
A COMP (0,5ml pro well)	160.000 Zellen	160.000 Zellen	160.000 Zellen	160.000 Zellen	160.000 Zellen	160.000 Zellen
B COMP+ Carbachol 100µM (0,5ml pro well)	160.000 Zellen	160.000 Zellen	160.000 Zellen	160.000 Zellen	160.000 Zellen	160.000 Zellen
C COMP+ Pirenzepin 50µM (0,5ml pro well)	160.000 Zellen	160.000 Zellen	160.000 Zellen	160.000 Zellen	160.000 Zellen	160.000 Zellen

Danach wurden die Kulturplatten für weitere 24h in einem CO₂-Inkubator bei 37°C und 95% rel. Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Nach dieser zweiten 24-stündigen Inkubation erfolgte die Abpipettierung der Kulturmedien und nach Auffüllung der Vertiefungen der Zellkulturplatte mit 0.5ml COMP und 3%igem FCS und ohne Wachstumsfaktoren die Inkubation im CO₂-Inkubator für weitere fünf Tage zur Ausdifferenzierung der Zellen.

Nach Abschluss der siebentägigen Differenzierungsphase wurden die Kulturmedien aus den Vertiefungen der Kulturplatte abpipettiert und die Deckgläschen mit den Zellen verblieben in den Vertiefungen und es erfolgte eine viermalige Waschung der Deckgläschen mit je 0,5ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Gibco BRL LifeTechnologies, Trevose, USA). Dafür wurde die Kulturplatte für 5min unter Verwendung eines Rüttlers (Labortechnik GmbH, Burgwedel, D) mit einer Schüttelfrequenz von 200mal pro min gewaschen, um zu sichern, dass die Kulturmedien vollständig eliminiert wurden.

Nach dem letzten Waschvorgang erfolgte die Vorbereitung der Zellmarkierung für die Fluoreszenzmikroskopie mit dem Zusatz zellspezifischer Antikörper.

2.5.2 Verwendete Antikörper

Der monoklonale Antikörper TUJ1 (Neuronal Class III beta-Tubulin, Covance, Priveton, USA) wurde zum Nachweis der in der Zellkultur generierten Neurone verwendet.

Vor Anwendung des Antikörpers TUJ1 erfolgte eine Verdünnung im Verhältnis von 1:1000 mit PBS und die Zugabe von 10% NGS, (Normales Ziegen-Serum, Jackson Immuno Research Inc, West Grove, USA) und 0,05% Tween20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D) und die Lagerung dieser Antikörperpräparation bis zur Anwendung in einer Tiefkühltruhe (Bosch GmbH, Gerlingen, D) bei -20°C.

Für die Kontrollgruppe wurden lediglich die Substanzen NGS und Tween20 ohne Antikörper eingesetzt.

Um die mit TUJ1 Antikörpern markierten de novo generierten Neuronen für die Fluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen, wurde ein gegen TUJ1 gerichteter sekundärer monoklonaler Ziege-Anti-Maus FITC-Antikörper (Cy3-conjugated AffiniPure Anti-Maus IgG, Jackson Immuno Research Inc, West Grove, USA) eingesetzt.

Dieser Antikörper kann durch Lichtbestrahlung von 460 bis 550nm zur Fluoreszenz angeregt werden (Absorptionsmaximum bei 460nm).

Vor Anwendung des sekundären Antikörpers erfolgten eine Verdünnung im Verhältnis von 1:1000 mit PBS, 10% NGS, 0,05% Tween20 und die Lagerung dieser Antikörperpräparation bis zur Anwendung in einer Tiefkühltruhe bei -20°C.

2.5.3 Zellmarkierung

Jeder der sechs Versuchsansätze (s.Tab.3, S.29) der drei Versuchsreihen (COMP; CCh, PIR) wurde in vier Positiv- und zwei Negativkontrollen unterteilt.

Für die Positivkontrollen wurden 300µl einer Zellsuspension mit TUJ1 Antikörper und PBS und für die Negativkontrollen 300µl mit PBS ohne TUJ1 in die Vertiefungen der 24-Well- Zellkulturplatte pipettiert.

Danach wurde die Zellkulturplatte mit der Antikörper-Zellsuspension für 2h bei Raumtemperatur auf einem Rüttler und einer Schüttelfrequenz von 200mal pro min inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Zugabe des sekundären Cy3- Antikörpers.

In jede Vertiefung der Kulturplatte wurden 300µl der Zellsuspension mit PBS und Cy3- Antikörper pipettiert und für 30min in einem abgedunkelten Raum bei Raumtemperatur auf einem Rüttler und einer Schüttelfrequenz von 200mal pro min inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen.

Zur Bestimmung der Proliferationsrate und der Differenzierung der Neuronen erfolgte eine Zellkernfärbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich, USA), gelöst in PBS im Verhältnis 1:1000.

Zunächst wurden die Zellen vor der Färbung mit 70%igem 2-Propanol für 1min dehydriert und die Anfärbung der Zellkerne erfolgte für 10min bei Raumtemperatur mit 300µl DAPI-Lösung pro Well.

Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und es folgte die Fixierung für 20min mit 4%igem Histofix (Paraformaldehyd, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D).

Die Deckgläschen wurden anschließend auf die Objektträger aufgebracht und mit dem Abdeckmittel MobiGLOW (MobiTech GmbH, Göttingen, D) luftdicht verschlossen. Zum Trocknen des Abdeckmittels wurden die mikroskopischen Präparate für 24h bei 4°C in einem Kühlschrank (Bosch GmbH, Gerlingen, D) gelagert.

Die Auswertung der Differenzierung der kultivierten ANSC erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan, Zeiss AG, Oberkochen, D) bei 400-facher Vergrößerung. Dieses Mikroskop war mit der Kamera ProgRes C10plus und der Software ProgRes Capture Pro 2.5 für die digitale Bildübertragung ausgestattet.

Für die Auswertung wurde eine Verblindung der Untersucher vorgenommen, so dass keine vorherige Kenntnis über die verwendete Testsubstanz (Kontrolle, CCh, PIR) vorlag.

Ausgewertet wurden fünf zufällig ausgewählte Gesichtsfelder aus den drei Versuchsansätzen. Zunächst wurden die DAPI-gefärbten Kerne gezählt und anschließend die Zahl der *TUJ1-positiven*, fluoreszierender Zellkerne, die in Neurone differenzierter Zellen entsprachen. Die Differenz zwischen der Zahl aller DAPI-gefärbten Zellen und der Zahl der fluoreszierenden Zellen ergab die Anzahl der nicht zu Neuronen differenzierten *negativen* Zellen.

Daraus ergab sich für den Differenzierungsversuch der Stammzellen in fünf Versuchsreihen eine visuelle Auswertung von je 18 Objektträgern mit der Zählung von insgesamt ca. 50.000 Zellen.

2.6 Statistische Auswertung

Alle Messdaten zur ANSC-Proliferation, -Migration und -Differenzierung wurden zunächst im Programm Microsoft Excel tabellarisch erfasst und danach mit Hilfe des Programms SPSS (Statistical Package for Social Science, Version 14) statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt.

Danach wurden in Abhängigkeit von der Fragestellung die folgenden statistischen Kennzahlen ausgeführt:

- Stichprobenumfang (n)
- Arithmetisches Mittel (\bar{x})
- Standardabweichung (\pm s.d.)

sowie die statistischen Tests über die Variationsdifferenzen (F-Test), Mittelwertdifferenzen (t-Test) und Anteilsdifferenzen mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS Version 14.

Als signifikanter Unterschied wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ (Konfidenzintervall 95%) bzw. $p \leq 0,01$ definiert.

Für wiederholte Messungen in einer Gruppe wurde die Bonferroni-Korrektur verwendet (Bland und Altman, 1995). Mit ihrer Hilfe wird die Alphafehler-Kumulierung bei multiplen Paarvergleichen neutralisiert.

Für die statistische Berechnung von intergruppalen Unterschieden bezüglich der Proliferation, Migration und Differenzierung nach ANSC-Kultur kam der Kruskal-Wallis-Test zur Anwendung (Kruskal und Wallis, 1952).

Hierbei handelt es sich um einen einfaktoriellen Vergleich, der statistische Unterschiede zwischen mehr als zwei Versuchsgruppen erfassen kann, die eine kategoriebezogene, und damit nicht unbedingt eine Normalverteilung aufweisen. Die für diesen Test notwendige Bedingung eines randomisierten, und damit zufälligen Versuchplans wurde mit der zufälligen Auswertung der Stichproben erfüllt.

Die Voraussetzung für den Kruskal-Wallis-Test, dass es nur einen Bezugsfaktor in der Berechnung gibt, wurde erfüllt, da sich die Gruppen lediglich in den verwendeten Testsubstanzen CCh bzw. PIR unterschieden.

Die statistische Aussage des Kruskal-Wallis-Tests beinhaltet mit dem p-Wert die statistische Signifikanz der intergruppalen Unterschiede und dazu das Ergebnis der numerischen Integrati-

on der Verteilungsfunktion (χ^2 -Verteilung) von 0 bis zu dem Wert der Teststatistik. Die hypergeometrische Verteilung ermittelt die Wahrscheinlichkeit dafür, dass bei n gegebenen Elementen (Grundgesamtheit des Umfangs n), von denen m die gewünschte Eigenschaft besitzen, bei Stichproben des Umfangs n k Treffer erzielt werden, d.h. es besteht eine Wahrscheinlichkeit für $x = k$ Erfolge in n Versuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Werte mit der hypergeometrischen Verteilung der Wahrscheinlichkeit der Zufallsgröße Y mit dem Symbol H deklariert.

2.7 Verwendete Geräte, Materialien, Chemikalien, Lösungen und Antikörper

Tab. 4: Verwendete Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Fluoreszenzmikroskop Axioplan für Durchlicht und Auflicht-Fluoreszenz	Zeiss-AG, Oberkochen, D
Filtersätze: - 487901 - 487915, Grün - 487909, Blau	Zeiss-AG, Oberkochen, D
Kamera: ProgResC10plus	Zeiss-AG, Oberkochen, D
Software: ProgRes CapturePro 2.5	Zeiss-AG, Oberkochen, D
Auflichtmikroskop: Axiovert 120	Zeiss-AG, Oberkochen, D
Handpipetten; Elektrischer Pipettierhelfer Accu-Jet	Eppendorf Research AG, Hamburg, D
Pipetten-Rüttler 3015	Labortechnik GmbH, Burgwedel, D
Eismaschine Scotsman AF-10	Scotsman, Frimont, Italien
Kühlschrank	Bosch GmbH, Gerlingen, D
Tiefkühltruhe	Bosch GmbH, Gerlingen, D
Stickstofftank	Tayler-Wharton, Mildstedt, D
Flowzytometer: Coulter Z2	Beckmann Coulter, Krefeld, D
Zentrifuge Rotixa 120R	Hettich GmbH, Tuttlingen, D
Vortexgerät: Vortex-Genie 2®	Bender und Hobein, Zürich, Schweiz
Sicherheitswerkbank Hera Safe, HSP 12	Heraeus GmbH, Mannheim, D
CO ₂ -Inkubator, CB210	Binder GmbH, Tuttlingen, D

Tab. 5: Verwendete Materialien

Material	Hersteller
Plastikkolben für Zellkultur (T25 cm ³)	Sarstedt Inc., Newton, USA
Multiwell-Zellkulturplatten: 24-Well	Nunc TM , Roskilde, Dänemark
Filter: Ø 50mm; Porengröße 0,2µm	Nunc TM , Roskilde, Dänemark
Deckgläser: Ø 10mm und 24x60mm; Objektträger: geschliffen 76x26mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, D
Zentrifugenröhrchen: 15ml/ 50ml; Polypropylen	Sarstedt Inc, Newton, USA
Kryoröhrchen: Polypropylen	Brand GmbH, Wertheim, D
Pipetten: 10, 100, 200 und 1000µl	Eppendorf Research AG, Hamburg, D
Serologische Auslaufpipette: 10/15 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht, D
Glaspipetten	Mettler-Toledo GmbH, D
Boyden Chambers	N.T.G. – Biotech, Mailand, Italien
Cell-Migration Membranen: Polykarbonatmembran Ø 13mm, Porengröße 8µm	GE Water&Process Technologies, Trevose, USA
Zählkammer: Coulter Counter Accuvette, ST. 25 x 25ml	Beckman Coulter, Krefeld, D
Pinzetten	W&H GmbH, Laufen, D
Sterile Kompressen	Fa. Hartmann, Heidenheim, D

Tab. 6: Verwendete Reagenzien und Antikörper

Reagenzien, Antikörper	Hersteller
Carbachol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pirenzepin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Zählpuffer: Coulter Isoton II Diluent	Beckmann Coulter, Fullerton, USA
Aqua bidest	Merck AG, Darmstadt, D
2-Propanol 70%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Trypanblau	Serva GmbH, Heidelberg, D
Phosphatgepufferte NaCl-Lösung (PBS)	Gibco, Grand Island, USA
DMEM-Kulturmedium: GIBCO 31885	Gibco, Grand Island, USA
Matrigel Matrix Growth Factor Reduced	BD-Biosciences, San José, USA
Roti-Histofix: 4%iges Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
DPX-Eindeckmittel:	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NGS: unimmunisiertes Ziegenserum	Jackson Immuno Research Inc., West Grove, USA
Tween20:	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
MobiGLOW	MobiTech GmbH, Göttingen, D
Giemsalösung für Giemsafärbung	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Amersham Cell Proliferation Kit: RPN20,	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Primärer Antikörper: (TUJ1)	Covance, Princeton, USA
Sekundärer Antikörper: Monoklonaler Cy3-konjugierter Antikörper (Ziege-Maus)	Jackson Immuno Research Inc., West Grove, USA
DAPI: DNA-Fluoreszenz	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NaCl-Lösung 0,9%, steril	Serumwerk AG, Bernburg, D

Tab. 7: Zusammensetzung des Zellkulturmediums COMP

Komponenten			Hersteller
DMEM/F12: serumfrei	-	10,0ml	Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, USA
Glukose 0,6%	-	2,0ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NaHCO ₃ 7,5%	-	1,5ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
HEPES 1M	-	0,5ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
L-Glutamin 2mmol auf	-	1,0ml	Biochrome AG, Berlin, D
Penizillin-50 U und Streptomycin 50µg	-	1,0ml	Biochrome AG, Berlin, D
Heparin 0,2 µg/ml	-	0,2ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Aqua bidest.	-	40,0ml	Merk Millipore, Darmstadt, D
Fetales Kälberserum (FCS)	-	33,8ml	Biochrome AG, Berlin, D
Zusätze:			
EGF 20ng/ml	-	4µl	PeproTech, Hamburg, D
FGF-2 10ng/ml	-	4µl	D PeproTech, Hamburg, D
Amphotericin B 25 µg pro	-	1,0ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Gentamycin 0,25 µg pro	-	1,0ml	Biochrome AG, Berlin, D
Hormonmix			s. Tabelle 8

Tab. 8: Zusammensetzung des Kulturadjuvans „Hormonmix“ für COMP

Hormonmix: 10fach konzentriert Zusammensetzung für 436ml:		
DMEM/ F12	- 40,0ml	Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, USA
Glukose 30%	- 8,0ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NaOHCO ₃	- 6,0ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
HEPES 1mol	- 2,0ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Transferrin 0,1mg/ml	- 400mg	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Putrescin 9,6 µg/ml	- 40,0ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Progesteron 6,3 µg/ml	- 40,0ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Insulin 0,025 mg/ml	- 40,0ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Na-Selenite 5,2 ng/ml	- 40,0ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Aqua dest.	- 300,0ml	Merk Millipore, Darmstadt, D

3 Ergebnisse

3.1 Datenanalyse

Das Hauptkriterium für die drei Versuchsansätze Proliferation, Migration und Zelldifferenzierung stellte der Verlauf der Zellzahlen in den Kontrollgruppen ohne Chemoattraktant und in den Versuchsgruppen mit Zugabe von CCh bzw. PIR dar.

Für die Auswertung der Proliferations- und Migrationsversuche wurden die Gesamtzahlen der Zellkerne von ANSC ermittelt. Vitale und nicht geschädigte *positive* ANSC wiesen keine Anfärbung bei Zugabe von Trypanblau auf.

Transmembranös migrierende *positive* ANSC wurden mittels einer Giemsa-Kernfärbung identifiziert.

Die Differenzierung von ANSC und Neuronen erfolgte durch Auszählung der TUJ1-*positiven* (Neuronen) und TUJ1-*negativen* Zellkerne (ANSC). Positive Zellkerne bedeuteten bei der Untersuchung zur Zelldifferenzierung, dass es sich bei diesen Zellen um aus ANSC gebildete Neurone handelte.

Die Bestimmung der Relation zwischen Neuronen und nicht zu Neuronen differenzierter ANSC (Kennwert K) diente dazu, die Schwankungsbreite im Zählergebnis zwischen den Versuchsgruppen I (Zusatz CCh) und II (Zusatz PIR) vernachlässigen zu können.

Mit der Berechnung des Kennwerts K war es möglich, die Auswirkung einer variablen Stichprobe zu eliminieren.

Der Kennwert K wurde nach folgender Formel berechnet (Bortz u. Schuster, 2010):

$$K_{pg1,2,3...} = \frac{\text{positive Kerne pro Passage, Gruppe und Beobachtungszeitpunkt 1,2,3 ...}}{\text{Anzahl aller Zellkerne}}$$

Der K -Wert liegt zwischen den beiden Extremen 0 (keine Differenzierung zu Neuronen) und 1 (alle Zellen sind neugebildete Neuronen).

Für die Auswertung der Ergebnisse war es mit diesen Berechnungen möglich, den Kennwert K jeder Einzelmessung als Bezugsgröße zum Effekt der parasymphatischen und sympathischen Adjuvans zu verwenden.

3.2 Zellproliferation

Für den Proliferationsassay wurden für jede Untersuchungsgruppe (Kontrolle, CCh, PIR) je fünf ANSC-Zelllinien (Mi2-Mi6) mit 200.000 Zellen pro Kultur eingesetzt. Die Zellzählung erfolgte in viertägigen Abständen bis zum 24. Tag nach Kulturbeginn.

Die Zellzahlen wurden sowohl mit der Neubauer Zählkammer, als auch automatisch mit dem Zellzählgerät Coulter Counter Accuvette ST. 25 x 25ml (Tab.4) ermittelt.

Die Ergebnisse der Zellzählungen und der statistischen Berechnungen sind in der Tabelle 9 (Kontrollgruppe) und Tabelle 10 (Gruppe CCh und PIR) dargestellt.

Berechnet wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Proliferation aus je sechs Zählungen pro Dauer der Kultur von 4, 8, 12, 16, 20 und 24 Tagen (Tab.9). Zusätzlich erfolgte eine Varianzanalyse, sowie die Ermittlung der Verteilungsfunktion H (Wahrscheinlichkeitsgrad der Proliferation) und der statistischen Signifikanz p in den Gruppen CCh und PIR (Tab.10).

In der Kontrollgruppe (COMP) kam es innerhalb von vier Tagen zu einer Proliferation von $3,80 \pm 0,65$ Mio. Zellen. Von diesen wurden 200.000 Zellen zum Ansetzen einer neuen Zellkultur für weitere vier Tage entnommen. Dasselbe Vorgehen erfolgte bis zum 24. Tag nach Versuchsbeginn.

Die Mittelwerte in dieser Gruppe lagen bis zum 24. Tag nach Kulturbeginn zwischen 3,81 und 3,98 Mio. Zellen. Die höchsten Proliferationsraten wurden acht Tage nach Kulturbeginn ($3,96 \pm 0,58$ Mio.) und 16 Tage nach Beginn der Kultur ($3,98 \pm 0,73$ Mio.) ermittelt.

Innerhalb der sechs Auszählungen zwischen den Tagen 4 bis 24 traten in der Kontrollgruppe keine statistisch signifikanten Unterschiede auf.

Tab. 9: Zellzählung von fünf Versuchsreihen Proliferationsassay der Kontrollgruppe COMP

Kulturmedium	Tag der Kultur	in Mio. n =5	SD ($\pm s$) in Mio.
COMP	4	3,80	$\pm 0,65$
	8	3,76	$\pm 0,76$
	12	3,87	$\pm 0,58$
	16	3,81	$\pm 0,73$
	20	3,78	$\pm 0,54$
	24	3,78	$\pm 0,67$

In der Gruppe mit Zusatz von Carbachol (CCh) wurde mit Ausnahme der Zählung am 8. Tag nach Beginn der Kultur ($p = 0,078$) eine signifikante ($p < 0,05$ bis $p < 0,02$) Steigerung der Proliferation mit Zellzahlen zwischen $3,94 \pm 0,69$ Mio. und $4,15 \pm 0,48$ Mio. nachgewiesen.

Dagegen kam es in der Gruppe mit Zusatz von Pirenzepin (PIR) zu einer signifikanten Abnahme der Proliferation am 16. Tag nach Kulturbeginn und zu einer signifikanten Inhibition der Proliferation von $p < 0,012$ am 8. Tag und am 24. Tag und $p < 0,016$ am 12. Tag nach Beginn der Kultur (Tab.10).

Tab. 10: Statistische Auswertung von je fünf Versuchsreihen Proliferationsassay nach Zugabe von Carbachol (CCh) in der Gruppe I und Pirenzepin (PIR) in Gruppe II; H = Wahrscheinlichkeitsgrad der Proliferation

Zusatz	Tag der Kultur	n in Mio.	SD ($\pm s$) in Mio.	Varianz	H	Signifikanz
Gruppe I CCh	4	4,16	$\pm 0,52$	0,003	8,307	$p < 0,034$
	8	4,12	$\pm 0,82$	0,018	3,103	$p = 0,078$
	12	4,17	$\pm 0,74$	0,014	4,333	$p < 0,037$
	16	4,21	$\pm 0,45$	0,015	5,409	$p < 0,020$
	20	4,14	$\pm 0,69$	0,009	4,333	$p < 0,047$
	24	4,12	$\pm 0,63$	0,007	3,718	$p < 0,053$
Gruppe II PIR	4	3,51	$\pm 0,42$	0,004	4,021	$p < 0,044$
	8	3,39	$\pm 0,49$	0,004	6,181	$p < 0,012$
	12	3,43	$\pm 0,64$	0,008	5,769	$p < 0,016$
	16	3,27	$\pm 0,71$	0,005	3,692	$p < 0,054$
	20	3,34	$\pm 0,81$	0,004	7,436	$p = 0,063$
	24	3,35	$\pm 0,39$	0,005	7,410	$p < 0,006$

Nach den ersten vier Tagen der Zellkultur wiesen die mit CCh behandelten Zellen eine starke und signifikante proliferative Rate gegenüber der Kontrollgruppe und der mit PIR behandelten ANSC auf (Abb.5A-F).

Nach acht Tagen Kultur (Abb.5B) war die Hemmung der Proliferation durch PIR gegenüber der Kontrollgruppe statistisch signifikant, während in den Kulturen mit CCh eine tendentielle, aber nichtsignifikante Steigerung der Proliferation gefunden wurde.

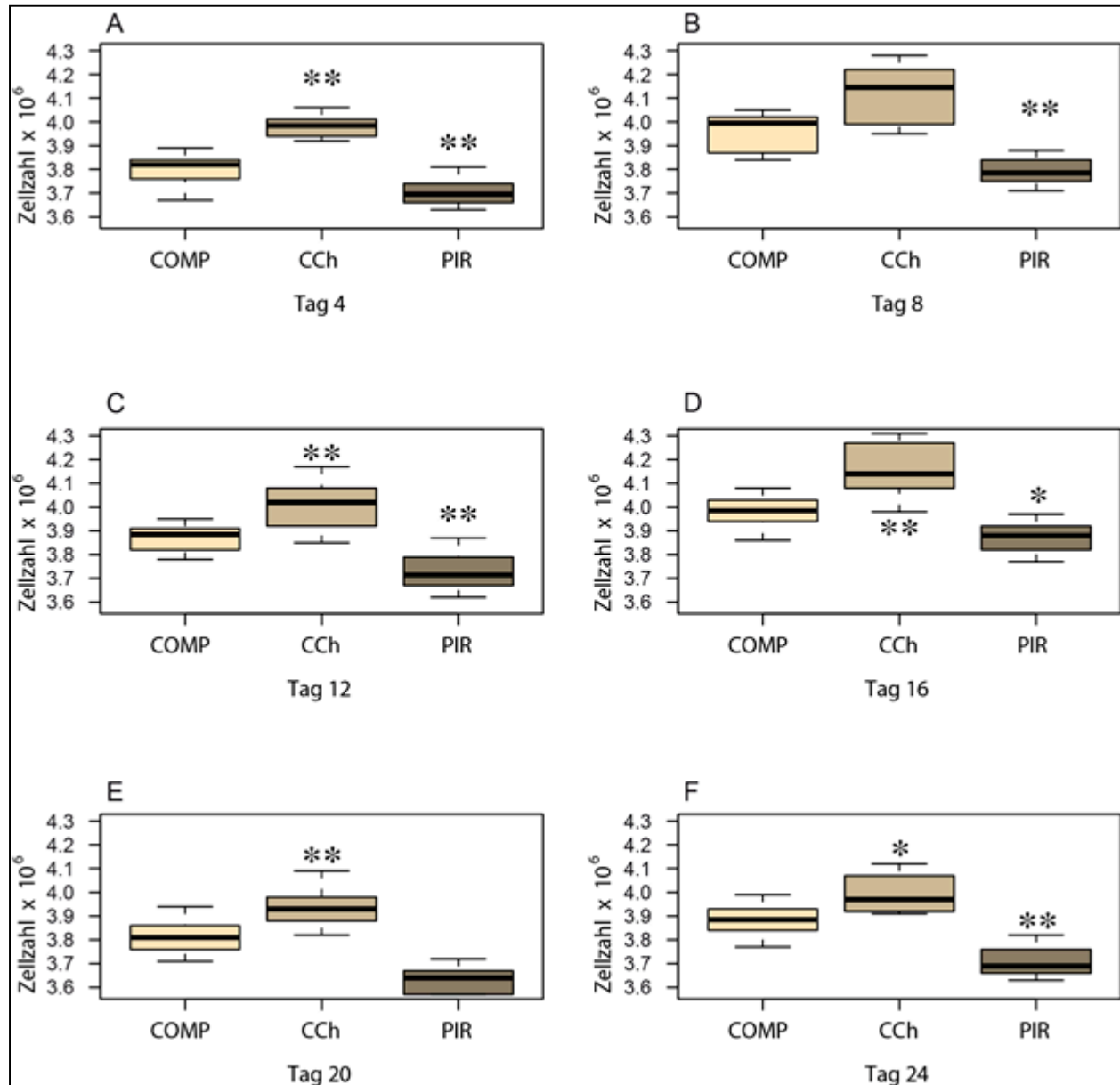


Abb. 5: Auswirkung einer cholinergen und sympathikomimetischen Wirkung auf die Zellproliferation; * Signifikanz $p < 0,05$; ** Signifikanz $p < 0,01$; CCh – Carbachol; PIR – Pirenzepin; Comp – Completo

Nach 12 Tagen Kultur (Abb.5C) und 16 Tagen (Abb.5D) fanden sich sowohl in der Proliferationssteigerung durch CCh als auch in der Hemmung der Proliferation mit PIR signifikante Unterschiede zu den unbehandelten Zellkulturen.

Während es 20 Tage nach Beginn der Kulturen in der Gruppe mit CCh-Zusatz noch zu einer signifikanten Zunahme ($p < 0,01$) der Rate der Proliferation kam (Abb.5E), war die Hemmung durch PIR lediglich tendenziell und nichtsignifikant. 24 Tage nach Kulturbeginn wies die Proliferationsrate sowohl in der CCh-Gruppe eine signifikante Steigerung ($p < 0,01$) als auch in der PIR-Gruppe ($p < 0,01$) auf (Abb.5F).

Für die Ermittlung der insgesamt in 24 Tagen in den drei Gruppen (COMP, CCh, PIR) proliferierten Zellzahlen wurden diese summiert und die 200.000, in viertägigem Abstand neu angesetzten Zellen subtrahiert (Tab.11).

Tab. 11: Summation der Zellzahlen von fünf Versuchsreihen mit drei Versuchsgruppen COMP, CCh, PIR von der Startzahl 200.000 Zellen (0,2) am Beginn der Kultur (d_0) bis zum 24. Tag der Kultur (d_{24}); $p < 0,01 = **$; $p < 0,05 = *$

Tag der Kultur	COMP Zellen $\times 10^6$ $x \pm s$	CCh Zellen $\times 10^6$ $x \pm s$	PIR Zellen $\times 10^6$ $x \pm s$
d_0	0,2	0,2	0,2
d_4	$3,80 \pm 0,65$	$4,16 \pm 0,52$	$3,51 \pm 0,42$
d_8	$7,36 \pm 0,57$	$8,28 \pm 0,72$	$6,90 \pm 0,59$
d_{12}	$11,23 \pm 0,62$	$12,45 \pm 0,44 *$	$10,33 \pm 0,48 *$
d_{16}	$15,04 \pm 0,65$	$16,66 \pm 0,61 *$	$13,60 \pm 0,61 *$
d_{20}	$18,82 \pm 0,71 *$	$20,80 \pm 0,59 **$	$16,94 \pm 0,67 **$
d_{24}	$22,60 \pm 0,69 *$	$24,92 \pm 0,73 **$	$20,29 \pm 0,69 **$

In den Abb. 6 und 7 sind die Proliferationsraten der drei Gruppen (Kultur ohne Zusatz, Kultur mit Zusatz CCh bzw. PIR) im Verlauf von 4 bis 24 Tagen graphisch dargestellt.

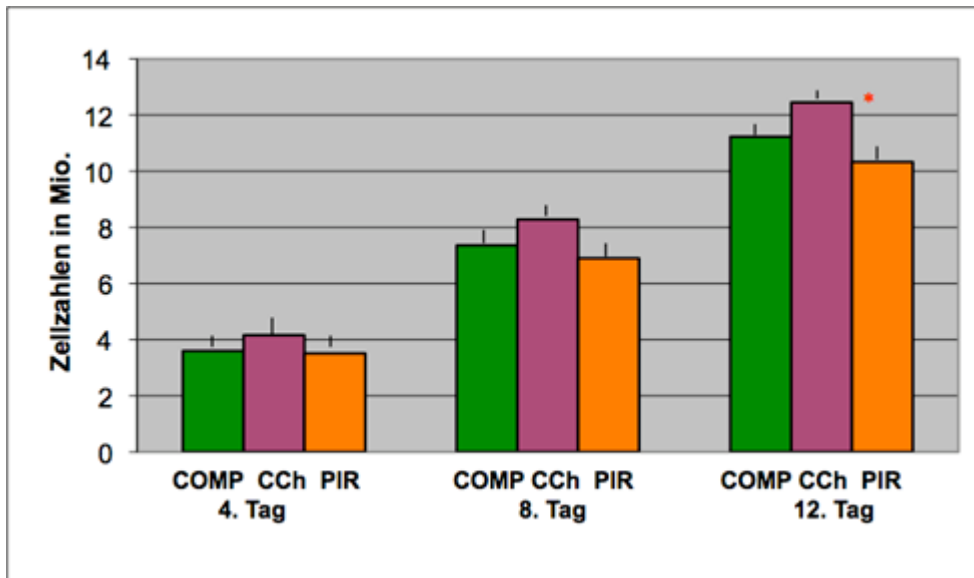


Abb. 6: Zuwachsraten der Proliferation in Mio. Zellen 4. bis 12. Tag nach Beginn der Kultivierung;
* = $p < 0,05$

Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zeigte sich erstmals am 12. Tag nach Beginn der Kultur zwischen der Behandlungsgruppe I (CCh-Zusatz) und II (PIR-Zusatz), während zwischen den zwei Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe-COMP keine signifikanten Unterschiede bestanden.

Dieselben statistischen Ergebnisse wiesen die drei Gruppen auch am 16. Tag nach Beginn der Kultur auf (Abb.7).

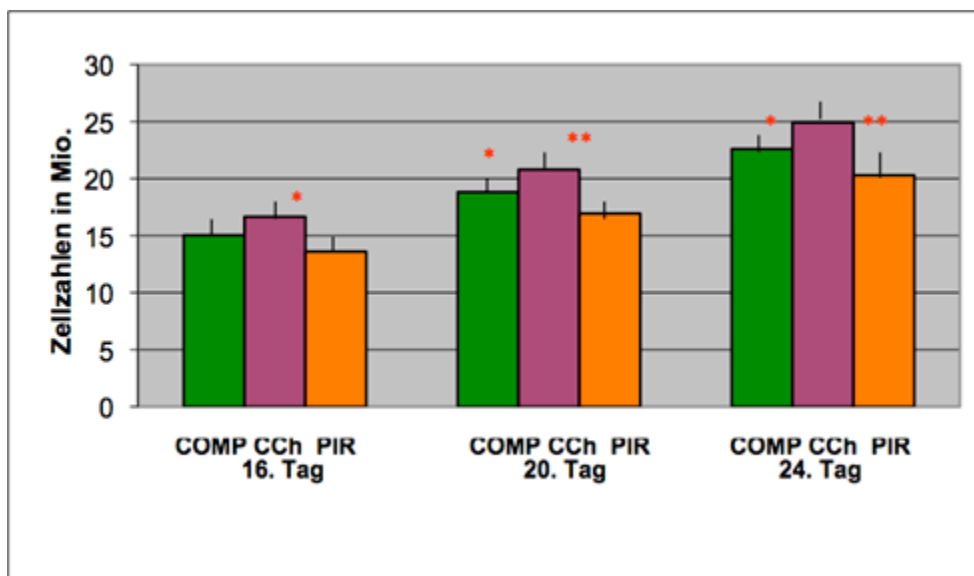


Abb. 7: Zuwachsraten der Proliferation in Mio. Zellen 16. bis 24. Tag nach Beginn der Kultivierung;
* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,03$ bis $0,01$

Am 20. und 24. Tag nach Kulturbeginn bestanden zwischen der Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen sowie zwischen beiden Behandlungsgruppen signifikante Unterschiede in den Proliferationsraten (Abb.8).

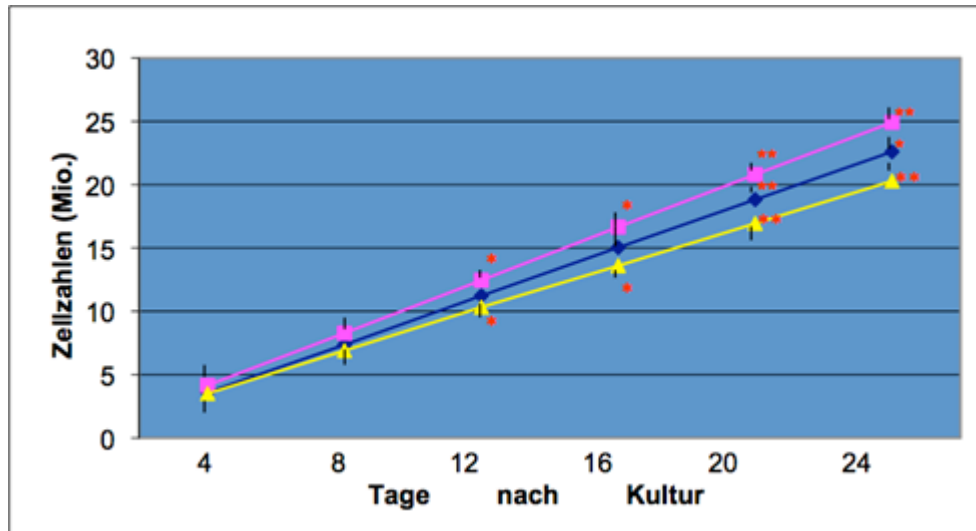


Abb. 8: Kalkulierte Zellzahlen im Langzeit-Proliferationsassay bis 24 Tage nach Beginn der Kultur ■—■ CCh; ◆—◆ COMP; ▲—▲ PIR (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$)

Zusätzlich wurde die hypothetische Proliferationsrate (Wachstumsrate r/d_{24}) für den Gesamtzeitraum von 24 Tagen berechnet. Dabei wird die Kapazitätsgrenze für die proliferierenden Zellen (Nahrung, Energie und Lebensraum) vernachlässigt.

Die Proliferation der ANSC erfolgte exponentiell und stieg in der Kontrollgruppe von 19×200.000 Zellen am 4. Tag der Kultur auf $47.007.564 \times 200.000$ Zellen an (Tab.12).

Tab. 12: Kalkulation der hypothetischen Wachstumsrate COMP r/d4-24, CCh r/d4-24, PIR r/d4-24

Medium	Tag der Kultur	Zellzahl x 200.000 (Mio.)
COMP	4	19
	8	357
	12	6.907
	16	131.596
	20	2.487.172
	24	47.007.564
CCh	4	21
	8	432
	12	9.020
	16	189.865
	20	3.930.203
	24	80.962.185
PIR	4	18
	8	297
	12	5.101
	16	83.401
	20	1.392.802
	24	23.329.441

Demgegenüber war die Proliferationsrate in der Gruppe mit Zusatz von CCh signifikant erhöht ($p < 0,01$) und die Zellzahl betrug am 24. Tag der Zellkultur 80.962.185 x 200.000 Zellen.

Signifikant niedriger, sowohl gegenüber der Kontrollgruppe als auch gegenüber der Gruppe mit Zusatz von CCh waren die Zellzahlen bei Zugabe von PIR mit 23.329.441 x 200.000 Zellen am 24. Tag der Kultur ($p < 0,01$).

Zusammengefasst zeigte sich bei allen Berechnungen der Zellzahlen, sowohl bei den viertägigen Kulturen als auch kalkuliert über 24 Tage im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikanter

stimulierender Einfluss von CCh und eine Hemmung der Proliferation bei Zugabe von PIR zum Kulturmedium (Abb.9).

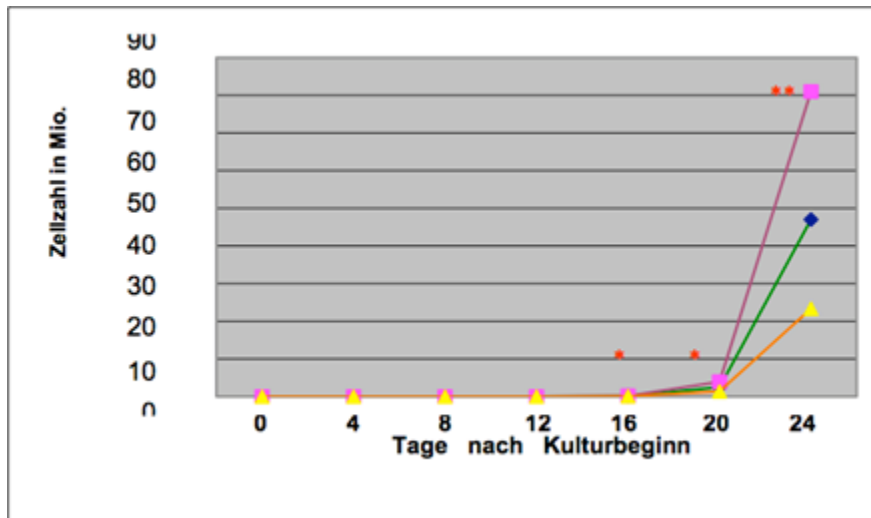


Abb. 9: Kalkulierte Zellzahlen im Langzeit-Proliferationsassay bis 24 Tage nach Beginn der Kultur; ■ CCh; ◆ COMP; ▲ PIR (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$)

3.3 Zellmigration

ANSC besitzen die Fähigkeit zur Migration und in vivo migrieren diese Stammzellen in Phase III (Migrationsphase) aus der SGZ in die Granularzone (GZ) des GD und differenzieren sich hier zu neuronalen Granularzellen.

Die Zellmigration kann in vitro mittels permeabler Membranen und einer Zellkernfärbung der ANSC untersucht werden.

In den in dieser Arbeit vorgenommenen Migrationsversuchen wurde die Stammzellfunktion der Migration durch Zellkernzählung in zwei Kontrollgruppen nach Inkubation in COMP bzw. DMEM ohne Zugabe von CCh und PIR gemessen.

Desweiteren erfolgten Migrationsbestimmungen im Kulturmedium DMEM unter Zugabe der Chemoattraktants CCh oder PIR.

Bei allen vier differenten Versuchsansätzen erfolgten aus fünf ANSC-Passagen je drei Versuche zur Zellmigration und die verblindete Auszählung von fünf zufällig gewählten Gesichtsfeldern, so dass für jeden Versuchsansatz 75 Zählungen vorgenommen wurden.

Um die Validität der Migrationsversuche nachzuweisen, wurde in einem parallelen Versuchsansatz als Nährmedium COMP mit FGF und EGF verwendet.

In dieser „positiven“ Kontrollgruppe mit dem Kulturmedium COMP ergab die Zählung migrierter Zellen an der Unterfläche der permeablen Membran nach 6h Inkubation $138,62 \pm 12,43$ Zellen (Tab.13).

Bei insgesamt 75 Zählungen betrug die minimale Migrationszahl in einem der fünf Zählfelder $n = 98$ Zellen und maximal $n = 160$ Zellen. Bei Kultivierung ohne EGF und FGF mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) als „negative“ Kontrolle wurden maximal fünf migrierte ANSC gezählt und es ergab sich aus fünf Zählungen ein Mittelwert von $2,44 \pm 1,06$ Zellen.

Tab. 13: Migration von ANSC in COMP und DMEM ohne Chemoattraktants von fünf ANSC-Passagen (6, 8, 10, 12, 14) und Migration von ANSC in DMEM mit Zusatz CCh bzw. PIR; H = Wahrscheinlichkeit für Migration

Kulturmedium	n	min	max	MW	\pm SD	Varianz	H	p-value
pos. Kontrolle COMP	75	n = 98	n = 160	138,62	12,43	152,64		
neg. Kontrolle DMEM	75	1	5	2,44	1,06	1,11		
DMEM + CCh vs. DMEM	75	2	7	3,53	1,22	1,49	25,48	p = 0,113
DMEM + PIR vs. DMEM	75	1	5	2,57	1,04	1,08	0,44	p = 0,254

Nichtsignifikante Unterschiede bestanden zwischen beiden Behandlungsgruppen mit Zusatz von CCh bzw. PIR und zwischen beiden Behandlungsgruppen gegenüber DMEM ohne Chemoattraktants. Die p-Werte betrugen bei Zusatz von CCh $p = 0,113$ und bei PIR $p = 0,254$.

Der Zusatz von CCh zum Kulturmedium DMEM führte mit $3,53 \pm 1,22$ migrierter Zellen zu einer nichtsignifikanten Zunahme gegenüber DMEM ohne Chemoattraktant ($2,44 \pm 1,06$) und auch bei Zusatz von PIR mit kompetitiver Hemmung des M1-Rezeptors gab es eine minimale Steigerung der Zahl migrierter Zellen von $2,57 \pm 1,04$ gegenüber DMEM (Tab.14).

In Abb. 10 sind die migrierten Zellen differenziert nach den Zellpassagen zwischen 6 und 14 dargestellt

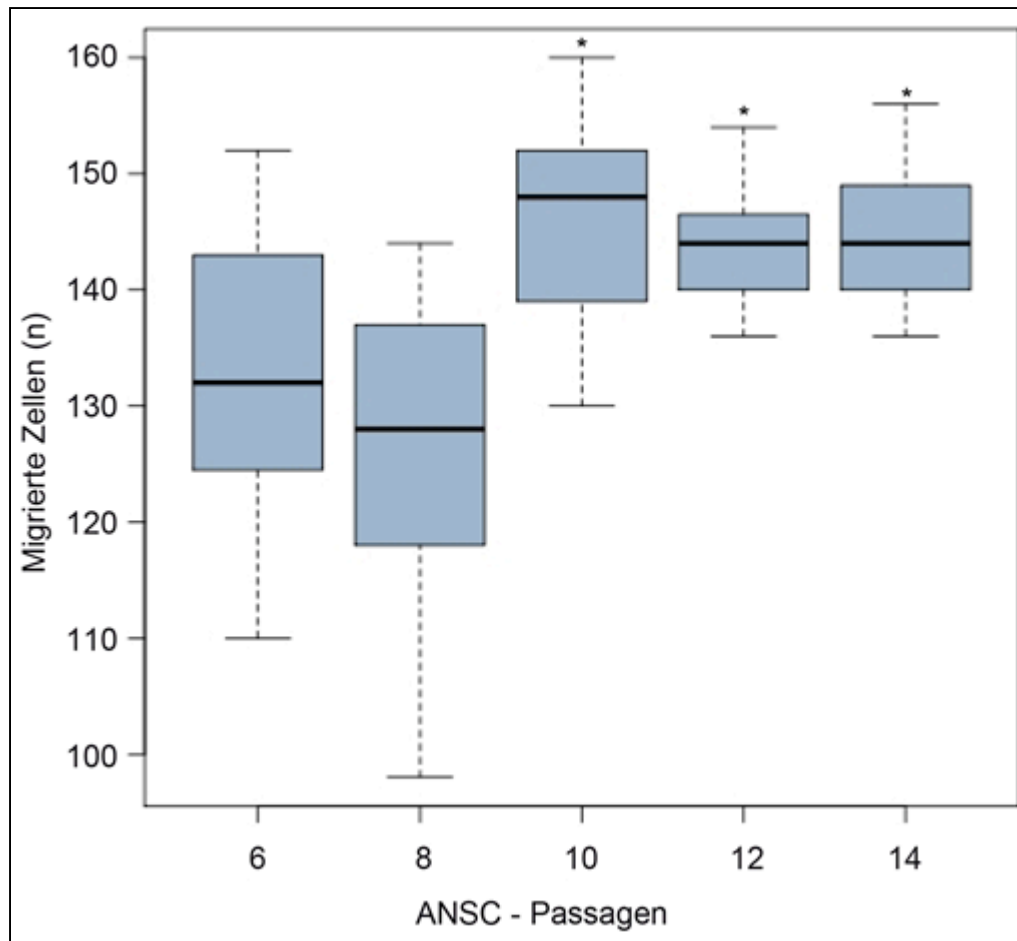


Abb. 10: Migrierte Zellzahlen der positiven Kontrollgruppe (COMP) von fünf differenten ANSC-Passagen 6, 8, 10, 12 und 14 ($p < 0,05^*$)

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der migrierten Zellen betrugen aus fünf Zählungen in der 6. Passage $132,6 \pm 14,1$ und in der 8. Passage $128,3 \pm 15,2$. Bei ANSC-Passage 10 wurden $148,4 \pm 16,3$ migrierte Zellen, bei Passage 12 $145,3 \pm 14,2$ und bei Passage 14 $145,3 \pm 16,1$ migrierte Zellen aus fünf Zählungen ermittelt. Diese Unterschiede zwischen den Passagen 6/8 und 10/12/14 waren statistisch signifikant ($p < 0,05$).

In Abbildung 11 sind die Ergebnisse der Migrationsversuche mit DMEM ohne Chemoattraktants und nach Zugabe von CCh bzw. PIR als Box-Plot Übersicht dargestellt.

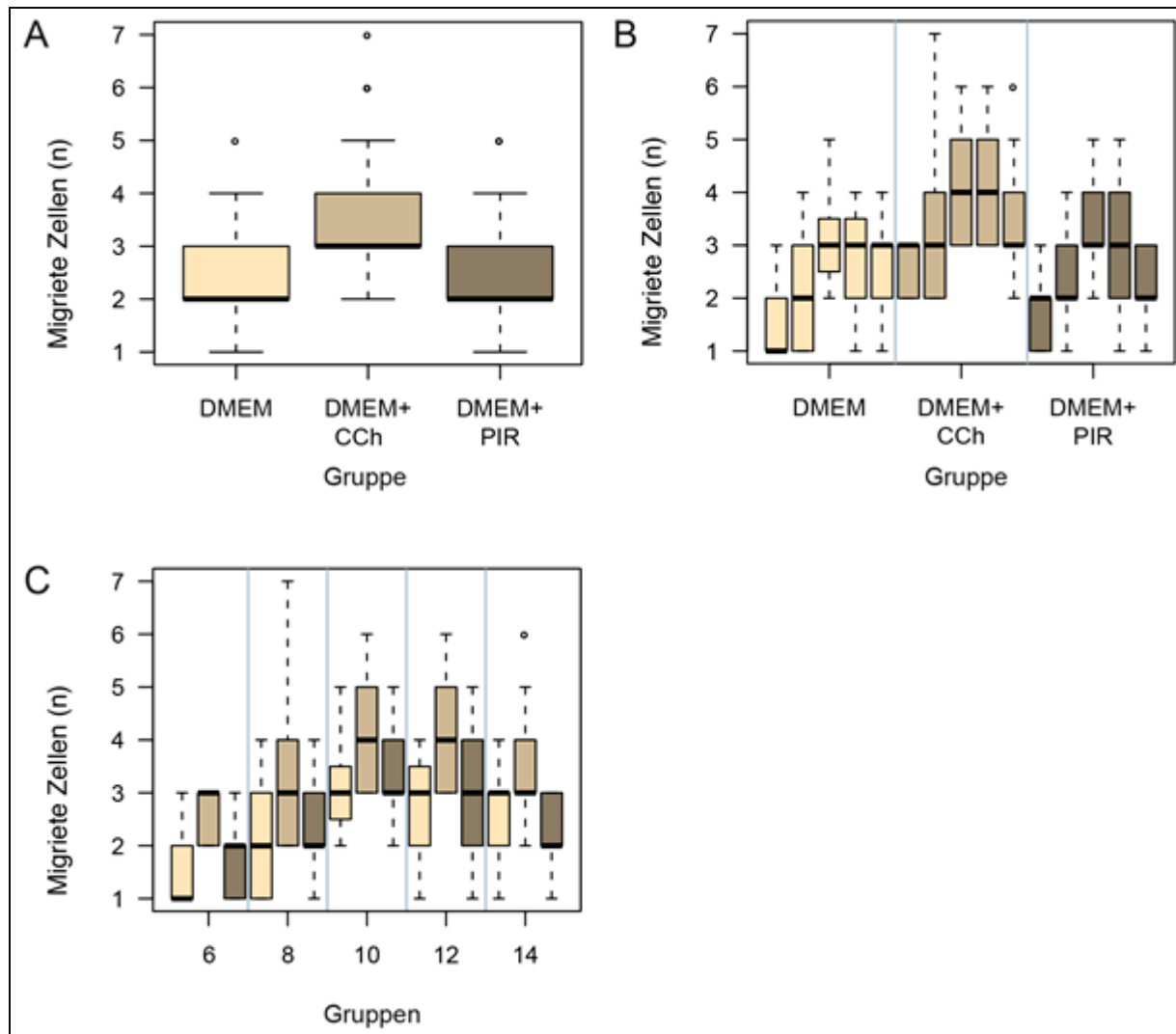


Abb. 11: Box-Plot-Grafik von drei Migrationsversuchen mit DMEM, CCh, PIR (A), Einzeldarstellung von fünf ANSC-Passagen (B), Einzelwerte der drei Versuchsgruppen, bezogen auf die fünf ANSC-Passagen (C)

Zwischen den drei Gruppen bestanden im Migrationsverhalten keine signifikanten Unterschiede (Abb.11A). Analysiert man die Zahlen der migrierten Zellen in den drei Versuchsgruppen in Bezug auf die ANSC-Passagen, dann zeigte sich in den Passagen 6 und 8 gegenüber den Passagen 10, 12 und 14 eine geringere Migration von ANSC (Abb.11B/C). In der DMEM-Gruppe migrierten in den Passagen 6 und 8 insgesamt drei Zellen und in den Passagen 10 bis 14 insgesamt neun Zellen. Nach CCh-Zusatz migrierten aus den Passagen 6 und 8 insgesamt sechs und nach PIR-Zusatz vier Stammzellen. Dagegen waren es in den Passagen 10 bis 14 in der CCh-Gruppe insgesamt elf und in der PIR-Gruppe acht ANSC (Abb.11B). Dasselbe passage-bezogene Migrationsverhalten mit einer höheren Migrationsrate in den Passagen 10 bis 14 zeigte sich in den intergruppalen Vergleichen zwischen den Passagen 6 bis 14 (Abb.11C).

3.4 Zelldifferenzierung

In der Phase der Migration beginnt die Differenzierung von ANSC zu Neuronen und diese Differenzierungsphase findet ihren Abschluss in der Granularzone des Gyrus dentatus.

Zur Überprüfung cholinerg und sympathikomimetischer Einflüsse auf die Differenzierung von ANSC wurden die Zelllinien Mi2 bis Mi6 für insgesamt sieben Tage kultiviert. In den ersten 24h erfolgte die Kultivierung im Medium COMP mit EGF und FGF-2, für den zweiten Tag in COMP nur mit FGF-2 und für die weiteren fünf Tage in COMP ohne Wachstumsfaktoren.

In einer Kontrollgruppe (Gruppe-COMP) wurde kein Chemoattraktant eingesetzt und in zwei Behandlungsgruppen enthielt das Kulturmedium 100µM Carbachol (Gruppe-CCh) bzw. 50µM Pirenzepin (Gruppe-PIR).

Sechs Kulturansätze pro Versuchsgruppe enthielten für den ersten Kultivierungszeitraum von 24h je 160.000 ANSC und die Zellauszählungen erfolgten in 5 mal 5 Gesichtsfeldern pro Versuchsgruppe.

Für die Identifikation differenzierter Neurone erfolgte in vier Versuchen (Positivkontrollen) eine Immunofluoreszenzmarkierung mit den neuronenspezifischen primären Antikörpern TUJ1 und einem sekundären FITC-Antikörper (monoklonaler Cy3 konjugierter Antikörper) und in zwei Versuchen (Negativkontrollen) keine Fluoreszenzmarkierung (Abb.12).

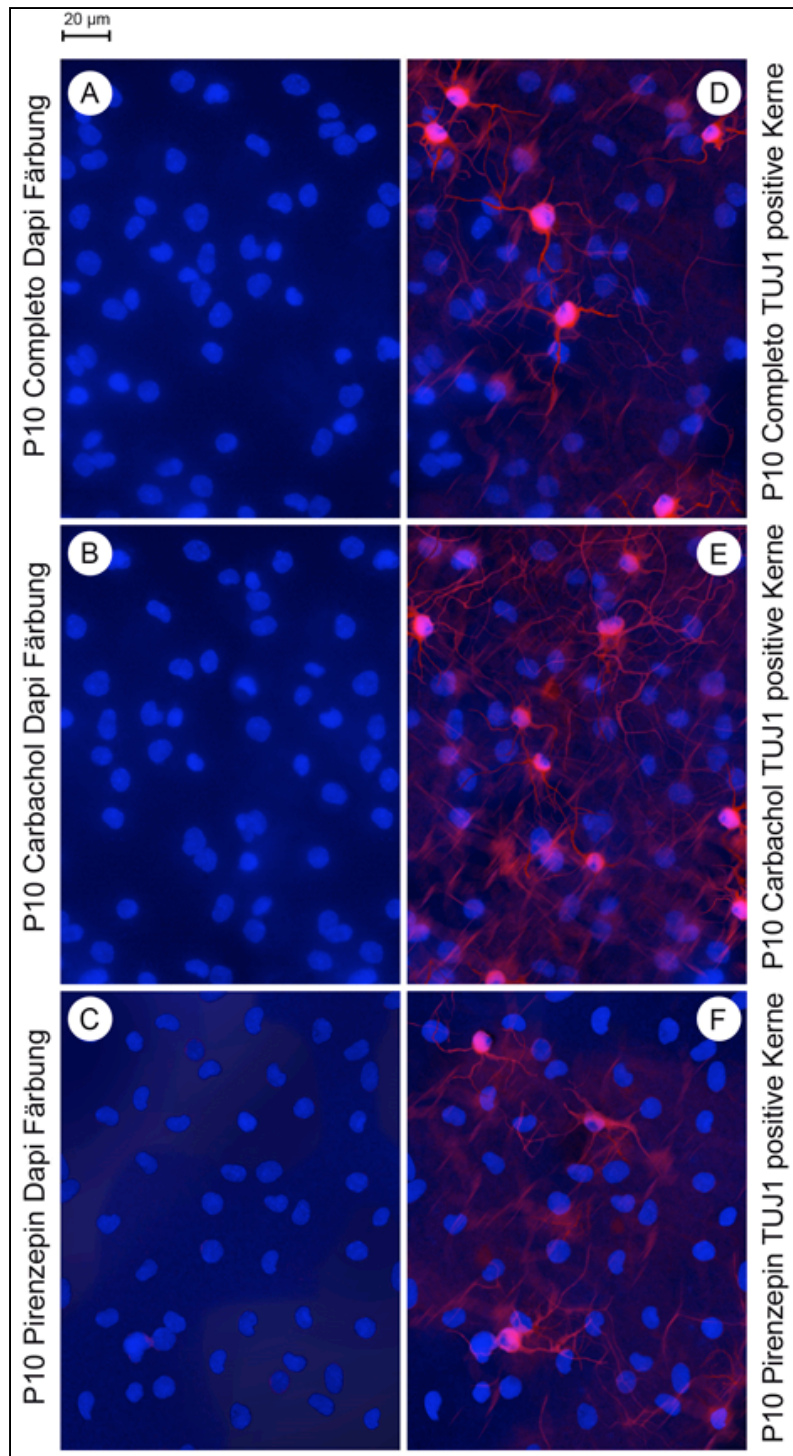


Abb. 12: Kernfärbung mit DAPI: A-COMP/ B-CCh/ C-PIR; DAPI mit TUJ1: D-COMP/ E-CCh/ F-PIR

Um in allen Versuchen nichtdifferenzierte ANSC von Neuronen unterscheiden zu können, wurde eine Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI vorgenommen, wie es in der Abb.12 A–F an einem Beispiel der Passage 10 dargestellt ist.

Bei Kultivierung im Medium COMP sind im Gesichtsfeld 12 D sechs Neurone erkennbar, bei Zusatz von CCh (12 E) acht Neurone und bei Zugabe von PIR im Gesichtsfeld 12 F lediglich zwei zu Neuronen differenzierte ANSC.

In der Gruppe COMP waren von 160.000 zu Beginn des Versuchs eingesetzten Zellen nach sieben Tagen Kultivierung 15.738 ± 1.952 ANSC zu Neuronen differenziert (Tab.15).

Bei Zusatz von CCh erhöhte sich die Zahl der Neuronen signifikant auf 20.624 ± 2.248 ($p = 0,031$) und nach Zugabe von PIR kam es zu einer nichtsignifikant geringeren Differenzierung von 13.312 ± 1.792 Neuronen ($p = 0,066$).

Die Wahrscheinlichkeit H, dass es bei Zusatz von Chemoattraktants zur Differenzierung zu Neuronen kam betrug bei CCh 35,08 und bei PIR 74,31 (Tab.15).

Tab. 14: Differenzierte Neurone (n) ohne und mit Zusatz von CCh bzw. PIR versus COMP); H = Wahrscheinlichkeitsgrad für Differenzierung

Kulturmedium	n	MW	\pm SD	Varianz	H	p-value
COMP	125	15,738	1,952	3,810		
CCh	125	20,624	2,248	5,053	35,08	$p = 0,031$
PIR	125	13,312	1,792	3,221	74,31	$p = 0,066$

Gegenüber der Kontrollgruppe COMP mit einer relativen Differenzierungsrate der ANSC zu Neuronen von $10,31\% \pm 1,22\%$ betrug der Anteil von Neuronen nach sieben

Tagen Kultivierung mit CCh $12,89\% \pm 1,53\%$ und bei Zugabe von PIR $8,32\% \pm 1,12\%$ (Abb.13).

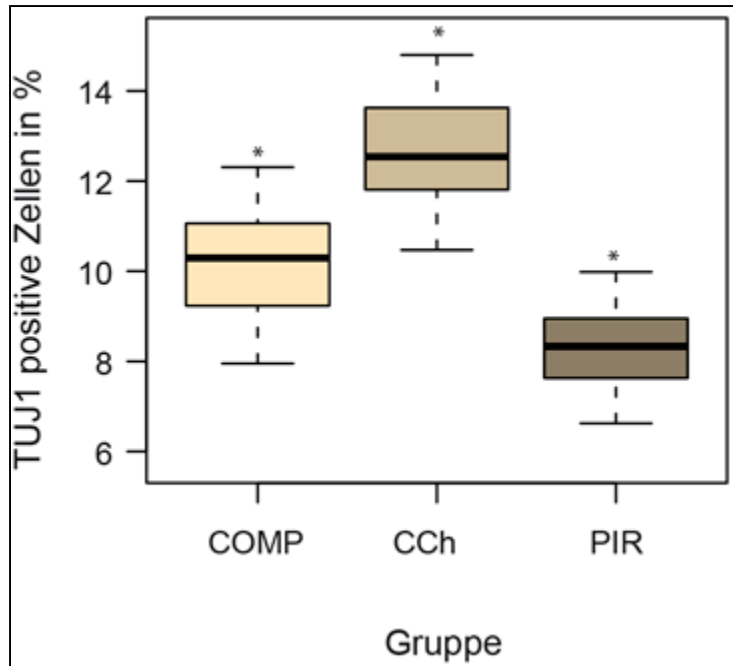


Abb. 13: Prozentualer Anteil differenzierter Neurone versus Kernzahl der Gruppen Comp, CCh und PIR ($p < 0,01$)

Bei differenzierter Auswertung der Neuronenzahlen in Bezug auf die fünf eingesetzten ANSC-Passagen konnten besonders für die Gruppe-CCh Unterschiede festgestellt werden (Abb.14A/B)

In der Versuchsgruppe CCh kam es von Passage 5 bis zu Passage 10 zu einem kontinuierlichen prozentualen Anstieg der differenzierten Neurone von 11,1% auf 13,8%. Dagegen fiel die Zellzahl im Versuch mit der 19. Passage auf 12,9% ab (Abb.14B).

Diese passageabhängigen Zellzahldifferenzen waren in den Versuchsgruppen COMP und PIR nicht nachweisbar, jedoch traten besonders in der Gruppe COMP tendentielle intergruppale Unterschiede auf.

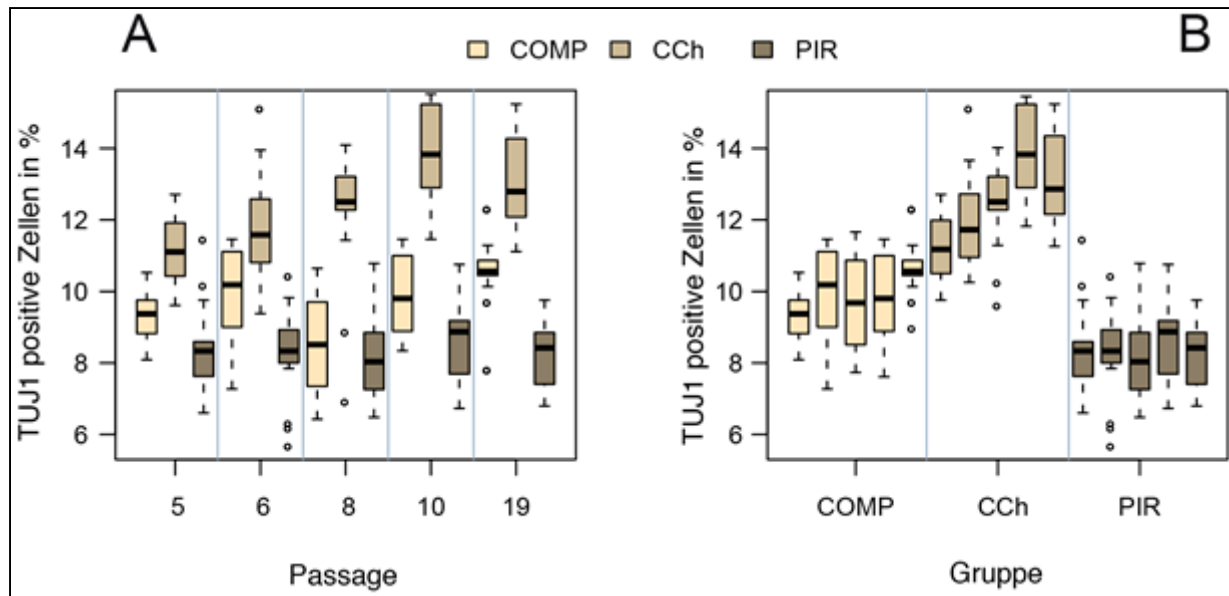


Abb. 14: Prozentualer Anteil differenzierter Neurone für die drei Gruppen in Bezug auf die Passage (A) und für die fünf Passagen in Bezug auf die Versuchsgruppe (B)

Die Schwankungsbreite der Zählergebnisse in den Versuchsgruppen CCh und PIR konnte vernachlässigt werden, indem nicht die absolute Anzahl von positiven Kernen das Kriterium für einen cholinergen bzw. parasympathikolytischen Einfluss darstellte, sondern das Verhältnis der absoluten prozentualen Anteile der Neurone zur Anzahl aller gezählten Zellkerne (Kennwert K).

Bei der Berechnung des K -Wertes konnte der differenzierte Einfluss der Chemoattraktants auf die Zelldifferenzierung gegenüber der Kontrollgruppe COMP bestätigt werden (Abb. 15).

Die Zugabe von CCh führte zu einer signifikanten Zunahme der differenzierten Neurone gegenüber der Zellzahl im Kulturmedium COMP ($p = 0,003$) und PIR hemmte die Differenzierungsrate gegenüber COMP ebenfalls signifikant ($p = 0,007$).

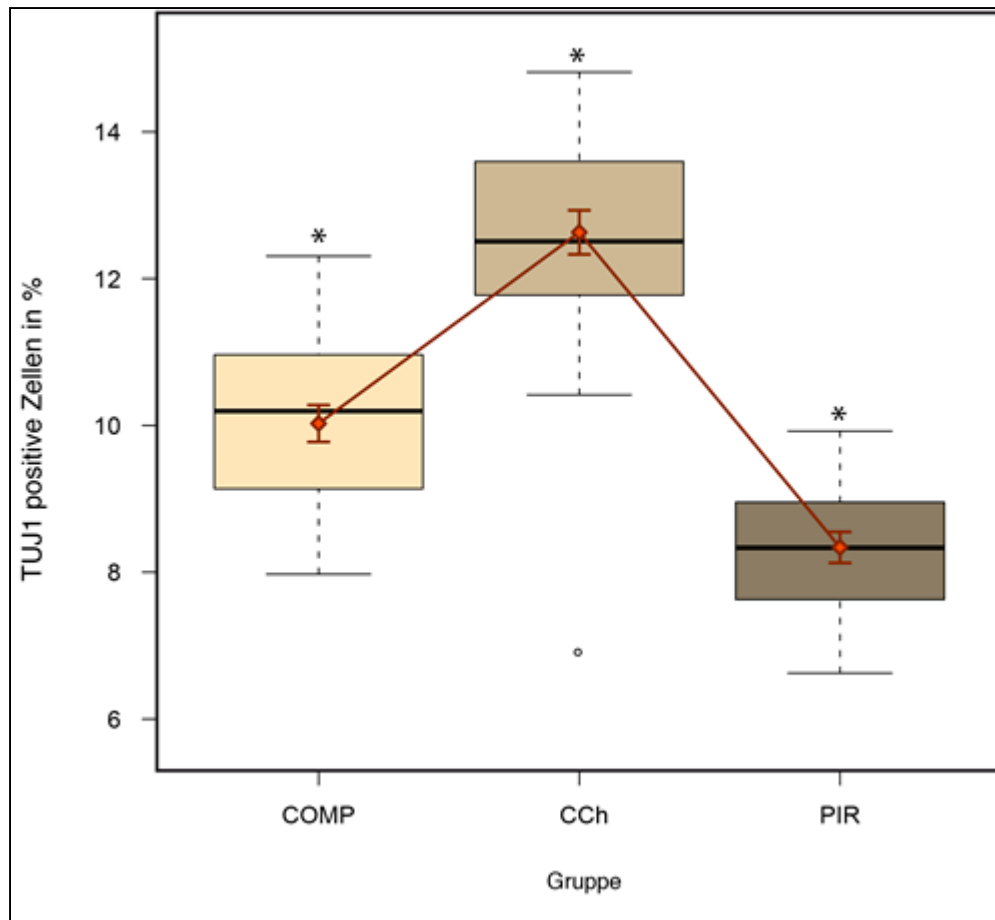


Abb. 15: Prozentualer Anteil differenzierter Neurone der Gruppen COMP, CCh und PIR mit eingefügten K-Werten ($p < 0,01$)

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Acetylcholinanalogon Carbachol und des Parasympathikolytikums Pirenzepin auf die Proliferation, Migration und Differenzierung von ANSC in vitro untersucht.

Bei Durchführung eines Langzeitproliferationsassays mit Kultivierung von 200.000 ANSC über 6 mal 4 Tage kam es bei Verwendung des Kulturmediums DMEM/F12 (COMP) ohne den Zusatz eines Chemoattraktants zu einem durchschnittlichen Zuwachs der Zellen von $3,80 \pm 0,65$ Mio. Zellen.

In der Gruppe mit dem ACh-Analogon CCh wurde eine Steigerung der Proliferation von $4,16 \pm 0,52$ Mio. Zellen beobachtet und bei Zusatz von PIR kam es zu einer signifikanten Abnahme der Proliferation von $3,51 \pm 0,42$ Mio. Zellen.

Unter der Prämisse, dass die Zellkultur kontinuierlich über 24 Tage erfolgt wäre, wurden für die Kontrollgruppe COMP eine kalkulierte Zellzahl am 24. Tag der Kultur von $47.007.454 \times 200.000$ Zellen, in der Gruppe mit CCh von $80.962.185 \times 200.000$ und in der Gruppe mit PIR von $23.329.441 \times 200.000$ Zellen hypothetisch berechnet.

Neben der Proliferation wurde in der vorliegenden Arbeit die Fähigkeit kultivierter ANSC zur Migration durch eine permeable Membran mittels Zellkernzählung in zwei Kontrollgruppen (COMP und DMEM ohne Chemoattraktants) ermittelt und in zwei weiteren Gruppen erfolgten Migrationsbestimmungen im Kulturmedium DMEM unter Zugabe der Chemoattraktants CCh oder PIR.

Bei allen vier differenten Versuchsansätzen erfolgten aus fünf ANSC-Passagen je drei Versuche zur Zellmigration und die verblindete Auszählung von fünf zufällig gewählten Gesichtsfeldern.

In der Kontrollgruppe COMP betrug die Zahl der migrierenden Zellen $138,60 \pm 12,40$. In dieser Gruppe wurden signifikante Unterschiede hinsichtlich der Anzahl migrierter ANSC und der eingesetzten Zellpassagen gefunden.

Während bei den eingesetzten Passagen 6 und 8 die Anzahl der migrierten Zellen $132,6 \pm 14,1$ und $128,3 \pm 15,2$ betrugen, waren die Zahlen migrierter Zellen in den Passagen 10, 12 und 14 mit $148,4 \pm 16,3$, $145,3 \pm 14,2$ und $145,3 \pm 16,1$ signifikant höher ($p < 0,05$).

Keine signifikanten Unterschiede fanden sich intergruppal bei Verwendung des Kulturmediums DMEM, jedoch waren in allen drei DMEM-Gruppen die Zahlen der migrierten Zellen hochsignifikant geringer gegenüber der Kontrollgruppe COMP.

Die Zahl migrierter Zellen in der Kontrollgruppe DMEM betrug $2,44 \pm 1,06$, bei Zusatz von CCh $3,53 \pm 1,22$ und bei Zusatz von PIR $2,57 \pm 1,04$.

Zur Überprüfung cholinerg und sympathikomimetischer Einflüsse auf die Differenzierung von ANSC erfolgte eine Kultivierung für insgesamt sieben Tage. Nach 24h Kultivierung im Medium COMP mit EGF und FGF-2 wurde für den 2. Tag COMP ohne EGF und nach 48h für die weiteren fünf Tage COMP ohne Wachstumsfaktoren eingesetzt. Messungen differenzierter Neurone erfolgten in einer Kontrollgruppe DMEM/F12 ohne Chemoattraktants und in zwei Gruppen mit Zusatz von CCh bzw. PIR.

In der Gruppe DMEM/F12 waren von 160.000 zu Beginn des Versuchs eingesetzten ANSC nach sieben Tagen Kultivierung 15.74 ± 1.95 ANSC zu Neuronen differenziert.

Bei Zusatz von CCh zum Kulturmedium DMEM/12 erhöhte sich die Zahl der Neurone signifikant auf 20.62 ± 2.25 ($p = 0.003$) und nach Zugabe von PIR kam es zu einer signifikant geringeren Differenzierung von 13.31 ± 1.79 Neuronen ($p = 0.007$).

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die neuroplastischen Eigenschaften der Proliferation, Migration und Differenzierung von hippokampalen ANSC in Zellkulturen unter cholinergen und parasymphathikolytischen Einflüssen zu untersuchen.

Eine Vielzahl von Faktoren beeinflussten die Regulation der adulten Neurogenese durch Stimulation und Hemmung der Proliferation, Migration und Differenzierung von ANSC. Mitogene, wie die Wachstumsfaktoren EGF, FGF-2 und Insulin-like growth factor I (IGF-I), sowie der Transforming growth factor alpha (TGF- α) stimulieren die Proliferation von ANSC in vitro (Gritti et al., 1995, 1996, 1999; Weickert und Blum, 1995; Kuhn et al., 1997; Tropepe et al., 1997; Narimatsu et al. 2009).

Neben diesen Faktoren beeinflussen das cholinerge und das sympathikoerge System die adulte Genese, wobei in der Literatur bisher wenige Untersuchungen zur parasymphatischen und sympathischen Beeinflussung der Neuroplastizität von juvenilen und adulten neuronalen Stammzellen (NSC) vorliegen (Mohapel et al., 2005; Narimatsu et al., 2009; Benninghoff et al., 2010; Itou et al., 2011).

Für die cholinerge M1-Rezeptor-Stimulation wurde das parasymphatisch wirkende ACh-Analogon CCh und für die Blockierung des muskarinergen ACh-Rezeptors M1 der ACh-Antagonist PIR verwendet.

Das cholinerge System besitzt für die Modulation der adulten hippokampalen Neurogenese eine Schlüsselrolle, die in den letzten Jahren zunehmend bei zerebralen Erkrankungen hinsichtlich einer möglichen klinischen Relevanz von stimulierender und suppressiver Beeinflussung zunehmend untersucht wurde (Gritti et al., 2002; Ming und Song, 2005; Cobb et al., 2005; Deng et al., 2010; Benninghoff et al., 2010, 2013). Der in vitro Nachweis einer stimulierenden Wirkung cholinergischer Substanzen in Zellkulturen auf das proliferative, migrierende und differenzierende Verhalten von ANSC könnte für Therapieoptionen von eminenter Bedeutung sein.

4.1 Kultivierung von ANSC

Die Kultivierung von ANSC ist für die Hirnforschung eine essentielle Methode, da bisher keine direkten Nachweismethoden für in vivo Untersuchungen zur quantitativen Erfassung der Proliferation, Migration und Differenzierung existieren.

Erste Untersuchungen zu Stammzellkulturen aus dem menschlichen Gehirn wurden von Roy et al. publiziert (Roy et al., 2000). Aus dem Gyrus dentatus, der bei Patienten chirurgisch entfernt werden musste, konnten ANSC isoliert und kultiviert werden, und während der Kultivierung gelang unter Zugabe des Nestin-Enhancer (E/nestin) und Talpha1 tubulin promotor (P/Talpha1) die Identifikation von neugebildeten Neuronen mit der Expression von beta-III-tubulin und microtubule-associated protein-2.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Kultivierung der ANSC von Mäusen das Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Dulbecco und Freeman 1959) und das COMP-Medium verwendet, welches aus einer Mixtur von DMEM und Ham's Nutrient Mixture F-12 (Ham, 1965) im Verhältnis 1:1 bestand.

Die Kombination DMEM/HNM F12 enthält die Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 und neben FCS und Aminosäuren die Hormone Insulin und Progesteron, sowie das Glykoprotein Transferin.

Das von Ham entwickelte Supplement F-12 wurde ursprünglich für das Wachstum von Tumorzellen in Kulturen entwickelt, ist jetzt aber in Kombination mit DMEM das am häufigsten für die Kultur von Stammzellen verwendete Kulturmedium (Benninghoff et al., 2010; Li et al., 2010; Shivaraj et al., 2012; Hattiangady und Shetty, 2012).

In vergleichenden Untersuchungen mit verschiedenen Kulturmedien konnte nachgewiesen werden, dass die Kombination DMEM/F12 gegenüber F12 und RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) zu stärkeren Proliferationsraten bei zahlreichen Zelltypen führt (Freshney, 2005; Talorete et al., 2006; Hu und Zhang, 2010).

In einer neueren Untersuchung konnte ein regulierender und stimulierender Effekt auf die hippocampale Neurogenese nachgewiesen werden, wenn dem Kulturmedium DMEM/F12 Taurin (2-Aminoethansulfonsäure) beigelegt wurde (Shivaraj et al., 2012). Die Untersucher konnten nachweisen, dass dieses Supplement in Kulturen und Gewebeschnitten des Hippokampus von Mäusen die embryonale und postnatale Proliferation von neuronalen Progenitorzellen gegenüber Vergleichsgruppen signifikant stimuliert. Desweiteren konnte auch der Nachweis einer Stimulation der Synaptogenese erbracht werden, indem es zu einer verstärkten Expression von Synapsin 1 und von PSD-95 (postsynaptic density protein 95) kommt.

Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Shivaraj et al. könnten bei Fortführung der in der vorliegenden Arbeit vorgenommenen Versuche eine Bedeutung dahingehend erfahren, ob es unter Verwendung des Supplements Taurin zu synergischen cholinergen Einflüssen auf Proliferation,

Migration und Differenzierung von ANSC in Kulturen kommt. Diese Hypothese wird durch weitere Untersuchungen zur Wirkung eines Taurinmangels auf die embryonale Hirnentwicklung verschiedener Tierspezies untermauert. So konnte bei Rhesusaffen nachgewiesen werden, dass es bei taurinloser Ernährung zu einer gestörten Bildung der Hirnrinde im visuellen Kortex kommt (Neuringer et al., 1990) und neugeborenen Katzen von Muttertieren, die taurinfrei ernährt wurden, wiesen ebenfalls Abnormitäten im Kleinhirn und im visuellen Kortex auf (Sturman et al., 1985).

Für die Durchführung von Zellkulturen ist neben wichtigen technischen Erfordernissen, die das geeignete Kulturmedium, die Sterilität und die Inkubationskriterien betreffen, auch der Zeitpunkt des Wechsels des Kulturmediums von Bedeutung (Hildebrand et al., 1997; Mayer-Proschel et al., 1997; Lim et al., 1999). Ein zu rascher Austausch des Mediums kann Zellen ablösen, die noch nicht an der Oberfläche der Kulturschale oder am proliferierten Zellverband haften. Zu später Mediumwechsel führt durch Übersäuerung zu einem Anstieg apoptotischer, mitosehemmender Zellen. In den hier vorliegenden Untersuchungen wurde das Kulturmedium für die Proliferationsversuche daher in dreitägigem Abstand und für die Versuche zur Differenzierung ab dem 2. Tag ebenfalls in dreitägigem Abstand gewechselt.

Für die hier vorliegende Arbeit war der zeitlich optimale Austausch des Kulturmediums hinsichtlich der ungestörten, interzellulären Wirkung zwischen der Proliferation und Differenzierung von Neuronen und parallel dazu von Astrozyten eminent wichtig, da Untersuchungen gezeigt haben, dass Astrozyten in der Phase der Konfluenz mitogene Faktoren wie EGF, basaler FGF, TGF α und Neurotrophin-3 freisetzen und die Expression von membrangebundenen und synaptischen Rezeptoren fördern (Hatten et al., 1988; Petroski et al., 1991; Gray et al., 1992; Vescovi und Kempermann, 1993; Gritti et al., 1996; Miehe et al., 1996; Morrison et al., 1997; Mayer-Proschel et al., 1997; Gritti et al., 1999; Lim et al., 1999; Lee et al., 2000).

4.2 Zellproliferation

In den in der vorliegenden Arbeit vorgenommenen Proliferationsversuchen an ANSC konnte bei den Berechnungen der Zellzahlen, sowohl bei den viertägigen Kulturen als auch kalkuliert über 24 Tage Kultivierung, ein signifikanter stimulierender Einfluss von CCh und eine Hemmung der Proliferation bei Zugabe von PIR zum Kulturmedium nachgewiesen werden.

In der CCh-Gruppe wurde mit Ausnahme der Zählung am 8. Tag nach Beginn der Kultur ($p = 0,078$) signifikante Steigerungen der Proliferation mit Zellzahlen zwischen $3,94 \pm 0,69$ Mio. und $4,15 \pm 0,48$ Mio. nachgewiesen.

Dagegen bewirkte der Zusatz der parasymphikolytischen Substanz PIR eine signifikante Abnahme der Proliferation am 16. Tag nach Kulturbeginn und hochsignifikante Inhibitionen der Proliferation ($p < 0,01$) am 8., 12. und 24. Tag nach Beginn der Kultur. Diese Effekte konnten bei allen fünf separat getesteten ANSC-Zelllinien beobachtet werden.

Die Ergebnisse dieser Proliferationsversuche stimmen mit Untersuchungen in der Literatur überein, bei denen an Precursorzellen des Hippokampus von 8 bis 12 Wochen alten Ratten sowohl die Muskarinrezeptoren M1, M2, M3 und M4 als auch eine neurogenetische Wirkung von ACh nachgewiesen werden konnte (Ma et al., 2000; Cooper-Kuhn et al., 2004).

Erstmals haben Ma et al. gefunden, dass die embryonale Entwicklung von neuronalen Stammzellen (NSC) in der Ventrikularzone von Ratten über cholinerge Transmitter, insbesondere durch ACh gesteuert wird und dass die Übermittlung der wachstumsregulierenden Signale von der Expression membranständiger, muskarinergen Rezeptoren abhängig ist. In Zellkulturen mit FGF-haltigem Kulturmedium konnte mit der Technik der Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion und zytochemisch die Expression der Muskarinrezeptoren M2-M4 bewiesen werden.

Unter Zugaben von ACh bzw. Carbachol kam es zunächst zu einem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} und zu einer verstärkten Proliferation der embryonalen neuroepithelialen Zellen mit einem erhöhten Gehalt an DNS und bei Zugabe von Atropin wurde dieser cholinerge Effekt supprimiert (Ma et al., 2000).

Der gravierende Einfluss des cholinergen Systems auf die hippokampale Neurogenese wurde ebenfalls von Mohapel et al. in zwei unterschiedlichen Versuchsansätzen bewiesen. Die Applikation des Acetylcholinesterasehemmers Physostigmin mit der dadurch induzierten Verstärkung der ACh-Wirkung führte zur Proliferation von Precursorzellen im GD. Bei Hemmung der cholinergen Impulsgebung an den Hippokampus durch neurotoxische Läsion des medialen Septumsystems mit 192 IgG-Saporin wurde die Proliferation von ANSC gehemmt und führte zu einer Schädigung des Gedächtnisses der Versuchstiere für räumliche Orientierung (Mohapel et al., 2005).

Diese Ergebnisse konnten durch weitere Untersuchungen bestätigt werden, bei denen mit einer Erhöhung der cholinergen Stimulation die Proliferationsrate von ANSC gesteigert und das Überleben der Stammzellen sowohl bei juvenilen als auch adulten Versuchstieren verlängert werden konnte (Van der Borgh et al., 2005; Kaneko et al., 2006; Narimatsu et al., 2009; Itou et al., 2011).

Itou et al. konnten nachweisen, dass eine cholinergische Stimulation einen positiven Effekt auf die Proliferation von NSC sowohl bei jungen Mäusen (8-12 Wochen) als auch bei alten Tieren (>2 Jahre) ausübt. Nach Applikation von cholinergen Substanzen (Eserin, Donepezil) wurde in histologischen Schnitten des GD in beiden Altersgruppen der Effekt der muskarinergen cholinergen Stimulation an einem sofortigen Kalziumanstieg verifiziert, während dieser bei spezifischer Hemmung des septalen cholinergen Systems mit 192 IgG-Saporin ausblieb. Die durch Gedächtnistraining der Tiere induzierte Proliferation von NSC im Hippokampus stieg unter Applikation von Eserin und Donepezil an und fiel nach Zugabe von 192 IgG signifikant ab (Itou et al., 2011).

Hinsichtlich des sympathikomimetischen Einflusses auf die hippokampale Neurogenese haben tierexperimentelle Untersuchungen in der Literatur in Übereinstimmung mit den hier vorliegenden Ergebnissen nachgewiesen, dass die cholinerge Stimulation über muskarinerge, membranständige Acetylcholinrezeptoren einen starken Impuls auf die Steigerung der Proliferationsrate von NSC ausübt. Diese Stimulation ist im Vergleich zu einer pharmakologischen Anregung nikotinerger, ligandenaktivierter Ionenkanäle hinsichtlich des Anstiegs der Proliferationsrate dominierender (van Kampen und Eckman, 2010). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Applikation von reinem Nikotin dosisabhängig die Neurogenese im GD hemmt (Jang et al., 2002; Abrous et al., 2002, 2005).

Neben der stimulierenden Wirkung von EGF, FGF-2 und TGF- α auf die Proliferationsrate von ANSC konnte ein identischer Einfluss bei Erhöhung des Gehalts von IGF-I im Hippokampus adulter Mäuse erzielt werden (Narimatsu et al., 2009). Nach Applikation des AChE-hemmers Donepezil und der damit induzierten Verstärkung des cholinergen Systems kam es zu einer Freisetzung von Calcitonin-Gen-bezogenem Peptid (CGRP) aus Neuronen der dorsalen Wurzelganglien von Wild-Typ-Mäusen und diese Peptidfreisetzung führte zu einer Erhöhung der IGF-I-Konzentration im Hirngewebe. In diesem Tiermodell fanden sich vier Wochen nach oraler Applikation von Donepezil signifikant erhöhte Gewebekonzentrationen von CGRP, IGF-I und IGF-I-mRNA im Hippokampus und in der Testung kognitiver Fähigkeiten wiesen die mit Donepezil behandelten Versuchstiere gegenüber unbehandelten Vergleichsgruppen deutlich bessere Ergebnisse auf. Da die Applikation des ebenfalls als AChE-Hemmer bekannten Tacrin in einer weiteren Versuchsgruppe nicht zu vergleichbaren positiven Resultaten führte, könnte die Ursache zum einen darin liegen, dass Tacrin keine hemmende Wirkung auf AChE besitzt oder die Wirkung von Donepezil vorwiegend über die Freisetzung von IGF-I erfolgt.

Mit 5-Hydroxytryptamin (5-HT) wurde ein weiterer Transmitter in seiner Wirkung auf die Proliferation von ANSC untersucht (Benninghoff et al., 2010).

Benninghoff et al. beobachteten bei Kultivierung von ANSC in EGF- und FGF-2-haltigem serumfreien Kulturmedium eine Expression von Tryptophanhydroxylase (TPH) und 5-HT. Nach selektiver Hemmung von TPH durch Zugabe von Parachlorphenylalanin (PCPA) wurde die Proliferation gehemmt und nach Zugabe von 5-HT zum Kulturmedium konnte die Proliferationshemmung aufgehoben werden. Die proliferative Wirkung von 5-HT erfolgte vorwiegend über den Serotoninrezeptor- Subtyp 5-HT1A und teilweise über den Subtyp 5-HT2C, was durch selektive Rezeptorblockaden bewiesen werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde in den Ergebnissen die depressive Wirkung des parasympathikolytisch wirkenden PIR auf die Proliferation von ANSC ab 8. Tag nach Beginn der Zellkultur nachgewiesen. Untersuchungen mit diesem in vitro Modell liegen bisher in der Literatur nicht vor, jedoch wurden Kultivierungen von ANSC unter Zugabe sympathikomimetischer Substanzen, wie z.B. Atropin, vorgenommen, (Ma et al., 2000). Während die Atropinzugabe eine suppressive Wirkung auf die Proliferation embryonaler NSC und ANSC bewirkte, wurde in einer weiteren Untersuchung nachgewiesen, dass der Neurotransmitter Dopamin die Neurogenese förderte (Höglinger et al., 2004).

4.3 Zellmigration

Die Möglichkeit einer cholinergen Stimulation der Migration von NSC wurde zum Anlass für Untersuchungen, nachdem an migrierenden Sensorneuronen des dorsalen Thalamus von embryonalen Ratten erstmals die Expression von ACh-Rezeptoren nachgewiesen werden konnte (Schlaggar et al., 1993). Mit dem Zusatz von Inhibitoren der AchE wie z.B. Physostigmin und Donepezil gelang in vitro an kultivierten embryonalen spinalen motorischen Neuronen und in vivo an embryonalen Gehirnen von Wild-Typ Mäusen die Stimulation der Migration (Bataille et al., 1998; Dori et al., 2005).

ANSC des Hippokampus migrieren in vivo in Phase III (Migrationsphase) der Neurogenese aus der SGZ in die GZ des GD (Seki, 2002; Bruel-Jungerman et al., 2007; Zhao et al., 2008; Amrein et al., 2009; Lucassen et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde in zwei Kontrollgruppen die Migration von ANSC nach sechsstündiger Inkubation in den Kulturmedien DMEM/F12 und DMEM verglichen. Nach Inkubation von ANSC aus fünf Zellpassagen in Gegenwart von EGF und FGF-2 (DMEM/F12) migrierten

innerhalb von 6h $138,62 \pm 12,43$ Zellen und nach Inkubation im Medium DMEM $2,44 \pm 1,06$ Zellen.

Die Überprüfung des Einflusses von CCh bzw. PIR erfolgte nach sechsständiger Inkubation im Kulturmedium DMEM ohne die Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2. Dabei konnte keine Beeinflussung der Migration nachgewiesen werden. Nach Zugabe von CCh betrug die Zahl migrierter Zellen $3,53 \pm 1,22$ und unter PIR $2,57 \pm 1,04$ Zellen.

Kritisch muss hier bezüglich der Versuche mit CCh und PIR eingeschätzt werden, dass diese Migrationsuntersuchungen, nach Vorliegen der Ergebnisse der Kontrollversuche, im Kulturmedium DMEM/F12 hätten durchgeführt werden müssen, was bei weiteren Versuchsplanungen berücksichtigt werden sollte.

Es wäre möglich, dass die Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 einen stärkeren Einfluss auf die Migration von ANSC ausüben, als die Stimulierung bzw. Hemmung des M1-Muskarinrezeptors mit CCh bzw. PIR. Auch ist zu diskutieren, dass die Kombination EGF, FGF-2 und CCh eine kumulative Anregung der Migration undifferenzierter ANSC bewirkt.

Diese Hypothese konnte in einem weiterführenden Versuch unserer Arbeitsgruppe nach Inkubation von ANSC im Kulturmedium DMEM/F12 und Zugabe von CCh durch den Nachweis einer signifikanten Steigerung der Migration gegenüber den Kontrollen ohne CCh bestätigt werden (Benninghoff et al., 2013).

Die stimulierende Wirkung der Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 auf die Migration undifferenzierter ANSC wurde ebenfalls durch mehrere Untersuchungen in vivo (Kuhn et al., 1997; Doetsch et al., 2002 und in vitro (Gritti et al., 1995, 1999, 2002) bewiesen.

Desweiteren zeigten Untersuchungen eine Stimulierung der Migration nach Zugabe des Neurotransmitters Serotonin (Schmitt et al., 2007; Benninghoff et al., 2007, 2010).

Die Stimulierung des cholinergen Systems und die damit verbundene Erhöhung der Migration und Chemotaxis von ANSC könnte ein relevantes Konzept für neuropharmakologische Interventionen darstellen (Prestoz et al., 2001; Seki, 2002; Corti et al., 2005; Ikegami et al., 2005; Shan et al., 2006).

In diesem Zusammenhang sind Ergebnisse von Untersuchungen von Bedeutung, in denen in vivo nachgewiesen werden konnte, dass die Migration von neugebildeten ANSC aus der SGZ in die GZ des Gyrus dentatus nur teilweise stattfindet. Nur ca. 30 bis 40% migrieren innerhalb von vier Wochen in die GZ und ca. 60 bis 70% neugebildeter ANSC verbleiben in der SGZ (Alvarez-

Buylla et al., 1988, 1990; Kimelberg et al., 1989; Kempermann et al., 2003). Diese „Reserve“ nicht migrierender ANSC könnte durch den Einsatz stimulierender Faktoren therapeutisch genutzt werden.

4.4 Zelldifferenzierung

In der Phase der Migration aus der SGZ beginnt die Differenzierung von ANSC zu Neuronen und diese Differenzierungsphase findet ihren Abschluss in der Granularzone des Gyrus dentatus (Stanfield und Trice, 1988; Kuhn et al., 1996; Hastings und Gould, 1999; Seki, 2002; van Praag et al., 2002; Zhao et al., 2003; Brandt et al., 2003).

Erstmals konnte durch Zheng et al. der Nachweis erbracht werden, dass das cholinerge System, mit Präsenz von ACh und extrazellulärem Ca^{2+} während der embryonalen Entwicklung einen wesentlichen Einfluss auf die neurale Differenzierung ausübt (Zheng et al., 1994).

Zur Überprüfung cholinерger und parasympathikolytischer Einflüsse auf die Differenzierung von NSC wurden in der vorliegenden Arbeit je 160.000 ANSC aus fünf Zelllinien für insgesamt sieben Tage kultiviert. In den ersten 24h erfolgte die Kultivierung im Medium COMP mit EGF und FGF-2, für den 2. Tag in COMP mit FGF-2 und für die weiteren fünf Tage in COMP ohne Wachstumsfaktoren.

In der Kontrollgruppe wurde kein Chemoattraktant eingesetzt und in zwei Behandlungsgruppen enthielt das Kulturmedium 100µM CCh bzw. 50µM PIR.

Für die Identifikation differenzierter Neurone erfolgte eine Immunofluoreszenzmarkierung mit den neuronenspezifischen primären Antikörpern TUJ1 und einem sekundären FITC-Antikörper (monoklonaler Cy3-konjugierter Antikörper).

In der Kontrollgruppe ohne Zusatz von Chemoattraktants waren nach sieben Tagen Kultivierung 15.738 ± 1.952 ANSC zu Neuronen differenziert.

Bei Zusatz von CCh erhöhte sich die Zahl der Neuronen signifikant auf 20.624 ± 2.248 und nach Zugabe von PIR kam es zu einer signifikant geringeren Differenzierung von 13.312 ± 1.792 Neuronen.

Die in den vorliegenden Untersuchungen bei cholinерger und parasympathikolytischer Beeinflussung erzielten Ergebnisse der in vitro Proliferation von ANSC stimmen mit anderen Untersuchungen in der Literatur, in denen ACh bzw. das Analogon CCh beigefügt wurde überein, wobei bisher Untersuchungen an embryonalem und postnatalem Hirngewebe vorgenommen wurden,

und die Versuche in dieser Arbeit erstmals an ANSC erfolgten (Ma et al., 2000; Coronas et al., 2000).

Ma et al. konnten während der Kultivierung embryonaler neuroepithelialer Zellen aus der Ventrikularzone und Zusatz von CCh eine signifikante Zunahme der Differenzierung in Neurone gegenüber Kultivierung ohne CCh-Zugabe beobachten.

Coronas et al. verwendeten in ihren Versuchen an Ratten für die Kultivierung das Modell des Riechkolbens, in dem sich ANSC mit muskarinergen und nikotinergen Rezeptoren befinden und deren Expression in der unmittelbaren postnatalen Periode nachweisbar ist. Nach drei- bis sechstägiger Kultur und Zugabe von 100µM Carbachol konnte ein signifikanter Anstieg des Wachstums von Neuriten an den kultivierten Neuronen nachgewiesen werden. Demgegenüber konnte das neuritische Aussprossen durch die Zugabe des Nikotinrezeptorantagonisten Bungarotoxin, nicht aber mit Atropin unterdrückt werden.

Insbesondere der Muskarin-M1-Rezeptor, der sehr zahlreich an den Somata und Dendriten der CA1-pyramidalen Neuronen und den Körnerzellen des DG exprimiert ist (Levey et al., 1995), besitzt in der cholinergen Beeinflussung der Neurogenese eine dominierende Rolle, wie die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse und Resultate der Literatur gezeigt haben (Gutkind et al., 1998; Ma et al., 2000; Li et al., 2001; Zhao et al., 2003; Mohapel et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit führte die Zugabe von CCh zu einer signifikant höheren Anzahl von aus ANSC differenzierten Neuronen gegenüber der Kultivierung ohne Chemoattraktant und der Zugabe von PIR.

Andere Signal- und Stoffwechselwege, wie z.B. die über Proteinkinasen gesteuerte Signaltransduktion (Aktivierung von Phosphatidylinositol-3-Kinase, Proteinkinase C, Tyrosinkinase Mitogenaktivierte-Protein-2-Kinase, G-Protein gekoppelter Rezeptoren, Wnt/β-catenin signalisierter Pathway), könnten isoliert oder interaktiv zusätzlich an der Steuerung der Neurogenese beteiligt sein (Hirabayashi et al., 2004; Ma et al., 2007; Korur et al., 2009; Zhang et al., 2011; Joksimovic et al., 2012).

Neben dem cholinergen System und der Aktivierung von Proteinkinasen spielen die mitogenen Faktoren EGF und FGF-2 in der Neurogenese eine wichtige Rolle, wobei Untersuchungen ergaben, dass der Einfluss von Mitogenen auf die Differenzierung von Neuronen und Astrozyten in der frühen postnatalen Entwicklung ausgeprägter ist als während der embryonalen Entwicklung (González et al., 1990; Wanaka et al., 1991; Petroski et al., 1991; Ray et al., 1993; Kempermann et al., 1997; Hildebrand et al., 1998).

Desweiteren konnte ein synergistischer Effekt zwischen der Aktivierung von muskarinergen Rezeptoren und der Freisetzung von Wachstumsfaktoren auf die Differenzierungsrate nachgewiesen werden, wobei es nach Zugabe von M-Rezeptoragonisten zu einer dreifachen Freisetzung des nervalen Wachstumsfaktors (NGF) aus kultivierten astroglialen Zellen von acht Tage alten Mäusen kam (Furukawa et al., 1987). In Übereinstimmung mit diesen Resultaten haben Lindholm et al. zeigen können, dass es bei Aktivierung des cholinergen Systems mit dem muskarinergen Agonisten Pilocarpin zu einer verstärkten Freisetzung des zerebralen neurotrophischen Faktors und des NGF aus hippokampalen Neuronen kommt (Lindholm et al., 1994).

Bezug nehmend auf die in der Arbeit vorgenommenen Untersuchungen ist es auf Grund der Ergebnisse aus der Literatur möglich, dass es nach Zufügung von CCh bei Kultivierung von ANSC zu einer Stimulierung der Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus diesen Stammzellen oder aus Precursorzellen kommt. Gestützt wird diese Theorie durch Untersuchungen, bei denen in vitro gezeigt wurde, dass die vermehrte Freisetzung von NGF den Gehalt an muskariner 4-Rezeptor-RNA in Phäochromozytomzellen (PC12) erhöht, was zu einer vermehrten Expression von muskarinergen, membrangebundenen Rezeptoren führt (Lee und Malek, 1998).

Insgesamt könnten die Ergebnisse einer in vitro Stimulierung der Proliferation, Migration und Differenzierung von ANSC des Hippokampus für Therapieansätze bei zerebralen Erkrankungen relevant sein, in denen es durch Reduktion oder Schädigung von Neuronen zu gravierenden Funktionsausfällen kommt, die insbesondere und lokalisationsbedingt kognitive Funktionen betreffen.

Eine Zielgruppe für diese therapeutischen Interventionen stellen Patienten mit Alzheimer Erkrankung (AD) dar.

Untersuchungen haben gezeigt, dass bei AD auf Grund einer verminderten Produktion der rezeptorbezogenen mRNS eine reduzierte Expression des hippokampalen M1-Rezeptors vorliegt und die rezeptorvermittelte Produktion GTP-bindender Protein (G-Proteine) vermindert ist (Wang et al., 1992; Wang und Friedman, 1994). Diese Störungen bei AD sind vorwiegend in der CA1-Region des Ammonshorns lokalisiert (Davies et al., 1992; Fukutani et al., 2000; Kril et al., 2004).

Mit den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen konnte nachgewiesen werden, dass eine cholinerge Stimulation mit CCh die Neurogenese hinsichtlich Proliferation und Differenzie-

rung von ANSC stimuliert, woraus sich eine klinische Relevanz, insbesondere für Patienten mit neurodegenerativen Störungen ergeben könnte.

5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte der Nachweis erbracht werden, dass sich ANSC von Mäusen in Kulturen mit dem Medium DMEM/F12, das die Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 enthält, über sechs Passagen kontinuierlich vermehren und differenzieren. Proliferation und Differenzierung von ANSC wurden durch Zugabe des ACh-Analogons CCh stimuliert und durch PIR, einem parasymphatikolytisch wirkenden M1-Rezeptorhemmer reduziert.

Dieses Modell könnte auf Grund dieser Ergebnisse sowohl für die Therapieoption Transplantation, als auch für die Stimulation einer adulten Neurogenese geeignet sein, wenn durch Hirnerkrankungen oder altersbedingt ein Mangel funktionierender Neurone vorliegt.

Für die Behandlung einer Alzheimer Erkrankung sind Untersuchungsergebnisse relevant, bei denen an Ratten gezeigt werden konnte, dass Fähigkeiten wie Lernvermögen und Gedächtnis in direkter Relation zur Zahl der Neuronen in der CA 1-Region des Hippokampus stehen (Stepanichev et al., 2004; Roberge et al., 2008).

Nachdem vor 30 Jahren eine cholinerge Beeinflussung der Neurogenese bei AD erstmals postuliert wurde (Bartus et al., 1982), gelang es, verschiedene Therapiestrategien hinsichtlich einer cholinergen Stimulation der Neurogenese mit neuropharmakologischer und neurotropher Applikation (Acetylcholinesterase- Inhibitoren, Nervaler Wachstumsfaktor) sowie die Transplantation von cholinergisch-angereicherten fetalen Transplantaten vor 15 Jahren zu entwickeln (Winkler et al., 1998).

Im Fokus der gegenwärtigen Forschung zur Behandlung neurologischer Defizite steht die pharmakologische Beeinflussung der adulten Genese und nahezu parallel zu den hier vorliegenden Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass der Muskarin 1- Rezeptoragonist Oxotremorin eine induzierte, gestörte cholinerge Neurogenese im Tiermodell restauriert (van Kampen und Eckman, 2010).

Von großer Bedeutung für den klinischen Einsatz stimulierender Faktoren der adulten Genese könnte die weitere Abklärung folgender, noch ungelöster Fragestellungen sein:

1. Gelingt mit einer pharmakologischen Stimulation die Restauration aller fünf Phasen der adulten Neurogenese (Proliferations-, Differenzierungs-, Migrations-, Aussprossungs- und Synaptische Phase)?
2. Weisen neugebildete Precursorzellen in vitro dieselben morphologischen und funktionellen Merkmale wie neugebildete Precursorzellen in vivo auf?

Während es gesicherte in vitro und in vivo Erkenntnisse zur cholinergen Stimulation von Proliferation, Differenzierung, dendritischer Aussprossung und Synapsenbildung gibt (van Praag et al., 2002; Ming und Song, 2005; Wenping et al., 2010), stehen die in der vorliegenden Arbeit erbrachten Ergebnisse, die keinen cholinergen Einfluss zur Migration und Chemotaxis nachweisen konnten, nicht in Übereinstimmung zu in vivo Untersuchungen (Prestoz et al., 2001; Seki, 2002; Corti et al., 2005; Ikegami et al., 2005; Shan et al., 2006).

Die Ursache könnte in der Zusammensetzung des verwendeten Kulturmediums DMEM zu suchen sein, welches keine Wachstumsfaktoren (EGF, FGF-2) enthält.

Nachfolgende Untersuchungen sollten daher die Interaktionen zwischen cholinerger Aktivität und Wachstumsfaktoren betreffen. Die Möglichkeit einer Beeinflussung der Migration adulter NSC ist von Bedeutung, da Untersuchungen gezeigt haben, dass lediglich 30 bis 40% der Zellen innerhalb von vier Wochen in die GZ migrieren und ca. 60 bis 70% neugebildeter ANSC in der SGZ verbleiben (Alvarez-Buylla et al., 1988, 1990; Kimelberg et al., 1989; Kempermann et al., 2003). Hier existiert eine therapeutische „Reserve“ von nicht migrierenden ANSC, und diese könnte durch den erfolgreichen Einsatz stimulierender Faktoren therapeutisch genutzt werden.

In diesem Zusammenhang wäre auch eine Überprüfung der Einflussnahme auf Adhäsionsmoleküle von Bedeutung. Während der adulten Neurogenese exprimieren Precursorzellen frühzeitig den neuronalen Marker PSA-NCAM (Polysialiniertes neuronales Zelladhäsionsmolekül), welches die Richtung der Migration steuert (Seki, 2002). Diese Expression erfolgt sowohl an proliferierenden Neuronen als auch an Zellen der Umgebung, insbesondere Gliazellen. Aus dem olfaktorischen System ist bekannt, dass neugeborene Zellen in einem PSA-NCAM-positiven Trakt in einer „kettenähnlichen“ Form neuronaler Migration wandern (Lois et al., 1996).

Zusammenfassend lässt sich zum derzeitige Kenntnisstand der Regulation adulter Neurogenese in vivo und in vitro sagen, dass es sich um ein noch unfertiges Wissensmuster handelt, in dem jedoch wichtige Muster bereits aufgedeckt wurden. Insbesondere ist der Pfad der adulten hippocampalen Neurogenese ein gut einsetz- und steuerbares Modellsystem für die Regulation neuronaler Stammzellen in vivo und in vitro.

Literaturverzeichnis

- Abraham WC, Williams JM 2003 Properties and mechanisms of LTP maintenance. *Neurosci* 9(6): 463-474.
- Abrous DN, Adriani W, Montaron MF, Aurousseau C, Rougon G, Le Moal M, Piazza PV 2002 Nicotine self-administration impairs hippocampal plasticity. *J Neurosci* 22: 3656-62.
- Abrous DN, Koehl M, Le Moal M 2005. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev* 85: 523-69.
- Abrous DN, Wojtowicz JM 2008. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Physiol Rev* 42: 523-69.
- Aimone JB, Wiles J, Gage FH 2009 Computational influence of adult neurogenesis on memory encoding. *Neuron* 61(2): 187-202.
- Alonso M, Viollet C, Gabellec MM, Meas-Yedid V, Olivo-Marin JC, Lledo PM 2006 Olfactory discrimination learning increases the survival of adult-born neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 26:10508-13.
- Altman J, Das GD 1965 Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124: 319-335.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM 2002 Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22(3): 629-634.
- Ambrogini P, Lattanzi D, Ciuffoli S, Agostini D, Bertini L, Stocchi V 2004 Morphofunctional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cells of adult rat dentate gyrus. *Brain Res* 1017: 21-31
- Amrein I, Lipp HP 2009 Adult hippocampal neurogenesis of mammals: evolution and life history. *Biol Lett* 5(1): 141-4.
- Andersen P, Lømo T 1967 Control of hippocampal output by afferent volley frequency. *Prog Brain Res* 27: 400-412.
- Aptowicz CO, Kunkler PE, Kraig RP 2004 Homeostatic plasticity in hippocampal slice cultures involves changes in voltage-gated Na⁺ channel expression. *Brain Res* 998(2): 155-163.
- Aquilonius SM, Eckernas SA 1981 Topographical localization of choline acetyltransferase within the human spinal cord and a comparison with some other species. *Brain Res* 211(2): 329-40.
- Arlotta P, Magavi SS, Macklis JD 2003 Induction of adult neurogenesis: molecular manipulation of neural precursors in situ. *Ann N Y Acad Sci* 991:229-236.
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O 2002 Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8:963-970.
- Aubert I, Cécylre D, Gauthier S, Quirion R 1996. Comparative on to genic profile of cholinergic markers, including nicotinic and muscarinic receptors, in the rat brain. *J Comp Neurol* 369(1): 31-55.
- Bansal A, Singer JH, Hwang BJ, Xu W, Beaudet A, Feller MB 2000 Mice lacking specific nicotinic acetylcholine receptor subunits exhibit dramatically altered spontaneous activity patterns and reveal a limited role for retinal wave in forming ON and OFF circuits in the inner retina. *J Neurosci* 20:7672-81.

- Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS 1982 The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217:408-14.
- Bataille G, Bedard A, Parent A 1998 Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb. *Brain Res Dev* 14(139): 159-168.
- Beblo T, Hartje W, Lahr D 2006 Cognitive performance and subjective complaints before and after remission of major depression. *Cogn Neuropsychiatry* 12(1): 25-45.
- Ben-Ari Y 2002 Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nature. *Nat Rev Neurosci* 3(9): 728-39.
- Benninghoff J, Gritti A, Lamorte G, Schmitt A 2007 Adult neurogenesis in serotonin transporter deficient mice. *J Neural Transm* 79(87): 1107-1118
- Benninghoff J, Gritti A, Rizzi M, Lamorte G, Schloesser RJ 2010 Serotonin depletion hampers survival and proliferation in neurospheres derived from adult neural stem cells. *Neuropsychopharmacology* 34(4): 893-903.
- Benninghoff J, Rauh W, Brantl V, Schloesser RJ, Moessner R, Möller HJ, Rujescu D 2013 Cholinergic impact on neuroplasticity drives muscarinic M1 receptor mediated differentiation into neurons. *World J Biol Psychiatry* 14(3)241-6.
- Benoit BOT, Savarese T, Joly M, Engstrom CM, Pang L, Reilly J, et al. 2001 Neurotrophin channelling of neural progenitor cell differentiation. *J Neurobiol* 46 (4): 893-903.
- Bernier PJ, Bedard A, Vinet J, Levesque M, Parent A 2002 Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. *Proc Natl Acad Sci* 99:11464-69.
- 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.
- Bland MJ, Altman DJ 1995 Multiple significance tests: the Bonferroni method. *BMJ* 310: 170.
- Bliss TVP, Lømo 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.
- Book AA, Wiley RG, Schweitzer JB 1992 Specificity of 192 IgG-saporin for NGF receptor-positive cholinergic basal forebrain neurons in the rat. *Brain Res* 590:350-55.
- Bortz J, Schuster C 2010 Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler. Lehrbuch mit Online-Materialien. 7. Aufl., Springer-Verlag, Heidelberg
- Boyden S 1962 The Chemotactic Effect of Mixtures of Antibody and Antigen on Polymorphnuclear Leucocytes. *J Exper Med* 115: 453-466.
- Boyes BE, Kim SU, Lee V, Sung SC 1986 Immunohistochemical co-localization of S-100b and the glial fibrillary acidic protein in rat brain. *Neurosci* 17: 857-865.
- Braak H, Del Tredici K, Rub U, De Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E 2003 Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24:197-211.
- Brandt MD, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G, Reuter K, Bick-Sander A 2003 Transient calretin in expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci* 24(3): 603-13.
- Bruel-Jungerman E, Davis S, Rampon C, Laroche S 2006 Long-term potentiation enhances neurogenesis in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 26(22): 5888-93.

- Bruel-Jungerman E, Rampon C, Laroche S 2007 Adult hippocampal neurogenesis, synaptic plasticity and memory: facts and hypotheses. *Rev Neurosci* 18(2): 93-114.
- Bruel-Jungerman E, Lucassen PJ, Francis F 2011 Cholinergic influences on cortical development and adult neurogenesis. *Behav Brain Res* 221(2):379-88.
- Brustle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, Duncan ID, McKay RD 1999 Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* 285: 754-756.
- Bundesministerium für Bildung und Forschung <http://www.bmbf.de>
- Cao J, Wenberg K, Cheng MF 2002 Lesion induced new neuron incorporation in the adult hypothalamus of the avian brain. *Brain Res* 943(1): 80-92.
- Cameron HA, Gould E 1994 Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience* 61: 203-209.
- Cameron HA, McKay RD 2001 Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 435(4): 406-17.
- Carlsson A, Lindqvist M 1963 Effect of Chlorpromazine or Haloperidol on Formation of 3Methoxytyramine and Normetanephrine in Mouse Brain. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 20:140-144.
- Chen J, Magavi SS, Macklis JD 2004 Neurogenesis of corticospinal motor neurons extending spinal projections in adult mice. *Proc Natl Acad Sci* 101:16357-16362.
- Citri A, Malenka RC 2008 Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacology Reviews* 33: 18-41.
- Clelland CD, Choi M, Romberg C, Clemenson Jr GD, Fagniere A, Tyers P 2009 A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* 325(5937): 210-3.
- Cobb SR, Davies CH 2005 Cholinergic modulation of hippocampal cells and circuits. *J Physiol* 562: 81-8.
- Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Kuhn HG 2004 Decreased neurogenesis after cholinergic forebrain lesion in the adult rat. *J Neurosci Res* 77: 155-165.
- Coronas V, Durand M, Chabot JG, Jourdan F, Quirion R 2000. Acetylcholine induces neuritic outgrowth in rat primary olfactory bulb cultures. *Neurosci* 98(2): 213-219.
- Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, Donadoni C, Del Bo R 2005 Multipotentiality, homing properties, and pyramidal neurogenesis of CNS-derived LeX(ssea1)+/ CXCR4+ stem cells. *Faseb J* 19(13): 1860-62.
- Crespel A, Rigau V, Coubes P, Rousset MC, Okano H, Baldy-Moulinier M, Bockaert J, Lerner-Natoli M 2005 Increased number of neural progenitors in human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 19(3): 436-450.
- Dale HH 1914 The action of certain esters and ethers of cholin and their relation to muscarine. *J Pharmacol* 6: 147-190.
- Daoudal G, Debanne D 2003 Long-term plasticity of intrinsic excitability: learning rules and mechanisms. *Learn Mem* 10(6): 456-465.

- Davies DC, Horwood N, Isaacs SL, Mann DM 1992 The effect of age and Alzheimer's disease on pyramidal neuron density in the individual fields of the hippocampal formation. *Acta neuropathologica* 83(5): 510-517.
- Deng W, Aimone, JB, Gage FH 2010 New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11: 339-350.
- Desai NS, Rutherford LC, Turrigiano GG 1999 Plasticity in the intrinsic excitability of cortical pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 2(6):515-520.
- Dexter TM, Testa NG 1976 Differentiation and proliferation of hemopoietic cells in culture. *Methods Cell Biol* 14:387-405.
- Dityatev A, Schachner M 2003 Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 4:456-468.
- Dickinson-Anson H, Winkler J, Fisher LJ, Song HJ, Poo M, Gage FH 2003 Acetylcholine-secreting cells improve age-induced memory deficits. *Mol Ther* 8(1): 51-61.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Verdugo JMG 2002 Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 16(247): 703-716.
- Dori A, Cohen J, Silverman WF, Pollack Y, Soreq H 2005. Functional manipulations of acetylcholinesterase splice variants highlight alternative splicing contributions to murine neocortical development. *Cereb Cortex* 15(4): 419-430.
- Dori A, Soreq H 2006 The cleavable C-terminal peptide of "readthrough" acetylcholinesterase, promotes neuronal development and plasticity. *J Mol Neurosci* 28(3): 247-55.
- Dranovsky A, Hen R 2006 Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. *Biol Psychiatry* 59(12):1136-43.
- Dulbecco R, Freeman G 1959 Plaque production by the polyoma virus. *Virology* 8: 396-397.
- Dupret D, Fabre A, Döbrössy MD, Panatier A, Rodríguez JJ, Lamarque S 2007 Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons *PLoS Biol* 5(8): e214.
- Eckenhoff MF, Rakic P 1984 Radial organization of the hippocampal dentate gyrus: a Golgi, ultrastructural, and immunocytochemical analysis in the developing rhesus monkey. *J Comp Neurol* 223(1): 1-21.
- Emsley JG, Mitchell BD, Kempermann G, Macklis JD 2005 Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. *Progr Neurobiol* 75(5): 321-41.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH 1998 Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine* 4:1313-17.
- Esposito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ 2005 Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci* 25: 1074-86.
- Feuerstein TJ, Dooley DJ 1990 Inhibition of norepinephrine and acetylcholine release from human neocortex by omega-conotoxin GVIA. *J Pharmacol Exp Ther* 252(2): 778-85.
- Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, Yamaguchi M, Kettenmann H, Kempermann G 2003 Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 23: 373-382.

- Fischer AJ, Dirks BD, Reh TA 2002 Exogenous growth factors induce the production of ganglion cells at the retinal margin. *Development* 129: 2283-91.
- Forth W, Henschler D, Rummel W 2001 Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban & Fischer Verlag München Jena 111-124.
- Freshney RI. Culture of animal cells. 5.Ed. New Jersey, Wiley, 2005 pp. 120-128.
- Frick A, Johnston D 2005 Plasticity of dendritic excitability. *J Neurobiol* 64(1): 100-115.
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS 1970 The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3(4):393-403.
- Frielingsdorf H, Schwarz K, Brundin P, Mohapel P 2004 No evidence for newdopaminergic neurons in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci* 101:10177-10182.
- Fukuda S, Kato F, Tozuka Y, Yamaguchi M, Miyamoto Y, Hisatsune T. 2003 Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci* 23(28):9357-66.
- Fukutani Y, Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH 2000 Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 13(397): 1313-17.
- Furukawa S, Furukawa Y, Satoyoshi E, Hayashi K 1987 Synthesis/secretion of nerve growth factor is associated with cell cultured mouse astroglial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 142(2): 395-402.
- Gage FH 2000. Mammalian neural stem cells. *Science*. 27(196): 1433-1438.
- Gale GD, Anagnostaras SG, Fanselow MS 2001 Cholinergic modulation of pavlovian fear conditioning: effects of intrahippocampal scopolamine infusion. *Hippocampus* 11(4): 371-6.
- Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV 2004 GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* 7(11):1233-41.
- Garthe A, Behr J, Kempermann G 2009 Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS One* 4(5): e5464.
- 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(7076): 589–93.
- Ge S, Sailor KA, Ming GL, Song H 2008 Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus. *J Physiol*. 586(16):3759-65.
- 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* 80: 2390-94.
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ 1999 Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 2: 260-5.
- Gómez-Lira G, Trillo E, Ramírez M, Asai M, Sitges M, Gutiérrez R 2002 Expression of GABAergic transmission in the mossy fibre synapse coincides with the seizure-induced expression of GABA in mossy fibre synaptosomes. *Exp Neurol* 177: 276-283.
- Gold PE 2003 Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. *Neurobiol Learn Mem* 80(3): 194-210.

- González A, Dao L 1990 Physical exercise induces FGF-2 and its mRNA in the hippocampus. *Brain Res* 26(628): 1-8.
- Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LAM, 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: 2492-98.
- Gray CW, Patel AJ 1992. Characterization of a neurotrophic factor produced by cultured astrocytes involved in the regulation of subcortical cholinergic neurons. *Brain Res* 72(972): 257-265.
- Greengard P, McAfee DA 1972 Adenosine 3':5'-cyclic monophosphate as a mediator in the action of neurohumoral agents. *Biochem Soc Symp* 36: 87-102.
- Gritti A, Cova L, Parati EA, Galli R, Vescovi AL 1995. Basic fibroblast growth factor supports the proliferation of epidermal growth factor-generated neuronal precursor cells of the adult mouse CNS. *Neuroscience letters* 185(3): 151- 154.
- Gritti A, Parati EA, Cova L, Frolichsthal P, Galli R, Wanke E, Faravelli L, Morassutti DJ, Roisen F, Nickel DD, Vescovi AL 1996 Multipotential stem-like cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* 16: 1091-1100.
- Gritti A, Mainville L, Mancina M, Jones BE 1998. GABAergic and other non cholinergic basal forebrain neurons, together with cholinergic neurons, project to the mesocortex and isocortex in the rat. *J Comp Neurol* 383(2): 163-77.
- Gritti A, Cova L, Parati EA, Galli R, Vescovi AL 1999. Basic fibroblast growth factor supports the proliferation of epidermal growth factor-generated neuronal precursor cells of the adult mouse CNS. *Neurosci Lett* 37(203): 151-154.
- Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F, Caille I, Alvarez-Buylla A, Lim DA, Galli R, Verdugo JM, Herrera DG, Vescovi AL 2002 Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci* 22 (2): 437-45.
- Gross RE, Mehler MF, Mabie, PC, Zang Z, Santschi L, Kessler JA 2002 Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron* 17 (4): 595-606.
- Guizzetti M, Moore NH, Giordano G, Costa LG 2008 Modulation of neuritogenesis by astrocyte muscarinic receptors. *J Biol Chem* 283(46): 31884-97.
- Gutiérrez R, Romo-Parra R, Maqueda J, Vivar C, Ramírez M, Morales MA, Lamas M 2003 Plasticity of the GABAergic phenotype of the "glutamatergic" granule cells of the rat dentate gyrus. *J Neurosci* 23: 5594-98.
- Gutkind JS 1998. Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene* 17(11Rev): 1331-1342.
- Hack MA, Saghatelian A, de Chevigny A, Pfeifer A, Ashery-Padan R, Lledo PM, Götz M 2005 Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nat Neurosci* 8: 865-872.
- Ham R G 1965 Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, synthetic medium. *PNAS* 53: 288-293.
- Hartfuss E, Galli R, Heins N, Gotz M 2001 Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev Biol* 229: 15-30.

- Hasselmo ME 2006 The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol* 16(6): 710-15.
- Hatten ME, Mason CA, Edmondson JC 1988 The extending astroglial process: development of glial cell shape, the growing tip, and interactions with neurons. *J Neurosci* 8(9): 3124-34.
- Hattiangady B, Shetty AK 2012 Neural Stem Cell Grafting Counteracts Hippocampal Injury-Mediated Impairments in Mood, Memory, and Neurogenesis. *Stem Cells Trans Med* 1:696-708.
- Hebb DO 1949 *The Organization of Behavior: a neuropsychological theory*. Verlag Wiley, New York.
- Hildebrand G, Sulli A, Packard MG 1997 The dopaminergic mesencephalic projections to the hippocampal formation in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 21(1):1-22.
- Hildebrand G, Verney C, Innocenzi R, Campana E, Pacitti C 1998 Mesolimbic dopaminergic neurons innervating the hippocampal formation in the rat: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study. *Brain Res* 668:71-79.
- Hirabayashi Y, Itoh Y, Tabata H, Nakajima K, Akiyama T, Masuyama N, Yukiko Gotoh, Y 2004 The Wnt/ β -catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development div. biol org* 131: 2791-2801.
- Höglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I, Hirsch CE 2004 Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nature Neuroscience* 7: 726 -735.
- Horner PJ, Power AE, Kempermann G, Kuhn HG, Palmer TD, Winkler J et al. 2000 Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *J Neurosci* 20:2218-28.
- Hu BJ, Zhang SC 2010 Directed differentiation of neural-stem cells and subtype-specific neurons from hESCs. *Methods Mol Biol* 636: 123-137.
- Huether G, Doering S, Ruger U, Ruther E, Schussler G 1999 The stress-reaction process and the adaptive modification and reorganization of neuronal networks. *Psychiatry Res* 87:83-95.
- Huot P, Lévesque M, Parent A 2007 The fate of striatal dopaminergic neurons in Parkinson's disease and Huntington's chorea. *Brain* 130: 222-232.
- Ikegami T, Nakamura M, Yamane J, Katoh H, Okada S 2005 Chondroitinase combined with neural stem/progenitor cell transplantation enhances graft cell migration and outgrowth of growth-associated protein-43-positive fibers after rat spinal cord injury. *Europ J Neurosci* 12: 3036-46.
- Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Takao K, Miyakawa T, Yamaguchi M 2008 Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci* 11(10): 1153-61.
- Islam MR, Moriguchi S, Tagashira H, Fukunaga K 2014 Rivastigmine improves hippocampal neurogenesis and depression-like behaviors via 5-HT_{1A} receptor stimulation in olfactory bulbectomized mice. *Neuroscience* 272: 116-130.
- Itou Y, Nochi R, Kuribayashi H, Saito Y, Hisatsune T 2011 Cholinergic activation of hippocampal neural stem cells in aged dentate gyrus. *Hippocampus* 21(4):446-59.

- Jagasia R, Song H, Gage FH, Lie DC 2006 New regulators in adult neurogenesis and their potential role for repair. *Trends Mol Med* 12: 400-405.
- Jang JW, Shin MC, Jung SB, Lee TH, Bahn GH 2002 Alcohol and nicotine reduce cell proliferation and enhance apoptosis in dentate gyrus. *Neuroreport* 154(12): 1509-1513.
- Jessberger S, Clark RE, Broadbent NJ, Clemenson Jr GD, Consiglio A, Lie DC 2009 Dentate gyrus-specific knock down of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats. *Learn Mem* 16(2): 147-54.
- Jin K, Peel AL, Mao XO, Xie L, Cottrell BA, Henshall DC, Greenberg DA 2004 Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Nat Acad Sci* 101: 343-347.
- Joksimovic M, Patel M, Taketo MM, Johnson R, Awatraman R 2012 Ectopic Wnt/Beta-Catenin Signaling Induces Neurogenesis in the Spinal Cord and Hindbrain Floor Plate. *PLoS ONE* 7(1): e30266.
- Karmarkar UR, Buonomano DV 2006 Different forms of homeostatic plasticity are engaged with distinct temporal profiles. *Eur J Neurosci* 23(6): 1575-1584.
- Kandel ER, Spencer WA 1968 Cellular neurophysiological approaches in the study of learning. *Physiol Rev* 48: 65-134.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM 1996 *Neurowissenschaften: eine Einführung*. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg.
- Kandel ER 2001 The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. *Biosci Rep* 21:565-611.
- Kaneko N, Okano H, Sawamoto K 2006 Role of the cholinergic system in regulating survival of new born neurons in the adult mouse dentate gyrus and olfactory bulb. *GenesCells* 11(10): 1145-59.
- Kaplan MS, Hinds JW 1977 Neurogenesis in the Adult Rat: Electron Microscopic Analysis of Light Radioautographs. *Science* 197 (4308): 1092-94.
- Katz B 1969 *The Release of Neural Transmitter substances*. University Press, Liverpool.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 29(386): 493-5.
- Kempermann G, Gage FH 1999 Experience-dependent regulation of adult hippocampal neurogenesis: effects of long-term stimulation and stimulus withdrawal. *Hippocampus* 9: 321-332.
- Kempermann G, Kronenberg G 2003a Depressed new neurons-adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. *Biol Psychiatry* 54:499-503.
- Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH 2003b Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* 34(52): 391-399.
- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G 2004 Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 25(8): 447-52.
- Kempermann G 2008a *Neue Zellen braucht der Mensch. Die Stammzellforschung und die Revolution der Medizin*. Piper Verlag, München.
- Kempermann G 2008b The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for?. *Trends Neurosci* 31(4):163-9.

- Kempermann G 2012 Neuroscience. Youth culture in the adult brain. *Science* 335(6073):1175-6.
- Kish SJ, Olivier A 1988 Increased activity of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in actively epileptic human cerebral cortex. *Epilepsy Res* 2(4): 227-31.
- Koch HJ, Haas S, Jurgens T 2005 On the physiological relevance of muscarinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease. *Curr Med Chem* 12(24): 2915-21.
- Kokoeva MV, Yin H, Flier JS 2005 Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 310: 679-683.
- Kornack DR, Rakic P 1999 Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the macaque monkey. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 5768-73.
- Korur S, Huber RM, Sivasankaran B, Petrich M, Morin P, Hemmings BA, Merlo A, Lino MM 2009 GSK3beta regulates differentiation and growth arrest in glioblastoma. *PLoS ONE* 4, e7443.
- Kotani S, Yamauchi T, Teramoto T, Ogura H 2006 Pharmacological evidence of cholinergic involvement in adult hippocampal neurogenesis in rats. *Neurosci* 142(2): 505-14.
- Kril J, Hodges, J, Halliday G. 2004. Relationship between hippocampal volume and CA1 neuron loss in brains of humans with and without Alzheimer's disease. *Neuroscience letters* 142(1-3): 9-12.
- Kruskal WH, Wallis WA 1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J Amer Stat Ass* 47:583-621.
- 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: 2027-33.
- Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH 1997. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* 17(15): 5820-29.
- Lamas M, Gómez-Lira G, Gutiérrez R 2001 Vesicular GABA transporter mRNA expression in the dentate gyrus and in mossy fibre synaptosomes. *Mol Brain Res* 93: 209-214.
- Lara S, Beltrán J, Segovia J, Gutiérrez R, 2012 Granule cells born in the adult rat hippocampus can regulate the expression of GABAergic markers. *Exper Neurol*. 237: 134-141.
- Lee MK, Tuttle JB, Rebhun LI, Cleveland DW, Frankfurter A 1990 The expression and posttranslational modification of a neuron-specific β -tubulin isotype during chick embryogenesis. *Cell Motil Cytoskeleton* 17: 118-132.
- Lee NH, Malek RL 1998 Nerve growth factor regulation of m4 muscarinicreceptor mRNA stability but not gene transcription requires mitogen-activated protein kinase activity. *J Biol Chem* 273(35): 22317-25.
- Lee JC, Mayer-Proschel M, Rao MS 2000 Gliogenesis in the central nervous system. *Glia* 74(32): 105-12.
- Lee MG, Hassani OK, Alonso A, Jones BE 2005 Cholinergic basal forebrain neuron burst with theta during waking and paradoxical sleep. *J Neurosci* 25: 4365-69.
- Levison WW, Chuang C, Abramson BJ, Goldman JE 1993 The migrationel patterns and developmental fates of glial precursors in the rat subventricular zone are temoraly regulated. *Development* 119: 611-22.

- Levitt P, Rakic P 1980 Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J Comp Neurol* 193(3): 815-40.
- Li BS, Ma W, Zhang L, Barker JL, Stenger DA, Pant HC 2001 Activation of phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) and extracellular regulated kinases (Erk1/2) is involved in muscarinic receptor-mediated DNA synthesis in neural progenitor cells. *J Neurosci* 21(15): 5669-79.
- Li W, Sun X, Wang Z, Li R, Li L 2010 The effect of nerve growth factor on differentiation of corneal limbal epithelial cells to conjunctival goblet cells in vitro. *Mol Vis* 16: 2739-2744.
- Lie DC, Dziewczapolski G, Willhoite AR, Kaspar BK, Shults CW, Gage FH 2002 The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *J Neurosci* 22:6639-6649.
- Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Desire L, Mira H, Consiglio A et al. 2005 Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* 437:1370-1375.
- Lim DA, Alvarez-Buylla A 1999 Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 96(15): 8376-81.
- Lindholm D, da Penha Perzaghi M, Cooper J, Thoenen H, Castrén E 1994 Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4 increase neurotrophin-3 expression in the rat hippocampus. *Int J Dev Neurosci* 12(8): 745-51.
- Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR 1998 Increased neurogenesis in the dentate gyrus transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci* 18: 7768-78.
- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS 2006 Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 7:179-193.
- Loewi O 1921 Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. I, Mitt. *Pflügers Arch ges Physiol* 189: 239-242.
- Lohmann C, Myhr KL, Wong RO 2002 Transmitter-evoked local calcium release stabilizes developing dendrites. *Nature* 418:177-181.
- Lois C, Alvarez-Buylla A 1994 Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145-48.
- Lois C, Garcia-Verdugo J-M, Alvarez-Buylla A 1996 Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271: 978-981.
- Lømo T 1966 Frequency potentiation of excitatory synaptic activity in the dentate area of the hippocampal formation. *Acta Physiol Scand* 68 (Suppl 277): 128.
- Lucas-Meunier E, Fossier P, Baux G, Amar M 2003 Cholinergic modulation of the cortical neuronal network. *Pflügers Arch* 446: 17-29.
- Lucassen PJ, Meerlo P, Naylor AS, van Dam AM, Dayer AG, Fuchs E 2010 Regulation of adult neurogenesis by stress, sleep disruption, exercise, and inflammation: Implications for depression and antidepressant action. *Eur Neuropsychopharmacol* 20(1): 1-17.
- Luskin MB 1998 Neuroblasts of the postnatal mammalian forebrain: their phenotype and fate. *J Neurobiol* 36:221-233.
- Luzzati F, De MS, Fasolo A, Peretto P 2006 Neurogenesis in the caudate nucleus of the adult rabbit. *J Neurosci* 26:609-621.

- Ma W, Maric D, Li BS, Hu Q, Andreadis JD, Grant GM 2000 Acetylcholine stimulates cortical precursor cell proliferation in vitro via muscarinic receptor activation and MAP kinase phosphorylation. *Eur J Neurosci* 12(4): 1227-40.
- Ma C, Wang J, Gao Y, Gao TW, Chen G, Bower KA, Odetallah M, Ding L, Ke Z, Luo J 2007 The role of glycogen synthase kinase 3 β in the transformation of epidermal cells. *Cancer Res* 67: 7756-64.
- Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD 2000 Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 405:951-955.
- Malberg JE, 2004 Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action. *J Psych Neurosci* 29: 196-205.
- Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H 2004 Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429(6993): 761-766.
- Mayer-Proschel M, Kalyani AJ, Mujtaba T, Rao MS 1997 Isolation of lineage-restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells. *Neuron* 19(4):773-85.
- Mesulam MM 1996 The systems-level organization of cholinergic innervation in the human cerebral cortex and its alterations in Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* 109: 285-97.
- McKinney M 2005 Brain cholinergic vulnerability: relevance to behaviour and disease. *Biochem Pharmacol* 70: 1115-24.
- Miehe M, Morrison S, Uchida N, Weissmann I 1996. The biology of haematopoietic stem cells. *Ann Rev Cell Dev Biol* 76(509): 35-71.
- Mineur YS, Belzung C, Crusio WE 2007 Functional implications of decreases in neurogenesis following chronic mild stress in mice. *Neuroscience* 150(2): 251-59.
- Ming GL, Song H 2005 Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 28:223-50.
- Minger SL, Esiri MM, McDonald B, Keene J, Carter J, Hope T et al. 2000 Cholinergic deficits contribute to behavioral disturbances in patients with dementia. *Neurology* 55: 1460-67.
- Mohapel P, Leanza G, Kokaia M, Lindvall O 2005 Forebrain acetylcholine regulates adult hippocampal neurogenesis and learning. *Neurobiology of aging* 26(6): 939-946.
- Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ 1997 Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 88(3): 287-98.
- Mufson EJ, Ma SY, Cochran EJ, Bennett DA, Beckett LA, Jaffar S, Saragovi HU, Kordower JH 2000 Loss of nucleus basalis neurons containing trkA immunoreactivity in individuals with mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* 427(1): 19-30.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM 1992 NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116: 201-211.
- Nagerl UV, Eberhorn N, Cambridge SB, Bonhoeffer T 2004 Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron* 44(5): 759-767.
- Nakagawa E, Aimi Y, Yasuhara O, Tooyama I, Shimada M, McGeer PL, Kimura H 2000 Enhancement of progenitor cell division in the dentate gyrus triggered by initial limbic seizures in rat models of epilepsy. *Epilepsia* 41(1): 10-18.

- Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N et al. 2002 Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 110:429-441.
- Narimatsu N, Harada N, Kurihara H, Nakagata N, Sobue K 2009 Donepezil improves cognitive function in mice by increasing the production of insulin-like growth factor-I in the hippocampus. *Journal Pharmacol Exper Therap* 330(1): 2-12.
- Neuringer M, Palackal T, Kujawa M, Moretz RC, Sturman JA 1990 Visual cortex development in rhesus monkeys deprived of dietary taurine. *Prog Clin Biol Res* 351: 415-422.
- Nottebohm F 1981 A brain for all seasons: cyclical anatomical changes in song control areas of the songbird brain. *Science* 214:1368-70.
- Oddo S, LaFerla FM 2006 The role of nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease. *J Physiol* 99(2-3): 172-79.
- Palmer TD, Ray J, Gage FH 1995 FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci* 6: 474-486
- Palumbo A, García-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A 1998 Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 28(296): 223-250.
- Parent JM, Lowenstein DH 2002 Seizure-induced neurogenesis: are more new neurons good for an adult brain? *Prog Brain Res* 135:121-31.
- Parent JM, Vexler ZS, Gong C, Derugin N, Ferriero DM 2002 Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann Neurol* 52 (6): 802-813.
- Parent JM 2003 injury-induced neurogenesis in the adult mammalian brain. *Neuroscientist* 9: 261-272.
- Parent JM, Elliot RC, Pleasure SJ, Barbaro NM, Lowenstein DH, 2006 Aberrant Seizure-Induced Neurogenesis in Experimental Temporal Lobe Epilepsy. *Ann Neurol* 59: 81-91.
- Paton JA, Nottebohm F 1984 Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science* 225: 1046-48.
- Pencea V, Bingaman KD, Freedman LJ, Luskin MB 2001 Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. *Exp Neurol* 172:1-16.
- Petroski A, Parent J M, Yu TW 1991. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 86(620): 3727-3738.
- Ponti G, Peretto P, Bonfanti L 2006 A subpial, transitory germinal zone forms chains of neuronal precursors in the rabbit cerebellum. *Dev Biol* 294:168-180.
- Power AE, Vazdarjanova A, McGaugh JL 2003 Muscarinic cholinergic influences in memory consolidation. *Neurobiol Learn Mem* 80(3): 178-93.
- Prestoz L, Relvas JB, Hopkins K, Patel S, Sowinski P 2001 Association between integrin-dependent migration capacity of neural stem cells in vitro and anatomical repair following transplantation. *Mol Cell Neurosci* 18(5): 473-484.
- Ragozzino ME, Unick KE, Gold PE 1996 Hippocampal acetylcholine release during memory testing in rats: augmentation by glucose. *Proc Nat Acad Sci* 93(10): 4693-4698.

- Ramón y Cajal S 1894 "The Croonian Lecture: La Fine Structure des Centres Nerveux". Proc R Soc 55 (331-335): 444-468.
- Rakic P 1985 Limits of Neurogenesis in Primates. Science 227: 1054-56.
- Ramírez M, Gutiérrez R 2001 Activity-dependent expression of GAD67 in the granule cells of the rat hippocampus. Brain Res 917: 139-146.
- Ray J, Peterson DA, Schinstine M, Gage FH 1993. Proliferation, differentiation, and longterm culture of primary hippocampal neurons, Proc Natl Acad Sci USA 98(450): 3602-3606.
- Reynolds IJ, Wagner JA 1986 Brain voltage-sensitive calcium channel subtypes differentiated by omega-conotoxin fraction GVIA. Proc Natl Acad Sci 83(22): 8804-7.
- Reynolds BA, Weiss S 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. Science (New York, NY.) 255(5052): 1707-1710.
- Roberge MC, Messier C, Staines WA, Plamondon H 2008 Food restriction induces long-lasting recovery of spatial memory deficits following global ischemia in delayed matching and non-matching-to-sample radial arm maze tasks. Neurosci 156: 11-29.
- Roessmann U, Velasco ME, Sindely SD, Gambetti P 1980 Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in ependymal cells during development. An immunocytochemical study. Brain Research 200 (1): 13-21.
- Roy NS, Wang S, Jiang L, Kang J, Benraiss A, Harrison-Restelli C, Fraser RA, Couldwell WT, Kawaguchi A, Okano H, Nedergaard M, Goldman SA 2000 In vitro neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. Nat Med 6: 271-77.
- Safilina VF, Fattorini G, Conti F, Cherubini E 2006 GABAergic signaling at mossy fiber synapses in neonatal rat hippocampus. J Neurosci 26: 597-608.
- Sato A, Sato Y, Uchida S 2004 Activation of the intracerebral cholinergic nerve fibres originating in the basal forebrain increases regional cerebral blood flow in the rat's cortex and hippocampus. Neurosci Lett 361: 90-93.
- Schaeffer EL, Novaes BA, daSilva ER, Skaf HD, Mendes-Neto AG 2009 Strategies to promote differentiation of newborn neurons into mature functional cells in Alzheimer brain. Prog Neuropsych Biol Psychiatry 33(7): 1087-102.
- Schlaggar M, Reynolds BA, Rietze RL 1993 Neural stem cells and neurospheres-reevaluating the relationship. Nat Methods 23(5): 333-336.
- Schliebs R, Arendt T 2006 The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. J Neural Transm 113(11): 1625-44.
- Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J 2004 Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. Nature 429:184-187.
- Schmitt A, Benninghoff J, Moessner R, Rizzi M, Paizanis E, Doenitz C 2007 Adult neurogenesis in serotonin transporter deficient mice. J Neural Transm 114(9): 1107-19.
- Seki T 2002 Hippocampal adult neurogenesis occurs in a microenvironment provided by PSA-NCAM-expressing immature neurons. J Neurosci Res 69(6): 772-83.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM et al. 2001. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. J Neurosci 22(608): 7153-60.

- Shan X, Chi L, Bishop M, Luo C, Lien L, Zhang Z 2006 Enhanced de novo neurogenesis and dopaminergic neurogenesis in the substantia nigra of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease-like mice. *Stem Cells* 24(5): 1280-87.
- Sherrington CS. The integrative action of the nervous system. Verlag Charles Scribner's Sons: New York, 1906.
- Shivaraj MC, Marcy G, Low G, Ryu JR, Zhao X, Rosales FJ, Goh, ELK 2012 Taurine Induces Proliferation of Neural Stem Cells and Synapse Development in the Developing Mouse Brain. *PLoS One* 7(8): e42935.
- Sommer I, Schachner M 1981 Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytochemical study in the central nervous system. *Dev Biol.* 83(2):311-27.
- Soriano E, Del Rio JA 1991 Simultaneous immunocytochemical visualization of bromodeoxyuridine and neural tissue antigens. *J Histochem Cytochem* 39: 255-263.
- Steiner B, Kronenberg G, Jessberger S, Brandt MD, Reuter K, Kempermann G. 2004 Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia* 46(1):41-52.
- Stepanichev MY, Zdobnova IM, Zarubenko I, Moiseeva Y, Lazareva NA, Onufriev MV 2004 Amyloid-beta(25-35)-induced memory impairments correlate with cell loss in rat hippocampus. *Physiol Behav* 80(5): 647-655.
- Sturman JA, Moretz RC, French JH, Wisniewski HM 1985 Taurine deficiency in the developing cat: persistence of the cerebellar external granule cell layer. *J Neurosci Res* 13: 405-416.
- Stryer L 1994. Biochemie. Oxford, Spektrum Akademischer Verlag.
- Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness VS, 1992 BUdR as an S-phase marker for quantitative studies of cytokinetic behaviour in the murine cerebral ventricular zone. *J Neurocytol* 21: 185-197.
- Talorete TPN, Bouaziz M, Sayadi S, Isoda H 2006 Influence of medium type and serum on MTT reduction by flavonoids in the absence of cells. *Cytotechnology* 52: 189-198.
- Temple S 2001 The development of neural stem cells. *Nature* 414(6859): 112-117.
- Toni N, Laplagne DA, Zhao C, Lombardi G, Ribak CE, Gage FH 2008 Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat Neurosci* 11(8): 901-7.
- Trepel M 2011 Neuroanatomie, Struktur und Funktion. 5. Aufl. Verlag: Elsevier, München; Urban & Fischer.
- Tropepe V, Craig CG, Morshead CM, van der Kooy D 1997 Transforming growth factor-alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *J Neurosci* 20: 7850-59.
- Trouche S, Bontempi B, Rouillet P, Rampon C 2009. Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. *Proc Natl AcadSci USA* 106(14): 5919-24.
- Turrigiano GG, Leslie KR, Desai NS, Rutherford LC, Nelson SB 1998. Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* 391: 892-896.
- van der Borgh K, Mulder J, Keijser JN, Eggen BJ, Luiten PG, Van der Zee EA 2005 Input from the medial septum regulates adult hippocampal neurogenesis. *Brain Res Bull* 67: 117-25.

- van Eckman CB 2010 Agonist-induced restoration of hippocampal neurogenesis and cognitive improvement in a model of cholinergic denervation. *Neuropharmacology* 58(6):921-29.
- van Praag H und Christie B 1999 Running enhances neurogenesis, learning and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci* 62(609): 13427-31.
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH 2002 Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415: 1030-4.
- Veena J, Shankaranaravana Rao BS, Srikumar BN 2011 Regulation of adult neurogenesis in the hippocampus by stress, acetylcholine and dopamine. *J Nat Sci Biol Med* 2(1): 26–37.
- Vescovi K, Kempermann G 1993 Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 82(560): 266-270.
- Wachs FP, Couillard-Despres S, Engelhardt M, Wilhelm D, Ploetz S, Vroemen M, Kaesbauer J, Uyanik G, Klucken J, Karl C, Tebbing J, Svendsen C,
- Weidner N, Kuhn HG, Winkler J, Aigner L 2003 High Efficacy of Clonal Growth and Expansion of Adult Neural Stem Cells. *Lab Invest* 83: 949-962.
- Walford RL, Gallagher R, Sjaarda JR 1964 Serologic typing of human lymphocytes with immune serum obtained after homografting. *Science* 144:868-870.
- Wanaka X, Shi M, Chen LW, Cao R, Zhang P, Chan YS 1991. Nestin containing cells express glial fibrillary acidic protein in the proliferative regions of central nervous system of postnatal developing and adult mice. *Brain Res* 73(51): 9-17.
- Wang LP, Zhu S, Mash DC 1992 Comparison of the concentration of messenger RNA encoding four muscarinic receptor subtypes in control and Alzheimer brains. *Brain research* 16(1-2): 64-70.
- Wang LP, Friedman E 1994 Receptor-mediated activation of G proteins is reduced in postmortem brains from Alzheimer's disease patients. *Neuroscience letters* 173(1-2): 37-39.
- Warner-Schmidt JL, Duman RS 2006 Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus* 16:239-249.
- Weickert CS, Blum M 1995 Striatal TGF- α : postnatal developmental expression and evidence for a role in the proliferation of subependymal cells. *Brain Res Dev Brain Res* 86: 203-16.
- Wenping Z, Yao- Fang T, Harold L, Atwood H 2010 Biphasic effects of the dentate gyrus of the mammalian hippocampus. *Neuroscience Letters* 17(39): 157- 160.
- Wiltout C, Lang B, Yan Y, Dempsey RJ, Vemuganti R 2007 Repairing brain after stroke: A review on post-ischemic neurogenesis. *Neurochem Int* 50: 1028-47.
- Winkler J, Thal, LJ, Gage FH, Fisher LJ 1998 Cholinergic strategies for Alzheimer's disease. *J Mol Med* 76: 555-67.
- Winner B, Geyer M, Couillard S, Aigner R, Bogdahn, Aigner L, Kuhn G, U Winkler J 2006 Striatal deafferentation increases dopaminergic neurogenesis in the adult olfactory bulb. *Exp Neurol* 197(1):113-121.
- Winner B, Kohl Z., Gage F 2011 Neurodegenerative disease and adult neurogenesis. *Eur J Neurosc* 33:1139-51

- Woo HK, Cho KK, Rha HK, Lee KJ, Park SC, Cho JK, Park HK, Kang JK, Choi CR 2001 Photodynamic Therapy with Photofrin Reduces Invasiveness of U87 Malignant Human Glioma Cells. *J Korean Neurosurg Soc (Suppl.)* S189- 196.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB 2000 Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61:364-370.
- Wormer EJ 2003 Stammzellen - Mehr Wissen? Lingen Verlag, Köln.
- Wozniak DF, Stewart GR 1989 Comparison of behavioral effects of nucleus basalis magnocellularis lesions and somatosensory cortex ablation in the rat. *Neurosci* 32(3): 685-700.
- Yamamoto S, Yamamoto N, Kitamura T, Nakamura K, Nakafuku M 2001 Proliferation of parenchymal neural progenitors in response to injury in the adult rat spinal cord. *Exp Neurol* 172:115-127.
- Young D, Lawlor PA, Leone P, Dragunow M, Matthew J. During MJ 1999 Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective *Nature Medicine* 5: 448-53.
- Zhang W, Linden DJ 2003 The other side of the engram: experience-driven changes in neuronal intrinsic excitability. *Nat Rev Neurosci* 4(11):885-900.
- Zhang L, Yang X, Yang S, Zhang J 2011 The Wnt/ β -catenin signaling pathway in the adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* 33: 1-8.
- Zhao M, Momba S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB et al. 2003 Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci* 100:7925-30.
- Zhao C, Deng W, Gage FH 2008 Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132(4): 645-60.
- Zheng JQ, Felder M, Connor JA, Poo M 1994 Turning of nerve growth cones induced by neurotransmitters. *Nature*. 368(6467): 140-144.
- Zhou C, Wen ZX, Shi DM, Xie ZP 2004 Muscarinic acetylcholine receptors involved in the regulation of neural stem cell proliferation and differentiation in vitro. *Cell Biol Int* 28(1): 63-67.
- Zilles K, 1992 Neuronal plasticity as an adaptive property of the central nervous system. *Ann Anat* 174: 383-391.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name, Vorname	Werner Georg Rauh
Geburtstag	04.04.1979
Geburtsort	München
Nationalität	deutsch

Schulbildung

1989 – 1998	Elsa-Brändström Gymnasium München
Juni 1998	Abitur

Studium

Oktober 2002-April 2005	Vorklinisches Studium der Zahnheilkunde an der LMU München
08. 04. 2005	Physikum
April 2005-August 2007	Klinisches Studium der Zahnheilkunde an der LMU München
06.08.2007-06.02.2008	Staatsexamen
13. 02. 2008	Erteilung der Approbation als Zahnarzt

Eidesstattliche Erklärung

Rauh, Werner Georg

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Die muskarinerge in vitro Beeinflussung der Neurogenese gezüchteter adulter neuronaler
Stammzellen von Mäusen mit Carbachol und Pirenzepin

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand