

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

**Direktor: Herr Prof. Dr. med. Peter Falkai**

**Neuroplastische Effekte  
des Acetylcholinesteraseinhibitors Eserine  
am Modell  
adulter neuraler Stammzellen des Maushippocampus**

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

vorgelegt von  
Julius-Christopher Gerold Wilhelm Pape  
aus  
München  
2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

**Berichterstatter:** Prof. Dr. med. Dan Rujescu

**Mitberichterstatter:** Prof. Dr. Magdalena Götz  
Prof. Dr. Christoph Schmitz

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

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

**Tag der mündlichen Prüfung:** 05.06.2014

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>5</b>
1.1	Historischer Überblick über die adulte Neurogenese.....	5
1.2	Die neurale Stammzelle .....	7
1.3	Die adulte Neurogenese .....	9
1.3.1	Die neurogene Nische .....	9
1.3.2	Neurogenese im Hippocampus.....	10
1.3.3	Regulation der Neurogenese und Plastizität.....	11
1.3.3.1	Alter und Stress .....	12
1.3.3.2	Lernen, physische Aktivität und eine stimulierende Umgebung .....	13
1.3.3.3	Funktionsstörungen und Schädigungen des ZNS.....	13
1.3.3.4	Wachstumsfaktoren und Hormone.....	14
1.3.3.5	Neurotransmitter.....	15
1.4	Der Acetylcholinesteraseinhibitor Eserine .....	19
1.5	Differentielle Genexpression und Neuroplastizität .....	21
1.5.1	Brain Derived Neurotrophic Factor.....	21
1.5.2	Synaptophysin .....	23
1.5.3	Beta-Site APP Cleaving Enzyme-1 .....	25
1.5.4	Tryptophanhydroxylase 2 .....	26
<b>2</b>	<b>FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>29</b>
3.1	Geräte.....	29
3.2	Verbrauchsmaterialien .....	30
3.3	Chemikalien und Puffer .....	31
3.4	Medien und Lösungen.....	33
3.4.1	Medien.....	33
3.4.2	Lösungen.....	35
3.5	Kits.....	36
3.6	Antikörper .....	36
<b>4</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>37</b>
4.1	Zellkultur .....	37
4.1.1	Kultivierung.....	37
4.1.2	Passage der neuronalen Stammzellen.....	38
4.1.3	Kryokonservierung und Auftauen der Zellen .....	39

4.2	Alamar Blue Assay (Zytotoxizitätsversuch).....	40
4.3	Langzeit-Proliferationsversuch.....	41
4.4	BrdU-Proliferationsversuch.....	43
4.5	Zellmobilisierungsversuch .....	48
4.6	Quantitative Genexpressionsanalyse mittels Real-Time PCR .....	52
4.6.1	RNA-Extraktion .....	52
4.6.2	Quantitative und qualitative RNA-Bestimmung .....	54
4.6.3	cDNA-Synthese mittels Reverser Transkription .....	55
4.6.4	Primerdesign .....	57
4.6.5	Quantitative Real Time PCR .....	59
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>65</b>
5.1	Langzeit-Proliferationsversuch .....	65
5.2	BrdU-Proliferationsversuch.....	67
5.3	Zellmobilisierungsversuch .....	69
5.4	Genexpressionsanalyse .....	71
5.4.1	Auswahl der Referenzgene .....	71
5.4.2	Quantitative Real Time PCR .....	72
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>78</b>
6.1	Proliferation .....	78
6.2	Zellmobilisierung.....	84
6.3	Genexpression .....	87
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>99</b>
<b>9</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>101</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>120</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Historischer Überblick über die adulte Neurogenese

Bis in die neunziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts galt das Dogma des Neurowissenschaftlers und Nobelpreisträgers Santiago Ramon y Cajal, das er mit den Worten „Alles kann sterben, nichts kann sich regenerieren“ begründete (Cajal, 1928). Seine These beinhaltete, dass es ein abgeschlossenes Entwicklungsstadium für das Gehirn gibt.

Die Bildung neuer Nervenzellen war demnach postnatal nicht mehr möglich und untergegangene Neurone konnten nicht ersetzt werden. Für Santiago Ramon y Cajal war es unverständlich, dass sich neu generierte Nervenzellen in die so komplexen Abläufe des menschlichen Gehirns einfinden könnten.

Obwohl es gegenüber dieser Theorie in der Neurowissenschaft kritische Stimmen gab, dauerte es noch Jahrzehnte bis sie akzeptiert wurden. Der Grund hierfür waren fehlende Untersuchungs- bzw. Nachweismethoden.

Erst durch eine neu entwickelte Technik, in Teilung befindliche Zellen mit  $^3\text{H}$ -Thymidin markieren zu können (Sidman et al., 1959), gelang es Altman und Das 1965 neu generierte Zellen im Gehirn von Ratten nachzuweisen (Altman und Das, 1965).

Allerdings war es ihnen noch nicht möglich, die sich teilenden Zelltypen exakt zu definieren. Ihre Arbeiten wurden daher nicht vollständig anerkannt.

Kaplan und Hinds konnten mit Hilfe des neu entwickelten Elektronenmikroskops, mitotischen Zellen in Rattengehirnen charakteristische strukturelle Eigenschaften von Neuronen zuordnen und somit Altmans Arbeiten unterstützen (Kaplan und Hinds, 1977).

Goldman und Nottebohm, die in den siebziger und achtziger Jahren das Gehirn von Kanarienvögeln untersuchten, konnten zeigen, dass postnatale *de novo* Neurogenese im *hyperstriatum ventrale, pars caudalis* der Tiere möglich ist. In diesem Hirnareal, das auch als HVC (*high vocal center*) bezeichnet wird, kam es

während des Erlernens neuer Lieder zur Neubildung tausender Neuronen (Goldman und Nottebohm, 1983).

Allerdings wurden auch diese Arbeiten nicht vollständig akzeptiert. Es vergingen weitere ca. zehn Jahre bis das fast ein Jahrhundert alte Postulat Cajals ins Wanken geriet.

So waren es schließlich Reynolds und Weiss, denen 1992 erstmals die Isolation adulter neuraler Stammzellen aus dem Gehirn von Nagetieren gelang (Reynolds und Weiss, 1992). Dieser Arbeit folgten viele weitere, die das Vorkommen von Stammzellen in den verschiedensten Teilen des ZNS von Nagetieren beschrieben. So zeigten beispielsweise Luskin und Mitarbeiter 1993 die Proliferation von neu generierten Neuronen in der subventrikulären Zone (SVZ) des Vorderhirns von adulten Nagetieren und Palmer und Mitarbeiter konnten 1997 neurale Stammzellen (neural stem cells, NSC) im Hippocampus der Ratte nachweisen (Luskin, 1993; Palmer et al., 1997).

Eriksson und Mitarbeiter beschrieben 1998 als erste die adulte Neurogenese im menschlichen Gehirn, genauer gesagt im Hippocampus (Eriksson et al., 1998). Sie benutzten hierfür ein ursprünglich aus der Tumorforschung stammendes Verfahren, welches das Thymidinanalogon 5-Bromo-2- Deoxyuridin (BrdU) als Marker für proliferierende Zellen verwendet und bis heute standardmäßig eingesetzt wird.

Die Vorzüge dieser Methode liegen einerseits in der Verwendung von BrdU, bei dem es sich im Vergleich zum früher eingesetzten <sup>3</sup>H Thymidin um einen nicht radioaktiven Stoff handelt und andererseits in der Möglichkeit einer phänotypischen Analyse der Zellen.

Der von Eriksson erbrachte Beweis der adulten Neurogenese im menschlichen Gehirn widerlegte endgültig das von Cajal begründete Postulat: „no new neurons after birth“ (Cajal, 1928).

## 1.2 Die neurale Stammzelle

Die klassische Definition einer Stammzelle erfolgt vor allem nach zwei funktionellen Kriterien.

Erstens handelt es sich um undifferenzierte Zellen, die proliferieren können und die Fähigkeit zur unbegrenzten Selbsterneuerung besitzen. Zweitens können sie durch sog. asymmetrische Zellteilung eine der Mutterzelle entsprechende Stammzelle und eine hochdifferenzierte somatische Tochterzelle hervorbringen (Potten und Loeffler, 1990).

Anhand ihrer Fähigkeit, sich in verschiedene Zelltypen zu entwickeln (Entwicklungs- bzw. Differenzierungspotenz), können Stammzellen in totipotente, pluripotente und multipotente Stammzellen eingeteilt werden.

Eine totipotente Stammzelle ist eine Zelle, aus der alle Zellen eines Organismus hervorgehen. Beim Menschen ist die einzige Zelle, die diese Fähigkeit besitzt, die Zygote. Während der weiteren Entwicklung schränkt sich die Differenzierungspotenz immer mehr ein, die Zellen werden pluripotent. Eine pluripotente Stammzelle ist in der Lage, Zellen aus allen drei Keimblättern hervorzubringen, allerdings kann sie keinen gesamten Organismus mehr bilden. Die multipotente Stammzelle, unabhängig davon, ob fetal oder adult, besitzt ein noch geringeres Differenzierungspotential. Aus ihr gehen nur Zellen eines bestimmten Gewebes bzw. Keimblattes hervor. Sie sind also gewebespezifisch (Alison et al., 2002).

Die beschriebene Einteilung der Stammzellen in toti-, pluri- und multipotent beinhaltet eine über lange Zeit vertretene Theorie. Nach dieser sei es nicht möglich, Zellen zu reprogrammieren, die einmal darauf programmiert worden sind, eine bestimmte Zelle bzw. ein bestimmtes Gewebe zu bilden (Wagers und Weissman, 2004). Eine Reihe von Arbeiten widerspricht aber dieser Theorie. So zeigten Bjornson und Kollegen in ihrer Arbeit „Turning Brain to Blood“, dass neurale Stammzellen von adulten Mäusen in der Lage sind Blutzellen zu bilden (Bjornson et al., 1999). Orlic und Mitarbeiter injizierten Knochenmarkzellen in infarzierte Mäuseherzen und berichteten, dass die lokal injizierten Zellen neues Myokard bildeten (Orlic et al., 2001).

Wagers und Weissman beschreiben diese sog. Transdifferenzierung einer Zelle folgendermaßen: „Transdifferenzierung beschreibt die Umwandlung einer Zelle einer

Gewebeabstammung in eine Zelle einer völlig unterschiedlichen Gewebeabstammung mit gleichzeitigem Verlust der gewebespezifischen Marker und Funktionen des ursprünglichen Zelltyps und Aneignung der Marker und Funktionen des transdifferenzierten Zelltyps“ (Wagers und Weissman, 2004).

Entsprechend der oben genannten Einteilung handelt es sich bei der adulten neuralen Stammzelle also um eine multipotente Stammzelle. Gage hat diese folgendermaßen definiert: „Neurale Stammzellen können neurales Gewebe bilden, haben die Fähigkeit sich selbst zu erneuern und bringen durch asymmetrische Teilung andere Zellen als sich selbst hervor“ (Gage, 2000).

Isolierte, adulte neurale Stammzellen können über lange Zeit als Zellverbände, sog. Neurosphären in Zellkultur expandieren. Serumfreies Medium, versetzt mit epidermalem Wachstumsfaktor (epidermal growth factor, EGF) und Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (fibroblast growth factor 2, FGF2), ermöglicht die Proliferation der Stammzellen (Gritti et al., 1999). Durch symmetrische Zellteilung (eine undifferenzierte Mutterstammzelle bringt zwei undifferenzierte Tochterstammzellen hervor) behalten sie ihre ausgiebige Fähigkeit zur Selbsterneuerung und bleiben multipotent. Durch Entzug der genannten Wachstumsfaktoren sind sie erneut in der Lage sich zu differenzieren (Galli et al., 2003; Kilpatrick und Bartlett, 1993; Vescovi et al., 1993).

Diese Eigenschaften unter Kulturbedingungen machen neurale Stammzellen zu einer interessanten Alternative zu primären Neuronenkulturen, die nur wenige Passagen in Kultur überleben.



## 1.3 Die adulte Neurogenese

### 1.3.1 Die neurogene Nische

Neurale Stammzellen (neural stem cells, NSC) konnten in vielen verschiedenen Teilen des adulten Gehirns von Säugetieren gefunden und aus diesen isoliert werden. Zu diesen Hirnregionen zählen unter anderem die subventrikuläre Zone, der Hippocampus (Alvarez-Buylla und Lim, 2004; Gage, 2000), das Rückenmark (Shihabuddin et al., 1997), die Substantia Nigra (Lie et al., 2002) und die Retina (Tropepe et al., 2000).

Das Vorkommen von Stammzellen in einer Hirnregion allein bedeutet allerdings nicht, dass hier auch aktive Neurogenese stattfindet. Die Fähigkeit zur aktiven Neurogenese ist abhängig von der sog. Nische, in der sich die Stammzellen befinden. Die Stammzellnische wird als spezialisierte Umgebung definiert, in der die Selbsterneuerung und Differenzierung der Stammzelle reguliert wird (Alvarez-Buylla und Lim, 2004).

Der strukturelle Aufbau der Stammzellnische und die genauen Mechanismen und Faktoren, die das Verhalten von neuronalen Stammzellen steuern, spielen in der aktuellen Forschung eine große Rolle. Wichtige Komponenten der Stammzellnische sind Astrozyten (Song et al., 2002), Ependymzellen (Ramirez-Castillejo et al., 2006), vaskuläre Zellen, verschiedene Wachstumsfaktoren (Doetsch, 2003) sowie Neurotransmitter und Faktoren der extrazellulären Matrix (Alvarez-Buylla und Lim, 2004; Morrison und Spradling, 2008).

Die Nischen, in denen unter normalen Bedingungen Neurogenese stattfindet, werden als permissive Nischen bezeichnet. Es scheinen nur zwei dieser permissiven Nischen zu existieren: Zum einen die subgranuläre Zone (SGZ) im Gyrus Dentatus des Hippocampus und zum anderen die subventrikuläre Zone (SVZ) der Seitenventrikel, in der neue Neurone generiert werden, um dann über den sog. „*rostral migratory stream*“ zum Riechkolben zu wandern (Ming und Song, 2011).

Hirnregionen, in denen zwar neurale Stammzellen gefunden werden, aber unter normalen Bedingungen keine regelmäßige Neurogenese stattfindet, werden als sog. nicht-permissive Nischen bezeichnet. Allerdings ist es möglich, diese Stammzellen

derart zu stimulieren, dass sie erneut in den Zellzyklus eintreten und neue Neurone hervorbringen (Ahmed et al., 2011; Jiao und Chen, 2008).

### 1.3.2 Neurogenese im Hippocampus

Der Hippocampus ist eine der beiden Regionen des Gehirns, in denen unter normalen Bedingungen Neurogenese stattfindet.

Der Prozess der hippocampalen Neurogenese beinhaltet die Proliferation der neuralen Stammzellen, die Differenzierung zu ausgereiften Neuronen sowie die Eingliederung in die hippocampalen Schaltkreise (Itou et al., 2011).

Der Weg von einer neuralen Stammzelle zu einem neuen funktionsfähigen Neuron kann anhand von morphologischen Eigenschaften und bestimmten Expressionsmarkern der Zellen in verschiedene Entwicklungsstufen eingeteilt werden.

Die Entwicklung geht von der mutmaßlichen neuralen Stammzelle, der sog. Typ-1 Zelle aus, die hohe Ähnlichkeit zu radialen Gliazellen aufweist und sich in der subgranulären Zone befindet. Diese Zellen besitzen ein dreieckförmiges Soma mit weiten Zellausläufern (Kempermann et al., 2004) und exprimieren den Astrozytenmarker GFAP (glial fibrillary acidic protein) (Kriegstein und Alvarez-Buylla, 2009), das Intermediärfilamentprotein Nestin (Yu et al., 2008), den Transkriptionsfaktor SOX2 (sex determining region Y-box 2) (Graham et al., 2003) und den Gliazellmarker BLBP (brain lipid-binding protein) (Feng et al., 1994; Ming und Song, 2011).

Aus diesen mitotisch eher inaktiven Zellen gehen die proliferationsaktiven Progenitorzellen Typ-2a und Typ-2b hervor. Sie haben ein mehr rundliches Soma mit nur kurzen tangentialen Ausläufern und sind GFAP-negativ.

Die Aufteilung in a und b beruht auf ihrem Expressionsprofil: Typ-2a Zellen exprimieren weiterhin in hohem Maße die glialen Marker Nestin, SOX2 und BLBP, während deren Expression bei Typ-2b Zellen weitaus geringer ist (Dhaliwal und Lagace, 2011; Yu et al., 2008). Typ-2b Zellen zeigen bereits anfängliche Expression

neuronaler Marker wie DCX (Doublecortin) und PSA-NCAM (polysialylated neural cell adhesion molecule) (Ming und Song, 2005).

Der nächste Schritt der Neurogenese bringt Neuroblasten (Typ-3 Zellen) hervor. Diese sind durch einen rundlichen Zellkern sowie durch eine fehlende Expression von Nestin charakterisiert. Dagegen zeigen sie unter anderem eine ausgeprägte Expression von DCX und PSA-NCAM. Dies scheint ein entscheidender Schritt in der Umwandlung von glialen Zellen zu Neuronen zu sein (Kempermann et al., 2004; Ming und Song, 2011).

Aus den Neuroblasten gehen postmitotische, noch unreife Körnerzellen hervor. An diesem Punkt der Neurogenese ist die Zahl der Zellen am höchsten. Allerdings findet in den darauf folgenden Tagen eine erhebliche Auslese statt. Durch apoptotische Mechanismen wird deren Zellzahl reduziert. Morphologisch zeigen die unreifen Körnerzellen einen runden bis dreieckförmigen Zellkern und besitzen bereits einen deutlichen apikalen Dendriten (Kempermann et al., 2004). Sie exprimieren das Kalzium bindende Protein Calretinin (Brandt et al., 2003) und beginnen mit der Expression des neuronalen Kernproteins NeuN (Neuronal Nuclei), einem Marker für reife Neuronen. Die unreifen Neuronen wandern schließlich von der subgranulären Zone in die Granulärschicht des Hippocampus und entwickeln sich dort zu reifen Neuronen (Ming und Song, 2005; 2011). Sie sind durch eine ausgeprägte Expression von NeuN charakterisiert und das vorher exprimierte Calretinin wird durch Calbindin ersetzt (Brandt et al., 2003; Ming und Song, 2011).

Nach ca. vier bis sieben Wochen sind die neu gebildeten Neurone anhand morphologischer, biochemischer und physiologischer Eigenschaften nicht mehr von den älteren zu unterscheiden (Kempermann et al., 2004).

### **1.3.3 Regulation der Neurogenese und Plastizität**

Der Begriff der neuronalen Plastizität beschreibt die Fähigkeit des Gehirns, sich durch funktionelle und strukturelle Veränderung extrinsischen und/oder intrinsischen Reizen anzupassen. Diese Anpassung erfolgt nicht nur durch Ausbildung neuer bzw. Reorganisation bereits bestehender Synapsen oder Veränderung der Genexpression

von Zellen, sondern auch durch Bildung und Einbindung neuer Nervenzellen (Neurogenese) (Suh et al., 2009).

Die adulte Neurogenese kann durch zahlreiche Faktoren reguliert werden. Hier spielen u.a. Alter, Lernen, Funktionsstörungen des ZNS und Neurotransmitter eine wichtige Rolle.

### **1.3.3.1 Alter und Stress**

Das Alter ist einer der Faktoren, die sich negativ auf die Neurogenese auswirken. Es wurde gezeigt, dass die Bildung neuer Nervenzellen im Hippocampus adulter Ratten im Laufe des Lebens deutlich abnimmt (Hattiangady und Shetty, 2008; Kuhn et al., 1996).

Allerdings gibt es auch Arbeiten, die behaupten, dass das Alter keine derart entscheidende Rolle spielt wie bisher angenommen. Die Neurogenese im Gyrus Dentatus von Ratten erreicht ihren Höhepunkt nach ca. acht Tagen. Danach fällt die Bildung neuer Neurone rapide ab und bleibt bis zum Lebensende der Ratte auf einem konstant niedrigen Niveau (Ben Abdallah et al., 2010).

Da eine Ratte mit acht Tagen noch nicht als adult definiert wird, lässt sich ableiten, dass der Einfluss des Alters auf die adulte Neurogenese geringer ist als bisher vermutet (Kempermann, 2011).

Allerdings scheint die Neurogenese bei Ratten auch im Alter noch durch bestimmte Stimuli beeinflussbar zu sein. Van Praag und Mitarbeitern gelang es, im Hippocampus von Ratten mit erhöhter physischer Aktivität (*exercise*) eine vermehrte Bildung neuer Nervenzellen nachzuweisen (van Praag et al., 2005).

Auch Stress hat eine hemmende Wirkung auf die Neurogenese. In einer Reihe von Versuchen konnte gezeigt werden, dass chronische Stresseinwirkung die Zellproliferation im Hippocampus vermindert (Duman et al., 2001; Gould et al., 1998; Mirescu und Gould, 2006). Verantwortlich hierfür sind Glukokortikoide. Sie werden bei Stress durch Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse vermehrt ausgeschüttet (Cameron und Gould, 1994). Wird hingegen der Glukokortikoidspiegel durch Entnahme der Nebennierenrinde gesenkt, führt dies zu einer deutlichen Erhöhung der Neurogenese (Mirescu und Gould, 2006).

### **1.3.3.2 Lernen, physische Aktivität und eine stimulierende Umgebung**

Wird einer Maus ein Laufrad zur Verfügung gestellt oder wird sie in eine stimulierende Umgebung gesetzt, die der natürlichen Umwelt des Tiers ähnelt und in der sie neue Dinge entdecken kann, kommt es zu einer Steigerung der Proliferation mit einer längeren Überlebensdauer der Neuronen (Kempermann et al., 1997; van Praag et al., 1999).

Auch Lernvorgänge können die Bildung neuer Nervenzellen im Gehirn fördern. Interessanterweise lässt sich hierbei nur in der Region eine erhöhte Neurogenese nachweisen, die durch den Lernvorgang beansprucht wird. So zeigen hippocampusabhängige Lernvorgänge - wie z.B. das Wasserlabyrinth von Morris (*Morris Water Maze*) - nur eine verlängerte Lebensdauer von Neuronen des Gyrus Dentatus und nicht von solchen in der subventrikulären Zone (Gould et al., 1999). Dementsprechend kommt es bei Versuchen, bei denen das Riechvermögen der Nager trainiert wird, zu einer isolierten Proliferationssteigerung in der SVZ (Rocheffort et al., 2002).

### **1.3.3.3 Funktionsstörungen und Schädigungen des ZNS**

Das zentrale Nervensystem scheint eine Art Selbstreparaturmechanismus zu besitzen. So konnte gezeigt werden, dass fokale sowie globale Ischämien bei adulten Nagetieren zu einer gesteigerten Zellproliferation sowohl in der SGZ als auch in der SVZ führen. Des Weiteren scheint das ZNS in der Lage zu sein, neurale Vorläuferzellen so zu mobilisieren, dass sie aus intakten Hirnarealen in geschädigte Gebiete wandern und hier beispielsweise untergegangene Neurone ersetzen (Bendel et al., 2005; Chen et al., 2004; Nakatomi et al., 2002; Parent, 2003; Yang et al., 2009).

Auch bei zerebralen Anfallsleiden zeigt sich eine gesteigerte Neurogenese in SGZ und SVZ. Die neuen Nervenzellen können sich in die hippocampalen Schaltkreise integrieren, weisen allerdings einige Veränderungen auf, wie z.B. abnorme dendritische Ausläufer, veränderte elektrophysiologische Eigenschaften oder fremdartiges Migrationsverhalten (Ming und Song, 2011; Parent et al., 1997).

Bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Morbus Alzheimer, wird die Rolle der Neurogenese weiterhin kontrovers diskutiert. In zahlreichen Studien kam es, abhängig von den jeweiligen Versuchsbedingungen, entweder zu gesteigerter (Jin et al., 2004; Kolecki et al., 2008) oder verminderter (Haughey et al., 2002; Zhang et al., 2007) Neurogenese. Für die unterschiedlichen Ergebnisse ist eine Vielzahl von Faktoren verantwortlich. Hierzu zählen unter anderem das gewählte transgene Tiermodell, die Anzahl und Art der Mutationen, das Alter des Tieres, das verwendete BrdU-System und die Art der Zellmarker (Lazarov und Marr, 2010).

#### 1.3.3.4 Wachstumsfaktoren und Hormone

Wie bereits weiter oben erwähnt zeigen EGF und FGF-2 einen proliferationssteigernden Effekt auf adulte neurale Stammzellen *in vitro*.

Aber auch *in vivo* beeinflussen Wachstumsfaktoren die Neurogenese. So führte die intrazerebrale Infusion der Faktoren EGF und FGF-2 bei Nagetieren zu einer gesteigerten Neurogenese in der SVZ (Kuhn et al., 1997). In der SGZ erzielten der *Insulin-like Growth Factor* (IGF) (Aberg et al., 2000) und in SVZ und SGZ der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (Jin et al., 2002) einen ähnlichen Effekt. VEGF scheint außerdem mitverantwortlich zu sein für die vermehrte Neurogenese bei Nagern unter erhöhter körperlicher Aktivität und in reizreicher Umgebung (Cao et al., 2004; Fabel et al., 2003).

Der Wachstumsfaktor *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) und seine Rolle als Regulator der adulten Neurogenese werden unter 1.5.1 ausführlich beschrieben.

Auch Hormone haben Einfluss auf die adulte Neurogenese. Die bereits beschriebenen Glukokortikoide hemmen die Neurogenese, während bei Estrogenen und Prolaktin ein positiver Effekt beobachtet werden konnte (Shingo et al., 2003; Tanapat et al., 1999).

### 1.3.3.5 Neurotransmitter

Die klassische Funktion der Neurotransmitter als Botenstoffe für die neurale Kommunikation scheint nicht ihre einzige Aufgabe zu sein. Ihnen wird zunehmend auch eine bedeutende Rolle für neuroplastische Vorgänge zugewiesen. Unter anderem greifen sie in die Regulation der adulten Neurogenese ein.

#### **Gamma-Aminobutyric Acid (GABA)**

Gamma-Amino-Buttersäure (GABA) ist der wichtigste hemmende Neurotransmitter des Gehirns. Diese hemmende Wirkung wird durch eine Hyperpolarisation von Zellen erreicht. Allerdings kann GABA unter gewissen Umständen, wie z.B. in der neuralen Entwicklungsphase, durch Depolarisation auch exzitatorisch wirken (Owens und Kriegstein, 2002).

Der jeweilige Effekt von GABA auf die Neurogenese ist stark abhängig von der Entwicklungsstufe der neuralen Zellen und der Hirnregion, in der sich diese befinden. Im Gyrus Dentatus scheint GABA durch exzitatorische Signale die Differenzierung und später die synaptische Integration der Neurone zu regulieren:

So kommt es durch GABAerge Depolarisation zu einer vermehrten Ausdifferenzierung von Typ-2 Vorläuferzellen sowie zu einer Zunahme der Expression von NeuroD, einem für das Überleben von jungen Neuronen essentiellen Faktor (Tozuka et al., 2005). Zum anderen fördert GABA durch Depolarisation die synaptische Integration von neu gebildeten Neuronen in das hippocampale Netzwerk. Ge und Mitarbeiter zeigten dies, indem sie neu gebildete Neurone genetisch so veränderten, dass die GABAerge Wirkung zu einer Hyperpolarisation anstatt zu der vorherigen Depolarisation führte. Die Neurone wiesen daraufhin verminderte dendritische Ausläufer und Defekte in ihrer synaptischen Formation auf (Ge et al., 2006).

In der SVZ dient GABA als negativer Rückkopplungsmechanismus. Wie unter 1.3.2 beschrieben gehen aus GFAP exprimierenden Vorläuferzellen über einige Zwischenschritte Neuroblasten hervor. Durch eine hohe Anzahl an neuen Neuroblasten scheint auch die Ausschüttung von GABA in den extrazellulären Raum anzusteigen, was zu einem erhöhten GABA-Spiegel führt (Bordey, 2006). GFAP

exprimierende Vorläuferzellen besitzen GABA-A Rezeptoren, die durch den erhöhten GABA-Spiegel zunehmend aktiviert werden. Diese Aktivierung führt letztendlich zu einer Hemmung der Proliferation von GFAP exprimierenden Vorläuferzellen. Durch diese negative Rückkopplung scheint GABA die Bildung neuer Neurone zu regulieren (Liu et al., 2005; Pathania et al., 2010).

## **Glutamat**

Glutamat ist der häufigste erregende Neurotransmitter und wirkt auf verschiedene Rezeptoren wie z.B. alpha-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat Rezeptoren (AMPA-R), N-Methyl-D-Aspartat Rezeptoren (NMDA-R) und Kainat-Rezeptoren. Abhängig vom jeweiligen Rezeptor scheint Glutamat unterschiedliche Effekte auf die adulte Neurogenese zu haben. Detaillierte Daten liegen insbesondere für den NMDA-Rezeptor vor:

In frühen Studien von Cameron und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren mit diversen Agonisten zu einer verminderten Proliferation von Vorläuferzellen in der SGZ führte und eine Blockade der Rezeptoren mit Antagonisten eine Proliferationssteigerung der Zellen bewirkte. Des Weiteren zeigten die Autoren durch eine Läsion des entorhinalen Kortex, aus dem der Gyrus Dentatus den größten Teil seiner glutamatergen Signale erhält, ebenfalls einen Anstieg der Proliferation. Dieser Versuch sollte jedoch kritisch betrachtet werden, da durch eine Läsion des gesamten entorhinalen Kortex keine isolierte Ausschaltung von glutamaterger Innervation möglich ist, sondern vielmehr eine ganze Reihe von verschiedenen Neurotransmittern in Mitleidenschaft gezogen wird (Cameron et al., 1995; Suh et al., 2009; Vaidya et al., 2007).

Die genauen Effekte von Glutamat auf die Proliferation von Vorläuferzellen in der SGZ sind nicht abschließend geklärt. Offen bleibt unter anderem die Frage, ob es sich um einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Vorläuferzellen handelt.

Tozuka und Mitarbeiter konnten keine signifikante funktionelle Expression von NMDA-Rezeptoren auf Nestin exprimierende Vorläuferzellen feststellen. Sie gehen deshalb von einem indirekten Effekt durch GABAerge Einflüsse von NMDA-Rezeptor exprimierenden hippocampalen Interneuronen aus (Tozuka et al., 2005). Für einen direkten Effekt von Glutamat auf die Vorläuferzellen in der SGZ spricht der Nachweis



von den NMDA-Rezeptor Subtypen NR1 und NR2B auf einigen Typ-1 Vorläuferzellen (Nacher et al., 2007).

Die genannten Ergebnisse sprechen dafür, dass eine Vorläuferzelle offenbar je nach ihrer Entwicklungsstufe unterschiedliche Expressionsmuster von NMDA-Rezeptoren aufweist. Demnach sollte auch der jeweiligen Entwicklungsstufe, in der sich eine Zelle befindet, entsprechende Beachtung geschenkt werden (Vaidya et al., 2007).

## **Serotonin**

Der Neurotransmitter Serotonin spielt nicht nur eine wesentliche Rolle in der Pathogenese zahlreicher psychiatrischer Erkrankungen, wie z.B. Depression und Angststörungen, sondern scheint auch bei der adulten Neurogenese von Bedeutung zu sein.

In zahlreichen Studien konnte der Einfluss dieses Neurotransmitters auf die Neurogenese nachgewiesen werden. Brezun und Daszuta gelang es, die Neurogenese im Gehirn adulter Ratten durch zwei verschiedene Mechanismen zu beeinflussen. Sie verminderten die Serotoninsynthese einerseits durch pharmakologische Inhibitoren (Parachlorphenylalanin, PCPA) und andererseits durch Läsion des dorsalen Raphe-Kerns, dem Ort mit der höchsten Dichte an serotonergen Neuronen. Beides führte zu einer Senkung der Proliferationsrate von Vorläuferzellen in SGZ und SVZ (Brezun und Daszuta, 1999).

Weiter zeigten die Autoren, dass dieser Effekt umkehrbar ist. Durch Transplantation fetaler serotonerger Neurone konnte die Neurogenese in den manipulierten Gehirnen wieder gesteigert und so die Annahme, dass Serotonin positiven Einfluss auf die Neurogenese hat, unterstützt werden (Brezun und Daszuta, 2000).

Auch Benninghoff und Mitarbeiter konnten zeigen, dass ein Mangel an Serotonin negative Effekte auf die Neurogenese ausübt. Durch Blockierung des Enzyms Tryptophanhydroxylase (TPH), das den limitierenden Faktor der Serotoninsynthese darstellt, konnte eine deutliche Reduzierung der Proliferation von Vorläuferzellen nachgewiesen werden. Dieser Effekt konnte ebenfalls durch exogene Zufuhr des Neurotransmitters rückgängig gemacht werden (Benninghoff et al., 2009).

Allerdings gibt es auch widersprüchliche Studien. So konnten etwa Jha und Mitarbeiter keine veränderte Neurogenese nach künstlich hervorgerufenem Serotoninmangel in Gehirnen adulter Ratten feststellen (Jha et al., 2006). Diese

Diskrepanz lässt sich unter anderem durch experimentelle Bedingungen erklären, wie z.B. unterschiedliche transgene Tiermodelle oder Methoden.

Ein weiterer Grund für die Komplexität der neurogenen Effekte von Serotonin ist die Fülle von Rezeptoren, auf die der Neurotransmitter wirken kann. Beispielweise führt in der SVZ eine Aktivierung des 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptors durch den Agonisten 8-OH-DPAT zu einer gesteigerten Neurogenese, während die Aktivierung des 5-HT<sub>1B</sub> Rezeptors durch seinen Agonisten Sumatriptan einen Abfall der Proliferationsrate nach sich zieht (Banasr et al., 2004).

Klinisch interessant und ein weiterer Hinweis dafür, dass Serotonin einen wichtigen Regulator der adulten Neurogenese darstellt, ist der Zusammenhang zwischen Neurogenese und verschiedenen Antidepressiva, insbesondere den selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmern (serotonin reuptake inhibitors, SSRI). Sie verhindern die Wiederaufnahme von Serotonin aus dem synaptischen Spalt und führen somit zu einer erhöhten Verfügbarkeit des Neurotransmitters. So kam es nach Langzeitbehandlungen von Nagern mit dem SSRI Antidepressivum Fluoxetin zu einem deutlichen Anstieg der Neurogenese in der SGZ des Hippocampus (Encinas et al., 2006; Malberg et al., 2000). Hierfür scheint unter anderem eine durch Serotonin induzierte, gesteigerte Genexpression des Wachstumsfaktors BDNF verantwortlich zu sein (Hagg, 2009; Martinowich und Lu, 2008).

### **Acetylcholin**

Acetylcholin ist ein Neurotransmitter, der mit Gedächtnisfunktionen und hippocampalen Lernvorgängen in Verbindung gebracht wird (Hasselmo, 2006). Beispielsweise kommt es beim Morbus Alzheimer zu einem Abbau von Acetylcholin produzierenden Neuronen und so zu einem Mangel dieses Neurotransmitters (Abdel-Salam, 2011). Des Weiteren konnte bei Lernprozessen ein Anstieg des Acetylcholin-Levels nachgewiesen werden (Dudar et al., 1979; Pepeu und Giovannini, 2004).

Auch die adulte Neurogenese spielt in diesem Zusammenhang eine große Rolle (Deng et al., 2010). Wie bereits unter 1.3.3.2 beschrieben führen Gedächtnistraining und hippocampale Lernvorgänge zu einer gesteigerten Bildung neuer Neurone.

Diese Befunde legen die Vermutung nahe, dass Acetylcholin auf die Regulation der adulten Neurogenese einwirkt.

Die meisten cholinergen Neurone befinden sich im basalen Vorderhirn. Durch selektive Läsion dieses cholinergen Systems kommt es zu einem signifikanten Abfall der Proliferation und zu einer verringerten Überlebensdauer von Vorläuferzellen im Gyrus Dentatus (Cooper-Kuhn et al., 2004; Mohapel et al., 2005).

Entsprechend diesen Befunden führte die systemische Gabe des Acetylcholinesterasehemmers Physostigmin bzw. Eserine zu einer Erhöhung der NSC Proliferation im Gyrus Dentatus adulter Nager (Cooper-Kuhn et al., 2004; Itou et al., 2011; Mohapel et al., 2005).

Acetylcholin scheint jedoch nicht nur Einfluss auf die Proliferation, sondern auch auf die Differenzierung adulter neuraler Stammzellen zu nehmen. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte, dass die Behandlung adulter neuraler Stammzellen *in vitro* mit dem Acetylcholin Analogon Carbachol zu einer signifikanten Erhöhung der Ausdifferenzierung zu Neuronen führte (Benninghoff et al., 2011).

#### **1.4 Der Acetylcholinesteraseinhibitor Eserine**

Acetylcholinesteraseinhibitoren stellen neben dem NMDA-Modulator Memantine bei leicht bis mittelgradiger Alzheimer Demenz derzeit die einzige krankheitsspezifische medikamentöse Therapieoption dar. Klinisch eingesetzt werden die Substanzen Rivastigmin, Galantamin und Donepezil. Für die Zellkulturexperimente in dieser Arbeit wurde der AChE-Inhibitor Eserine verwendet.

Bei Eserine bzw. Physostigmin handelt es sich um einen reversiblen Inhibitor der Acetylcholinesterase, der erstmals 1864 aus dem Samen der Calabar Bohne der Westafrikanischen Pflanze „*Physostigma venenosum*“ extrahiert wurde (Shannon, 1998). Durch die Hemmung der Acetylcholinesterase wird der Abbau von Acetylcholin im synaptischen Spalt verhindert. Hierdurch kommt es zu einer Erhöhung des Neurotransmittergehalts, was zu einer vermehrten cholinergen Wirkung führt.

Aufgrund seiner chemischen Struktur als tertiäres Amin ist Eserine ungeladen und lipophil und somit in der Lage die Blut-Hirn Schranke zu überwinden. Dadurch kann es seine Wirkung nicht nur peripher, sondern auch innerhalb des ZNS entfalten (Rumack, 1973).

Das Einsatzgebiet von Eserine ist vielfältig und erstreckt sich über mehrere Teilgebiete der Medizin.

Wegen seiner Wirkung auf die Mm. ciliaris und Sphincter pupillae, die in einer Nahakkomodation und einer Engstellung der Pupille (Miosis) resultiert, wird es in der Ophthalmologie lokal am Auge zur Behandlung von Glaukompatienten eingesetzt.

Seit Ende der 1960er Jahre wurde Eserine zunehmend als Antidot gegen das anticholinerge Syndrom eingesetzt, welches seinerseits durch eine Reihe von Faktoren verursacht werden kann. So stellt es beispielsweise eine postoperative Komplikation dar, hervorgerufen durch intraoperativ verabreichte Substanzen wie verschiedene Narkotika, Benzodiazepine und Antihistaminika (Brown et al., 2004; Schmitt und Pajonk, 2008).

Des Weiteren spielt Eserine als Antidot in der Psychiatrie und Neurologie eine wichtige Rolle. Hier kommt es als Gegenspieler zahlreicher anticholinergischer Substanzen wie trizyklischer Antidepressiva, Neuroleptika, Benzodiazepine und Antiparkinson-Medikamente zum Einsatz (Beaver und Gavin, 1998).

Beim Morbus Alzheimer können Acetylcholinesteraseinhibitoren den kognitiven Abbau verlangsamen, stabilisieren und teilweise sogar zu einer Besserung der klinischen Symptomatik führen. Darüber hinaus zeigen klinische Beobachtungen stimmungsaufhellende Wirkung bei Demenzpatienten, die mit Acetylcholinesteraseinhibitoren behandelt werden (Burt, 2000; Gauthier et al., 2002).

## **1.5 Differentielle Genexpression und Neuroplastizität**

Die veränderte Expression von Genen spielt im Rahmen der neuronalen Plastizität eine wichtige Rolle. Durch die Hoch- bzw. Herunterregulierung von Genen kann möglicherweise die Wirkung des Genproduktes verstärkt oder abgeschwächt werden. Dies hat auch Relevanz für die Entstehung und Behandlung von neurologischen Erkrankungen (McClung und Nestler, 2008). So könnte zum Beispiel die antidementive und affektverändernde Wirkung von AChE-Inhibitoren auf die veränderte Expression bestimmter Gene, die im Zusammenhang mit der Pathogenese des Morbus Alzheimer stehen, zurückzuführen sein.

### **1.5.1 Brain Derived Neurotrophic Factor**

Der Wachstumsfaktor Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) bildet zusammen mit dem Nerve Growth Factor (NGF) und den Neutrophinen 3-5 die Familie der Neutrophine und wurde erstmals 1982 aus Schweinehirnen isoliert. Er ist ubiquitär im ZNS verteilt mit höchster Expressionsrate im Hippocampus (Binder und Scharfman, 2004).

BDNF spielt sowohl in der Entwicklung des ZNS als auch für die neurale Plastizität eine entscheidende Rolle:

Mehrere Knockout-Studien zeigten Effekte von BDNF auf die Hirnentwicklung. Homozygote Knockout-Mäuse für das BDNF-Gen verstarben wenige Wochen nach der Geburt. Heterozygote Tiere überlebten zwar, zeigten jedoch auffällige Verhaltensweisen wie Hyperaktivität, verminderte Krampfneigung und Fettleibigkeit (Kernie et al., 2000; Kokaia et al., 1995; Rios et al., 2001).

Infusion von BDNF in den Hippocampus adulter Ratten resultierte in einer Erhöhung der Neurogenese (Scharfman et al., 2005). Außerdem kam es durch verschiedene Faktoren wie körperliche Aktivität, reizreiche Umgebung oder diätetische Beschränkungen, die alle zu einer gesteigerten Neurogenese führen, gleichzeitig zu einer vermehrten Expression von BDNF (Lee et al., 2000; Neeper et al., 1996; Rossi et al., 2006; Russo-Neustadt et al., 2004). Diese Befunde spiegeln einen möglichen Zusammenhang zwischen BDNF und adulter Neurogenese wieder.

Neben der Proliferation scheinen aber auch das Überleben und die Differenzierung von Neuronen durch das Neutrophin gefördert zu werden (Ghosh et al., 1994; Lee et al., 2001). BDNF steigerte bei Ratten die Überlebensrate und Differenzierung hippocampaler Zellen *in vitro* um bis zu 80% (Lowenstein und Arsenault, 1996).

Einen weiteren Effekt auf die neurale Plastizität zeigt die Bedeutung von BDNF auf Gedächtnis und Lernvorgänge. So kam es einerseits zu einer vermehrten hippocampalen BDNF Expression während kontextbasierten Lernens und andererseits führte eine funktionelle Ausschaltung von BDNF durch Antikörper oder Knockout des Gens zu Defiziten des räumlichen Lernvermögens und des Gedächtnisses (Alonso et al., 2002; Hall et al., 2000; Linnarsson et al., 1997; Mu et al., 1999).

Durch diese Korrelation zwischen erhöhter BDNF-Expression während Lernvorgängen und dem engen Zusammenhang von Lernvorgängen und Formation bzw. Neubildung von Synapsen ist ein Einfluss von BDNF auf die synaptische Plastizität nahe liegend und konnte bereits mehrfach beschrieben werden (Kang und Schuman, 1995; Lessmann, 1998; Poo, 2001).

Dabei scheint BDNF die erregenden glutamatergen Synapsen zu stärken und die inhibitorischen GABAergen Synapsen abzuschwächen (Lessmann, 1998; Lessmann et al., 1994; Wardle und Poo, 2003).

Eine Reihe psychiatrischer und neurodegenerativer Erkrankungen steht ebenfalls in Zusammenhang mit diesem Wachstumsfaktor.

So scheint BDNF ein Faktor für die Stimmungsregulierung zu sein. Dies wird unter anderem deutlich durch die gesteigerte BDNF Expression im Hippocampus durch verschiedene antidepressiv wirkende Medikamente wie SSRI, tryzyklische Antidepressiva oder MAO-Inhibitoren sowie durch die Herunterregulation von BDNF durch Stress (Dias et al., 2003; Duman et al., 1999; Duman und Monteggia, 2006; Huang et al., 2008; Nibuya et al., 1995; Smith et al., 1995). Ferner konnte durch die Gabe von SSRI's ein signifikanter Anstieg des BDNF-Serumspiegels bei Depressionspatienten beobachtet werden (Gonul et al., 2005; Shimizu et al., 2003).

BDNF wird außerdem eine bedeutende Rolle beim Krankheitsbild des Morbus Alzheimer zugeschrieben. Schon früh konnte eine verminderte Expression von BDNF im Hippocampus und Cortex festgestellt werden (Holsinger et al., 2000; Murer et al.,

2001; Phillips et al., 1991). Der Wachstumsfaktor scheint positiven Einfluss auf die Erkrankung zu haben: Einerseits übt er durch Erhöhung der Überlebens- und Differenzierungsrate eine neuroprotektive Wirkung auf cholinerge Neurone aus, deren Untergang erheblichen Anteil an der Entstehung der Alzheimerdemenz zu haben scheint (Alderson et al., 1990; Nonomura und Hatanaka, 1992), andererseits wirkt BDNF durch Förderung der synaptischen Plastizität dem kognitiven Abbau bei Morbus Alzheimer entgegen (Mesulam, 1999; Zuccato und Cattaneo, 2009).

### 1.5.2 Synaptophysin

Synaptophysin ist ein synaptisches Vesikelprotein, das erstmals 1985 von Wiedenmann und Franke beschrieben wurde (Wiedenmann und Franke, 1985). Es weist vier transmembrane Domänen auf und hat ein Molekulargewicht von 38kD. Durch sein ubiquitäres Vorkommen in Vesikelmembranen von Neuronen im gesamten Gehirn dient es als weit verbreiteter Marker für Synaptogenese und die Anzahl von Nervenendigungen (Lietz et al., 2003; Valtorta et al., 2004). Diese Erkenntnis entwickelte sich durch frühe Arbeiten, die zeigten, dass es während der Synaptogenese zu einer stark erhöhten Expression von Synaptophysin kommt (Fletcher et al., 1991; Knaus et al., 1986).

Die genaue Funktion von Synaptophysin ist nicht vollständig bekannt.

In einigen Arbeiten wird eine Beteiligung des Proteins an der Exo- bzw. Endozytose von Neurotransmittern diskutiert:

Durch den Einsatz von Antikörpern oder Antisense-Oligonukleotiden gegen Synaptophysin kam es zu einer reduzierten Ausschüttung des Neurotransmitters Acetylcholin. Dementsprechend führte eine Überexpression des Proteins zu einer vermehrten Freisetzung des Transmitters (Alder et al., 1995; Alder et al., 1992).

Andererseits zeigten McMahon und Mitarbeiter sowie Eshkind und Leube, dass Synaptophysin Knockout-Mäuse keine signifikante Veränderung ihrer Neurotransmitterfreisetzung aufwiesen (Eshkind und Leube, 1995; McMahon et al., 1996). Auch die gemeinsame Ausschaltung von Synaptophysin und dem verwandten

Protein Synaptogyrin führte zu keiner Veränderung der Neurotransmitterfreisetzung, allerdings kam es zu signifikanten Defekten in verschiedenen Bereichen der synaptischen Plastizität (Janz et al., 1999).

Mehrere Arbeitsgruppen vermuten deshalb eine Beteiligung von Synaptophysin am Exo-Endozytischen Zyklus durch Interaktion mit anderen Membranproteinen.

Beispielweise scheint Synaptophysin indirekt durch Komplexbildung mit Synaptobrevin, einem weiteren Vesikelmembranprotein, eine Rolle in der Exozytose von Neurotransmittern zu spielen (Edelmann et al., 1995; Washbourne et al., 1995).

Weitere Erkenntnisse über Synaptophysin stammen aus einer kürzlich veröffentlichten *in vitro* Untersuchung von Kwon und Mitarbeitern. Sie gehen von einer Beteiligung des Proteins an der Regulation der Kinetik der Endozytose von synaptischen Vesikeln in hippocampalen Neuronen aus (Kwon und Chapman, 2011).

Da synaptische Vesikelproteine an der Exozytose von Neurotransmittern beteiligt sind, werden sie mit verschiedenen psychiatrischen Erkrankungen, unter anderem Schizophrenie und Depression, in Verbindung gebracht (Vawter et al., 2002).

Dieser Zusammenhang wurde in mehreren Studien durch medikamentöse Behandlung dargestellt.

Bragina und Mitarbeiter zeigten eine signifikante Hochregulation von Synaptophysin im frontalen Cortex von Ratten nach Behandlung mit dem Antipsychotikum Clozapin (Bragina et al., 2006).

Zahlreiche antidepressiv wirkende Medikamente führten zu einer gesteigerten Genexpression von Synaptophysin in hippocampalen Neuronen. Zu diesen gehören unter anderem die MAO-Hemmer Moclobemid, Clorgylin und Tranylcypromin, die trizyklischen Antidepressiva Amitriptylin und Desipramin sowie der selektive Serotonin Wiederaufnahmehemmer Fluoxetin (Drigues et al., 2003; Rapp et al., 2004).

Auch die kognitiven Einschränkungen bei Demenzkranken korrelieren unter anderem mit einer geringen Synapsendichte bzw. mit der fehlenden Möglichkeit der Ausbildung neuer Synapsen. Dementsprechend zeigten Alzheimerpatienten, die kognitiv stark eingeschränkt waren, signifikant verminderte Synaptophysinspiegel im Hippocampus (Sze et al., 1997).



### 1.5.3 Beta-Site APP Cleaving Enzyme-1

Die Beta-Sekretase BACE1 (auch Memapsin-2 oder Aspartatprotease 2 (ASP2) genannt) wurde 1999 von mehreren Forschergruppen als neuartige Klasse der transmembranen Aspartatproteasen identifiziert (Hussain et al., 1999; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999).

Bereits sieben Jahre vor seiner endgültigen Beschreibung waren die Eigenschaften des Enzyms weitestgehend charakterisiert. Unter anderem zeigt es seine höchste Expressionsrate in Neuronen im Gehirn und sein Aktivitätsmaximum liegt im sauren pH-Bereich (Haass et al., 1993; Kandalepas und Vassar, 2012; Vassar et al., 2009).

BACE1 ist durch seine proteolytische Aktivität das entscheidende Enzym bei der Entstehung von  $\beta$ -Amyloid und scheint daher maßgeblich an der Pathogenese des Morbus Alzheimers beteiligt zu sein (Kandalepas und Vassar, 2012; Selkoe, 2008; Venugopal et al., 2008).

Es schneidet zunächst das membranständige Amyloidvorläuferprotein (APP) in zwei Teile. Der eine Teil, der sog. C-Terminus, bleibt in der Membran enthalten und wird anschließend durch ein zweites Enzym, die  $\gamma$ -Sekretase gespalten, was zur Entstehung und Sekretion von  $\beta$ -Amyloid führt (Citron et al., 1995; Haass und Steiner, 2002; Vassar et al., 2009).

Die Rolle von BACE1 als Schlüsselenzym in der Bildung von  $\beta$ -Amyloid konnte von mehreren Gruppen mittels unterschiedlicher BACE1 Knockout-Mausmodelle dargestellt werden. In sämtlichen Studien zeigte sich in den Gehirnen der BACE1 defizienten Tiere eine stark verminderte bzw. ausbleibende Bildung von  $\beta$ -Amyloid (Cai et al., 2001; Luo et al., 2001; Roberds et al., 2001; Vassar, 2002).

BACE1 scheint das entscheidende und vielleicht sogar einzige Enzym im Gehirn zu sein, das für die Entstehung von A $\beta$  verantwortlich ist (Vassar, 2002).

Aus diesem Grund stellt BACE1 ein wichtiges therapeutisches Ziel bei der Entwicklung neuer Medikamente gegen den Morbus Alzheimer dar (Ghosh et al., 2012).

Die Synthese von  $\beta$ -Amyloid ist anscheinend aber nicht die einzige Funktion des Enzyms. Obwohl anfängliche Studien über unveränderte Phänotypen von homozygoten BACE1 Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen berichteten, gibt es zunehmend mehr Hinweise auf veränderte Verhaltensweisen und

Eigenschaften der Tiere (Luo et al., 2001; Roberds et al., 2001). Die BACE1 defizienten Mäuse zeigten unter anderem hypomyelinisierte periphere und zentrale Nerven, vermehrte spontane Krampfneigung, verändertes räumliches Gedächtnis und sogar eine erhöhte neonatale Sterblichkeitsrate (Dominguez et al., 2005; Hu et al., 2006; Hu et al., 2010; Kobayashi et al., 2008).

Diese phänotypischen Veränderungen müssen bei der Entwicklung BACE1 inhibierender Medikamente beachtet werden. Darüber hinaus muss das Ausmaß der Wirkung des Enzyms auf weitere biologische Prozesse untersucht werden (Kandalepas und Vassar, 2012).

#### **1.5.4 Tryptophanhydroxylase 2**

Die Tryptophanhydroxylase (TPH) ist das Schlüsselenzym der Serotoninbiosynthese. Sie gehört zusammen mit der Phenylalaninhydroxylase und der Tyrosinhydroxylase zur Familie der Aromatischen-Aminosäure-Hydroxylasen (AAAH) (Fitzpatrick, 2000). Durch Hydroxylierung der Aminosäure Tryptophan zu 5-Hydroxytryptophan katalysiert die Tryptophanhydroxylase den limitierenden Schritt in der Synthese von Serotonin (Matthes et al., 2010).

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass nur eine Isoform der Tryptophanhydroxylase existiert - TPH1. Erst in einer im Jahre 2003 von Walther und Mitarbeitern veröffentlichten Arbeit gelang der Nachweis einer zweiten Isoform - TPH2: TPH1 Knockout-Mäuse zeigten zwar deutlich verringerte bis nicht mehr nachzuweisende Serotoninspiegel in der Peripherie, dagegen blieben die Level des Neurotransmitters im zentralen Nervensystem unverändert. Neben der TPH1, die hauptsächlich für die Serotoninsynthese in der Peripherie zuständig ist, existiert also noch eine weitere Isoform, die TPH2. Diese ist exklusiv für die Bildung von Serotonin im ZNS verantwortlich (Invernizzi, 2007; Walther et al., 2003).

Da die TPH2 das Schlüsselenzym der neuralen Serotoninsynthese ist, führt eine veränderte Genexpression zu veränderten Serotoninspiegeln im ZNS (Zhang et al., 2004).

Ein Zusammenhang zwischen Veränderungen im serotonergen System und der Pathogenese affektiver Störungen ist in der Literatur vielfach beschrieben (Castren, 2005; Mann, 1999; Owens und Nemeroff, 1994; Ressler und Nemeroff, 2000). Dieser Zusammenhang wird zusätzlich durch die erfolgreiche Behandlung psychiatrischer Erkrankungen mit selektiven Serotonin Wiederaufnahmehemmern (SSRI) unterstützt (Belmaker und Agam, 2008; Nemeroff und Owens, 2002). Neuere Studien zeigen außerdem eine direkte Beziehung zwischen affektiven Störungen und veränderter TPH2-Expression bzw. dem TPH2-Gen (Matthes et al., 2010; Shishkina et al., 2007; Zill et al., 2004).

## 2 Fragestellung

Der Begriff der neuronalen Plastizität beschreibt die Fähigkeit des Gehirns, sich durch funktionelle und strukturelle Veränderung extrinsischen und/oder intrinsischen Reizen anzupassen. Aus der Literatur ist bekannt, dass Acetylcholin als ein Regulator der neuronalen Plastizität zu diesen Veränderungen beiträgt. Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe haben hierzu gezeigt, dass Acetylcholin die Proliferation sowie die Differenzierung von adulten neuronalen Stammzellen positiv beeinflusst (Benninghoff et al., 2011). Andere Arbeitsgruppen konnten ebenfalls neuroplastische Veränderungen nachweisen, die durch Acetylcholin hervorgerufen wurden (Bruehl-Jungerman et al., 2011; Mohapel et al., 2005). Vor diesem Hintergrund ist die Hirnregion des Hippocampus von besonderem Interesse. Sie ist nicht nur eine von zwei Regionen, in der Neurogenese stattfindet, sondern auch eine von der Alzheimerschen Demenz beeinträchtigte Hirnregion.

Eserine gehört zur Gruppe der Acetylcholinesterasehemmer. Durch Hemmung der Acetylcholinesterase kommt es zu einer Erhöhung des neuronalen ACh-Spiegels. Acetylcholinesteraseinhibitoren stellen zusammen mit dem NMDA-Modulator Memantine bei leicht bis mittelgradiger Alzheimer Demenz derzeit die einzige krankheitsspezifische medikamentöse Therapieoption dar und können die rasche Progression der Krankheit bis zu Jahren hinauszögern.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit Eserine, als Repräsentant der in der Klinik des Morbus Alzheimer eingesetzten Acetylcholinesterasehemmer, Auswirkungen auf die beschriebenen neuroplastischen Vorgänge besitzt. Hierfür wurden zunächst das Proliferationsverhalten und die Mobilisierung von undifferenzierten adulten neuronalen Hippocampus Stammzellen der Maus untersucht. Des Weiteren wurde in diesem Zellmodell der Einfluss von Eserine auf die Expression von Neurogenese-fördernden (BDNF), synaptischen (SYP), Alzheimer-spezifischen (BACE1) sowie serotonergen (TPH2) Genen analysiert, die auf unterschiedlichen Stufen der Pathogenese des Morbus Alzheimers involviert sein können.

### 3 Material

#### 3.1 Geräte

Tabelle 3-1: Verwendete Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Aluminium-Kühlblock	<i>Solid aluminium block</i>	Corbett Research, Sydney, Australien
Analysenwaage	Explorer E10645	Ohaus Corporation, Parsippany, USA
Boyden-Kammer	Boyden-Kammer	Neuro Probe, Inc., Gaithersburg, USA
Dampfsterilisator	Varioklav 500E	HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim
Eismaschine	Scotsman AF-10	Frimont S.p.a., Mailand, Italien
Fluoreszenzmikroskop	Universalmikroskop Axioplan	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Inkubator	CO <sub>2</sub> -Inkubator, CB210	Binder GmbH, Tuttlingen
Kapillarelektrophoresegerät	Agilent 2100 Bioanalyser	Agilent Technologies, Waldbronn
Kryo-Einfrierbehälter	Mr. Frosty	Nalgene, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Lichtmikroskop	Wilovert S	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5415 C	Eppendorf AG, Hamburg
Photometer	Sunrise	Tecan GmbH, Crailsheim
Pipetten (10µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhelfer	Accu-Jet Pro	Brand GmbH + CO KG, Wertheim
Real-Time PCR Thermocycler	Rotor Gene 2000	Corbett Research, Sydney, Australien

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Reinstwasseranlage	Milli-Q	Millipore GmbH, Eschborn
Sicherheitswerkbank	Hera Safe HSP12	Heraeus Instruments, Hanau
Schüttler	Kreis-Schüttler 3015	GFI GmbH, Burgwedel
Thermocycler	Mastercycler Gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Vakuumpumpe	Laboport	KNF Neuberger, Freiburg
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA
Zellzähler	Coulter Z2, Particle Count & Size Analyzer	Beckmann Coulter, Krefeld
Zentrifuge	Rotixa 120	Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen

### 3.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 3-2: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Deckgläser rechteckig, 24 x 60mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Deckgläser rund, 10mm $\varnothing$	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Eppendorfröhrchen 1,5ml, 2ml, steril	Eppendorf AG, Hamburg
Kapillarelektrophoresechip RNA 6000 NanoLab Chip	Agilent Technologies, Waldbronn
Kryoröhrchen 1,8ml, steril	Nunc, Roskilde, Dänemark
Kulturflasche 25cm <sup>2</sup> , steril	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Kulturflasche 75cm <sup>2</sup> , steril	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Kulturplatte: Nunclon delta Surface Multidish 24-well, steril	Nunc, Roskilde, Dänemark
Kulturplatte: Nunclon delta Surface Multidish 48-well, steril	Nunc, Roskilde, Dänemark
Kulturplatte Tissue Culture Plate 96 well	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Objektträger Super Frost Plus	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Pasteurpipette Natron-Kalk-Glas	Brand GmbH + CO KG, Wertheim
Petrischale Nunc, 150mm x 25mm	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Pipettenspitzen 10ml, 100ml, 200ml, 1000ml, im Haus autoklaviert	Brand GmbH + CoKG, Wertheim
Pipettenspitzen RNase-frei, Biosphere Filter Tips 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Polycarbonatmembranen PVPF, 13mmØ, Porengröße 8µm	GE Water & Process Technologies, Trevose, USA
QiaShredder Säule	Qiagen GmbH, Hilden
qRT-PCR Strip Tubes 0,1ml VE1000	LTF Labortechnik GmbH, Wasserburg
Serologische Pipette 10ml, steril	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Sterile Filtereinheit: Filtropur Vacuum Filter 500ml, Porengröße 0,2µm	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Sterile Filtereinheit: Filtropur Vacuum Filter 500ml, Porengröße 0,45µm	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Zellzählungs-Probengefäß, Accuvette ST 25ml	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld
Zentrifugenröhrchen 15ml, steril	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen 50ml, steril	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

### 3.3 Chemikalien und Puffer

**Tabelle 3-3: Verwendete Chemikalien und Puffer**

Chemikalie	Hersteller
0,1 M DTT Puffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
10µM dNTP Mix	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
4',6- Diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
5x First Strand Puffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Absolute qPCR SYBR Green Mix	Abgene, Hamburg

Chemikalie	Hersteller
Alamar Blue	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Cystein	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Earle's Balanced Salt Solution (EBSS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Eserine Salicylate	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Dibutylphthalat-Polystyren-Xylen (DPX) <i>Mountant for Histology</i>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ethanol Rotipuran >99,8% p.a.	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Giemsa Farbstoff , modifiziert	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
<i>Matrigel Basement Membrane Matrix,</i> <i>Growth Factor Reduced</i>	BD Bioscience GmbH, Heidelberg
MobiGLOW Mounting Medium	MoBiTec GmbH, Göttingen
Papain	Worthington Biochemical. Corp., Freehold, USA
Pentobarbital	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Random Hexamers	Applied Biosystems, Foster City, USA
RNAprotect Cell Reagent	Qiagen GmbH, Hilden
RNase Away	Molec. BioProducts Inc., San Diego, USA
RNase freie DNase-I (1500 Einheiten)	Qiagen GmbH, Hilden
RNase freies Wasser (Nuclease-Free Water)	Qiagen GmbH, Hilden
RNase H	New England BioLabs GmbH, Ipswich, England
RNase Inhibitor	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Roti Histofix Formaldehydlösung 4%	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Super Script II Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypanblau 0,4%	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Zählpuffer Coulter Isoton II	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld



### 3.4 Medien und Lösungen

Das in dieser Arbeit verwendete Reinstwasser wurde mit der Millipore Q-Pod, Milli.Q hergestellt und wies einen Restleitwert von 18.2M $\Omega$  auf.

#### 3.4.1 Medien

##### Vollmedium

Die für das Medium benötigten Reagenzien (Tab. 3-4, Reagenz 1-10) wurden in einer sterilen Flasche (Sarstedt AG & Co, Nürnberg) durch vorsichtiges Schwenken vermischt und mit einer sterilen Filtereinheit (Sarstedt AG & Co, Nürnberg) steril filtriert. Anschließend wurden Antimykotikum, Antibiotikum und Wachstumsfaktoren (Tab. 3-5, Reagenz 11-14) hinzugegeben.

**Tabelle 3-4: Zusammensetzung von 100ml Vollmedium**

Reagenz	Menge	Hersteller
1. Reinstwasser	40ml	Eigene Herstellung
2. DMEM/F12 5x	10ml	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
3. D(+) Glukose 30%	2ml	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
4. NaHCO <sub>3</sub> 7,5%	1,5ml	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
5. HEPES 1M	500 $\mu$ l	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
6. L-Glutamin 200mM	1ml	Biochrom AG, Berlin
7. Penicillin/Streptomycin 10 mg/ml	1ml	Biochrom AG, Berlin
8. Heparin 0,2%	200 $\mu$ l	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
9. Hormon Mix (siehe Tabelle 3-5)	10ml	Eigene Herstellung
10. Bovines Serumalbumin (BSA) gelöst in Reinstwasser	200mg gelöst in 33,8ml	Euroclone, Pero, Italien
11. Epidermal Growth Factor (EGF)	4 $\mu$ l	Peptotech GmbH, London
12. Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2)	4 $\mu$ l	Peptotech GmbH, London
13. Amphotericin B 250 $\mu$ g/ml	1ml	Biochrom AG, Berlin
14. Gentamycin 10mg/ml	1ml	Biochrom AG, Berlin

### Hormonmix

Zur Herstellung des Hormonmixes wurden die benötigten Reagenzien (Tab. 3-5) in eine sterile Flasche (Sarstedt AG & Co, Nürnberg) gegeben und durch vorsichtiges Schwenken vermischt. Anschließend erfolgte eine sterile Filtration mit einer sterilen Filtereinheit (Sarstedt AG & Co, Nürnberg).

**Tabelle 3-5: Hormonmix für Vollmedium**

Reagenz	Menge	Hersteller
DMEM/F12 (5x)	40ml	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
D(+) Glukose 30%	8ml	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
NaHCO <sub>3</sub> 7,5%	6ml	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
HEPES 1M	2ml	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Reinstwasser	300ml	Eigene Herstellung
Transferrine	400mg	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Putrescine 6mM	40ml	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Insulin	40ml	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Selen 3mM	40µl	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Progesteron 2mM	40µl	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

### Einfriermedium

Vollmedium mit 10% DMSO

### 3.4.2 Lösungen

#### Stammlösungen für Vollmedium

Stammlösung	Zusammensetzung	Sterile Filtration
5xDMEM/F12	66,9g DMEM, 53,1g F12 ad 1000ml Reinstwasser	0,45µm FilterUnit 500ml
30% D-(+)-Glucose	30g D-(+)-Glucose ad 100ml Reinstwasser	0,2µm FilterUnit 200ml
7,5%NaHCO <sub>3</sub>	7,5g NaHCO <sub>3</sub> ad 100ml Reinstwasser	0,2µm FilterUnit 200ml
1M HEPES	23,8g HEPES ad 100ml Reinstwasser	0,2µm FilterUnit 200ml
0,2% Heparin	100mg Heparin/50ml Reinstwasser	0,2µm FilterUnit 200ml
6mM Putrescin (1,4 Diaminobutandihydrochlorid)	96,6mg Putrescin/100ml Reinstwasser	0,2µm FilterUnit 200ml
3mM Selen	25,94mg Selen/50ml Reinstwasser	0,2µm FilterUnit 200ml
2mM Progesteron	31,5mg Progesteron/50ml Ethanol	-
Insulin	100mg Insulin in 4ml 0,1M HCL Lösung ad 40ml Reinstwasser	-
EGF 20µM	500µg EGF in 1ml Reinstwasser	-
FGF-2 20µM	50µg FGF-2 in 100µl Tris- HCL-Puffer 5mM, pH 7,6	-

#### Verdauungslösung

EBSS mit 0,94mg/ml Papain, 0,2mg/ml Cystein und 0,2mg/ml EDTA

**Eserine Stammlösung 500 $\mu$ M**

10,337 mg Eserine Salycilate in 50ml DMEM

**Giemsa-Lösung**

2ml Giemsa Farbstoff in 40ml H<sub>2</sub>O

**3.5 Kits****Tabelle 3-6: Verwendete Kits**

Bezeichnung	Hersteller
Cell Proliferation Kit	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Rneasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden

**3.6 Antikörper****Tabelle 3-7: Verwendete Antikörper**

Bezeichnung	Hersteller
Cy2-conjugated AffiniPure <i>Donkey- Anti-Mouse</i> IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA

## 4 Methoden

### 4.1 Zellkultur

Für die nachfolgenden Experimente wurden Zellen aus dem Hippocampus von erwachsenen Wildtyp C57B6 Mäusen (Charles River Italia, 14 Wochen alt) verwendet. Die Tiere wurden entsprechend den Richtlinien des NIH behandelt. Nachdem die Mäuse mit Pentobarbital (120mg/kg) betäubt worden waren, erfolgte die Tötung durch zervikale Dislokation. Die Gehirne wurden entnommen und in gekühltem PBS platziert. Anschließend wurden die Hippocampi vorsichtig aus den Gehirnen entfernt und für 50 Minuten bei 37°C unter leichtem Schütteln in eine Verdauungslösung (s.S. 34) gelegt. Nach der Verdauung wurden die Gewebeproben zweimal in DMEM (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) gewaschen, mechanisch mit einer hitzesterilisierten Pasteurpipette (Brand GmbH + CO KG, Wertheim) dissoziiert und schließlich in Vollmedium platziert.

#### 4.1.1 Kultivierung

Die Zellkulturen wurden unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub>-Partialdruck im Brutschrank (Binder GmbH, Tuttlingen) in Zellkulturflaschen kultiviert.

Das verwendete Vollmedium (eigene Herstellung) enthielt die Wachstumsfaktoren EGF (*Epidermal Growth Factor*) (Peprotech GmbH, London) und FGF-2 (*Fibroblast Growthfactor 2*) (Peprotech GmbH, London).

Durch diese beiden Wachstumsfaktoren sowie durch Aggregation und Proliferation formieren sich neurale Stammzellen *in vitro* zu dreidimensionalen Zellverbänden, sogenannten Neurosphären (Cattaneo und McKay, 1990; Reynolds und Weiss, 1992; Vescovi et al., 1993).

Um den Zellen ideale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten, wurde zweimal pro Woche eine Passage durchgeführt. Hierbei erfolgten der Austausch des Vollmediums und die Dissoziation der gebildeten Neurosphären.

#### 4.1.2 Passage der neuralen Stammzellen

Die Passage der Stammzellen erfolgte nach einem von Gritti und Mitarbeitern beschriebenen Verfahren und wurde zum Schutz vor Kontamination unter einer sterilen Arbeitsbank (Heraeus Instruments GmbH, Hanau) durchgeführt (Gritti et al., 2002).

Die Zellen wurden zuerst samt Medium mit Hilfe des Accu-Jet Pro (Brand GmbH+CO KG, Wertheim) aus der jeweiligen 75cm<sup>2</sup> Kulturflasche (Sarstedt AG & Co, Nürnbrecht) aufgenommen und in ein 15ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt AG & Co, Nürnbrecht) überführt. Hierbei war besonders darauf zu achten, dass die am Boden der Flasche haftenden Zellen durch mehrmaliges Überspülen gelöst und ebenfalls mit aufgenommen werden konnten.

Als nächstes wurden die Zellen in einer Zentrifuge (Rotixa 120, Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen) zehn Minuten lang bei 21°C und 800rpm sedimentiert.

Die Zellen waren jetzt in Form eines Pellets gut sichtbar und der Überstand konnte mit Hilfe einer Vakuumpumpe (Laboport, KNF Neuberger GmbH, Freiburg) abgesaugt werden.

Um die gebildeten Neurosphären zu dissoziieren, wurde 300µl frisches Vollmedium auf die Zellen gegeben und mehrfach mit einer 200µl Pipette (Eppendorf AG, Hamburg) resuspendiert.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe eines Zellzählers (Coulter Z2, Particle Count & Size Analyzer, Beckmann Coulter, Krefeld). Hierfür wurde die Suspension zunächst mit 700µl Vollmedium auf 1ml aufgefüllt. Danach wurden 10µl dieser Lösung mit 10ml *Counter Buffer* (Coulter Isoton II Diluent, Beckmann Coulter, Krefeld) in einem Probengefäß (Accuvette ST 25ml, Beckmann Coulter, Krefeld) vermischt und in den Zellzähler überführt.

Anschließend wurden jeweils 750000 Zellen in eine mit 10ml Vollmedium befüllte 75cm<sup>2</sup> Kulturflasche gegeben und wieder im Brutschrank platziert. Die erforderliche Menge an Zellsuspension konnte mithilfe der Zellzahl rechnerisch bestimmt werden.

### 4.1.3 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Zellen, die zu einem späteren Zeitpunkt erneut verwendet werden sollten, wurden zur Lagerung kryokonserviert.

Hierzu wurden die Zellen zunächst in einer Zentrifuge (Rotixa 120, Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen) bei 21°C und 800rpm sedimentiert. Danach wurde der gesamte Zellüberstand mit Hilfe einer Vakuumpumpe (Laboport, KNF Neuberger GmbH, Freiburg) abgesaugt und je 200µl Einfriermedium und zum Schutz der zelleigenen RNA 1000µl RNA-Protect Reagent (Qiagen GmbH, Hilden) hinzugegeben.

Anschließend wurde der gesamte Inhalt aus dem Zentrifugenröhrchen in ein Kryoröhrchen mit 1800µl Fassungsvermögen (Nunc, Roskilde, Dänemark) überführt und in einem speziellen Kryo-Einfrierbehälter (Nalgene, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) bei -80°C tiefgefroren. Die Wände dieses Behälters sind mit Isopropanol befüllt, was zu einer langsamen Abkühlung der Zellen führt (ca. 1C°/Minute).

Das im Einfriermedium enthaltene DMSO sowie das langsame Herunterkühlen der Zellen verhindern die Entstehung von Eiskristallen, die zu Schädigungen der Zellen führen könnten.

Zur Langzeitkonservierung der Zellen wurden diese anschließend in Flüssigstickstoff bei -196°C gelagert.

Das Auftauen der kryokonservierten Zellen erfolgte bei Raumtemperatur. Danach wurden die jeweiligen Zellsuspensionen in 1,5ml Röhrchen (Eppendorf, Hamburg) überführt und fünf Minuten bei 2100rpm sedimentiert. Nach vollständiger Entfernung des Überstands mit der Vakuumpumpe (Laboport, KNF Neuberger GmbH, Freiburg) wurde je nach Art der weiteren Verwendung der Zellen das entsprechende Medium hinzugegeben.

## 4.2 Alamar Blue Assay (Zytotoxizitätsversuch)

Um die geeignete Eserine-Konzentration für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche herauszufinden, wurde zunächst die Toxizitätsgrenze des Acetylcholinesterasehemmers ermittelt. Hierzu diente der Alamar-Blue Zellvitabilitätstest.

Das Prinzip des *Alamar Blue* Versuchs beruht auf der Erfassung vitaler Zellen anhand ihrer chemischen Reduktionsfähigkeit.

Bei der im *Alamar Blue Assay* eingesetzten Substanz handelt es sich um die chemische Verbindung Resazurin. Dieser Redox-Indikator wird von vitalen Zellen durch verschiedene Stoffwechselprozesse in seine reduzierte Form, Resofurin, umgewandelt. Dabei ändert sich dessen Farbe von blau zu rot (Ahmed et al., 1994). Da das rote Resofurin stark fluoreszierend wirkt, kann anhand der Farbintensität die Menge vitaler Zellen photometrisch gemessen werden.

Dabei gilt allgemein: Je intensiver die Fluoreszenz, desto stärker die zelluläre Reduktionskraft, desto mehr vitale Zellen.

### Durchführung

Zunächst wurden Zellsuspensionen mit 25000 Zellen pro 100µl erstellt, die jeweils unterschiedliche Konzentrationen von Eserine enthielten.

Danach wurden von jeder Zellsuspension mit einer bestimmten Eserine-Konzentration jeweils 100µl in fünf *wells* einer 96-*well*-Platte (Sarstedt AG & Co, Nürnberg) pipettiert.

Zusätzlich diente eine reine Zellsuspension ohne Zugabe von Eserine als Positivkontrolle und reines Vollmedium ohne Zellen als Negativkontrolle.

Anschließend wurden die Zellen für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von jeweils 10µl Alamar Blue pro *well* und eine erneute Inkubation von zwei Stunden.



### **Auswertung**

Nach der zweistündigen Inkubation erfolgte die Messung der Fluoreszenzemission mit Hilfe eines Photometers (Tecan GmbH, Crailsheim). Hierfür wurden eine Messwellenlänge von 570nm und eine Referenzwellenlänge von 600nm gewählt.

Abschließend erfolgte die Berechnung der Toxizitätsgrenze mit Hilfe des alamarBlue® Technical Datasheet der Firma AbD Serotec. (alamarBlue® Technical Datasheet, AbD Serotec, Oxford UK, 2009)

Aufgrund der Ergebnisse des Alamar-Blue Zellvitabilitätstest wurde für die nachfolgenden Experimente eine Eserinekonzentration von 5µM gewählt.

### **4.3 Langzeit-Proliferationsversuch**

Im Langzeit-Proliferationsversuch ging es darum, den Einfluss von Eserine auf die Proliferation der Zellen über einen längeren Zeitraum hinweg zu untersuchen. Hierfür wurde eine Zeitspanne von insgesamt vier Wochen gewählt, wobei eine Zählung der Zellen alle 96 Stunden erfolgte.

Die Kultivierung sowie die Auszählung der Zellen erfolgten bis auf wenige Unterschiede, vor allem die verwendete Zellzahl betreffend, nach dem unter 4.1.1 und 4.1.2 beschriebenen Prinzip.

Bei diesem Experiment wurden zwei verschiedene Gruppen untersucht. Zum einen die Kontrollgruppe K (unbehandelte Zellen), zum anderen die Eserine-Gruppe E (mit 5µM Eserine behandelte Zellen). Pro Gruppe wurden jeweils drei 25cm<sup>2</sup> Kulturflaschen (Sarstedt AG & Co, Nürnberg) mit jeweils 200000 Zellen und einem Endvolumen von 5ml verwendet.

Das Volumen der jeweiligen Flasche wurde wie folgt errechnet:

Eserinegruppe:

50 $\mu$ l Eserinelösung (500 $\mu$ M ) + 200000 Zellen in Suspension ad 5ml Vollmedium

Kontrollgruppe:

50 $\mu$ l DMEM + 200000 Zellen in Suspension ad 5ml Vollmedium

### **Durchführung**

Alle folgenden Schritte wurden erneut unter einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt.

Zu Beginn des Versuchs wurden die Zellen während einer Passage nach dem unter 4.1.2 genannten Verfahren ausgezählt und mit Hilfe des Ergebnisses die benötigte Menge an Zellsuspension errechnet, in der sich 200000 Zellen befanden.

Danach wurden die Volumina für die einzelnen Kulturflaschen jeder Gruppe mit Hilfe der oben genannten Formeln errechnet.

Bei der Eserinelösung (eigene Herstellung) handelte es sich um eine 500 $\mu$ M Stammlösung, die durch die in der oben genannten Formel ersichtliche 100fache Verdünnung zu einer endgültigen Konzentration von 5 $\mu$ M führte.

Durch den Einsatz an gleichem Volumen DMEM (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) in der Kontrollgruppe, wie Eserinelösung in der Eserinegruppe, wurde ein unterschiedliches Angebot an Wachstumsfaktoren in den beiden Gruppen verhindert, welches zu einem unterschiedlichen Wachstum der Zellen hätte führen können.

Danach wurden die befüllten Kulturflaschen wieder in den Inkubator (Binder GmbH, Tuttlingen) gestellt.

Nach 96 Stunden erfolgte die erste Zählung. Die Zellen wurden aus dem Inkubator genommen und mit jeder der sechs Kulturflaschen das bereits bekannte Zählverfahren durchgeführt. Nun wurden jeweils drei neue Flaschen für jede der zwei Gruppen befüllt. Um die gewünschte Zellzahl pro Flasche so genau wie möglich zu halten, wurde die benötigte Zellsuspension für die drei neuen Ansätze aus jeweils einer Flasche der entsprechenden Gruppe entnommen. Das restliche Volumen der neuen Ansätze wurde, wie weiter oben beschrieben, errechnet und in die jeweilige Flasche hinzugegeben. Die nicht benötigten Zellen wurden für nachfolgende Versuche mit dem unter 4.1.3 beschriebenen Verfahren kryokonserviert.

Diese Prozedur wurde dann fünfmal wiederholt, so dass die Proliferation der Zellen über einen Zeitraum von insgesamt 28 Tagen beobachtet werden konnte.

### Statistische Auswertung

Durch die erhaltenen Proliferationsergebnisse nach jeweils 4 Tagen konnte dann mit Hilfe folgender Formel das Gesamtwachstum der Zellen über den vierwöchigen Zeitraum geschätzt werden. Hierfür wurden jeweils die Mittelwerte der in den Experimenten angesetzten Triplets verwendet.

$$\text{Zellzahl insgesamt pro Zeitpunkt} = \frac{\text{aktuelle Auszählung} \times \text{Auszählung letzter Zeitpunkt}}{200000}$$

Für die statistische Auswertung über den Einfluss von Eserine auf die Proliferation der Zellen im Vergleich zu einer Negativkontrolle wurden pro Experiment und Gruppe die Ergebnisse logarithmiert und jeweils eine lineare Regression durchgeführt. Hierzu wurde folgende Formel verwendet:  $y = a + bx$ .  $y$  steht hier für die abhängige Variable - geschätzte Gesamtzellzahl,  $x$  für die unabhängige Variable - Zeit,  $a$  für den Achsenabschnitt der Regressionsgeraden und  $b$  für die Steigung. Anschließend wurden die berechneten Steigungen der Regressionsgeraden mit einem Wilcoxon Signed Ranks Test for paired samples miteinander verglichen. Als Software diente SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  festgelegt.

#### 4.4 BrdU-Proliferationsversuch

Der Versuch diente ähnlich wie der Langzeit-Proliferationsversuch der Zellproliferationsmessung.

Allerdings ging es hier nicht um die Veränderung der Zellproliferation über einen längeren Zeitraum hinweg, sondern vielmehr um die Frage, ob Eserine einen unmittelbaren Einfluss auf die Zellteilungsrate habe.

### **Prinzip des BrdU-Proliferationsversuchs**

Der BrdU-assay spiegelt durch Messung der DNA-Synthese von Zellen deren direkte Proliferationsaktivität wieder.

Das Prinzip des Versuchs beruht auf dem kompetitiven Einbau von 5-Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU) in die DNA während der S-Phase des Zellzyklus.

Bei BrdU handelt es sich um ein Thymidinanalogon, das sich lediglich durch den Ersatz einer Methylgruppe durch ein Brommolekül von diesem unterscheidet.

In Anwesenheit von BrdU wird dieses anstatt Thymidin in neu synthetisierte DNA eingebaut und dient somit als direkter Marker der Zellproliferation.

Um die Sensitivität der Zellen für den Einbau von BrdU zu erhöhen, werden die Zellen zeitgleich mit 5-Fluoro-2'-Desoxyuridin versetzt. Dabei handelt es sich um einen Inhibitor der Thymidin Synthese, der durch ein verringertes Angebot an endogenem Thymidin die Inkorporation des BrdUs steigert. (GE Healthcare, 2008)

Der Nachweis von eingebautem BrdU erfolgt immunozytochemisch mittels monoklonaler Antikörper. Nach Applikation eines primären Antikörpers, der spezifisch an BrdU bindet, wird ein sekundärer Antikörper (mit fluoreszierenden Eigenschaften) hinzugegeben, der den primären Antikörper visualisiert.

Auf diese Weise lassen sich die Kerne von Zellen, die sich während der Anwesenheit von BrdU in der Zellteilung befanden, also proliferatorische Aktivität zeigten, anfärben und werden so im Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

Um das Verhältnis von BrdU markierten Zellen zur Gesamtzellzahl zu bestimmen, erfolgt eine Gegenfärbung aller Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI).

Der Quotient aus proliferierten Zellen (BrdU-markierte Zellen) und Gesamtzellzahl (DAPI-markierte Zellen) spiegelt die Proliferationsaktivität der Zellen im jeweiligen Testmedium wider.

### **Durchführung**

Der Versuch wurde bis auf wenige im Folgenden beschriebene Veränderungen mit Hilfe des Cell Proliferation Kit von GE Healthcare (Buckinghamshire, UK) durchgeführt.

## Vorbereitung

Zunächst wurden unter der sterilen Arbeitsbank (Heraeus Instruments GmbH, Hanau) runde Deckgläser (10mmØ, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig) mit Matrigel (BD Bioscience GmbH, Heidelberg) beschichtet, um die Adhäsion der Zellen an den Deckgläsern zu verstärken. Hierzu wurden die Deckgläser in 48-*well*-Platten (Nunc, Roskilde, Dänemark) mit 200µl einer 1:100 Lösung aus Matrigel und DMEM bedeckt und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Nach Ablauf der 24 Stunden erfolgte die Vorbereitung der Zellen.

Sie wurden nach dem bereits beschriebenen Verfahren sedimentiert und ausgezählt und je eine Zellsuspension mit 35000 Zellen pro 500µl des jeweiligen Testmediums (Vollmedium als Positivkontrolle bzw. Vollmedium + Eserinelösung) wurde angesetzt. Danach wurde die Matrigellösung mit der Vakuumpumpe (Laboport, KNF Neuberger GmbH, Freiburg) vollständig aus den Vertiefungen der 48-*well* Platten entfernt und jeweils sechs Deckgläser wurden mit 500µl einer der beiden oben genannten Zellsuspensionen bedeckt.

Die *well*-Platte wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Partialdruck für 24 Stunden im Brutschrank (Binder GmbH, Tuttlingen) inkubiert.

## Inkorporation des BrdU

Nach 24 Stunden wurden die Zellen erneut aus dem Inkubator entnommen und es folgte die Zugabe des Proliferationsmarkers (BrdU). Hierfür wurde zunächst das mit 5-bromo-2'-Deoxyuridine und 5-fluoro-2'-deoxyuridine haltige *labeling reagent* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) im Verhältnis 1:1000 mit dem jeweiligen Testmedium gemischt und im Brutschrank für 20 Minuten erwärmt.

Anschließend wurden aus jedem *well* 400µl der Zellsuspension entfernt und jeweils 250µl des entsprechenden 0,1% *labeling reagent* hinzugefügt.

Um die Inkorporation des BrdU zu ermöglichen wurden die Zellen für eine Stunde bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub>-Partialdruck inkubiert.

Nach Ablauf der einstündigen Inkubation wurde das jeweils in den *wells* befindliche Medium mit Hilfe der Vakuumpumpe komplett abgesaugt und jedes Deckglas zum Waschen in je 1ml PBS (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) für fünf Minuten auf einem Schüttler (Kreis-Schüttler 3015, GFI GmbH, Burgwedel) bei Raumtemperatur inkubiert.

### Fixierung der Zellen

Die Deckgläser wurden von dem PBS befreit und es folgte die Fixierung der Zellen mit je 500µl einer 4%igen Formaldehydlösung (Roti Histofix, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) auf dem Schüttler für 20 Minuten bei Raumtemperatur.

Um die Deckgläser anschließend zu waschen, wurden sie dreimal jeweils vier Minuten in 1ml PBS inkubiert.

### Färbung der Zellen

- Applikation des primären Antikörpers

Zunächst wurde die gefriergetrocknete DNase-I (Qiagen GmbH, Hilden) mit 4ml Reinstwasser und 40µl des BrdU spezifischen Antikörpers (*Anti-5-bromo-2'-deoxyuridine monoclonal mouse antibody*, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) versetzt. Anschließend wurde die Lösung gut vermischt und auf Raumtemperatur erwärmt. Nach Entfernen des PBS wurden auf je fünf Deckgläser pro Testmedium 150µl der hergestellten Lösung gegeben, beim sechsten Deckglas wurde als Negativkontrolle auf den primären Antikörper verzichtet. Anschließend wurde die Platte für 60 Minuten inkubiert.

Während dieser Zeit konnte die eingesetzte DNase-I die DNA spalten und ermöglichte somit die Bindung des Antikörpers an das in die DNA eingebaute BrdU. Danach erfolgte erneut eine dreimalige Waschung mit anschließender Entfernung des PBS.

- Applikation des sekundären Antikörpers

Hier wurde ein Cy2-conjugated AffiniPure *Donkey-Anti-Mouse* IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) Antikörper verwendet.

Da dieser Antikörper wie auch das später eingesetzte 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) fluoreszierende Eigenschaften besitzt, wurde lichtgeschützt gearbeitet, um das Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs zu verhindern.

Zunächst wurde der Antikörper im Verhältnis 1:1000 mit eisgekühltem PBS gemischt und jeweils 300µl dieser Lösung in die *wells* gegeben. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubationszeit, in welcher der applizierte Antikörper an den primären Anti-BrdU Antikörper binden konnte und somit die proliferationsaktiven Zellen markierte bzw. sichtbar machte. Es folgte wiederum ein dreimaliges Waschen mit PBS.

- Färbung aller Zellkerne mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindol

Wie bereits beschrieben, sind für eine zuverlässige Auswertung nicht nur die Menge der proliferierten Zellen, sondern auch das Verhältnis dieser zur Gesamtzellzahl notwendig. Um die Gesamtzellzahl herauszufinden erfolgte eine Färbung aller vorhandenen Zellkerne unabhängig von ihrer Proliferationsaktivität mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim).

DAPI wurde ebenfalls in einer Konzentration von 1:1000 in PBS verwendet.

Jeweils 300µl dieser Lösung wurden auf die Deckgläser pipettiert und anschließend für zehn Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in den Inkubator gestellt.

### **Platzieren der Deckgläser auf den Objektträgern**

Nach einem letzten dreimaligen Waschen der Deckgläser und vollständiger Entfernung des PBS wurde erneut jeweils 50µl PBS in die *wells* pipettiert. Anschließend wurden die Deckgläser vorsichtig mit einer Pinzette aus den *wells* entnommen, in Reinstwasser getaucht und kurz getrocknet.

Zuletzt erfolgte das Platzieren der Deckgläser auf Objektträgern. Hierfür wurden jeweils zwei Deckgläser mit der Oberseite nach unten und 100µl MobiGLOW Mounting Medium (MoBiTec GmbH, Göttingen) auf einem Objektträger (Super Frost Plus, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig) fixiert und zum Trocknen für mindestens 24 Stunden lichtgeschützt bei 4°C gelagert. Bei MobiGLOW handelt es sich um ein Einbettmedium, das die Zellen in einem dauerhaften Zustand konserviert und das Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs verringert.

### **Statistische Auswertung**

Die Auswertung erfolgte verblindet unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan, Firma Carl Zeiss AG, Oberkochen). Pro Experiment wurden jeweils drei Deckgläser pro Gruppe ausgewertet. Auf jedem dieser Deckgläser wurden wiederum fünf Gesichtsfelder zufällig ausgewählt und analysiert, so dass pro Experiment 15 Gesichtsfelder jeder Gruppe analysiert wurden.

Innerhalb eines Gesichtsfelds wurden zunächst die mit DAPI markierten Zellen und dann die mit BrdU markierten Zellen ausgezählt. Anschließend wurde das Verhältnis

von proliferationsaktiven Zellen (BrdU-markierte Zellen) an der Gesamtzellzahl (DAPI-markierte Zellen) ermittelt.

Die statistische Analyse erfolgte mit der Software SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Die Daten wurden über eine Varianzanalyse (ANOVA) auf Signifikanz überprüft. Dabei wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  festgelegt.

#### **4.5 Zellmobilisierungsversuch**

Mit Hilfe dieses Versuchs konnte der Einfluss von Eserine auf die Mobilisierung der adulten neuralen Stammzellen analysiert werden.

##### **Die Boyden-Kammer**

Zur Untersuchung der Zellmobilisierung diente eine sog. *Boyden chamber* (Boyden-Kammer).

Bei der Boyden-Kammer handelt es sich um ein im Jahre 1962 von Stephen Boyden entwickeltes System, welches ursprünglich zur Untersuchung des chemotaktischen Verhaltens von Leukozyten verwendet wurde (Boyden, 1962).

Die Kammer ist ein wiederverwendbares Ein-*well*-System und besteht im Wesentlichen aus einem oberen Kompartiment (Fassungsvermögen ca. 220 $\mu$ l) und einem unteren Kompartiment (Fassungsvermögen ca. 55 $\mu$ l), welche durch eine Membran voneinander getrennt sind.

Die untere Kammer wird mit der jeweils zu testenden Substanz befüllt, die im Deckel befindliche obere Kammer mit den zu testenden Zellen.

Die in der Mitte angebrachte Membran ist mit Mikroporen ausgestattet, wobei die Porengröße so gewählt werden muss, dass die zu untersuchenden Zellen die Membran nur aktiv durchwandern können.

Bei entsprechendem Reiz kommt es zu einer Mobilisierung, d.h. aktiven Wanderung der Zellen durch die Membran.



## Vorbereitung

### Beschichten der Polycarbonatmembranen mit Matrigel

Matrigel ist eine lösliche rekonstruierte Basalmembran, die aus Engelbreth-Holm-Swarm Maussarkomzellen extrahiert wurde. Da dieser Tumor eine große Menge an Proteinen der Extrazellulärmatrix enthält (Laminin, Kollagen IV, Heparansulfatproteoglycan, Entactin), ist es möglich diese mithilfe des Extrakts zu imitieren. In diesem Versuch diente diese Substanz hauptsächlich der verbesserten Haftung der Zellen an der Membran. (BD Bioscience GmbH, 2008)

Um eine flüssige Konsistenz des Matrigels (BD Bioscience GmbH, Heidelberg) zu erreichen, wurde es aus dem Gefrierschrank (-20°C) entnommen, mehrere Stunden bei 4°C gelagert und anschließend mit DMEM (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) 1:1000 verdünnt.

Jeweils eine Polycarbonatmembran (GE Water & Process Technologies, Trevose, USA) mit einem Durchmesser von 13mm und einer Porengröße von 8µm wurde dann in einem *well* einer 24-*well*-Kulturplatte (Nunc, Roskilde, Dänemark) mit 500µl der Lösung bedeckt und für mindestens sechs Stunden im Inkubator (Binder GmbH, Tuttlingen) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gelagert.

### Vorbereitung der Zellen und Ansetzen der Testmedien

Die jeweils an dem Tag zu verwendenden Zellen wurden bereits 24h zuvor passagiert. Am Tag des Versuchs wurden die Zellen erneut passagiert. Allerdings wurde nach der Zentrifugation der Zellen der Überstand komplett entfernt und in diesem Versuch mit 300µl DMEM aufgefüllt. Durch den Einsatz von DMEM wurde verhindert, dass die Zellen von den im Vollmedium befindlichen Wachstumsfaktoren (EGF/FGF-2) zurückgehalten wurden. Dies hätte zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen können.

Nach anschließender Resuspension und Zugabe von weiteren 700µl DMEM wurden die Zellen nach der bekannten Methode gezählt und die Menge der benötigten Zellsuspension berechnet (50000 Zellen in 220µl DMEM). Als Testmedien dienten die 5µM Eserinelösung sowie neutrales Medium (DMEM) als Kontrolle.

### **Befüllen der Kammern**

Der untere Teil der Boyden-Kammer (Neuro Probe, Inc., Gaithersburg, USA) wurde mit dem Testmedium befüllt. Hierzu wurden jeweils 55µl der entsprechenden Substanz in die zentrale Vertiefung des unteren Kompartiments pipettiert.

Anschließend wurde die mit Matrigel beschichtete Membran vorsichtig auf die zentrale Vertiefung platziert. Hier war besonders darauf zu achten, die Entstehung von Luftblasen zu vermeiden, da diese den Kontakt der Zellen mit der zu testenden Substanz und somit eine eventuelle Wanderung verhindern würden.

Danach wurde der obere Teil der Boyden-Kammer fest in den unteren Teil geschraubt und vorsichtig, unter Vermeidung von Luftblasen, mit 220µl Zellsuspension befüllt. Durch den oben beschriebenen Aufbau der Kammer waren die Zellen somit in direktem Kontakt mit der Membran und nur durch diese vom jeweiligen Testmedium getrennt.

### **Wanderung der Zellen**

Pro Testmedium wurden jeweils drei Boydenkammern (Triplets) befüllt und anschließend bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Partialdruck für sechs Stunden im Brutschrank inkubiert. Dies waren optimale Bedingungen für die Zellen, bei entsprechendem Reiz die Membran aktiv zu durchwandern.

### **Färbung der Zellen und Platzieren der Membranen auf den Objektträgern**

Im Anschluss an die sechsstündige Inkubation der Zellen wurden die Kammern aus dem Brutschrank entnommen und die Zellsuspension aus dem oberen Kompartiment entfernt. Dies erfolgte durch Umdrehen und mehrmaliges Beklopfen der Kammern.

Danach konnte der obere Teil der Kammer aus dem unteren Teil herausgeschraubt und die Membran mit einer Pinzette entnommen werden. Mithilfe eines Wattestäbchens wurden anschließend die nicht gewanderten, auf der Oberseite der Membran befindlichen Zellen vorsichtig entfernt.

Die Membranen wurden nun umgedreht, so dass die Oberseite nach unten zeigte und mit Stecknadeln in einer mit erkaltetem Wachs gefüllten Petrischale befestigt.

Anschließend folgte die Fixierung der Zellen mit 100% Ethanol (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) für eine Minute. Nach Abgießen des Ethanols wurden die Membranen einige Male vorsichtig mit Wasser gespült.

Die Färbung der Zellen erfolgte mit 42ml einer 1:20 Giemsa-Lösung (s.S. 34). Nach 20 Minuten wurde die Giemsa-Lösung abgegossen und die Membranen erneut mit Wasser gewaschen.

Als nächstes erfolgte das Aufbringen der Membranen auf Objektträger (Super Frost Plus, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig). Hierfür wurden jeweils zwei Membranen kurz an der Luft getrocknet und mit der Unterseite nach oben vorsichtig nebeneinander auf einem Objektträger platziert. Anschließend wurden sie mit einem Tropfen Dibutylphthalat-Polystyren-Xylen (DPX) (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) und einem Deckglas (24 x 60mm, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig) fixiert und für mindestens 24h getrocknet.

### **Statistische Auswertung**

Die Auswertung erfolgte verblindet unter dem Lichtmikroskop (Helmut Hund GmbH, Wetzlar) in 40facher Vergrößerung. Pro Experiment wurden jeweils drei Membranen von jeder Gruppe ausgewertet. Auf jeder dieser Membranen wurden wiederum fünf Gesichtsfelder zufällig ausgewählt und analysiert, so dass pro Experiment 15 Gesichtsfelder jeder Gruppe ausgewertet wurden. Innerhalb eines dieser Gesichtsfelder wurden jeweils die durch die Membran hindurch gewanderten Zellen gezählt.

Die statistische Analyse erfolgte mit der Software SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Die Daten wurden über eine Varianzanalyse (ANOVA) auf Signifikanz überprüft. Dabei wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  festgelegt.

## **4.6 Quantitative Genexpressionsanalyse mittels Real-Time PCR**

Durch Analyse der RNA bzw. cDNA mittels Real-Time PCR konnte die differentielle Expression bestimmter Gene von Eserine behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen untersucht werden.

Hierfür wurde zunächst RNA von unbehandelten und mit 5µM Eserine behandelten Zellen extrahiert und revers transkribiert. Um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden hierfür jeweils fünf unterschiedliche Zellpassagen eingesetzt.

Anschließend wurden die gewonnenen Proben mit Hilfe der Real-Time PCR analysiert.

### **4.6.1 RNA-Extraktion**

Zunächst musste die RNA der Zellen gewonnen werden. Dies erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden).

Dieses Kit kombiniert die selektive RNA-Bindungsfähigkeit einer Silikamembran mit der Microspinttechnologie.

Mit Hilfe eines stark denaturierenden Puffers, der Guanidin-Thiocyanate enthält und RNasen umgehend inaktiviert, werden die zu untersuchenden Zellen zuerst lysiert und dann durch eine QIAshredder Säule homogenisiert. Durch die anschließende Zugabe von Ethanol werden perfekte Bedingungen für die RNA geschaffen, um an der Silikamembran zu binden. Um Kontaminationen zu entfernen wird die Membran abschließend mehrere Male gewaschen und die reine RNA kann in RNase freiem Wasser eluiert werden. (Qiagen GmbH, 2006)

### Durchführung der Extraktion

Die Zellen wurden zunächst durch Zugabe von 600µl des mit  $\beta$ -Mercaptoethanol (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) versetzten RLT-Puffers (Qiagen GmbH, Hilden) lysiert. Anschließend wurden die Zellen homogenisiert, indem sie in einer QiaShredder Säule zwei Minuten bei 14000rpm zentrifugiert wurden.

Danach wurde dem homogenen Zelllysate 600µl 70%-iger Ethanol hinzugefügt, gut gemischt und in einer Mini Spin Column (Qiagen GmbH, Hilden) 15 Sekunden bei 10000rpm zentrifugiert. Durch die Anwesenheit des Ethanols konnte die RNA, unter Ausbildung von Wasserstoffbrücken, selektiv an die Silikamembran der Mini Spin Column gebunden werden.

Der Durchfluß wurde verworfen und es erfolgte der erste von insgesamt vier Waschschritten, in denen verschiedene zelluläre Bestandteile wie z.B. Salze oder Proteine von der Membran entfernt wurden. Hierfür wurden 350µl RW1-Puffer (Qiagen GmbH, Hilden) auf die Silikamembran pipettiert und das Röhrchen 15 Sekunden bei 10000rpm zentrifugiert.

Um eventuell vorhandene genomische DNA-Reste von der Membran zu entfernen, wurde die Membran 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 80µl einer DNase-Lösung (10µl DNase I Stammlösung + 70µl RDD Puffer (Qiagen GmbH, Hilden)) inkubiert.

Nach Ablauf der 15 Minuten wurde die Membran erneut mit 350µl RW1-Puffer gewaschen. Der dritte und vierte Waschschritt erfolgte mit jeweils 500µl eines mit Ethanol versetztem RPE-Puffers (Qiagen GmbH, Hilden) für 15 Sekunden bei 10000rpm.

Anschließend wurde die Membran zwei Minuten bei 10000rpm getrocknet.

Zuletzt erfolgte die Elution der RNA. Hierfür wurde die Mini Spin Column in ein neues Röhrchen gestellt und 30µl RNase freies Wasser auf die Silikamembran pipettiert. Nach dreiminütiger Inkubation auf Eis wurde die Mini Spin Column eine Minute bei 10000rpm zentrifugiert, um die gebundene RNA aus der Membran zu lösen.

Dieser Schritt wurde zur maximalen Ausbeute der RNA ein weiteres Mal wiederholt.

Die eluierte RNA wurde umgehend auf Eis gekühlt und bis zur weiteren Untersuchung bei -80°C gelagert.

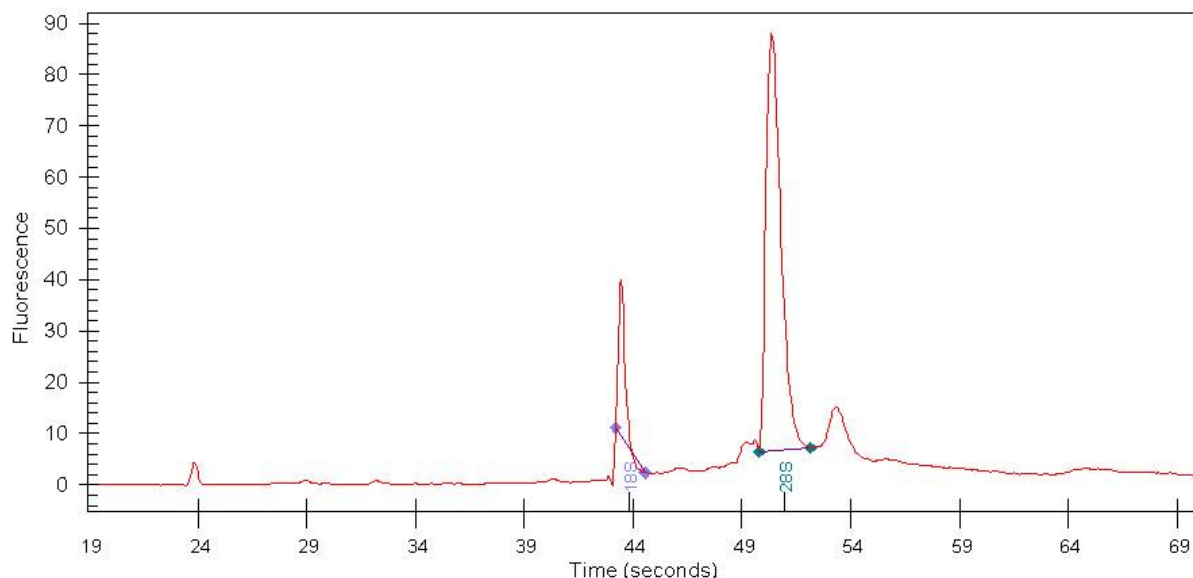
Die Extraktion wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Um eine Kontamination mit RNasen zu verhindern erfolgte die Extraktion an einem speziell mit RNase Away (Molecular BioProducts Inc., San Diego, USA) gereinigten Arbeitsplatz mit ausschließlich RNase-freiem Einmalmaterial.

#### 4.6.2 Quantitative und qualitative RNA-Bestimmung

Sowohl die Konzentration als auch die Qualität der extrahierten RNA wurde mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn) unter Verwendung des RNA 6000 NanoLab Chip (Agilent Technologies, Waldbronn) bestimmt.

Die Methode beruht auf dem Prinzip der Kapillarelektrophorese. Auf dem Chip befindet sich ein System aus zahlreichen Mikrokapillaren. Die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten RNA-Proben werden durch die Mikrokapillaren geführt und elektrophoretisch anhand ihrer Fragmentgröße aufgetrennt. Anschließend werden die Probenbestandteile mit Hilfe eines Lasers detektiert.

Durch die gleichzeitige Analyse eines internen RNA-Standards können sowohl Aussagen über die Quantität als auch über die Qualität der RNA getroffen werden. Als Qualitätskriterium gilt hier der 28S/18S-rRNA-Quotient, der im Optimalfall 2,0 beträgt. Da dieser Wert in der Praxis nur schwer zu erreichen ist (Fleige und Pfaffl, 2006), wurden für die nachfolgenden Experimente ausschließlich RNA-Proben mit einem Quotient zwischen 1,7 und 2,0 verwendet.



**Abbildung 4-1: Elektropherogramm einer RNA Probe quantifiziert mit dem Agilent Bioanalyzer 2100. Deutlich abgegrenzt sind die Peaks der 28S- und 18S-rRNAs. (Agilent Bioanalyzer 2100 Software)**

Für die Messung der Gesamt-RNA wurde der Elektrophorese-Chip nach Vorgabe mit Nano Gel Matrix (Agilent Technologies, Waldbronn) und einem Fluoreszenzfarbstoff (Agilent Technologies, Waldbronn) vorbereitet. Als interner Standard diente die RNA 6000 Leiter (Agilent Technologies, Waldbronn). Jeweils 1µl der extrahierten RNA wurde auf einen Messplatz des LabChips gegeben und nach Herstellerangaben im Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn) analysiert.

### 4.6.3 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkription

Da die isolierte RNA sehr empfindlich gegenüber freien RNAsen ist, wurde sie in die stabilere komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben.

Dies erfolgte im Wesentlichen in zwei Schritten.

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, bei dem es sich um eine RNA-abhängige Polymerase handelt, wird zunächst der zum RNA-Strang komplementäre DNA-Strang gebildet. Als Primer dienen hierbei sogenannte *Random Hexamer* Primer. Dabei handelt es sich um Oligonukleotide, die jeweils aus sechs zufällig zusammengesetzten Nukleotiden bestehen. Da sich in der Random Hexamer Primer-Lösung jede mögliche Nukleotidkombination ( $4^6$ ) befindet, können die Primer auch an jeden vorhandenen RNA Abschnitt binden (Feinberg und Vogelstein, 1983). Im zweiten Schritt wird der RNA-Strang mit Hilfe des Enzyms RNase H abgebaut. RNase H ist eine Ribonuklease, die RNA-DNA-Hybride erkennt und durch Hydrolyse spaltet.

#### Durchführung

Auch hier wurden, wie schon bei der RNA Extraktion, die Arbeitstische speziell gereinigt und ausschließlich RNase freie Materialien verwendet.

Jeweils 1µg der extrahierten RNA wurde mit RNase-freiem Wasser (Qiagen GmbH, Hilden) aufgefüllt, so dass sich ein Volumen von je 6µl ergab.

Als nächstes wurde der sogenannte Mastermix angesetzt. Dieser enthielt neben 5x First Strand Puffer (Invitrogen GmbH, Karlsruhe), Dithiothreitol (DTT) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe), dNTP Mix (je 100mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) (Fermentas

GmbH, St. Leon-Rot), Random Hexamer Primer (Applied Biosystems, Foster City, USA) und RNase freiem Wasser auch RNase Inhibitor (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) (zur Verhinderung des vorzeitigen RNA Abbaus) (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) und die Reverse Transkriptase (Superscript II) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe).

Tabelle 4-1 zeigt die jeweilige Menge der Reagenzien für eine Reaktion.

**Tabelle 4-1: Menge der pro Reaktion verwendeten Reagenzien**

<b>Reagenz</b>	<b>Menge pro Reaktion</b>
5x First Strand Buffer	4,0µl
0,1 M DTT	2,0µl
10µM dNTP Mix	1,0µl
Random Hexamer Primer	1,0µl
Superscript II RT (15U/µL)	1,0µl
RNase Inhibitor (40U/µl)	0,5µl
RNase freies Wasser	4,5µl
TOTAL	14,0µl

Aus der Anzahl der Reaktionen ergab sich die Gesamtmenge des Mastermix.

Jeweils 14µl des Mastermix wurden zu 6µl RNA hinzupipettiert und bei folgendem Programm in den Thermocycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf AG, Hamburg) gegeben:

**25°C (10 min)**

**42°C (50 min)**

**70°C (15 min)**

**4°C (HOLD)**

Die ersten zehn Minuten der Reaktion gewährleisteten die Anlagerung der Primer bei Raumtemperatur. In den folgenden 50 Minuten erfolgte die Reverse Transkription bei 42°C. Schließlich wurde die Reaktion durch Denaturierung der Superscript II bei 70°C gestoppt und auf 4°C heruntergekühlt.



Anschließend wurde jeweils 1µl RNase H (New England BioLabs GmbH, Ipswich) hinzugegeben und 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Dies diente dem Abbau der in den Reaktionsansätzen befindlichen RNA. Jede cDNA-Probe wurde mit Reinstwasser auf eine Konzentration von 1ng/µl verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Proben zur Herstellung der Standardkurve wurden gepoolt, auf Konzentrationen von 10ng/µl, 3ng/µl, 1ng/µl, 0,3ng/µl und 0,1ng/µl verdünnt und anschließend ebenfalls bei -20°C aufbewahrt.

#### 4.6.4 Primerdesign

Um die Genexpression mittels Real Time PCR zu analysieren, wurde pro Gen jeweils ein spezifisches Primerpaar benötigt.

Primer sind Oligonukleotidsequenzen, die spezifisch an das DNA-*template* des gesuchten Gens binden. Sie dienen als Start- und Stoppunkt für DNA-synthetisierende Enzyme, die den DNA-Abschnitt zwischen zwei Primerpaaren amplifizieren und so eine Analyse der Expression des gewünschten Genabschnitts ermöglichen.

Da die Primer eine entscheidende Rolle für ein erfolgreiches Messergebnis spielen, war ein optimales Primerdesign unerlässlich.

Zunächst wurde die mRNA-Sequenz des gewünschten Gens über die Gendatenbank Ensembl (Ensembl, 2011) abgerufen und die Exon-Exon Grenzen identifiziert.

Die zu analysierende cDNA besitzt, als Komplement zur mRNA, im Gegensatz zu genomischer DNA keine Introns mehr.

Durch die Identifikation der angrenzenden Exons ist es später möglich, die Primer über einen solchen Exon-Exon Übergang zu legen und so die ungewollte Amplifikation von Verunreinigungen aus genomischer DNA zu verhindern (Hurteau und Spivack, 2002).

Die Primer wurden mit der vom Whitehead Institute for Biomedical Research kostenfrei zur Verfügung gestellten Software Primer3 (Primer3, 2011) erstellt.

Um das Design optimaler Primer zu gewährleisten, mussten eine Reihe an Kriterien, soweit möglich, erfüllt werden.

Die Primer sollten 18-22 Nukleotide lang sein und einen GC-Basenanteil von 40-60% haben. Ihre Schmelztemperatur wurde auf 59-61°C festgelegt, wobei sich die Temperatur der beiden Primer eines Primerpaares um maximal 1°C unterscheiden durfte.

Eine Hybridisierung der Primer untereinander (sog. Primerdimere) wurde durch maximal drei komplementäre Basen am 3'-Ende möglichst verhindert.

Des Weiteren wurden Primer vermieden, die interne komplementäre Sequenzen aufwiesen, da hierdurch Sekundärstrukturen (*hairpins*) auftreten könnten.

Alle in Primer3 verwendeten Einstellungen sind in Tabelle 4-2 abgebildet.

**Tabelle 4-2: Primer3 Einstellungen**

Kriterium	Einstellung
Product Size	50-150 bp
Primer Size	18-20-25 bp
Primer Temperature	59-60-61°C
Primer CG%	40-50-60%
Max. 3' Self Complementary	3
Max. Poly X	3

Abschließend wurden alle Primer mit dem NIH Genomic BLAST-Programm (NCBI BLAST, 2011) auf ihre Spezifität überprüft.

Die Primer wurden von der Firma Invitrogen GmbH synthetisiert und in lipophylierter Form geliefert. Anschließend wurden die Oligonukleotide mit Reinstwasser auf eine 100pmol/µl konzentrierte Stammlösung gebracht und bei -20°C gelagert.

Alle in der Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 4-3 und 4-4 aufgelistet.

**Tabelle 4-3: Primer der Referenzgene**

Genname	Forward Primer 5'-3'	Reverse Primer 5'-3'
ACTB	GCCTTCCTTCTTGGGTATGG	AGCACTGTGTTGGCATAGAGG
ARBP	GAAAATCTCCAGAGGCACCATTG	TCCCACCTTGTCTCCAGTCTTTATC
GAPDH	CCCCTCTTCCACCTTCGATG	GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG
HPRT	CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC	GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC
PPIA	TATCTGCACTGCCAAGACTGAATG	CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC
TBP	CCGTGAATCTTGGCTGTAACTTG	GTTGTCCGTGGCTCTCTTATTCTC

**Tabelle 4-4: Primer der *genes of interest***

Genname	Forward Primer 5'-3'	Reverse Primer 5'-3'
BACE	TCGCTTGCCCAAGAAAGTAT	CTGCTCCCCTAGCCAAAAG
BDNF	CCCATGAAAGAAGTAAACGTCC	GTCGTCAGACCTCTCGAACC
SYP	CAAGGAGATGCCTATGTGCC	AACACGAACCATAGGTTGCC
TPH2	AATTGAAGCATGCTCTTTCC	TTCAAAACTGTCCGAAACAAA

#### 4.6.5 Quantitative Real Time PCR

Die quantitative Echtzeit PCR (*real time quantitative PCR*, qPCR) beruht auf dem gleichen Prinzip wie die herkömmliche Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR). Allerdings kann mit dieser Methode nicht nur festgestellt werden, ob ein bestimmter DNA Abschnitt vorhanden ist, sondern es können auch Aussagen über die Quantität dieses Abschnitts getroffen werden.

Dies gelingt mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs, der an doppelsträngige DNA bindet, worauf der Grad seiner Fluoreszenz zunimmt. Die Fluoreszenzintensität kann gemessen werden und ist direkt proportional zur Menge des amplifizierten DNA Abschnitts.

Da es möglich, ist die neu entstandenen PCR-Produkte bereits während des Laufs in Echtzeit zu beobachten, wird dieses Verfahren als *real time* PCR (Echtzeit PCR) bezeichnet.

### **Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I**

Der Nachweis der PCR Produkte erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green I. Wie bereits weiter oben erwähnt bindet der Farbstoff an doppelsträngige DNA und erhöht dadurch seine Fluoreszenzintensität.

Da SYBR Green jedoch unspezifisch an jegliche doppelsträngige DNA bindet, kann es zur ungewollten Markierung von unspezifischen DNA Produkten und Primerdimeren kommen. Um dies zu überprüfen kann eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Im Optimalfall hat der Farbstoff nur an ein spezifisches Produkt gebunden und die Schmelzkurve zeigt nur einen *Peak* (Bustin, 2000).

### **Relative Quantifizierung**

Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression des zu untersuchenden Gens nicht absolut gemessen, sondern in Relation zu einem oder mehreren nicht regulierten Referenzgenen gesetzt (Normalisierung) (Pfaffl, 2004).

Hierfür wurde zunächst der sog. Ct-Wert benötigt. Er wird als Maß für die ursprüngliche Produktmenge verwendet.

Der Ct-Wert (*cycle threshold*) beschreibt jenen PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz der Probe über eine definierte Hintergrundfluoreszenz ansteigt.

Dieser Zyklus befindet sich in der exponentiellen Phase der Reaktion, da nur hier von einer Verdopplung der PCR Produkte pro Zyklus ausgegangen werden kann.

Beim Erreichen des vorgegebenen Fluoreszenzniveaus beinhaltet also jede Probe die gleiche Menge an PCR Produkten. Je weniger Zyklen dafür benötigt werden, desto höher war die Startmenge an cDNA. Der Ct-Wert verhält sich dabei umgekehrt proportional zur cDNA Konzentration.

Dieses Schema setzt eine Amplifikationseffizienz von 2 (100%) voraus. In der Praxis werden jedoch meist Werte erhalten, die zwischen 1,5 und über 2 schwanken.

Über die Ct-Werte einer Standardkurve, die mit Hilfe einer Verdünnungsreihe bekannter cDNA-Konzentrationen generiert wurde, können die Effizienzen für die einzelnen qPCR-Läufe berechnet werden. (Pfaffl, 2004)

Hierfür wurde cDNA von unbehandelten hippocampalen Stammzellen entsprechend verdünnt (10ng/μl, 3ng/μl, 1ng/μl, 0,3ng/μl, 0,1ng/μl) und in jedem qPCR-Lauf eingesetzt.

Das für die spätere Auswertung der qPCR Ergebnisse verwendete Programm qbase kann mit Hilfe des Tools „PCR efficiency correction“ die einzelnen Effizienzen korrigieren und somit die Schwankungen der Werte kompensieren.

### **Normalisierung**

Ein weiterer Faktor, der zu einer fehlerhaften quantitativen Aussage führen kann, ist die unterschiedliche Menge von Startmaterial innerhalb der einzelnen Proben, welche unter anderem durch eine unterschiedliche Effizienz während der RNA-Extraktion oder der cDNA Synthese bedingt ist.

Um diese Variation auszugleichen erfolgt die Normalisierung der Proben auf sogenannte Referenzgene.

Ein Referenzgen (*housekeeping gene*) ist ein Gen, dessen Produkt in der Regel für die basale Zellfunktion notwendig ist. Deshalb wird davon ausgegangen, dass es ubiquitär ist und weitestgehend konstant exprimiert wird.

Das ideale Referenzgen wird nicht reguliert, d.h. dass weder exogene noch endogene Faktoren Einfluss auf seine Expression haben. Zudem sollte es über den gesamten Untersuchungszeitraum so wenige Schwankungen wie möglich aufweisen (Suzuki et al., 2000).

Ein solches „ideales Referenzgen“ konnte allerdings bis heute nicht ermittelt werden. Deshalb wurden mehrere *housekeeping* Gene unter den in dieser Arbeit individuellen Versuchsbedingungen in Hinblick auf die Stabilität ihres Expressionsniveau getestet (Dheda et al., 2004; Tricarico et al., 2002).

Hierzu diente das Programm GeNorm. Es ermittelt die stabilsten Referenzgene und berechnet durch geometrisches Mitteln einen Normalisierungsfaktor (Vandesompele et al., 2002).

## Durchführung

Die Durchführung der qPCR erfolgte mit dem Thermocycler Rotor Gene 2000 (Corbett Research, Sydney, Australien). Als Fluoreszenzfarbstoff diente der absolute qPCR SYBR Green Mix (Abgene, Hamburg).

Die Reaktionsgefäße (LTF Labortechnik GmbH, Wasserburg) mit einem Fassungsvermögen von 0,1ml wurden während des Experiments auf einem gekühlten Alublock (Corbett Research, Sydney, Australien) platziert.

Jeder PCR-Lauf enthielt jeweils Triplets der zu analysierenden Proben, der Verdünnungsstufen der Standardkurve sowie der Negativkontrolle.

Die einzelnen Reaktionsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

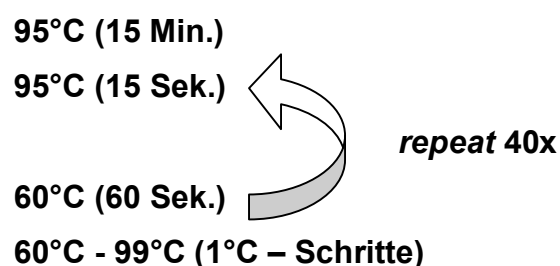
**Tabelle 4-5: Zusammensetzung der einzelnen Reaktionsansätze**

Reagenz	Volumen pro Reaktion
cDNA	10,0µl
SYBRGreen Mix	12,5µl
Forward Primer	1,0µl
Reverse Primer	1,0µl
RNase freies Wasser	0,5µl
Gesamt	25µl

Zuerst wurden die Rörchen mit jeweils 10µl der entsprechenden cDNA Probe befüllt.

Danach wurde der Mastermix mit dem jeweiligen spezifischen Primerpaar (auf 10nmol/µl verdünnt) erstellt und 15µl in jedes Rörchen pipettiert.

Schließlich wurden sämtliche Proben im Rotorgene positioniert und die Reaktion wurde unter folgendem Protokoll gestartet:

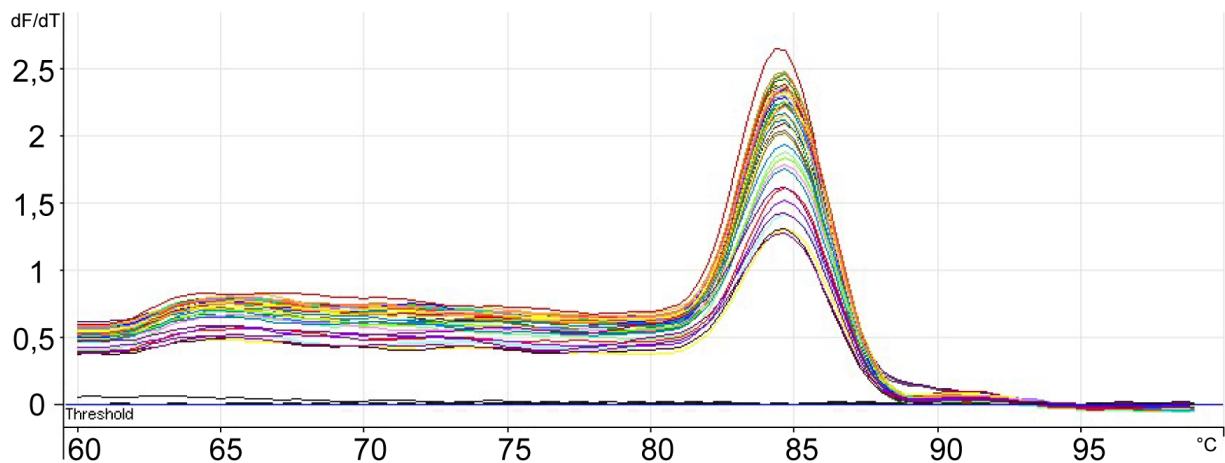


Initial erfolgte die Denaturierung und Aktivierung der Polymerase bei 95°C für 15 Minuten. Danach folgten 40 Schritte, jeweils bestehend aus einer 15sekündigen Denaturierung bei 95°C, gefolgt von der Annealing- und Elongationsphase für 60 Sekunden bei 60°C.

Abschließend wurde die Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, indem die Proben kontinuierlich in Temperaturschritten von jeweils 1°C von 60°C auf 99°C erhitzt wurden.

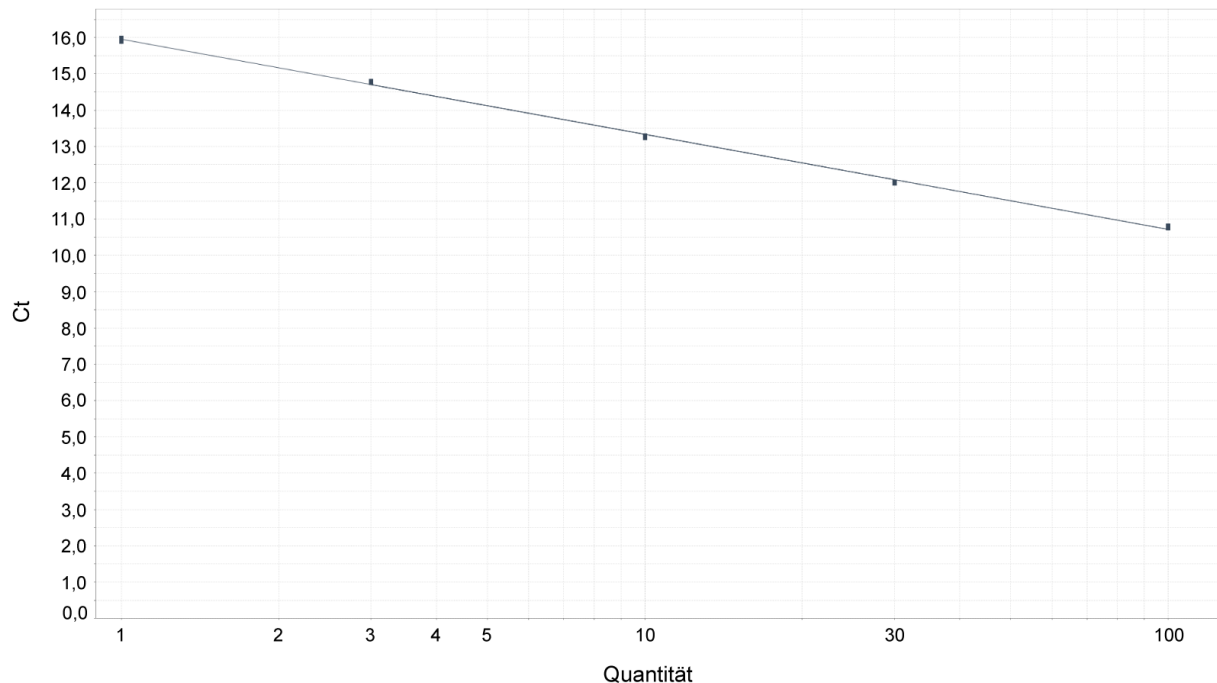
### Qualitätskontrolle

Alle PCR-Läufe wurden einer Qualitätskontrolle unterzogen. Für die Auswertung wurde eine homogene Schmelzkurve vorausgesetzt, die nur ein Fluoreszenzmaximum aufwies. (Abb. 4-2) Beim Auftreten von unspezifischen Nebenmaxima wurden die Ergebnisse verworfen.



**Abbildung 4-2: Schmelzkurve am Beispiel von GAPDH (erstellt mit Rotor Gene Software)**

Des Weiteren wurde ein Pearsonscher Korrelationskoeffizient der Standardkurve von  $R^2=0,990$  oder höher vorausgesetzt. (Abb. 4-3)



**Abbildung 4-3: Standardkurve am Beispiel von GAPDH (erstellt mit qPCR-Analyse Software Qbase)**

### Statistische Auswertung

Mit Hilfe der Rotor Gene 4.6 Software wurden die einzelnen Ct-Werte für sämtliche Referenzgene und *genes of interest* berechnet.

Die Ct-Werte der sechs Referenzgene wurden in GeNorm (Vandesompele et al., 2002) importiert und die drei stabilsten Housekeepinggene ermittelt.

Danach konnten die Ct-Werte der *genes of interest* in die qPCR-Analyse Software Qbase (Hellemans et al., 2007) importiert und auf die Referenzgene normalisiert werden. Mit Hilfe der Software SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) Statistics wurden die von Qbase normalisierten Daten über den Wilcoxon-Mann-Whitney-Test auf Signifikanz überprüft.

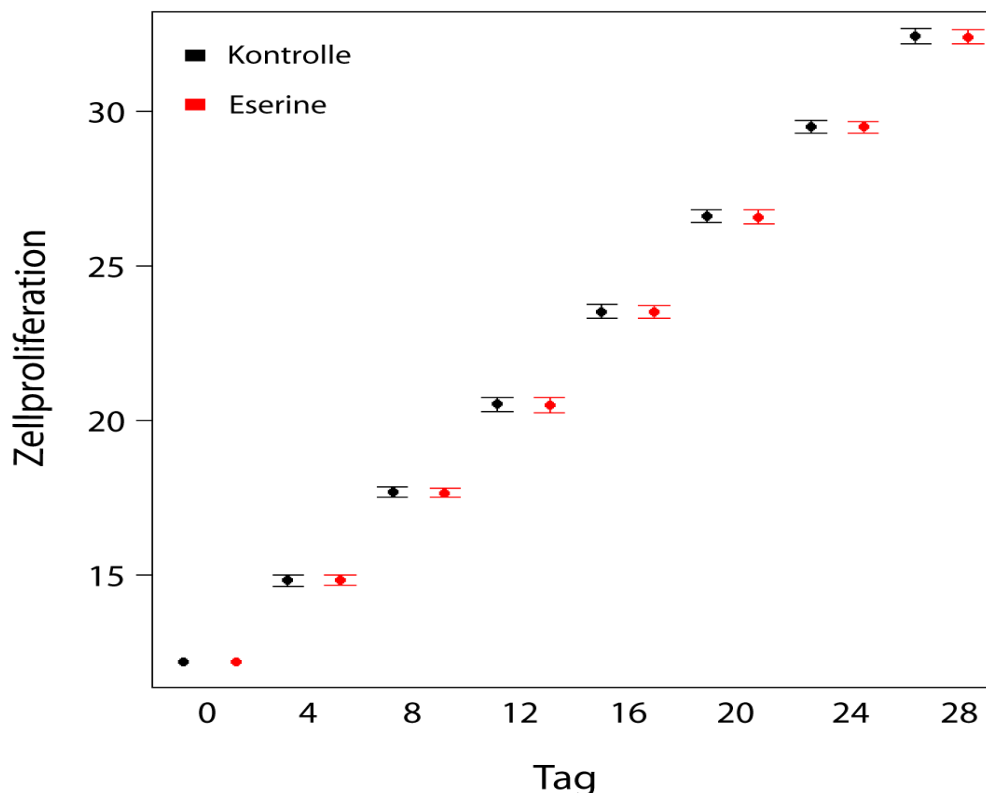


## 5 Ergebnisse

### 5.1 Langzeit-Proliferationsversuch

Mit Hilfe des Langzeit-Proliferationsversuchs konnte der Einfluss von Eserine auf das Proliferationsverhalten der adulten hippocampalen Stammzellen über einen Zeitraum von 28 Tagen beobachtet werden. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Pro Experiment und Gruppe wurden jeweils Triplets a 200000 Zellen angesetzt.

Die Zählung der Zellen erfolgte dabei alle vier Tage und das Experiment wurde viermal wiederholt. Für die statistische Auswertung wurden jeweils die Mittelwerte der Triplets verwendet. Diese sind in absoluter und logarithmierter Form (ln) in Tabelle 5-1 dargestellt.



**Abbildung 5-1:** Zusammenfassende Darstellung der fünf Einzelerperimente in logarithmierter Form (ln). Pro Zeitpunkt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen der fünf Experimente für die Kontrollgruppe (schwarz/dunkel) sowie für die Eserinegruppe (rot/hell) aufgezeigt.

**Tabelle 5-1: Gesamtzellzahl der einzelnen Experimente zum jeweiligen Zeitpunkt.**

Tag	Kontrolle (n x 10 <sup>6</sup> )	Eserine (n x 10 <sup>6</sup> )	Tag	Kontrolle (ln)	Eserine (ln)
<b>Experiment 1</b>					
0	0,2	0,2	0	12,21	12,21
4	2,09	2,13	4	14,55	14,57
8	42,67	42,13	8	17,57	17,56
12	576,06	565,29	12	20,17	20,15
16	14593,43	14254,70	16	23,40	23,38
20	312542,52	305525,77	20	26,47	26,45
24	5532002,58	5316148,37	24	29,34	29,30
28	104831448,9	99500577	28	32,28	32,23
<b>Experiment 2</b>					
0	0,2	0,2	0	12,21	12,21
4	3,19	3,22	4	14,97	14,99
8	58,9	57,54	8	17,89	17,87
12	991,49	973,33	12	20,71	20,70
16	21283,92	21137,39	16	23,78	23,77
20	461506,39	463613,46	20	26,86	26,86
24	7853300,35	7835067,47	24	29,69	29,69
28	162825093,87	164405832,36	28	32,72	32,73
<b>Experiment 3</b>					
0	0,2	0,2	0	12,21	12,21
4	3,2	3,14	4	14,98	14,96
8	55,46	55,15	8	17,83	17,83
12	903,11	895,32	12	20,62	20,61
16	17535,37	17667,61	16	23,59	23,59
20	428447,43	436095,44	20	26,78	26,80
24	6155361,38	6439675,98	24	29,45	29,49
28	102691945,67	107220605,12	28	32,26	32,31
<b>Experiment 4</b>					
0	0,2	0,2	0	12,21	12,21
4	2,64	2,64	4	14,79	14,79
8	40,17	39,56	8	17,51	17,49
12	745,06	735,74	12	20,43	20,42
16	12554,34	12581,18	16	23,25	23,26
20	277450,98	281818,46	20	26,35	26,36
24	5516650,37	5631672,27	24	29,34	29,36
28	99207762,44	100149905,29	28	32,23	32,24
<b>Experiment 5</b>					
0	0,2	0,2	0	12,21	12,21
4	2,94	2,85	4	14,89	14,86
8	48,31	46,64	8	17,69	17,66
12	1023,33	963,85	12	20,75	20,69
16	19357,95	17991,86	16	23,69	23,61
20	359090,06	336447,8	20	26,61	26,54
24	8426646,7	7783159,18	24	29,76	29,68
28	162072504,80	150733849,48	28	32,72	32,65

Angezeigt sind jeweils die Mittelwerte der Triplets in absoluter Form und in logarithmierter Form (ln).

Die mit Eserine behandelten Zellen zeigten im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe über den gesamten Zeitraum von 28 Tagen keine signifikante Veränderung ihrer Proliferationsrate ( $p=1,0$ ;  $V=8$ ).

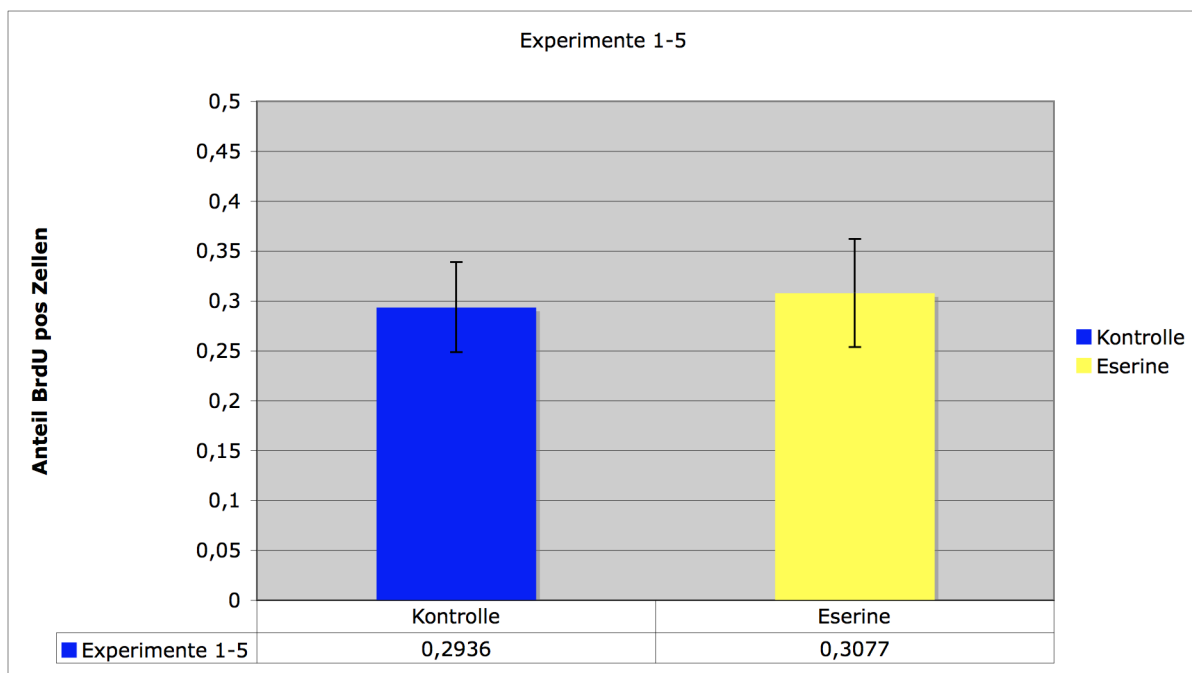
## 5.2 BrdU-Proliferationsversuch

Mit Hilfe des BrdU-Proliferationsversuchs wurde der Einfluss von Eserine auf die Proliferationsaktivität der Stammzellen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe (Kontrolle) nach 24 Stunden untersucht.

Dafür wurde der prozentuale Anteil von proliferationsaktiven Zellen an der Gesamtzellzahl für die jeweilige Gruppe berechnet. Der Versuch wurde in fünf unabhängigen Experimenten wiederholt. Pro Experiment wurden jeweils 15 Gesichtsfelder ausgezählt (Tab. 5-2).

**Tabelle 5-2: Anteil der BrdU positiven Zellen an der Gesamtzellzahl**

	Gesamtzellzahl	BrdU pos. Zellen	Anteil BrdU pos. Zellen an Gesamtzellzahl
<b>Experiment 1</b>			
Kontrolle	1271	377	29,66%
Eserine	1293	397	30,7%
<b>Experiment 2</b>			
Kontrolle	1377	407	29,56%
Eserine	1447	433	29,92%
<b>Experiment 3</b>			
Kontrolle	1433	390	27,22%
Eserine	1436	405	28,2%
<b>Experiment 4</b>			
Kontrolle	1435	428	29,83%
Eserine	1438	451	31,36%
<b>Experiment 5</b>			
Kontrolle	1415	434	30,67%
Eserine	1460	471	32,26%



**Abbildung 5-2: Anteil von proliferationsaktiven (BrdU-markierten) Zellen an der Gesamtzellzahl von unbehandelten Zellen (Kontrolle) und von Zellen unter Eserinebehandlung (Eserine).**

**Aufgetragen sind die Mittelwerte von fünf unabhängigen Experimenten mit ihren Standardabweichungen.**

Die mit Eserine behandelten Zellen zeigten in allen fünf unabhängigen Experimenten eine erhöhte Proliferationsrate im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollgruppen. Diese Ergebnisse sprechen für einen positiven Effekt von Eserine auf die Proliferation der Zellen. Allerdings wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht. ( $p=0,08391$ ;  $df=1$ ;  $F=3,03057$ )

### 5.3 Zellmobilisierungsversuch

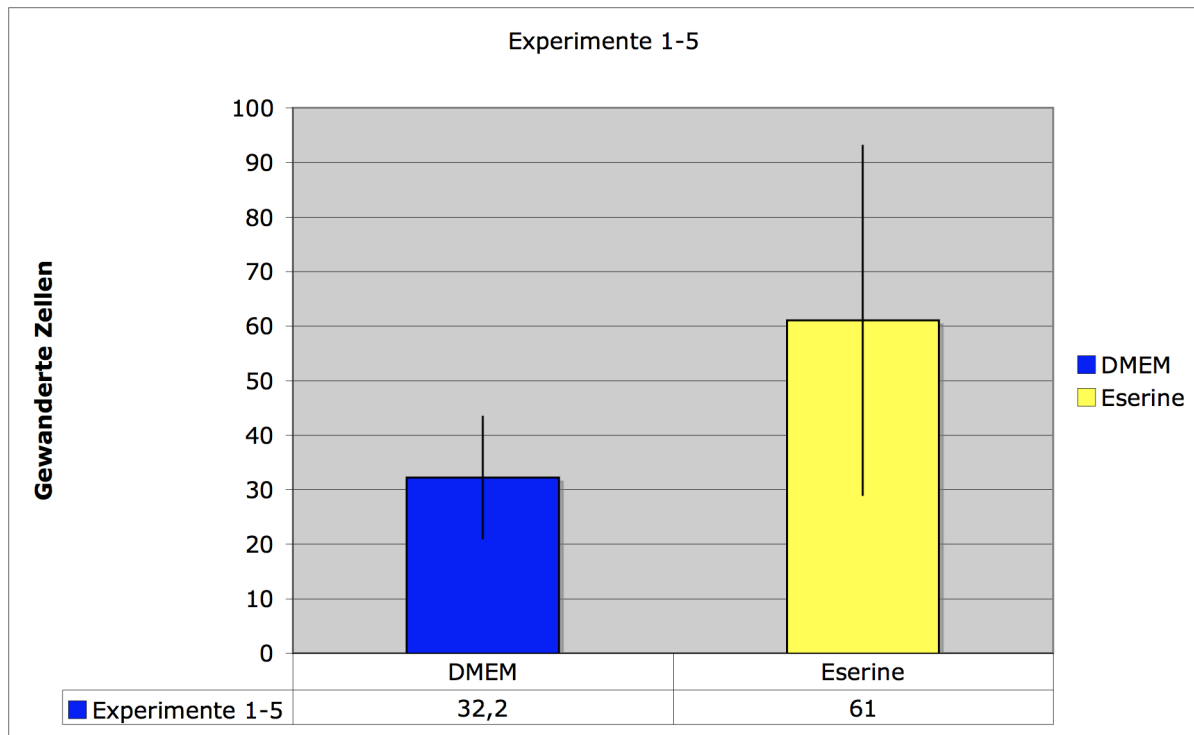
Der Zellmobilisierungsversuch ist mit Hilfe der Boydenkammer durchgeführt worden. Hierbei wurde ein möglicher Einfluss des AChE-Inhibitors Eserine auf die Mobilisierung der adulten hippocampalen Stammzellen im Vergleich zu einer Kontrolle (DMEM) untersucht.

Das Experiment erfolgte insgesamt fünfmal. Pro Experiment wurden 15 Gesichtsfelder analysiert.

Die einzelnen Ergebnisse der fünf unabhängigen Experimente sind in Tabelle 5-3 dargestellt.

**Tabelle 5-3: Darstellung der einzelnen Ergebnisse der fünf Experimente über die Zellmobilisierung in Bezug auf Eserine im Vergleich zu DMEM.**

	Anzahl der durch die Membran gewanderten Zellen	
	DMEM	Eserine
Experiment 1	40	81
Experiment 2	25	23
Experiment 3	21	99
Experiment 4	48	40
Experiment 5	27	62



**Abbildung 5-3: Graphische Darstellung der durch DMEM (dunkler Balken) bzw. Eserine (heller Balken) mobilisierten Zellen.**

Angezeigt sind die Mittelwerte von fünf unabhängigen Experimenten mit ihren Standardabweichungen.

Eserine führte zu einer statistisch signifikant gesteigerten Mobilisierung der Zellen im Vergleich zu DMEM ( $p=4,29099E-006$ ,  $df=1$ ,  $F=22,89503$ ).

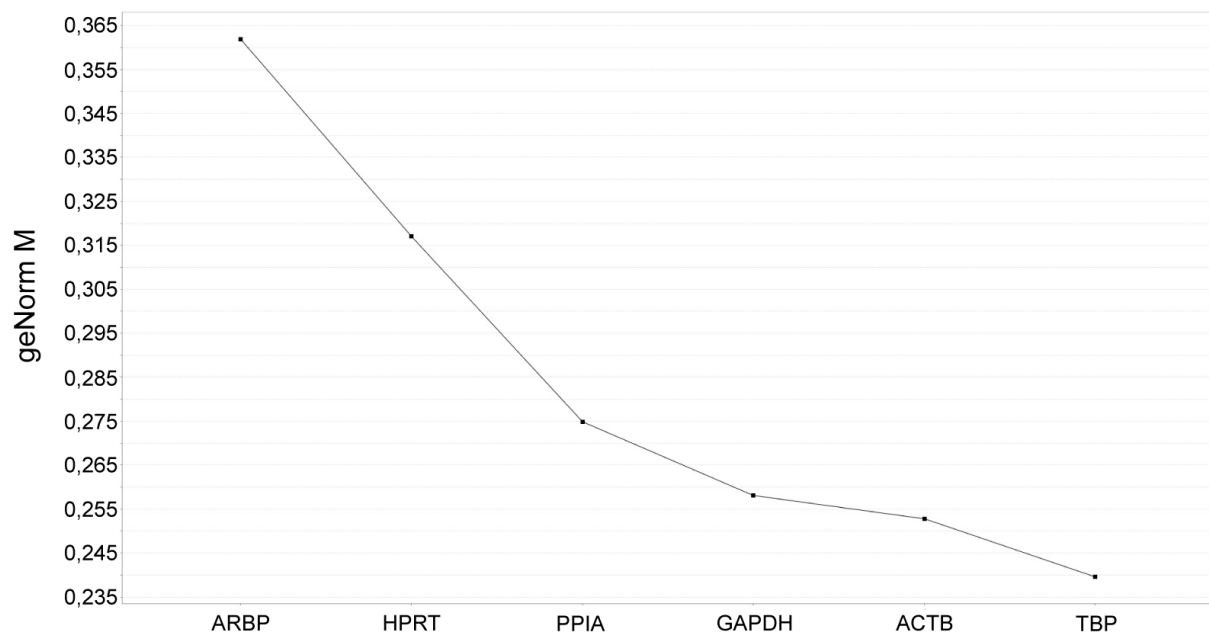
Die Zahl der durch die Membran gewanderten, d.h. der mobilisierten Zellen war in der Eserinegruppe um den Faktor 1,88 erhöht.

## 5.4 Genexpressionsanalyse

### 5.4.1 Auswahl der Referenzgene

Mit Hilfe des Programms Genorm konnten die am besten geeigneten Referenzgene für die Normalisierung der Ergebnisse analysiert werden. Dabei dienten die in der qPCR ermittelten Ct-Werte zur Berechnung des Expressionsstabilitätswertes M. Je niedriger der Wert M, desto stabiler ist das jeweilige Referenzgen.

Folgende Referenzgene wurden auf ihre Expressionsstabilität untersucht: ACTB, ARBP, GAPDH, HPRT, PPIA und TBP.



**Abbildung 5-4: Darstellung der Expressionsstabilität der Referenzgene anhand des M-Wertes.**

Die untersuchten Referenzgene wurden mit Hilfe des Programms Genorm ihrer Expressionsstabilität (M) entsprechend geordnet. Ein niedriger M-Wert bedeutet eine hohe Expressionsstabilität, ein hoher M-Wert bedeutet dementsprechend eine niedrige Expressionsstabilität (erstellt mit qPCR-Analyse Software Qbase).

Wie in Abbildung 5-4 ersichtlich stellten ACTB, GAPDH und TBP die drei stabilsten Referenzgene dar. Sie wurden für die Normalisierung der Real Time PCR Ergebnisse verwendet.

### 5.4.2 Quantitative Real Time PCR

Die differentielle Expressionsanalyse der Gene BACE, BDNF, SYP und TPH2 erfolgte mit Hilfe der quantitativen Real Time PCR. Unbehandelte Zellen und mit 5µM Eserine behandelte Zellen wurden im Hinblick auf ihre Expression der oben genannten Gene untersucht und miteinander verglichen.

Die Messergebnisse der *genes of interest* wurden auf die Expression der Referenzgene ACTB, GAPDH und TBP normalisiert.

## BDNF

Sowohl in Zellen unter Eserinebehandlung als auch in unbehandelten Zellen konnte die Expression von BDNF-mRNA nachgewiesen werden.

Alle fünf Passagen wiesen eine erhöhte BDNF-Expression in der Eserinegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe auf, wobei sich dies am deutlichsten in Passage 35 und 36 zeigte. Dies lässt eine eindeutige Tendenz erkennen.

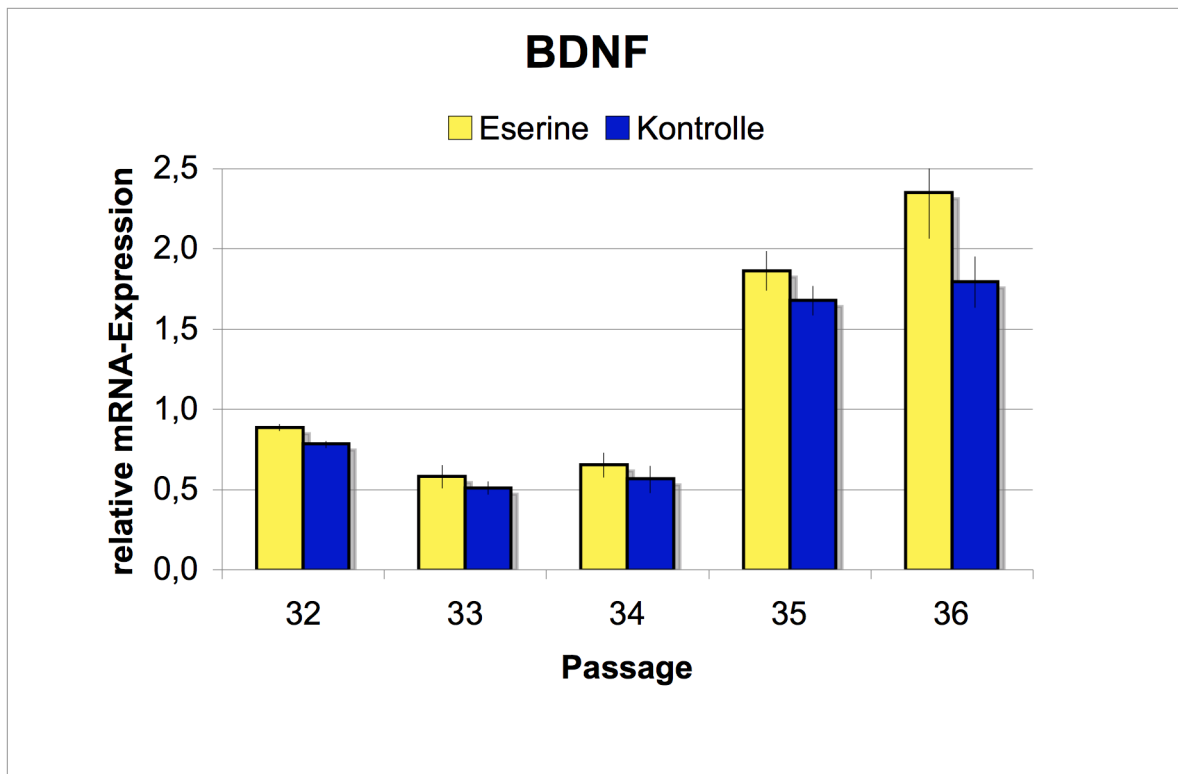
Insgesamt konnte aber in der Eserinegruppe kein signifikanter Unterschied des Expressionsniveaus von BDNF im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. (p=0,421; W=23)

**Tabelle 5-4: BDNF-Expressionsergebnisse der unterschiedlichen Passagen von Kontrollzellen und von mit Eserine behandelten Zellen.**

	Mittelwert der Expressionsergebnisse Kontrolle (SD)	Mittelwert der Expressionsergebnisse Eserine (SD)
Passage 32	0,7822 (0,0220)	0,8854 (0,0215)
Passage 33	0,5094 (0,0424)	0,5825 (0,0725)
Passage 34	0,5645 (0,0842)	0,6528 (0,0797)
Passage 35	1,6790 (0,0910)	1,8640 (0,1224)
Passage 36	1,7950 (0,1588)	2,3520 (0,2877)

Angezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (SD).





**Abbildung 5-5: Graphische Darstellung der relativen mRNA-Expression von BDNF in fünf unterschiedlichen Passagen von Zellen unter Eserinebehandlung (E/heller Balken) und unbehandelten Kontrollzellen (K/dunkler Balken).**

**Aufgetragen sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen.**

## SYP

Sowohl in Zellen unter Eserinebehandlung als auch in unbehandelten Zellen konnte die Expression von SYP-mRNA nachgewiesen werden.

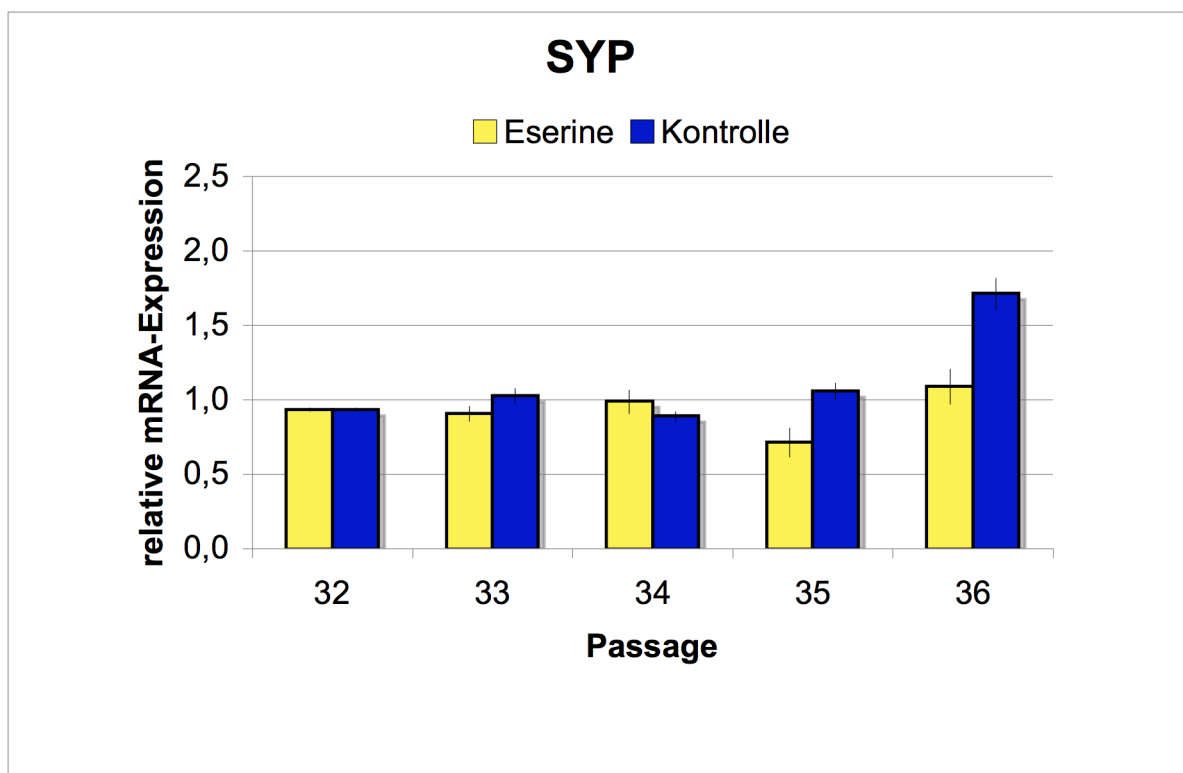
Die Passagen 32, 33 und 34 zeigten ein ähnliches Expressionsniveau in beiden Gruppen. In Passage 35 und insbesondere in Passage 36 waren deutlich niedrigere SYP-Expressionswerte in der Eserinegruppe als in der Kontrollgruppe zu erkennen.

Insgesamt konnte aber in der Eserinegruppe kein signifikanter Unterschied der SYP-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden ( $p=0,548$ ;  $W=24$ ).

**Tabelle 5-5: SYP-Expressionsergebnisse der unterschiedlichen Passagen von Kontrollzellen und von mit Eserine behandelten Zellen.**

	Mittelwert der Expressionsergebnisse Kontrolle (SD)	Mittelwert der Expressionsergebnisse Eserine (SD)
Passage 32	0,9329 (0,0137)	0,9348 (0,0148)
Passage 33	1,0280 (0,0489)	0,9055 (0,0506)
Passage 34	0,8899 (0,0341)	0,9878 (0,0799)
Passage 35	1,0560 (0,0577)	0,7127 (0,0973)
Passage 36	1,7130 (0,1063)	1,0870 (0,1196)

Angezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (SD).



**Abbildung 5-6: Graphische Darstellung der relativen mRNA-Expression von SYP in fünf unterschiedlichen Passagen von Zellen unter Eserinebehandlung (E/heller Balken) und unbehandelten Kontrollzellen (K/dunkler Balken).**

Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen.

## BACE

Sowohl in Zellen unter Eserinebehandlung als auch in unbehandelten Zellen konnte die Expression von BACE-mRNA nachgewiesen werden.

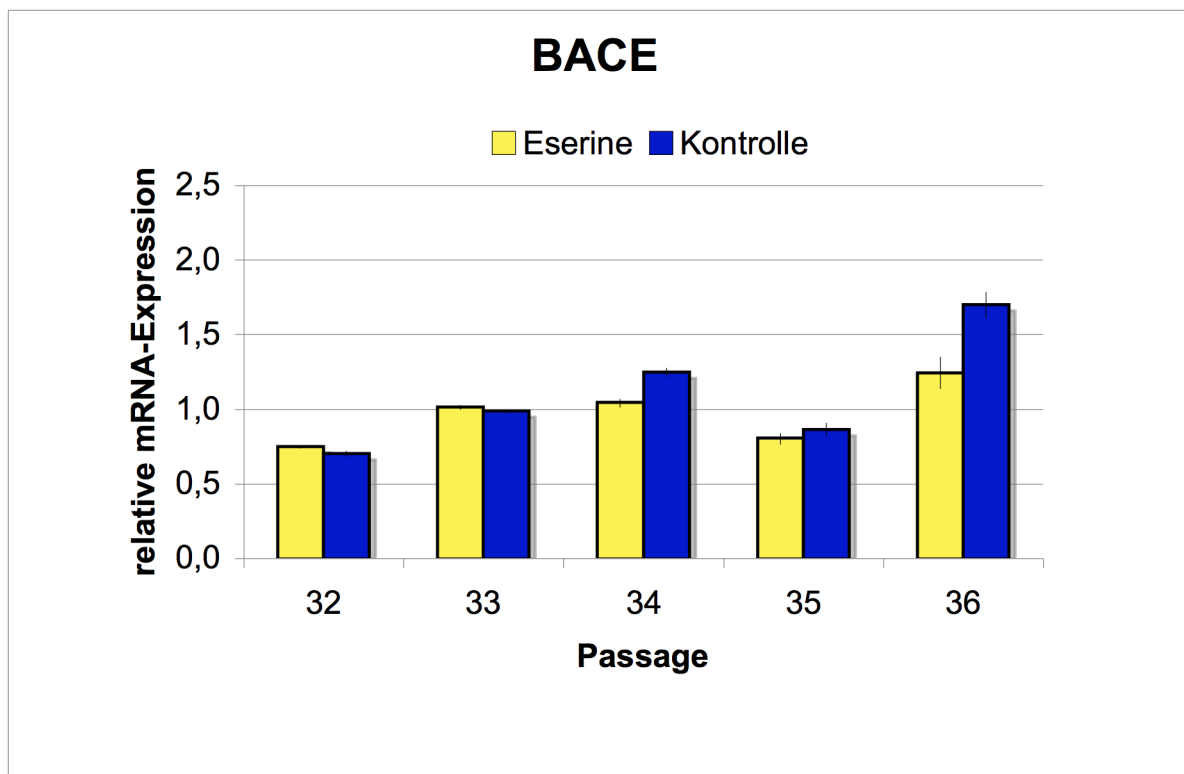
Die Passagen 32, 33 und 35 zeigten ähnliche Expressionswerte in beiden Gruppen, wohingegen Passage 34 und insbesondere Passage 36 eine deutlich geringere Expression von BACE in der Eserinegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe aufweisen.

Insgesamt konnte aber in der Eserinegruppe kein signifikanter Unterschied der BACE-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden ( $p=0,841$ ;  $W=26$ ).

**Tabelle 5-6: BACE-Expressionsergebnisse der unterschiedlichen Passagen von Kontrollzellen und von mit Eserine behandelten Zellen.**

	Mittelwert der Expressionsergebnisse Kontrolle (SD)	Mittelwert der Expressionsergebnisse Eserine (SD)
Passage 32	0,7014 (0,0215)	0,7491 (0,0121)
Passage 33	0,9853 (0,0151)	1,0120 (0,0155)
Passage 34	1,2470 (0,0330)	1,0430 (0,0288)
Passage 35	0,8638 (0,0452)	0,8033 (0,0407)
Passage 36	1,7000 (0,0873)	1,2430 (0,1062)

Angezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (SD).



**Abbildung 5-7:** Graphische Darstellung der relativen mRNA-Expression von BACE in fünf unterschiedlichen Passagen von Zellen unter Eserinebehandlung (E/heller Balken) und unbehandelten Kontrollzellen (K/dunkler Balken).

Aufgetragen sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen.

## TPH2

Sowohl in Zellen unter Eserinebehandlung als auch in unbehandelten Zellen konnte die Expression von TPH2-mRNA nachgewiesen werden.

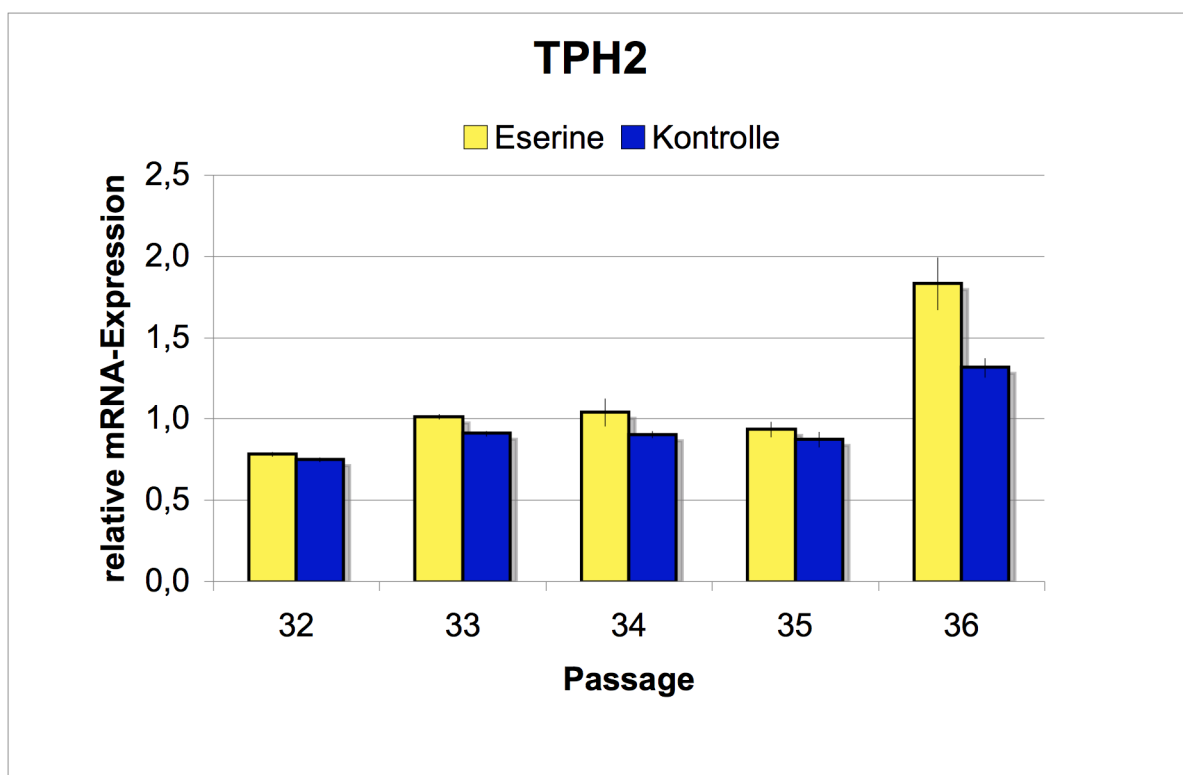
Alle fünf Passagen wiesen ein erhöhtes Expressionsniveau von TPH2 in der Eserinegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Am deutlichsten zeigte sich dies in Passage 34 und 36.

Auch hier ist eine Tendenz zu erkennen. Dennoch konnte kein signifikanter Unterschied des Expressionsniveaus von TPH2 in der Eserinegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden ( $p=0,31$ ;  $W=22$ ).

**Tabelle 5-7: TPH2-Expressionsergebnisse der unterschiedlichen Passagen von Kontrollzellen und von mit Eserine behandelten Zellen.**

	Mittelwert der Expressionsergebnisse Kontrolle (SD)	Mittelwert der Expressionsergebnisse Eserine (SD)
Passage 32	0,7488 (0,0141)	0,7826 (0,0143)
Passage 33	0,9094 (0,0179)	1,0130 (0,0178)
Passage 34	0,9041 (0,0193)	1,0400 (0,0849)
Passage 35	0,8731 (0,0461)	0,9369 (0,0481)
Passage 36	1,3150 (0,0609)	1,8320 (0,1628)

Angezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (SD).



**Abbildung 5-8: Graphische Darstellung der relativen mRNA-Expression von TPH2 in fünf unterschiedlichen Passagen von Zellen unter Eserinebehandlung (E/heller Balken) und unbehandelten Kontrollzellen (K/dunkler Balken).**

Aufgetragen sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen.

## 6 Diskussion

### 6.1 Proliferation

Der Prozess der adulten hippocampalen Neurogenese beinhaltet die Proliferation der neuralen Stammzellen, die Differenzierung zu ausgereiften Neuronen sowie die Eingliederung in die hippocampalen Schaltkreise (Itou et al., 2011).

Der Einfluß des Acetylcholinesterasehemmers Eserine auf die Proliferation adulter neuraler Stammzellen wurde anhand von zwei unterschiedlichen Proliferationsmodellen untersucht.

Im BrdU-Proliferationsversuch wurde die Proliferationsaktivität der Zellen nach 24stündiger Behandlung mit Eserine im Vergleich zu unbehandelten Zellen anhand der Messung ihrer DNA-Synthese analysiert. Die mit Eserine behandelten Zellen zeigten in allen fünf unabhängigen Experimenten eine erhöhte Proliferationsrate im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollgruppen. Dies ließ eine Tendenz zugunsten der Eserinegruppe in Bezug auf die Proliferation erkennen, wobei das statistische Signifikanzniveau verfehlt wurde. ( $p=0,08391$ )

Im Langzeit-Proliferationsversuch wurde das Wachstum der Zellen anhand der absoluten Zellzahl gemessen. Die Zählung erfolgte dabei alle vier Tage über insgesamt 28 Tage. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden.

Die Ergebnisse des BrdU Versuchs lassen sich in die zunehmend anerkannte Theorie einer „Doppelfunktion“ der Neurotransmitter einordnen. Ein Einfluss unterschiedlicher Neurotransmitter wie GABA, Glutamat oder Serotonin auf die Proliferation von Stammzellen und Genese neuer Neurone wurde in zahlreichen Arbeiten beschrieben (Brezun und Daszuta, 1999; Cameron et al., 1995; Suh et al., 2009; Tozuka et al., 2005; Vaidya et al., 2007). So zeigten beispielsweise Benninghoff und Mitarbeiter, dass die Proliferationsrate von hippocampalen Stammzellen *in vitro* durch Serotonin beeinflusst wird. Insbesondere führte der Entzug bzw. die Abwesenheit des Neurotransmitters zu einer statistisch signifikanten Proliferationsminderung der Zellen (Benninghoff et al., 2009).

Auch Acetylcholin scheint als Regulator der Stammzellproliferation und der adulten Neurogenese zu fungieren:

Das cholinerge System spielt eine entscheidende Rolle bei Hippocampus-basierten Lernvorgängen und Gedächtnisfunktionen. So konnte bei Lernprozessen ein Anstieg des Acetylcholin-Levels nachgewiesen werden (Dudar et al., 1979; Pepeu und Giovannini, 2004). In diesem Zusammenhang sei auch auf den Morbus Alzheimer verwiesen. Bei dieser Erkrankung kommt es unter anderem durch den Untergang cholinergischer Neurone zu einer Beeinträchtigung von Lernvorgängen und Gedächtnis (Abdel-Salam, 2011; Gold, 2003). Entsprechend dazu führt die Gabe von Acetylcholinesteraseinhibitoren zu einer Verbesserung eben dieser Funktionen.

Da Hippocampus-abhängige Lernvorgänge auch Auswirkungen auf die Neurogenese haben und mehrere Arbeiten eine Störung der Neurogenese bei Morbus Alzheimer beschreiben, ist ein Einfluss von ACh auf die Neurogenese naheliegend (Gould et al., 1999; Haughey et al., 2002; Jin et al., 2004).

Das Ergebnis des BrdU-Proliferationsversuchs steht im Einklang mit mehreren *in vivo* Arbeiten, in denen ebenfalls der Zusammenhang zwischen dem Neurotransmitter und adulten Neurogenese untersucht wurde und eine positive Wirkung von ACh auf die Proliferationsrate von neuralen Stammzellen (NSC) sowie die Bildung neuer Neurone nachgewiesen werden konnte.

Die experimentelle Läsion des cholinergen Systems des Vorderhirns bei Nagern mit 192 IgG-Saporin führte zu einer Beseitigung des cholinergen Inputs auf den Hippocampus, was wiederum eine signifikant verminderte Proliferationsrate von NSC im Gyrus Dentatus bewirkte. Umgekehrt konnte durch systemische Gabe des auch in dieser Arbeit verwendeten Acetylcholinesterasehemmers Eserine (Physostigmin) ein signifikanter Anstieg der Zellproliferation im Hippocampus gezeigt werden (Itou et al., 2011; Mohapel et al., 2005).

Ähnliche Ergebnisse in Bezug auf cholinerge Beeinflussung zeigten auch *in vitro* Experimente mit adulten hippocampalen Mäusestammzellen innerhalb unserer Arbeitsgruppe. Bei diesen Untersuchungen induzierte eine Behandlung der Zellen mit dem ACh-Strukturanalogon Carbachol einen statistisch signifikanten Anstieg ihrer Proliferationsrate. Darüber hinaus kam es unter dem Einfluss von Carbachol zu einer signifikanten Steigerung der *de novo* Differenzierung von Neuronen. Umgekehrt bewirkte die Behandlung der Zellen mit Pirenzepin, einem Antagonisten des

Muskarinrezeptors M1, eine Reduktion der Differenzierung der Stammzellen zu Neuronen (Benninghoff et al., 2011).

Insgesamt weisen die genannten Arbeiten auf eine proliferationssteigernde Wirkung von Acetylcholin bzw. AChE-Inhibitoren auf adulte neurale Stammzellen hin.

Hippocampale Lernvorgänge sowie vermehrte körperliche Anstrengung führen zu einer gesteigerten Neurogenese (Gould et al., 1999; Kempermann et al., 1997; van Praag et al., 1999). Gleichzeitig kommt es hierbei zu einem Anstieg des ACh Levels (Dudar et al., 1979; Pepeu und Giovannini, 2004). Die Ergebnisse unserer und der anderen oben genannten Arbeiten deuten darauf hin, dass ACh zumindest teilweise für diese gesteigerte NSC-Proliferation und Neurogenese verantwortlich sein könnte.

Mit zunehmendem Alter nimmt die neurale Stammzellproliferation bei Menschen und Tieren natürlicherweise ab (Hattiangady und Shetty, 2008; Kuhn et al., 1996). Itou zeigte in seiner Arbeit, dass diesem Prozess mit einer Erhöhung des ACh-Levels durch Eserine entgegengewirkt werden kann. So kam es auch bei älteren Tieren, die mit dem Acetylcholinesterasehemmer behandelt wurden, noch zu einer Steigerung der hippocampalen Stammzellproliferation (Itou et al., 2011).

Auch unsere Ergebnisse des BrdU-Versuchs deuten auf eine proliferationssteigernde Wirkung eines Acetylcholinesteraseinhibitors auf adulte neurale Stammzellen hin. Möglicherweise lassen sich diese experimentellen Befunde klinisch nutzen, um dem Nachlassen der kognitiven Funktionen im Alter sowie verschiedenen Demenzformen wie dem Morbus Alzheimer entgegenzuwirken (Itou et al., 2011).

Auch wenn die oben genannten Arbeiten darauf hinweisen, dass Acetylcholin ein Regulator der hippocampalen Neurogenese ist, sind die genauen molekularen Mechanismen, über die ACh bzw. Acetylcholinesterasehemmer Einfluss auf die Neurogenese nehmen, weitestgehend unbekannt (Bruehl-Jungerman et al., 2011). Unklar hierbei ist unter anderem, ob es sich um eine direkte oder indirekte Wirkung von ACh handelt bzw. ob Acetylcholinesterasehemmer über einen z.B. intrinsischen Weg, also unabhängig von ihrer eigentlichen Wirkungsweise als Esterasehemmer, fungieren.

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit zeigten Narimatsu und Mitarbeiter, dass der Acetylcholinesterasehemmer Donepezil die Neurogenese indirekt über den Insulin



like Growthfactor (IGF-1) steigert. Sie behandelten WT-Mäuse (genetisch unveränderte Mäuse) mit Donepezil und konnten anschließend erhöhte IGF-1, IGF-1 mRNA und CGRP-Level im Hippocampus nachweisen. CGRP (*Calcitonin Gene-Related Peptide*) wird von sensorischen Neuronen freigesetzt und führt zu einer erhöhten Produktion von IGF-1 (Narimatsu et al., 2009). Anschließend behandelten sie CGRP Knockout-Mäuse mit Donepezil. Diese zeigten keine erhöhten IGF-1 Level und wiesen eine signifikant verminderte Proliferation von neuronalen Stammzellen im Vergleich zu den WT-Mäusen auf.

Da die gleiche Behandlung mit Tacrin, einem anderen Acetylcholinesterasehemmer, weder die CGRP, IGF-1, igf-1 mRNA Level noch die Proliferationsrate steigerte, vermuten Narimatsu und Mitarbeiter, dass es sich bei Donepezil um einen anderen als den bekannten Wirkmechanismus von Acetylcholinesterasehemmern handeln könnte (Narimatsu et al., 2009).

Diese Daten sprechen dafür, dass Acetylcholinesterasehemmer, wie auch das in dieser Arbeit verwendete Eserine, ihre Wirkung auch über alternative, intrinsische Mechanismen entfalten könnten.

Die Langzeit-Proliferationsversuche verliefen jeweils über insgesamt 28 Tage. Die Auszählung der Zellen erfolgte dabei alle vier Tage. An keinem der insgesamt sieben einzelnen Zeitpunkte sowie über den gesamten Zeitraum konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen in Bezug auf ihre Proliferationsrate festgestellt werden.

In Arbeiten von Mohapel und Mitarbeiter oder Itou und Mitarbeiter, in denen ebenfalls die Zellproliferation unter der Behandlung von Eserine bzw. Physostigmin über einen gewissen Zeitraum (Mohapel: 1d bzw 28d; Itou: 3d) beobachtet wurde, kam es dagegen zu einer signifikanten Steigerung der Proliferationsrate (Itou et al., 2011; Mohapel et al., 2005).

Der positive Effekt von ACh auf die Proliferation von adulten neuronalen Stammzellen konnte auch in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden. Der Versuchsaufbau war weitestgehend identisch mit dem in dieser Arbeit durchgeführten Experiment. Der Unterschied bestand darin, dass die Behandlung der Zellen nicht mit dem Acetylcholinesterasehemmer Eserine, sondern mit Carbachol, einem Analogon von Acetylcholin erfolgte (Benninghoff et al., 2011).

Mehrere Faktoren könnten dafür verantwortlich sein, dass das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde:

Bezogen auf die Arbeiten von Mohapel und Mitarbeitern sowie Itou und Mitarbeitern könnte das unterschiedliche experimentelle Vorgehen eine Rolle spielen. In den erwähnten Arbeiten wurden im Gegensatz zu unseren *in vitro* Modellen *in vivo* Modelle angewandt.

Die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Experimente finden in einer kontrollierbaren, künstlichen Mikroumgebung ohne physiologische Stör- bzw. Kompensationsfaktoren statt. In einem derartigen experimentellen *Setup* lassen sich Störfaktoren zwar eher beherrschen, allerdings kann es durch den beschriebenen Wegfall von physiologischen Gegenregulatoren zu dementsprechend unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Einen weiteren, allgemeinen Nachteil von *in vitro* Experimenten stellen die Kulturbedingungen der Zellen dar. Um vor Kontaminationen zu schützen, ist die Zugabe von z.B. Antibiotika bzw. Antimykotika zum Zellmedium erforderlich. Derartige Reagenzien können z.B. die Zellfunktion, das Zellwachstum oder die Zellmorphologie beeinflussen und somit ebenfalls zu ungleichen Ergebnissen zwischen *in vivo* und *in vitro* Experimenten führen (Kuhlmann et al., 1996).

Auch eine niedrig gewählte Konzentration des Acetylcholinesteraseinhibitors könnte eine Erklärung sein. Durch entsprechend unzureichende Hemmung der Acetylcholinesterase könnte der Anstieg des Acetylcholin-Levels zu gering sein, um Einfluss auf die Proliferation der Stammzellen zu nehmen.

Des Weiteren könnten die Zellen in Bezug auf das ACh-Angebot innerhalb ihrer Mikroumgebung bereits gesättigt sein, so dass die Inhibition der Acetylcholinesterase zu keinem weiteren Effekt führt.

Gegen die letzten zwei Punkte spricht allerdings das positive Ergebnis im BrdU-Proliferationsversuch.

Eine zu geringe Anfangskonzentration von Eserine bzw. ein mögliches Überangebot von ACh wären bereits zu Beginn der Behandlung relevant und so würde sich auch im BrdU-Versuch keine Proliferationssteigerung zeigen.

Ein weiteres Argument, das gegen eine zu geringe Ausgangskonzentration des Acetylcholinesterasehemmers spricht, sind die Ergebnisse des zu Beginn der Experimente durchgeführten Alamar Blue-Versuchs. Nach Messung der

Toxizitätsgrenze von Eserine wurde eine Konzentration von zwei Zehnerpotenzen unterhalb dieser Grenze gewählt, wie es für die Art der durchgeführten Versuche üblich ist.

Eine zusätzliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse der Experimente könnte mit der Halbwertszeit von Eserine zusammenhängen.

Im BrdU-Versuch, also nach 24 Stunden, ist Eserine noch in der Lage seine Wirkung zu entfalten. Der im Langzeitversuch nach vier Tagen ausbleibende Effekt ist möglicherweise durch die Halbwertszeit von Eserine zu erklären. Die Konzentration der Substanz könnte mittlerweile so gering sein, dass eine ausreichende Hemmung der Acetylcholinesterase nicht mehr möglich ist.

Das positive Ergebnis in Bezug auf die Proliferationssteigerung in der Arbeit von Benninghoff und Mitarbeitern könnte auch mit der in diesen Experimenten eingesetzten Substanz im Zusammenhang stehen. Carbachol ist das chemisch stabilere Strukturanalogon von Acetylcholin und weist deshalb eine längere Halbwertszeit als ACh auf. Sogar nach vier Tagen konnte Carbachol die Proliferationsrate der Zellen noch beeinflussen (Benninghoff et al., 2011).

Da der Hersteller des verwendeten Eserine keine Angaben zur Halbwertszeit des Produktes macht, kann über diesen Punkt nur spekuliert werden.

## 6.2 Zellmobilisierung

Der Zellmobilisierungsversuch wurde mit Hilfe der Boydenkammer durchgeführt.

Wie in den Ergebnissen dargelegt kam es zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der Zellmobilisierung unter dem Einfluss von Eserine im Vergleich zu DMEM.

Der Versuch wurde in fünf unabhängigen Experimenten wiederholt. Zusammengefasst zeigte sich nach sechsständiger Inkubation der Zellen, dass Eserine die Induktion der Zellmobilisierung nahezu verdoppelte, d.h. dass fast doppelt so viele Zellen unter Eserine wanderten.

Adulte neurale Stammzellen sind grundsätzlich in der Lage, zu geschädigten Hirnregionen zu wandern und dort neuroprotektive Wirkung („repair mechanisms“) durch z.B. Neurogenese zu entfalten. Dies wurde in der Literatur mehrfach beschrieben: Durch BrdU Markierung der Zellen konnten unter anderem Chen und Mitarbeiter bei adulten Mäusen eine Wanderung von endogenen neuronalen Stammzellen zu geschädigten Regionen nachweisen. So führte eine induzierte Apoptose corticospinaler Motoneurone zu einer Mobilisierung von neuronalen Stammzellen aus der SVZ zum Cortex, wo sie sich zu ausgereiften pyramidalen Neuronen differenzierten (Chen et al., 2004).

Auch Bendel und Mitarbeiter zeigten mit Hilfe der BrdU Zellmarkierung, dass neurale Stammzellen in der Lage sind, in geschädigte Gebiete einzuwandern. Durch globale Ischämie zerstörten sie ca. 97 % der CA1 Region des Hippocampus von Ratten. Nach 90 Tagen waren Zellen aus der benachbarten periventriculären Zone eingewandert und hatten bis zu 40% der ursprünglichen Neurone ersetzt. Diese Neubildung der Neurone ging mit einer Verbesserung von Gedächtnisleistung und räumlichen Lernvorgängen einher, die die Tiere durch die Zerstörung der CA1 Region weitestgehend verloren hatten (Bendel et al., 2005). Dies ist in Bezug auf den Morbus Alzheimer interessant, da die CA1 Region des Hippocampus die am schwersten betroffene Hirnregion bei Alzheimerpatienten darstellt (Padurariu et al., 2012; West et al., 2000).

In neueren Arbeiten, die die Analyse der Zellmobilisierung zum Inhalt haben, wird die Methode der hochauflösenden Magnetresonanztomographie eingesetzt. Die Zellen werden hierbei entsprechend markiert, so dass die von ihnen zurückgelegten Wege im MRT verfolgt werden können. Yang und Mitarbeiter verwendeten hierfür

Eisenoxid-Partikel in Mikrongröße. Sie markierten in ihren Experimenten neurale Stammzellen der SVZ von Ratten mit massiv geschädigten Hirnarealen sowie von gesunden Kontrolltieren. Die MRT-Analyse zeigte, dass sich die markierten Zellen bei den kranken Tieren zu den infarzierten Gebieten hin bewegten, während bei den Kontrolltieren der physiologische Weg der Zellen entlang des sog. „rostral migratory stream“ zum Riechkolben zu beobachten war. Diese Ergebnisse zeigen, dass neurale Stammzellen ihre klassischen Wanderungseigenschaften als Reaktion auf pathologische Vorgänge im Gehirn verändern können (Yang et al., 2009).

Neurale Stammzellen sind also in der Lage, in geschädigte Hirnregionen einzuwandern und dort Reparaturmechanismen auszuüben. Dieser Mobilisierungsprozess und Selbstreparaturmechanismus scheint jedoch natürlicherweise begrenzt zu sein. Nakatomi und Mitarbeiter zeigten allerdings, dass diese Vorgänge durch exogen gegebene Faktoren erheblich verstärkt werden können. Sie zerstörten durch ischämischen Insult einen Großteil der CA1 Region des Hippocampus von Ratten. Anschließend konnten sie eine Mobilisierung von neuronalen Vorläuferzellen aus der benachbarten periventrikulären Zone beobachten. Es kam zu einer Wanderung, Proliferation und Differenzierung der Zellen, wodurch ein Teil der ursprünglichen Neurone in den geschädigten Gebieten ersetzt wurde. Dieser beschriebene Prozess konnte anschließend durch die exogene Infusion der Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 in hohem Maße gesteigert werden (Nakatomi et al., 2002).

Auch Eserine könnte stellvertretend für die Gruppe der ACh-Inhibitoren einen solchen Verstärker der oben beschriebenen Prozesse darstellen. In unseren Experimenten kam es durch Eserine zu einer signifikanten Erhöhung der Zellmobilisierung. Des Weiteren konnte in Bezug auf die Steigerung der Proliferation der Zellen durch Eserine eine positive Tendenz beobachtet werden.

Die diskutierten Studien deuten darauf hin, dass neurale Vorläuferzellen in geschädigte Hirnregionen wandern und dort Reparaturprozesse ausführen. Dementsprechend kann spekuliert werden, dass eine Steigerung der Zellmobilisierung durch Eserine einen weiteren Erklärungsansatz für die positive Wirkung von ACh-Hemmern bei Alzheimerpatienten darstellt.

Um verlässliche Ergebnisse im Zellmobilisierungsversuch zu gewährleisten wurden die Zellen vom Vollmedium befreit und in neutrales Medium (DMEM) überführt. Die Experimente erfolgten also in Abwesenheit der mitogenen, essentiellen Wachstumsfaktoren EGF und FGF II. Dieses Vorgehen ist wichtig, da die beiden Wachstumsfaktoren ideale Wanderungs- bzw. Mobilitätsbedingungen für Stammzellen darstellen und auf diese Weise das Ergebnis des Versuches verfälscht hätten.

Das Risiko falscher Ergebnisse durch Pipettierfehler, Beschädigungen der Membran, Lufblasenbildung oder sonstiger experimenteller Fehler wurde verringert, indem jeweils ein dreifacher Ansatz (Triplets) für die Eserinegruppe sowie für die Kontrolle (DMEM) erfolgte.

Die mechanische Entfernung der nicht gewanderten Zellen könnte als ein Nachteil der Methode ausgelegt werden, da die auf der Oberseite der Membran befindlichen Zellen unter dem Mikroskop nur schwer von den tatsächlich gewanderten Zellen zu unterscheiden sind. Allerdings gilt diese Vorgehensweise in der Literatur als Standard für Boydenkammer-Experimente unterschiedlicher Art und stellte sich auch in eigenen Testungen als effektiv heraus (Chakroborty et al., 2008; Ma et al., 2004; Mitchell et al., 2007).

Des Weiteren handelt es sich bei diesem Versuch um *in vitro* Experimente. Dieser Versuchsaufbau ermöglicht eine isoliertere Analyse der Wirkung von Eserine auf die Mobilisierung der Zellen. Ein Nachteil dieser Methode liegt allerdings in der Nichtbeachtung physiologischer Stör- bzw. Kompensationsfaktoren. Dieser Wegfall von möglichen Gegenregulatoren kann zu Veränderungen der Zellmobilisierung führen. Hierdurch kann es zu abweichenden Ergebnissen im Vergleich zu *in vivo* Experimenten kommen.

### **6.3 Genexpression**

#### **BDNF**

Die Messung des Neutrophin Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF-Expression) ergab eine Tendenz zugunsten der Eserinegruppe, d.h. die mRNA-Expression von BDNF war in allen untersuchten Proben erhöht. Dieses Ergebnis lässt sich mit einem Einfluss des Acetylcholinesterasehemmers auf die Expression des Wachstumsfaktors interpretieren.

Eine Wirkung von Neurotransmittern auf die Genexpression von BDNF wurde beschrieben. So führt zum Beispiel Serotonin zu einer Steigerung der BDNF-Expression. Ratten, die mit den selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmern (SSRI) Sertralin bzw. Fluoxetin behandelt wurden, zeigten eine signifikante Steigerung der BDNF mRNA im Hippocampus. Zusätzlich konnte einer durch Stress ausgelösten Herunterregulation von BDNF durch die Behandlung mit Sertralin bei diesen Tieren entgegengewirkt werden (Duman und Monteggia, 2006; Nibuya et al., 1995).

In der Klinik wurden bei Patienten mit Depressionen deutlich verminderte BDNF-Serumspiegel nachgewiesen, die nach Gabe von SSRIs signifikant anstiegen, verglichen mit einer unbehandelten Kontrollgruppe (Gonul et al., 2005; Shimizu et al., 2003).

Auch die beiden Neurotransmitter Glutamat und GABA beeinflussen die Expression dieses Wachstumsfaktors. Dabei wirkt Glutamat als steigernder und GABA als vermindernder Faktor der BDNF-Expression. Die Blockade von Glutamatrezeptoren bei Ratten durch den nicht-kompetitiven NMDA-Rezeptor Antagonisten MK-801 führte zu einer signifikanten Verminderung des BDNF mRNA-Gehalts im Hippocampus. Die Stimulation von GABA-Rezeptoren durch den GABA-Agonisten Muscimol erzielte ähnliche Ergebnisse (Zafra et al., 1991).

Der in den oben genannten Arbeiten gefundene Zusammenhang zwischen Neurotransmittern und der Regulation der BDNF-Expression wurde auch für das hier untersuchte cholinerge System beschrieben. Knipper und Mitarbeiter sowie Zafra und Mitarbeiter berichteten über eine Hochregulation von BDNF-mRNA im

Hippocampus von Ratten durch cholinerge Aktivierung. Auch unsere Ergebnisse deuten in diese Richtung.

Zafra und Mitarbeiter behandelten hippocampale Neurone mit Carbachol, das ein Struktur analogon von Acetylcholin darstellt. Es bindet am Muskarinrezeptor und aktiviert so das cholinerge System. Hierdurch kam es zu einer signifikant erhöhten Expression von BDNF (Zafra et al., 1990).

Auch Knipper und Mitarbeiter konnten eine signifikante Erhöhung der BDNF-Expression durch Aktivierung des cholinergen Systems nachweisen. Sie behandelten Ratten mit dem Parasympathikomimetikum Pilocarpin, das ebenfalls eine Bindung mit dem Muskarinrezeptor eingeht. Nach 4h zeigte sich eine Zunahme des BDNF mRNA-Spiegels im Hippocampus der Tiere um 350% (Knipper et al., 1994).

Umgekehrt führte die Ausschaltung der cholinergen Afferenzen des Hippocampus bei Ratten zu einer Verminderung des BDNF-mRNA Gehaltes von bis zu 69% (Lapchak et al., 1993).

Die Tendenz unserer Ergebnisse in Bezug auf eine erhöhte BDNF-Expression durch Eserine und die Ergebnisse der oben genannten Arbeiten stellen eine mögliche Erklärung für die unter 6.1 diskutierte Steigerung der Neurogenese dar. Die vermehrte Proliferation der adulten neuronalen Stammzellen durch Eserine bzw. Acetylcholin könnte indirekt über eine diskrete Erhöhung von BDNF verursacht sein, da eine proliferationssteigernde Wirkung des Wachstumsfaktor BDNF beschrieben wurde. So infundierten Scharfman und Mitarbeiter diesen Wachstumsfaktor über zwei Wochen mit Hilfe von osmotischen Pumpen direkt in den Hippocampus von Ratten mit dem Ergebnis einer signifikanten Steigerung der Neurogenese (Scharfman et al., 2005).

Für einen proliferationssteigernden Effekt von BDNF sprechen auch Beobachtungen von Rossi und Mitarbeitern: Es ist bekannt, dass Faktoren wie eine stimulierende Umwelt oder vermehrte körperliche Aktivität gleichzeitig zu einer erhöhten BDNF-Expression und zu einer gesteigerten Neurogenese führen (Russo-Neustadt et al., 2004; Sun et al., 2010). In ihrer Studie zeigten Rossi und Mitarbeiter, dass bei transgenen Mäusen (BDNF+/-), die einen verminderten Spiegel von BDNF aufwiesen, keine Steigerung der Neurogenese in einer reizüberfluteten Umwelt bewirkt werden konnte, verglichen mit WT Mäusen (BDNF+/+) (Rossi et al., 2006).



Seinen proliferationssteigernden Effekt entfaltet BDNF über den TrkB-Rezeptor. Durch Ausschaltung dieses Rezeptors kommt es zu einem drastischen Abfall der hippocampalen Neurogenese: Li und Mitarbeiter verglichen die Zahl der neu gebildeten Neurone in der SGZ von TrkB Knockout-Mäusen mit WT Mäusen. Die transgenen Tiere zeigten eine signifikant verminderte hippocampale Neurogenese im Vergleich zu den genetisch unveränderten Kontrolltieren. Des Weiteren behandelten sie transgene Tiere und Kontrolltiere mit antidepressiv wirkenden Substanzen (Fluoxetin bzw. Imipramin) für 21 Tage bzw. setzten sie für sechs Wochen vermehrter körperlicher Aktivität aus. Antidepressiva sowie gesteigerte körperliche Aktivität führen sowohl zu einem erhöhten BDNF-Spiegel als auch zu einer gesteigerten Neurogenese (Malberg et al., 2000; Russo-Neustadt et al., 2004; van Praag et al., 1999). So zeigten die Kontrolltiere nach der Behandlung mit Fluoxetin bzw. Imipramin eine signifikant gesteigerte Proliferation von hippocampalen Stammzellen im Vergleich zu den TrkB Knockout-Tieren. Auch die sechswöchige körperliche Anstrengung führte bei den transgenen Mäusen zwar zu einer Erhöhung des BDNF-Spiegels, jedoch nicht zu einer vermehrten Neurogenese, wie es bei den Kontrolltieren der Fall war. Diese Beobachtungen demonstrieren, dass die proliferationssteigernde Wirkung von BDNF nur im Zusammenspiel mit dem TrkB-Rezeptor möglich ist (Li et al., 2008).

Ein indirekter Weg zur Erhöhung der Neurogenese über einen proliferationssteigernden Wachstumsfaktor wurde bereits am Beispiel des Insulin like Growthfactor (IGF-1) beschrieben. Narimatsu und Mitarbeiter haben die proliferationssteigernde Wirkung des Acetylcholinestersehemmers Donepezil auf die vermehrte Expression von IGF-1 zurückgeführt (Narimatsu et al., 2009). Dementsprechend lassen die Ergebnisse dieser Arbeit die Vermutung zu, dass Eserine seine Wirkung auf die Neurogenese indirekt über den proliferationssteigernden Effekt von BDNF ausübt, dessen Expression gesteigert ist.

## SYP

Die Genexpression von Synaptophysin zeigte sowohl in der Eserinegruppe als auch in der Kontrollgruppe ähnliche Ergebnisse. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen in Bezug auf die mRNA-Expression von SYP war nicht zu erkennen.

Synaptophysin ist ein synaptisches Protein, das als Marker der Synaptogenese und der Anzahl von Nervenendigungen dient, da es unter anderem bei der Bildung neuer Synapsen vermehrt exprimiert wird (Lietz et al., 2003; Valtorta et al., 2004).

Das Protein wird unter anderem auch mit der Pathogenese des Morbus Alzheimers in Verbindung gebracht. Mehrere Arbeiten zeigten ein vermindertes Vorkommen des Proteins bei Alzheimer Patienten. So berichteten beispielsweise Sze und Mitarbeiter über eine Verminderung des Synaptophysingehaltes im Hippocampus von Alzheimerpatienten von bis zu 55% im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Sze et al., 1997). Des Weiteren scheint der Synaptophysingehalt mit dem Schweregrad der kognitiven Dysfunktion der Patienten - unter anderem gemessen an ihrem Ergebnis im Mini Mental Status Test (MMST) - zu korrelieren (Sze et al., 1997; Terry et al., 1991).

Ein positiver Einfluss von Acetylcholinesterasehemmern auf die SYP-Expression bzw. auf den SYP-Gehalt könnte also einen möglichen Erklärungsansatz für die schon vorher angesprochene symptomlindernde Wirkung der Medikamente bei Alzheimer Patienten darstellen. Allerdings wird der Einfluss von Acetylcholinesterasehemmern auf Synaptophysin in der Literatur kontrovers diskutiert. Es finden sich sowohl Arbeiten, die über einen Anstieg von Synaptophysin berichten, als auch Arbeiten, die keinen Einfluss der Inhibitoren zeigten.

So konnten beispielsweise Bailey und Lahiri eine statistisch signifikante Erhöhung des SYP-Spiegels bei Ratten unter der Behandlung mit dem AChE-Hemmer Rivastigmin nachweisen. Zelllysate kortikaler Kulturen von Rattenembryos, die für 48h mit dem ACh-Inhibitor behandelt wurden, zeigten auf Proteinebene einen dosisabhängigen Anstieg des Synaptophysingehaltes um bis 250% (Bailey und Lahiri, 2010).

Hedberg und Mitarbeiter behandelten zwei unterschiedliche transgene Alzheimer Mausmodelle (APPswe und 3xTg-AD) mit dem AChE-Hemmer Huprine X. Sie konnten signifikant erhöhte Synaptophysinspiegel bei den 3xTg-AD-Mäusen (um ca.

140%) im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren nachweisen. Im APPswe-Modell konnte allerdings, ähnlich zu unseren Ergebnissen, keine Veränderung des SYP-Spiegels nachgewiesen werden (Hedberg et al., 2010).

In einer weiteren Arbeit, die vergleichbare Resultate erzielte, wurden APPswe-Mäuse mit dem AChE-Hemmer Donepezil behandelt. Auch hier konnten keine signifikanten Veränderungen des Synaptophysinspiegels festgestellt werden (Dong et al., 2009).

Diese Diskrepanz der Ergebnisse wird in der Literatur in erster Linie mit den unterschiedlichen Tier- bzw. Zellmodellen begründet, die für die Untersuchungen herangezogen wurden (Hedberg et al., 2010). Ein weiterer Grund für die abweichenden Resultate könnten die eingesetzten Substanzen sein. Der Synaptophysin steigernde Effekt einiger AChE-Hemmer könnte durch einen bis jetzt unbekanntem Mechanismus unabhängig von ihrer Wirkung gegen die Acetylcholinesterase hervorgerufen werden.

## **BACE**

Die Genexpressionsanalyse der Beta-Sekretase-1 (BACE1) zeigte in der Mehrzahl der untersuchten Proben ähnliche Ergebnisse und zwar sowohl in der Eserinegruppe als auch in der Kontrollgruppe. Zwei Proben wiesen stark erniedrigte BACE1-Expressionswerte unter der Behandlung mit Eserine im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Eine statistische Signifikanz der Ergebnisse war insgesamt jedoch nicht zu erkennen.

Der mehrfach angesprochene positive Effekt von Acetylcholinesterasehemmern auf Alzheimerpatienten scheint nicht allein auf ihre ACh-steigernde Wirkung beschränkt zu sein. Giacobini und Mitarbeiter gehen davon aus, dass die Medikamente neben den symptomatischen auch zusätzliche krankheitsverändernde Effekte ausüben (Giacobini, 2001). Mehrere Arbeiten deuten in diesem Zusammenhang auf einen Einfluss von ACh-Hemmern auf den  $\beta$ Amyloid-Spiegel und die Prozessierung des  $\beta$ Amyloid-Vorläuferproteins Amyloid-Precursor-Protein (APP) hin.

So behandelten beispielsweise Shaw und Mitarbeiter humane Neuroblastomzellen mit dem selektiven, nicht kompetitiven ACh-Inhibitor Phenserine. Anschließende Analysen des Zellmediums ergaben statistisch signifikant verminderte APP- und  $\beta$ -Amyloid-Werte. Ferner konnten sie nachweisen, dass der angesprochene Effekt nicht durch die klassische Acetylcholinesterase-hemmende Wirkung des Medikaments hervorgerufen wurde, da das bezüglich dieser Wirkung inaktive Stereoisomer die gleichen Effekte erzielte (Shaw et al., 2001). Dies ist ein weiteres Beispiel für einen alternativen, intrinsischen Wirkmechanismus der ACh-Inhibitoren.

Die genauen molekularen Mechanismen, die zu einer Abnahme von  $\beta$ -Amyloid durch ACh-Hemmer führen, sind allerdings nicht abschließend geklärt.

In diesem Zusammenhang könnte die Beta-Sekretase eine interessante Rolle spielen. Sie ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in der Entstehung von  $\beta$ -Amyloid und somit maßgeblich an der Pathogenese des Morbus Alzheimer beteiligt. Durch Inaktivierung bzw. Fehlen des Enzyms kommt es zu stark verminderter bzw. ausbleibender Bildung von  $\beta$ -Amyloid, wie es in zahlreichen Studien anhand von BACE1 Knockout-Mausmodellen dargestellt wurde (Cai et al., 2001; Luo et al., 2001; Roberds et al., 2001; Vassar, 2002).

Einige Acetylcholinesterasehemmer scheinen die Aktivität bzw. Expression der beta-Sekretase zu vermindern. Hierauf deuten mehrere Arbeiten hin:

Zimmermann und Mitarbeiter arbeiteten mit Thrombozyten von Alzheimerpatienten. Diese stellen ein verlässliches Modell für die pathogenetischen Veränderungen im zentralen Nervensystem dar (Baskin et al., 2000; Colciaghi et al., 2004; Li et al., 1995). Die Untersucher behandelten Alzheimer Patienten über 30 Tage mit dem ACh-Hemmer Donepezil. Im Anschluß wurden die Thrombozyten der Patienten u.a. auf die Aktivität (das Schneideverhalten) der beta-Sekretase untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine statistisch signifikant verminderte beta-Sekretase-Aktivität bei AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen (Zimmermann et al., 2005).

Lahiri und Mitarbeiter untersuchten ebenfalls den Einfluss von ACh-Inhibitoren auf die beta-Sekretase. Sie behandelten Mäuse über 21 Tage mit Posiphen, dem cholinergisch inaktiven Enantiomer von Phenserine. Die Ergebnisse zeigten eine

signifikante Reduktion der beta-Sekretase-Aktivität. Da Posiphen keine Cholinesterase-hemmende Wirkung besitzt, scheint auch dieser Effekt durch einen alternativen Wirkmechanismus des ACh-Inhibitors hervorgerufen zu sein (Lahiri et al., 2007).

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde die beta-Sekretase Proteinexpression unter dem Einfluss eines ACh-Hemmers untersucht. Eine humane Neuroblastom Zelllinie wurde mit dem ACh-Inhibitor Galantamin behandelt. Die anschließende Analyse des BACE1 Spiegels zeigte signifikant verminderte Werte in der Galantamin-Gruppe im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Li et al., 2010).

Li und Mitarbeiter zeigten ferner, dass eine leichte Hochregulation der BACE mRNA zu einem massiven Anstieg von  $\beta$ -Amyloid führt. Ob eine geringe Herunterregulation zu einem Abfall führt, kann nur spekuliert werden (Lahiri et al., 2007; Li et al., 2006).

Aufgrund der entscheidenden Rolle, die BACE1 an der Prozessierung von APP zu  $\beta$ Amyloid spielt, könnte eine Aktivitätsminderung des Enzyms bzw. eine wie auch in dieser Arbeit untersuchte Herunterregulation der BACE1 mRNA eine mögliche Ursache für den verminderten  $\beta$ -Amyloidspiegel unter Behandlung mit ACh-Inhibitoren darstellen. Dies könnte ein weiterer Erklärungsansatz für den durch ACh-Inhibitoren hervorgerufenen, positiven Effekt auf den Verlauf der Alzheimer-Krankheit sein.

## **TPH2**

Unsere Ergebnisse der Genexpressionsanalyse von TPH2 zeigen eine eindeutige Tendenz in Bezug auf eine erhöhte TPH2-Expression in Zellen unter Behandlung mit Eserine. In allen untersuchten Proben konnte ein höherer TPH2-mRNA Gehalt in der Eserinegruppe im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe festgestellt werden.

Klinische Beobachtungen belegen eine stimmungsaufhellende Wirkung von Acetylcholinesterasehemmern. Vor allem bei Patienten mit Morbus Alzheimer, die häufig unter depressiven Verstimmungen leiden, konnte über den positiven Effekt

berichtet werden. Die meisten erfolgreichen Ergebnisse wurden in diesem Zusammenhang mit Donepezil erzielt. So ergab beispielsweise eine Studie mit über 2000 Patienten, die unter leichtem bis mittelschwerem Morbus Alzheimer litten, eine signifikante Besserung der Stimmungslage unter der Behandlung mit Donepezil (Burt, 2000).

Gauthier und Mitarbeiter berichteten ebenfalls über die vorteilhafte Wirkung dieses Medikaments auf Depression und Angststörungen. In einer Studie mit 290 Patienten mit mittelschwerer bis schwerer Alzheimer-Demenz konnte in Bezug auf die oben genannten Symptome ein signifikanter Vorteil von Donepezil im Vergleich zu einem Placebo festgestellt werden (Gauthier et al., 2002).

Die genauen molekularen Mechanismen, durch die die Acetylcholinesterasehemmer ihre positive Wirkung auf die Stimmung der Patienten entfalten, sind allerdings nicht bekannt. Eine mögliche Erklärung könnte die Hochregulation der Tryptophanhydroxylase-2 sein. Sie ist das Schlüsselenzym der neuronalen Serotoninsynthese und somit der bestimmende Faktor für den Serotoninspiegel im zentralen Nervensystem.

Der Neurotransmitter Serotonin spielt eine bedeutende Rolle in der Pathogenese von affektiven Störungen, was unter anderem durch die erfolgreiche Behandlung dieser Erkrankungen durch selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitoren (SSRI's) verdeutlicht wird (Castren, 2005; Mann, 1999; Nemeroff und Owens, 2002; Owens und Nemeroff, 1994; Ressler und Nemeroff, 2000).

In neueren Studien wird sogar über einen direkten Zusammenhang von affektiven Störungen und TPH2 berichtet.

Shishinka und Mitarbeiter behandelten Ratten mit dem SSRI Fluoxetin. Die Wirkung des Medikaments wurde mit Hilfe des *forced swim test* gemessen. Beim *forced swim test* wird das Versuchstier in einen zylinderförmigen Glasbehälter platziert. Dieser Behälter enthält so viel Wasser, dass das Tier den Boden nicht berühren kann. Zunächst versucht das Tier aus dem Behälter zu entfliehen und zeigt dabei angestrengte Bewegungen (*Struggling*), welche als eine Art Bewältigungsstrategie angesehen werden. Nach einer Weile scheint das Tier zu erkennen, dass es keinen Ausweg gibt. Es macht nur noch so viele Bewegungen, dass es mit dem Kopf über Wasser bleibt. Dieses sog. *floating* spiegelt eine Depressions-ähnliche Verhaltensweise wider (Cryan und Mombereau, 2004). Durch den Einsatz von

Fluoxetin kam es zu einer Verkürzung der *floating*-Phasen. Des Weiteren korrelierte der antidepressive Effekt des Medikaments mit einer signifikanten Hochregulation der neuronalen TPH2 mRNA (Shishkina et al., 2007).

Auch Beaulieu und Mitarbeiter konnten die enge Beziehung zwischen TPH2 und depressiven Störungen aufzeigen. Sie arbeiteten mit genetisch veränderten Mäusen, deren TPH2 Aktivität um 80% reduziert war. Diese Tiere zeigten deutlich vermehrte depressionsverwandte Verhaltensweisen (Beaulieu et al., 2008).

Die Tendenz unserer Ergebnisse in Bezug auf die Hochregulation von TPH2 durch Eserine, in Zusammenhang mit den oben genannten Arbeiten, könnte einen möglichen Erklärungsansatz für die stimmungsaufhellende Wirkung von Acetylcholinesterasehemmern darstellen. Die Tendenz der eigenen Ergebnisse weist zwar auf eine Hochregulation von TPH2 durch Eserine hin, da jedoch keine statistische Signifikanz erreicht wurde, bleibt dieser Erklärungsansatz zunächst, trotz in diese Richtung deutende Sachlage, ohne statistische Relevanz.

Die Messung der Genexpression erfolgte mit Hilfe der quantitativen Real Time PCR. Sie stellt auf diesem Gebiet momentan eine der zuverlässigsten Methoden dar (Bustin et al., 2009; Kubista et al., 2006).

Durch unterschiedliche Effizienzen während der RNA-Extraktion sowie der Reversen Transkription kann es zu ungleichmäßigen RNA-Konzentrationen innerhalb der einzelnen Proben kommen. Um diese Schwankungen weitestgehend zu verhindern, wurden die RNA-Konzentration und Qualität mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzer vermessen.

Ein weiterer Schritt, falsche Messungen aufgrund von unterschiedlichen Mengen von Startmaterial innerhalb der Proben zu vermeiden, stellt die Normalisierung der Proben auf Referenzgene dar. Referenzgene zeichnen sich durch ubiquitäres Vorkommen und eine weitestgehend konstante Expression aus. Idealerweise wählt man hierbei mehr als ein Referenzgen. Dementsprechend wurden in dieser Arbeit die Gene GAPDH, ACT $\beta$  und TBP eingesetzt.

Da alle Proben gemeinsam innerhalb eines PCR-Laufs gemessen wurden, konnten Messfehler aufgrund von technischen Faktoren des Lightcyclers sowie evtl. schwankende Enzymaktivitäten von unterschiedlichen Herstellerchargen umgangen werden. Ferner konnte das Risiko von Pippetierfehlern durch das Ansetzen der Proben in Triplets verringert werden.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse ließen keine statistische Signifikanz erkennen. Allerdings zeigte sich v.a. bei zwei der untersuchten Gene - BDNF und TPH2 - eine Tendenz in Bezug auf eine erhöhte Genexpression in der Eserinegruppe. Bei diesen beiden Genen kam es in allen untersuchten Proben zu einer gesteigerten Expression unter Eserinebehandlung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Eine statistische Signifikanz der Ergebnisse könnte in nachfolgenden Experimenten durch Analyse einer erhöhten Anzahl von Proben erreicht werden.

Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass die Genexpressionsanalyse lediglich Auskunft über die mRNA Expression der Gene gibt. Durch posttranskriptionale sowie posttranslationale Veränderungen können Diskrepanzen zwischen exprimierter mRNA und der im Endeffekt vorhandenen Proteinmenge auftreten. Um Aussagen über die tatsächlich translatierte Proteinmenge bzw. die Enzymaktivität zu treffen, könnte in nachfolgenden Versuchen ein zusätzlicher Nachweis auf Proteinebene, z.B. in Form eines Westernblots durchgeführt werden.



## 7 Zusammenfassung

Das Gehirn ist in der Lage, sich sowohl an physiologische Anforderungen der Umwelt als auch an pathologische Veränderungen anzupassen. Diese Eigenschaft wird als Neuroplastizität bezeichnet. Derartige neuroplastische Anpassungsmechanismen spielen auch bei der Wirkung von Psychopharmaka eine wichtige Rolle. Allerdings sind die genauen molekularen Mechanismen, die diese auf die Neuroplastizität ausüben, für viele Substanzen nicht abschließend geklärt. Dies gilt auch für Acetylcholinesterase-Inhibitoren, die im Rahmen des Morbus Alzheimers eingesetzt werden, um den bei dieser Erkrankung auftretenden ACh-Mangel auszugleichen.

Die vorliegende Arbeit untersucht am Beispiel von Eserine den Einfluss von ACh-Inhibitoren auf neuroplastische Vorgänge. Die Untersuchung konzentriert sich auf Veränderungen neuraler Stammzellen, die einen großen Teil dieser neuroplastischen Prozesse ausmachen. Als Zellmodell dienten undifferenzierte adulte neurale Hippocampus Stammzellen der Maus. Diese wurden auf neuroplastische Effekte in Bezug auf die Expression bestimmter Zielgene, Proliferation sowie Zellmobilisierung analysiert.

Die veränderte Expression von bestimmten Zielgenen stellt einen neuroplastischen Anpassungsmechanismus dar. In dieser Arbeit wurde der Effekt von Eserine auf BACE1, BDNF, SYP, TPH2 untersucht, da diese Gene auf verschiedenen Stufen in der Pathologie des Morbus Alzheimer involviert sein können.

Die Expressionsanalyse der Gene BACE1 und SYP zeigte keine Veränderung durch den AChE-Inhibitor. Bei BDNF und TPH2 konnte eine Erhöhung der Genexpression durch den Einfluss von Eserine festgestellt werden, ohne jedoch das Signifikanzniveau zu erreichen.

Bei einer Schädigung von neuronalem Gewebe kann es durch eine vermehrte Stammzellproliferation zu einem Ersatz von untergegangenen Nervenzellen kommen. Ein positiver Effekt auf die Proliferation neuraler Stammzellen ist durch AChE-Inhibitoren insbesondere in *in vivo* Experimenten wiederholt in der Literatur beschrieben worden. In den Experimenten dieser Arbeit konnte ebenfalls eine

proliferationssteigernde Wirkung auf Stammzellen durch Eserine beobachtet werden, die allerdings das statistische Signifikanzniveau verfehlte.

Mobilisierung von Stammzellen aus anderen Hirnarealen in geschädigte Gebiete, um untergegangene Zellen zu ersetzen, stellt eine weitere Facette zum Themenkomplex Neuroplastizität dar. Dementsprechend wurde dieser Reparaturmechanismus untersucht. Es konnte eine statistisch signifikante Erhöhung der Zellmobilisierung durch Eserine festgestellt werden.

Aufgrund dieser Untersuchungen lässt sich der Acetylcholinesteraseinhibitor Eserine als Kandidat für sogenannte exogene Induktoren der Neuroplastizität diskutieren.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

A $\beta$	Beta-Amyloid
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
ACTB	Beta-Aktin
AMPA-R	alpha-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat Rezeptor
ARBP	<i>attachment region binding protein</i>
BACE1	<i>beta-site APP cleaving enzyme 1</i>
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
BLBP	<i>brain lipid-binding protein</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CGRP	<i>calcitonin gene-related peptide</i>
Ct-Wert	<i>cycle threshold</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCX	<i>doublecortin</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPX	Dibutylphthalat-Polystyren-Xylen
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
FGF2	<i>fibroblast growth factor 2</i>
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
NeuN	Neuronales Kernprotein
NMDA-R	N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor
NSC	Neurale Stammzellen
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>

PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A
PSA-NCAM	<i>polysialylated neural cell adhesion molecule</i>
qPCR	quantitative real time polymerase chain reaction
RNA	Ribonukleinsäure
SGZ	Subgranuläre Zone
SOX2	<i>sex determining region Y-box 2</i>
SSRI	Serotonin-Wiederaufnahmeinhibitor
SVZ	Subventrikuläre Zone
SYP	Synaptophysin
TBP	TATA-Box-bindendes Protein
TPH2	Tryptophanhydroxylase 2
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 9 Literatur

- Abdel-Salam OM 2011. Stem cell therapy for Alzheimer's disease. CNS Neurol Disord Drug Targets **10**(4): 459-85.
- Aberg MA, Aberg ND, Hedbacker H, Oscarsson J, Eriksson PS 2000. Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. J Neurosci **20**(8): 2896-903.
- Ahmed AI, Zaben M, Gray WP 2011. Stem cells in the adult human brain. Br J Neurosurg **25**(1): 28-37.
- Ahmed SA, Gogal RM, Jr., Walsh JE 1994. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. J Immunol Methods **170**(2): 211-24.
- Alder J, Kanki H, Valtorta F, Greengard P, Poo MM 1995. Overexpression of synaptophysin enhances neurotransmitter secretion at Xenopus neuromuscular synapses. J Neurosci **15**(1 Pt 2): 511-9.
- Alder J, Xie ZP, Valtorta F, Greengard P, Poo M 1992. Antibodies to synaptophysin interfere with transmitter secretion at neuromuscular synapses. Neuron **9**(4): 759-68.
- Alderson RF, Alterman AL, Barde YA, Lindsay RM 1990. Brain-derived neurotrophic factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture. Neuron **5**(3): 297-306.
- Alison MR, Poulson R, Forbes S, Wright NA 2002. An introduction to stem cells. J Pathol **197**(4): 419-23.
- Alonso M, Vianna MR, Depino AM, Mello e Souza T, Pereira P, Szapiro G, Viola H, Pitossi F, Izquierdo I, Medina JH 2002. BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. Hippocampus **12**(4): 551-60.
- Altman J, Das GD 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. J Comp Neurol **124**(3): 319-35.
- Alvarez-Buylla A, Lim DA 2004. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. Neuron **41**(5): 683-6.
- Bailey JA, Lahiri DK 2010. A novel effect of rivastigmine on pre-synaptic proteins and neuronal viability in a neurodegeneration model of fetal rat primary cortical cultures and its implication in Alzheimer's disease. J Neurochem **112**(4): 843-53.

- Banasr M, Hery M, Printemps R, Daszuta A 2004. Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. Neuropsychopharmacology **29**(3): 450-60.
- Baskin F, Rosenberg RN, Iyer L, Hynan L, Cullum CM 2000. Platelet APP isoform ratios correlate with declining cognition in AD. Neurology **54**(10): 1907-9.
- BD Bioscience GmbH 2008. Matrigel Manual
- Beaulieu JM, Zhang X, Rodriguiz RM, Sotnikova TD, Cools MJ, Wetsel WC, Gainetdinov RR, Caron MG 2008. Role of GSK3 beta in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency. Proc Natl Acad Sci U S A **105**(4): 1333-8.
- Beaver KM, Gavin TJ 1998. Treatment of acute anticholinergic poisoning with physostigmine. Am J Emerg Med **16**(5): 505-7.
- Belmaker RH, Agam G 2008. Major depressive disorder. N Engl J Med **358**(1): 55-68.
- Ben Abdallah NM, Slomianka L, Vyssotski AL, Lipp HP 2010. Early age-related changes in adult hippocampal neurogenesis in C57 mice. Neurobiol Aging **31**(1): 151-61.
- Bendel O, Bueters T, von Euler M, Ove Ogren S, Sandin J, von Euler G 2005. Reappearance of hippocampal CA1 neurons after ischemia is associated with recovery of learning and memory. J Cereb Blood Flow Metab **25**(12): 1586-95.
- Benninghoff J, Gritti A, Rizzi M, Lamorte G, Schloesser RJ, Schmitt A, Robel S, Genius J, Moessner R, Riederer P, Manji HK, Grunze H, Rujescu D, Moeller HJ, Lesch KP, Vescovi AL 2009. Serotonin depletion hampers survival and proliferation in neurospheres derived from adult neural stem cells. Neuropsychopharmacology **35**(4): 893-903.
- Benninghoff J, Rauh W, Brantl V, Schloesser RJ, Moessner R, Moller HJ, Rujescu D 2011. Cholinergic impact on neuroplasticity drives muscarinic M1 receptor mediated differentiation into neurons. World J Biol Psychiatry.
- Binder DK, Scharfman HE 2004. Brain-derived neurotrophic factor. Growth Factors **22**(3): 123-31.
- Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL 1999. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. Science **283**(5401): 534-7.
- Bordey A 2006. Adult neurogenesis: basic concepts of signaling. Cell Cycle **5**(7): 722-8.
- Boyden S 1962. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. J Exp Med **115**: 453-66.

- Bragina L, Melone M, Fattorini G, Torres-Ramos M, Vallejo-Illarramendi A, Matute C, Conti F 2006. GLT-1 down-regulation induced by clozapine in rat frontal cortex is associated with synaptophysin up-regulation. J Neurochem **99**(1): 134-41.
- Brandt MD, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G, Reuter K, Bick-Sander A, von der Behrens W, Kempermann G 2003. Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. Mol Cell Neurosci **24**(3): 603-13.
- Brezun JM, Daszuta A 1999. Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. Neuroscience **89**(4): 999-1002.
- Brezun JM, Daszuta A 2000. Serotonin may stimulate granule cell proliferation in the adult hippocampus, as observed in rats grafted with foetal raphe neurons. Eur J Neurosci **12**(1): 391-6.
- Brown DV, Heller F, Barkin R 2004. Anticholinergic syndrome after anesthesia: a case report and review. Am J Ther **11**(2): 144-53.
- Bruel-Jungerman E, Lucassen PJ, Francis F 2011. Cholinergic influences on cortical development and adult neurogenesis. Behav Brain Res **221**(2): 379-88.
- Burt T 2000. Donepezil and related cholinesterase inhibitors as mood and behavioral controlling agents. Curr Psychiatry Rep **2**(6): 473-8.
- Bustin SA 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J Mol Endocrinol **25**(2): 169-93.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem **55**(4): 611-22.
- Cai H, Wang Y, McCarthy D, Wen H, Borchelt DR, Price DL, Wong PC 2001. BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. Nat Neurosci **4**(3): 233-4.
- Cajal R 1928. Degeneration and Regeneration of the Nervous System. Oxford University Press
- Cameron HA, Gould E 1994. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. Neuroscience **61**(2): 203-9.
- Cameron HA, McEwen BS, Gould E 1995. Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. J Neurosci **15**(6): 4687-92.
- Cao L, Jiao X, Zuzga DS, Liu Y, Fong DM, Young D, During MJ 2004. VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. Nat Genet **36**(8): 827-35.

- Castren E 2005. Is mood chemistry? Nat Rev Neurosci **6**(3): 241-6.
- Cattaneo E, McKay R 1990. Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. Nature **347**(6295): 762-5.
- Chakroborty D, Chowdhury UR, Sarkar C, Baral R, Dasgupta PS, Basu S 2008. Dopamine regulates endothelial progenitor cell mobilization from mouse bone marrow in tumor vascularization. J Clin Invest **118**(4): 1380-9.
- Chen J, Magavi SS, Macklis JD 2004. Neurogenesis of corticospinal motor neurons extending spinal projections in adult mice. Proc Natl Acad Sci U S A **101**(46): 16357-62.
- Citron M, Teplow DB, Selkoe DJ 1995. Generation of amyloid beta protein from its precursor is sequence specific. Neuron **14**(3): 661-70.
- Colciaghi F, Marcello E, Borroni B, Zimmermann M, Caltagirone C, Cattabeni F, Padovani A, Di Luca M 2004. Platelet APP, ADAM 10 and BACE alterations in the early stages of Alzheimer disease. Neurology **62**(3): 498-501.
- Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Kuhn HG 2004. Decreased neurogenesis after cholinergic forebrain lesion in the adult rat. J Neurosci Res **77**(2): 155-65.
- Cryan JF, Mombereau C 2004. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. Mol Psychiatry **9**(4): 326-57.
- 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**(5): 339-50.
- Dhaliwal J, Lagace DC 2011. Visualization and genetic manipulation of adult neurogenesis using transgenic mice. Eur J Neurosci **33**(6): 1025-36.
- Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A 2004. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. Biotechniques **37**(1): 112-4, 116, 118-9.
- Dias BG, Banerjee SB, Duman RS, Vaidya VA 2003. Differential regulation of brain derived neurotrophic factor transcripts by antidepressant treatments in the adult rat brain. Neuropharmacology **45**(4): 553-63.
- Doetsch F 2003. A niche for adult neural stem cells. Curr Opin Genet Dev **13**(5): 543-50.
- Dominguez D, Tournoy J, Hartmann D, Huth T, Cryns K, Deforce S, Serneels L, Camacho IE, Marjaux E, Craessaerts K, Roebroek AJ, Schwake M, D'Hooge R, Bach P, Kalinke U, Moechars D, Alzheimer C, Reiss K, Saftig P, De Strooper B 2005. Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice. J Biol Chem **280**(35): 30797-806.



- Dong H, Yuede CM, Coughlan CA, Murphy KM, Csernansky JG 2009. Effects of donepezil on amyloid-beta and synapse density in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. Brain Res **1303**: 169-78.
- Drigues N, Poltyrev T, Bejar C, Weinstock M, Youdim MB 2003. cDNA gene expression profile of rat hippocampus after chronic treatment with antidepressant drugs. J Neural Transm **110**(12): 1413-36.
- Dudar JD, Wishaw IQ, Szerb JC 1979. Release of acetylcholine from the hippocampus of freely moving rats during sensory stimulation and running. Neuropharmacology **18**(8-9): 673-8.
- Duman RS, Malberg J, Nakagawa S 2001. Regulation of adult neurogenesis by psychotropic drugs and stress. J Pharmacol Exp Ther **299**(2): 401-7.
- Duman RS, Malberg J, Thome J 1999. Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. Biol Psychiatry **46**(9): 1181-91.
- Duman RS, Monteggia LM 2006. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. Biol Psychiatry **59**(12): 1116-27.
- Edelmann L, Hanson PI, Chapman ER, Jahn R 1995. Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. EMBO J **14**(2): 224-31.
- Encinas JM, Vaahtokari A, Enikolopov G 2006. Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. Proc Natl Acad Sci U S A **103**(21): 8233-8.
- Ensembl; [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)
- Hubbard TJ, Aken BL, Beal K, Ballester B, Caccamo M, Chen Y, Clarke L, Coates G, Cunningham F, Cutts T, Down T, Dyer SC, Fitzgerald S, Fernandez-Banet J, Graf S, Haider S, Hammond M, Herrero J, Holland R, Howe K, Johnson N, Kahari A, Keefe D, Kokocinski F, Kulesha E, Lawson D, Longden I, Melsopp C, Megy K, Meidl P, Ouverdin B, Parker A, Prlic A, Rice S, Rios D, Schuster M, Sealy I, Severin J, Slater G, Smedley D, Spudich G, Trevanion S, Vilella A, Vogel J, White S, Wood M, Cox T, Curwen V, Durbin R, Fernandez-Suarez XM, Flicek P, Kasprzyk A, Proctor G, Searle S, Smith J, Ureta-Vidal A, Birney E 2007. Ensembl 2007. Nucleic Acids Res **35**(Database issue): D610-7.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. Nat Med **4**(11): 1313-7.
- Eshkind LG, Leube RE 1995. Mice lacking synaptophysin reproduce and form typical synaptic vesicles. Cell Tissue Res **282**(3): 423-33.
- Fabel K, Tam B, Kaufer D, Baiker A, Simmons N, Kuo CJ, Palmer TD 2003. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. Eur J Neurosci **18**(10): 2803-12.
- Feinberg AP, Vogelstein B 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem **132**(1): 6-13.

- Feng L, Hatten ME, Heintz N 1994. Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS. Neuron **12**(4): 895-908.
- Fitzpatrick PF 2000. The aromatic amino acid hydroxylases. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **74**: 235-94.
- Fleige S, Pfaffl MW 2006. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. Mol Aspects Med **27**(2-3): 126-39.
- Fletcher TL, Cameron P, De Camilli P, Banker G 1991. The distribution of synapsin I and synaptophysin in hippocampal neurons developing in culture. J Neurosci **11**(6): 1617-26.
- Gage FH 2000. Mammalian neural stem cells. Science **287**(5457): 1433-8.
- Galli R, Gritti A, Bonfanti L, Vescovi AL 2003. Neural stem cells: an overview. Circ Res **92**(6): 598-608.
- Gauthier S, Feldman H, Hecker J, Vellas B, Ames D, Subbiah P, Whalen E, Emir B 2002. Efficacy of donepezil on behavioral symptoms in patients with moderate to severe Alzheimer's disease. Int Psychogeriatr **14**(4): 389-404.
- GE Healthcare 2008. Amersham Cell Proliferation Kit, Product Booklet
- 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.
- Ghosh A, Carnahan J, Greenberg ME 1994. Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. Science **263**(5153): 1618-23.
- Ghosh AK, Brindisi M, Tang J 2012. Developing beta-secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. J Neurochem **120** **Suppl 1**: 71-83.
- Giacobini E 2001. Do cholinesterase inhibitors have disease-modifying effects in Alzheimer's disease? CNS Drugs **15**(2): 85-91.
- Gold PE 2003. Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. Neurobiol Learn Mem **80**(3): 194-210.
- Goldman SA, Nottebohm F 1983. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. Proc Natl Acad Sci U S A **80**(8): 2390-4.
- Gonul AS, Akdeniz F, Taneli F, Donat O, Eker C, Vahip S 2005. Effect of treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci **255**(6): 381-6.
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ 1999. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. Nat Neurosci **2**(3): 260-5.

- Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E 1998. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 3168-71.
- Graham V, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L 2003. SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. Neuron **39**(5): 749-65.
- Gritti A, Frolichsthal-Schoeller P, Galli R, Parati EA, Cova L, Pagano SF, Bjornson CR, Vescovi AL 1999. Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. J Neurosci **19**(9): 3287-97.
- Gritti A, Vescovi AL, Galli R 2002. Adult neural stem cells: plasticity and developmental potential. J Physiol Paris **96**(1-2): 81-90.
- Haass C, Hung AY, Schlossmacher MG, Teplow DB, Selkoe DJ 1993. beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. J Biol Chem **268**(5): 3021-4.
- Haass C, Steiner H 2002. Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases. Trends Cell Biol **12**(12): 556-62.
- Hagg T 2009. From neurotransmitters to neurotrophic factors to neurogenesis. Neuroscientist **15**(1): 20-7.
- Hall J, Thomas KL, Everitt BJ 2000. Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. Nat Neurosci **3**(6): 533-5.
- Hasselmo ME 2006. The role of acetylcholine in learning and memory. Curr Opin Neurobiol **16**(6): 710-5.
- Hattiangady B, Shetty AK 2008. Aging does not alter the number or phenotype of putative stem/progenitor cells in the neurogenic region of the hippocampus. Neurobiol Aging **29**(1): 129-47.
- Haughey NJ, Nath A, Chan SL, Borchard AC, Rao MS, Mattson MP 2002. Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease. J Neurochem **83**(6): 1509-24.
- Hedberg MM, Clos MV, Ratia M, Gonzalez D, Lithner CU, Camps P, Munoz-Torrero D, Badia A, Gimenez-Llort L, Nordberg A 2010. Effect of huprine X on beta-amyloid, synaptophysin and alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptors in the brain of 3xTg-AD and APPswe transgenic mice. Neurodegener Dis **7**(6): 379-88.
- Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. Genome Biol **8**(2): R19.

- Holsinger RM, Schnarr J, Henry P, Castelo VT, Fahnstock M 2000. Quantitation of BDNF mRNA in human parietal cortex by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: decreased levels in Alzheimer's disease. Brain Res Mol Brain Res **76**(2): 347-54.
- Hu X, Hicks CW, He W, Wong P, Macklin WB, Trapp BD, Yan R 2006. Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. Nat Neurosci **9**(12): 1520-5.
- Hu X, Zhou X, He W, Yang J, Xiong W, Wong P, Wilson CG, Yan R 2010. BACE1 deficiency causes altered neuronal activity and neurodegeneration. J Neurosci **30**(26): 8819-29.
- Huang TL, Lee CT, Liu YL 2008. Serum brain-derived neurotrophic factor levels in patients with major depression: effects of antidepressants. J Psychiatr Res **42**(7): 521-5.
- Hurteau GJ, Spivack SD 2002. mRNA-specific reverse transcription-polymerase chain reaction from human tissue extracts. Anal Biochem **307**(2): 304-15.
- Hussain I, Powell D, Howlett DR, Tew DG, Meek TD, Chapman C, Gloger IS, Murphy KE, Southan CD, Ryan DM, Smith TS, Simmons DL, Walsh FS, Dingwall C, Christie G 1999. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. Mol Cell Neurosci **14**(6): 419-27.
- Invernizzi RW 2007. Role of TPH-2 in brain function: news from behavioral and pharmacologic studies. J Neurosci Res **85**(14): 3030-5.
- 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.
- Janz R, Sudhof TC, Hammer RE, Unni V, Siegelbaum SA, Bolshakov VY 1999. Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I. Neuron **24**(3): 687-700.
- Jha S, Rajendran R, Davda J, Vaidya VA 2006. Selective serotonin depletion does not regulate hippocampal neurogenesis in the adult rat brain: differential effects of p-chlorophenylalanine and 5,7-dihydroxytryptamine. Brain Res **1075**(1): 48-59.
- Jiao J, Chen DF 2008. Induction of neurogenesis in nonconventional neurogenic regions of the adult central nervous system by niche astrocyte-produced signals. Stem Cells **26**(5): 1221-30.
- Jin K, Peel AL, Mao XO, Xie L, Cottrell BA, Henshall DC, Greenberg DA 2004. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci U S A **101**(1): 343-7.
- Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA 2002. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A **99**(18): 11946-50.

- Kandalepas PC, Vassar R 2012. Identification and biology of beta-secretase. J Neurochem **120 Suppl 1**: 55-61.
- Kang H, Schuman EM 1995. Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. Science **267**(5204): 1658-62.
- Kaplan MS, Hinds JW 1977. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. Science **197**(4308): 1092-4.
- Kempermann G 2011. Seven principles in the regulation of adult neurogenesis. Eur J Neurosci **33**(6): 1018-24.
- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G 2004. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. Trends Neurosci **27**(8): 447-52.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. Nature **386**(6624): 493-5.
- Kernie SG, Liebl DJ, Parada LF 2000. BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. EMBO J **19**(6): 1290-300.
- Kilpatrick TJ, Bartlett PF 1993. Cloning and growth of multipotential neural precursors: requirements for proliferation and differentiation. Neuron **10**(2): 255-65.
- Knaus P, Betz H, Rehm H 1986. Expression of synaptophysin during postnatal development of the mouse brain. J Neurochem **47**(4): 1302-4.
- Knipper M, da Penha Berzaghi M, Blochl A, Breer H, Thoenen H, Lindholm D 1994. Positive feedback between acetylcholine and the neurotrophins nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in the rat hippocampus. Eur J Neurosci **6**(4): 668-71.
- Kobayashi D, Zeller M, Cole T, Buttini M, McConlogue L, Sinha S, Freedman S, Morris RG, Chen KS 2008. BACE1 gene deletion: impact on behavioral function in a model of Alzheimer's disease. Neurobiol Aging **29**(6): 861-73.
- Kokaia M, Ernfors P, Kokaia Z, Elmer E, Jaenisch R, Lindvall O 1995. Suppressed epileptogenesis in BDNF mutant mice. Exp Neurol **133**(2): 215-24.
- Kolecki R, Lafauci G, Rubenstein R, Mazur-Kolecka B, Kaczmarek W, Frackowiak J 2008. The effect of amyloidosis-beta and ageing on proliferation of neuronal progenitor cells in APP-transgenic mouse hippocampus and in culture. Acta Neuropathol **116**(4): 419-24.
- Kriegstein A, Alvarez-Buylla A 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. Annu Rev Neurosci **32**: 149-84.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N 2006. The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med **27**(2-3): 95-125.

- Kuhlmann I 1995. The prophylactic use of antibiotics in cell culture. Cytotechnology **19**(2): 95-105.
- 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**(6): 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): 5820-9.
- Kwon SE, Chapman ER 2011. Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons. Neuron **70**(5): 847-54.
- Lahiri DK, Chen D, Maloney B, Holloway HW, Yu QS, Utsuki T, Giordano T, Sambamurti K, Greig NH 2007. The experimental Alzheimer's disease drug posiphen [(+)-phenserine] lowers amyloid-beta peptide levels in cell culture and mice. J Pharmacol Exp Ther **320**(1): 386-96.
- Lapchak PA, Araujo DM, Hefti F 1993. Cholinergic regulation of hippocampal brain-derived neurotrophic factor mRNA expression: evidence from lesion and chronic cholinergic drug treatment studies. Neuroscience **52**(3): 575-85.
- Lazarov O, Marr RA 2010. Neurogenesis and Alzheimer's disease: at the crossroads. Exp Neurol **223**(2): 267-81.
- Lee J, Duan W, Long JM, Ingram DK, Mattson MP 2000. Dietary restriction increases the number of newly generated neural cells, and induces BDNF expression, in the dentate gyrus of rats. J Mol Neurosci **15**(2): 99-108.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL 2001. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. Science **294**(5548): 1945-8.
- Lessmann V 1998. Neurotrophin-dependent modulation of glutamatergic synaptic transmission in the mammalian CNS. Gen Pharmacol **31**(5): 667-74.
- Lessmann V, Gottmann K, Heumann R 1994. BDNF and NT-4/5 enhance glutamatergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurones. Neuroreport **6**(1): 21-5.
- Li Q, Wu D, Zhang L, Zhang Y 2010. Effects of galantamine on beta-amyloid release and beta-site cleaving enzyme 1 expression in differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Exp Gerontol **45**(11): 842-7.
- Li QX, Evin G, Small DH, Multhaup G, Beyreuther K, Masters CL 1995. Proteolytic processing of Alzheimer's disease beta A4 amyloid precursor protein in human platelets. J Biol Chem **270**(23): 14140-7.
- Li Y, Luikart BW, Birnbaum S, Chen J, Kwon CH, Kernie SG, Bassel-Duby R, Parada LF 2008. TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment. Neuron **59**(3): 399-412.

- Li Y, Zhou W, Tong Y, He G, Song W 2006. Control of APP processing and Abeta generation level by BACE1 enzymatic activity and transcription. FASEB J **20**(2): 285-92.
- Lie DC, Dzievczapolski G, Willhoite AR, Kaspar BK, Shults CW, Gage FH 2002. The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. J Neurosci **22**(15): 6639-49.
- Lietz M, Hohl M, Thiel G 2003. RE-1 silencing transcription factor (REST) regulates human synaptophysin gene transcription through an intronic sequence-specific DNA-binding site. Eur J Biochem **270**(1): 2-9.
- Linnarsson S, Bjorklund A, Ernfors P 1997. Learning deficit in BDNF mutant mice. Eur J Neurosci **9**(12): 2581-7.
- Liu X, Wang Q, Haydar TF, Bordey A 2005. Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. Nat Neurosci **8**(9): 1179-87.
- Lowenstein DH, Arsenault L 1996. The effects of growth factors on the survival and differentiation of cultured dentate gyrus neurons. J Neurosci **16**(5): 1759-69.
- Luo Y, Bolon B, Kahn S, Bennett BD, Babu-Khan S, Denis P, Fan W, Kha H, Zhang J, Gong Y, Martin L, Louis JC, Yan Q, Richards WG, Citron M, Vassar R 2001. Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. Nat Neurosci **4**(3): 231-2.
- Luskin MB 1993. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. Neuron **11**(1): 173-89.
- Ma X, Ottino P, Bazan HE, Bazan NG 2004. Platelet-activating factor (PAF) induces corneal neovascularization and upregulates VEGF expression in endothelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(9): 2915-21.
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS 2000. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. J Neurosci **20**(24): 9104-10.
- Mann JJ 1999. Role of the serotonergic system in the pathogenesis of major depression and suicidal behavior. Neuropsychopharmacology **21**(2 Suppl): 99S-105S.
- Martinowich K, Lu B 2008. Interaction between BDNF and serotonin: role in mood disorders. Neuropsychopharmacology **33**(1): 73-83.
- Matthes S, Mosienko V, Bashammakh S, Alenina N, Bader M 2010. Tryptophan hydroxylase as novel target for the treatment of depressive disorders. Pharmacology **85**(2): 95-109.
- McClung CA, Nestler EJ 2008. Neuroplasticity mediated by altered gene expression. Neuropsychopharmacology **33**(1): 3-17.

- McMahon HT, Bolshakov VY, Janz R, Hammer RE, Siegelbaum SA, Sudhof TC 1996. Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release. Proc Natl Acad Sci U S A **93**(10): 4760-4.
- Mesulam MM 1999. Neuroplasticity failure in Alzheimer's disease: bridging the gap between plaques and tangles. Neuron **24**(3): 521-9.
- Ming GL, Song H 2005. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. Annu Rev Neurosci **28**: 223-50.
- Ming GL, Song H 2011. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. Neuron **70**(4): 687-702.
- Mirescu C, Gould E 2006. Stress and adult neurogenesis. Hippocampus **16**(3): 233-8.
- Mitchell MD, Laird RE, Brown RD, Long CS 2007. IL-1beta stimulates rat cardiac fibroblast migration via MAP kinase pathways. Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(2): H1139-47.
- Mohapel P, Leanza G, Kokaia M, Lindvall O 2005. Forebrain acetylcholine regulates adult hippocampal neurogenesis and learning. Neurobiol Aging **26**(6): 939-46.
- Morrison SJ, Spradling AC 2008. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. Cell **132**(4): 598-611.
- Mu JS, Li WP, Yao ZB, Zhou XF 1999. Deprivation of endogenous brain-derived neurotrophic factor results in impairment of spatial learning and memory in adult rats. Brain Res **835**(2): 259-65.
- Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R 2001. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Prog Neurobiol **63**(1): 71-124.
- Nacher J, Varea E, Miguel Blasco-Ibanez J, Gomez-Clement MA, Castillo-Gomez E, Crespo C, Martinez-Guijarro FJ, McEwen BS 2007. N-methyl-d-aspartate receptor expression during adult neurogenesis in the rat dentate gyrus. Neuroscience **144**(3): 855-64.
- Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M 2002. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. Cell **110**(4): 429-41.
- Narimatsu N, Harada N, Kurihara H, Nakagata N, Sobue K, Okajima K 2009. Donepezil improves cognitive function in mice by increasing the production of insulin-like growth factor-I in the hippocampus. J Pharmacol Exp Ther **330**(1): 2-12.



- NCBI BLAST; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res **25**(17): 3389-402.
- Neeper SA, Gomez-Pinilla F, Choi J, Cotman CW 1996. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. Brain Res **726**(1-2): 49-56.
- Nemeroff CB, Owens MJ 2002. Treatment of mood disorders. Nat Neurosci **5 Suppl**: 1068-70.
- Nibuya M, Morinobu S, Duman RS 1995. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. J Neurosci **15**(11): 7539-47.
- Nonomura T, Hatanaka H 1992. Neurotrophic effect of brain-derived neurotrophic factor on basal forebrain cholinergic neurons in culture from postnatal rats. Neurosci Res **14**(3): 226-33.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P 2001. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. Nature **410**(6829): 701-5.
- Owens DF, Kriegstein AR 2002. Is there more to GABA than synaptic inhibition? Nat Rev Neurosci **3**(9): 715-27.
- Owens MJ, Nemeroff CB 1994. Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter. Clin Chem **40**(2): 288-95.
- Padurariu M, Ciobica A, Mavroudis I, Fotiou D, Baloyannis S 2012. Hippocampal neuronal loss in the CA1 and CA3 areas of Alzheimer's disease patients. Psychiatr Danub **24**(2): 152-8.
- Palmer TD, Takahashi J, Gage FH 1997. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. Mol Cell Neurosci **8**(6): 389-404.
- Parent JM 2003. Injury-induced neurogenesis in the adult mammalian brain. Neuroscientist **9**(4): 261-72.
- Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH 1997. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. J Neurosci **17**(10): 3727-38.
- Pathania M, Yan LD, Bordey A 2010. A symphony of signals conducts early and late stages of adult neurogenesis. Neuropharmacology **58**(6): 865-76.
- Pepeu G, Giovannini MG 2004. Changes in acetylcholine extracellular levels during cognitive processes. Learn Mem **11**(1): 21-7.

- Pfaffl MW 2004. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. Biospektrum 2004 (Sonderausgabe PCR) **10**:92-5.
- Phillips HS, Hains JM, Armanini M, Laramée GR, Johnson SA, Winslow JW 1991. BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. Neuron **7**(5): 695-702.
- Poo MM 2001. Neurotrophins as synaptic modulators. Nat Rev Neurosci **2**(1): 24-32.
- Potten CS, Loeffler M 1990. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. Development **110**(4): 1001-20.
- Primer3; <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>
- Rozen S, Skaletsky H 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods Mol Biol **132**: 365-86.
- Qiagen GmbH 2006. RNeasy Mini Kit, Handbook
- Ramirez-Castillejo C, Sanchez-Sanchez F, Andreu-Agullo C, Ferron SR, Aroca-Aguilar JD, Sanchez P, Mira H, Escribano J, Farinas I 2006. Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. Nat Neurosci **9**(3): 331-9.
- Rapp S, Baader M, Hu M, Jennen-Steinmetz C, Henn FA, Thome J 2004. Differential regulation of synaptic vesicle proteins by antidepressant drugs. Pharmacogenomics J **4**(2): 110-3.
- Ressler KJ, Nemeroff CB 2000. Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. Depress Anxiety **12 Suppl 1**: 2-19.
- Reynolds BA, Weiss S 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. Science **255**(5052): 1707-10.
- Rios M, Fan G, Fekete C, Kelly J, Bates B, Kuehn R, Lechan RM, Jaenisch R 2001. Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. Mol Endocrinol **15**(10): 1748-57.
- Roberds SL, Anderson J, Basi G, Bienkowski MJ, Branstetter DG, Chen KS, Freedman SB, Frigon NL, Games D, Hu K, Johnson-Wood K, Kappenman KE, Kawabe TT, Kola I, Kuehn R, Lee M, Liu W, Motter R, Nichols NF, Power M, Robertson DW, Schenk D, Schoor M, Shopp GM, Shuck ME, Sinha S, Svensson KA, Tatsuno G, Tintrup H, Wijsman J, Wright S, McConlogue L 2001. BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. Hum Mol Genet **10**(12): 1317-24.
- Rochefort C, Gheusi G, Vincent JD, Lledo PM 2002. Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. J Neurosci **22**(7): 2679-89.

- Rossi C, Angelucci A, Costantin L, Braschi C, Mazzantini M, Babbini F, Fabbri ME, Tessarollo L, Maffei L, Berardi N, Caleo M 2006. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. Eur J Neurosci **24**(7): 1850-6.
- Rumack BH 1973. Anticholinergic poisoning: treatment with physostigmine. Pediatrics **52**(3): 449-51.
- Russo-Neustadt AA, Alejandre H, Garcia C, Ivy AS, Chen MJ 2004. Hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression following treatment with reboxetine, citalopram, and physical exercise. Neuropsychopharmacology **29**(12): 2189-99.
- Scharfman H, Goodman J, Macleod A, Phani S, Antonelli C, Croll S 2005. Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. Exp Neurol **192**(2): 348-56.
- Schmitt TK, Pajonk FG 2008. [Postoperative delirium in the critically ill]. Anaesthetist **57**(4): 403-29; quiz 430-1.
- Selkoe DJ 2008. Biochemistry and molecular biology of amyloid beta-protein and the mechanism of Alzheimer's disease. Handb Clin Neurol **89**: 245-60.
- Shannon M 1998. Toxicology reviews: physostigmine. Pediatr Emerg Care **14**(3): 224-6.
- Shaw KT, Utsuki T, Rogers J, Yu QS, Sambamurti K, Brossi A, Ge YW, Lahiri DK, Greig NH 2001. Phenserine regulates translation of beta -amyloid precursor protein mRNA by a putative interleukin-1 responsive element, a target for drug development. Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7605-10.
- Shihabuddin LS, Ray J, Gage FH 1997. FGF-2 is sufficient to isolate progenitors found in the adult mammalian spinal cord. Exp Neurol **148**(2): 577-86.
- Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, Koike K, Komatsu N, Kumakiri C, Nakazato M, Watanabe H, Shinoda N, Okada S, Iyo M 2003. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. Biol Psychiatry **54**(1): 70-5.
- Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, Cross JC, Weiss S 2003. Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. Science **299**(5603): 117-20.
- Shishkina GT, Kalinina TS, Dygalo NN 2007. Up-regulation of tryptophan hydroxylase-2 mRNA in the rat brain by chronic fluoxetine treatment correlates with its antidepressant effect. Neuroscience **150**(2): 404-12.
- Sidman RL, Miale IL, Feder N 1959. Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone: an autoradiographic study of histogenesis in the nervous system. Exp Neurol **1**: 322-33.

- Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J, Jacobson-Croak K, Jewett N, Keim P, Knops J, Lieberburg I, Power M, Tan H, Tatsuno G, Tung J, Schenk D, Seubert P, Suomensaaari SM, Wang S, Walker D, Zhao J, McConlogue L, John V 1999. Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. Nature **402**(6761): 537-40.
- Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM 1995. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. J Neurosci **15**(3 Pt 1): 1768-77.
- Song H, Stevens CF, Gage FH 2002. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. Nature **417**(6884): 39-44.
- Suh H, Deng W, Gage FH 2009. Signaling in adult neurogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol **25**: 253-75.
- Sun H, Zhang J, Zhang L, Liu H, Zhu H, Yang Y 2010. Environmental enrichment influences BDNF and NR1 levels in the hippocampus and restores cognitive impairment in chronic cerebral hypoperfused rats. Curr Neurovasc Res **7**(4): 268-80.
- Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR 2000. Control selection for RNA quantitation. Biotechniques **29**(2): 332-7.
- Sze CI, Troncoso JC, Kawas C, Mouton P, Price DL, Martin LJ 1997. Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. J Neuropathol Exp Neurol **56**(8): 933-44.
- Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E 1999. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. J Neurosci **19**(14): 5792-801.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R 1991. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. Ann Neurol **30**(4): 572-80.
- Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T 2005. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. Neuron **47**(6): 803-15.
- Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M, Bustin SA, Orlando C 2002. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. Anal Biochem **309**(2): 293-300.
- Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, van der Kooy D 2000. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. Science **287**(5460): 2032-6.

- Vaidya VA, Vadodaria KC, Jha S 2007. Neurotransmitter regulation of adult neurogenesis: putative therapeutic targets. CNS Neurol Disord Drug Targets **6**(5): 358-74.
- Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F 2004. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? Bioessays **26**(4): 445-53.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH 1999. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. Nat Neurosci **2**(3): 266-70.
- van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH 2005. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. J Neurosci **25**(38): 8680-5.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol **3**(7): RESEARCH0034.
- Vassar R 2002. Beta-secretase (BACE) as a drug target for Alzheimer's disease. Adv Drug Deliv Rev **54**(12): 1589-602.
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. Science **286**(5440): 735-41.
- Vassar R, Kovacs DM, Yan R, Wong PC 2009. The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. J Neurosci **29**(41): 12787-94.
- Vawter MP, Thatcher L, Usen N, Hyde TM, Kleinman JE, Freed WJ 2002. Reduction of synapsin in the hippocampus of patients with bipolar disorder and schizophrenia. Mol Psychiatry **7**(6): 571-8.
- Venugopal C, Demos CM, Rao KS, Pappolla MA, Sambamurti K 2008. Beta-secretase: structure, function, and evolution. CNS Neurol Disord Drug Targets **7**(3): 278-94.
- Vescovi AL, Reynolds BA, Fraser DD, Weiss S 1993. bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. Neuron **11**(5): 951-66.
- Wagers AJ, Weissman IL 2004. Plasticity of adult stem cells. Cell **116**(5): 639-48.
- Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hortnagl H, Voits M, Fink H, Bader M 2003. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. Science **299**(5603): 76.

- Wardle RA, Poo MM 2003. Brain-derived neurotrophic factor modulation of GABAergic synapses by postsynaptic regulation of chloride transport. J Neurosci **23**(25): 8722-32.
- Washbourne P, Schiavo G, Montecucco C 1995. Vesicle-associated membrane protein-2 (synaptobrevin-2) forms a complex with synaptophysin. Biochem J **305 ( Pt 3)**: 721-4.
- West MJ, Kawas CH, Martin LJ, Troncoso JC 2000. The CA1 region of the human hippocampus is a hot spot in Alzheimer's disease. Ann N Y Acad Sci **908**: 255-9.
- Wiedenmann B, Franke WW 1985. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. Cell **41**(3): 1017-28.
- Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, Miao H, Tory MC, Pauley AM, Brashier JR, Stratman NC, Mathews WR, Buhl AE, Carter DB, Tomasselli AG, Parodi LA, Heinrikson RL, Gurney ME 1999. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. Nature **402**(6761): 533-7.
- Yang J, Liu J, Niu G, Chan KC, Wang R, Liu Y, Wu EX 2009. In vivo MRI of endogenous stem/progenitor cell migration from subventricular zone in normal and injured developing brains. Neuroimage **48**(2): 319-28.
- Yu TS, Zhang G, Liebl DJ, Kernie SG 2008. Traumatic brain injury-induced hippocampal neurogenesis requires activation of early nestin-expressing progenitors. J Neurosci **28**(48): 12901-12.
- Zafra F, Castren E, Thoenen H, Lindholm D 1991. Interplay between glutamate and gamma-aminobutyric acid transmitter systems in the physiological regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor synthesis in hippocampal neurons. Proc Natl Acad Sci U S A **88**(22): 10037-41.
- Zafra F, Hengerer B, Leibrock J, Thoenen H, Lindholm D 1990. Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. EMBO J **9**(11): 3545-50.
- Zhang C, McNeil E, Dressler L, Siman R 2007. Long-lasting impairment in hippocampal neurogenesis associated with amyloid deposition in a knock-in mouse model of familial Alzheimer's disease. Exp Neurol **204**(1): 77-87.
- Zhang X, Beaulieu JM, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Caron MG 2004. Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. Science **305**(5681): 217.
- Zill P, Baghai TC, Zwanzger P, Schule C, Eser D, Rupprecht R, Moller HJ, Bondy B, Ackenheil M 2004. SNP and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene provide evidence for association with major depression. Mol Psychiatry **9**(11): 1030-6.

- Zimmermann M, Borroni B, Cattabeni F, Padovani A, Di Luca M 2005. Cholinesterase inhibitors influence APP metabolism in Alzheimer disease patients. Neurobiol Dis **19**(1-2): 237-42.
- Zuccato C, Cattaneo E 2009. Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. Nat Rev Neurol **5**(6): 311-22.

## 10 Danksagung

Für die Möglichkeit, diese Arbeit an der Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapie durchführen zu dürfen, möchte ich dem Direktor der Klinik Herrn Prof. Dr. Peter Falkai und dem ehemaligen Direktor Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Möller danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dan Rujescu für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Dissertation in der Arbeitsgruppe für Molekulare Neurobiologie. Vor allem danke ich ihm auch für seinen erfahrenen und freundlichen Rat, für seine sachkundige Hilfe und für seine wissenschaftliche Förderung.

Ausdrücklich möchte ich Herrn PD Dr. Jens Benninghoff danken für die umfangreiche Betreuung dieser Arbeit und die Einführung in die Methodik. Ebenso danke ich ihm, dass er mir seine kompetente Hilfestellung bei den zahlreichen wissenschaftlichen Fragen, die im Rahmen dieser Arbeit aufgetreten sind, unermüdlich zur Verfügung gestellt hat.

Ein ganz spezieller Dank gilt Frau PD Dr. Ina Giegling und Frau Dr. Annette Hartmann. Beide standen mir mit ihrem detaillierten Fachwissen und ihrer Hilfe stets als Ansprechpartner zur Seite. Außerdem möchte ich ihnen für die rasche Korrektur und die Unterstützung in der wichtigen Endphase der Arbeit danken.

Bettina Konte gilt mein außerordentlicher Dank für die von ihr gewährte, zeitaufwendige und geduldige Beratung bei sämtlichen Fragen bzgl. der statistischen Auswertung.

Mein herzlichster Dank gilt Frau Dr. Marion Friedl und Herrn Martin Friedl. Sie waren meine ganz großen und unermüdlichen Stützen bei allen im Verlauf dieser Arbeit auftauchenden Fragen und Problemen, seien sie labortechnischen, anderem fachlichen oder persönlichen Charakters. Ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Das über die Jahre entstandene enge freundschaftliche Verhältnis freut mich ganz besonders.



Darüber hinaus danke ich selbstverständlich dem gesamten Team der molekularen Neurobiologie für die professionelle und entgegenkommende Atmosphäre im Labor. Besonders hervorzuheben sind hier Beate Kauschat, Birgit Burde und Barbara Meisel für ihre ständige Hilfsbereitschaft bei meinen labortechnischen Fragen und Problemen.

Schließlich möchte ich auch meiner Familie und meinem besten Freund Moe ganz herzlich danken. Sie waren entscheidend wichtig für diese Arbeit.

## Eidesstattliche Versicherung

Pape, Julius-Christopher Gerold Wilhelm

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

### **Neuroplastische Effekte des Acetylcholinesteraseinhibitors Eserine am Modell adulter neuraler Stammzellen des Maushippocampus**

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.

10.06.2014

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand