

**Einfluss aktivitätsabhängiger Prozesse auf
endogene neurale Stammzellen im Gyrus dentatus
nach photochemisch induzierten Hirninfarkten**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae
(Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Fanny Wurm
geboren am 23.06.1978 in Leipzig

Gutachter:

1. Herr PD Dr. med. C. Redecker
2. Herr Univ.-Prof. Dr. Dr. C. Redies
3. Herr Univ.-Prof. Dr. U. Dirnagl

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.05.2006

„Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will.“

Galileo Galilei

Abkürzungsverzeichnis

AUC	“area under the curve“, Fläche unter der Kurve
BDNF	“brain derived neurotrophic factor“
BrdU	Bromodesoxyuridin
COX	Cyclooxygenase
CTRL	Scheinoperierte Kontrollen
DPO	Postoperativer Tag
FGF	“fibroblast growth factor“, Fibroblastenwachstumsfaktor
GFAP	“glial fibrillary acidic protein“
GT	Greiftraining
IL	Interleukin
MCAO	Arteria cerebri media Okklusion
NeuN	“neuronal nuclei antigen“
NGF	“nerv growth factor“, Nervenwachstumsfaktor
NMDA	N-methyl-D-aspartat
PBS	Phosphat-gepufferte Normalsalzlösung
PFA	Paraformaldehydlösung
PT	Photothrombose
RR	Reizreiche Umgebung
S100 β	Calciumbindendes Protein
SGZ	Subgranulärzone
ST	Standardbedingungen
SVZ	Subventrikulärzone
TBS	Tris-gepufferte Normalsalzlösung
TNF α	Tumornekrosefaktor α

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	6
2.	Einleitung	8
3.	Fragestellung	15
4.	Material und Methoden	16
4.1.	Versuchstiere	16
4.2.	Anästhesie	16
4.3.	Induktion der Photothrombose	17
4.4.	Experimentelles Design	18
4.4.1.	Standardgruppe	18
4.4.2.	Reizangereicherte Umgebung	18
4.4.3.	Greiftraining	19
4.4.4.	Markierung proliferierender Zellen	20
4.5.	Verhaltensuntersuchungen	21
4.5.1.	Wasserlabyrinth nach Morris ("Morris Water Maze")	21
4.5.2.	Sprossen-Lauf-Test	22
4.6.	Transkardiale Perfusion	25
4.7.	Gewebegewinnung	25
4.8.	Immunhistochemie	26
4.8.1.	Peroxidase Technik	26
4.8.2.	Dreifach-Immunfluoreszenz-Technik	27
4.9.	Histologie	28
4.10.	Auswertung der immunhistochemischen Hirnschnitte	29
4.11.	Volumetrie der Hirne	29
4.12.	Statistik	30
5.	Ergebnisse	32
5.1.	Morphologie und Volumetrie der kortikalen Infarkte	32
5.2.	Überleben BrdU-positiver Zellen im Gyrus dentatus	34
5.3.	Differenzierung BrdU-positiver Zellen im Gyrus dentatus	37
5.4.	Funktionelle Auswirkungen	42

5.4.1.	Räumliche Gedächtnisleistung im Wasserlabyrinth	42
5.4.2.	Sprossen-Lauf-Test	48
6.	Diskussion	53
6.1.	Auswirkung von körperlicher Aktivität auf Neurogenese nach fokalen Hirninfarkten	53
6.2.	Funktionelle Auswirkungen einer gesteigerten Neurogenese im Gyrus dentatus	59
6.3.	Klinische Implikationen	63
7.	Schlussfolgerung	65
8.	Literaturverzeichnis	66
9.	Danksagung	79
10.	Lebenslauf	80
11.	Ehrenwörtliche Erklärung	81

1. Zusammenfassung

Lange Zeit ging man davon aus, dass die zelluläre Plastizität im adulten Gehirn nur auf der Ebene von Dendriten und Synapsen stattfindet und die Bildung neuer Nervenzellen lediglich dem embryonalen Gehirn vorbehalten ist. Diese Vorstellung wurde durch neuere Untersuchungen zumindest zum Teil widerlegt. So weiß man heute, dass auch das adulte Gehirn zur Neurogenese fähig ist. Unter Neurogenese versteht man die Bildung neuer Nervenzellen aus teilungsaktiven endogenen neuralen Stammzellen. Nach derzeitigen Kenntnissen gibt es im adulten Gehirn zwei Regionen, in denen Neurogenese stattfindet. Das ist die Subgranulärzone (SGZ) des Gyrus dentatus im Hippocampus und die Subventrikulärzone (SVZ), welche die Seitenventrikel umgibt. Weiterhin ist bekannt, dass Neurogenese im adulten Gehirn sowohl unter physiologischen als auch unter pathophysiologischen Bedingungen abläuft und dass sie durch verschiedene exogene und endogene Faktoren moduliert werden kann, wobei die zugrundeliegenden Mechanismen noch weitgehend ungeklärt sind. Zahlreiche Studien beschäftigten sich in den vergangenen Jahren mit dem aktivitätsabhängigen Einfluss auf die Neurogenese unter physiologischen Bedingungen. Dagegen ist über die aktivitätsabhängige Modulation neuer Nervenzellen unter pathophysiologischen Bedingungen nur wenig bekannt. Der Schlaganfall, ein häufiges neurologisches Krankheitsbild, zählt mit zu den Hauptursachen für Langzeitbehinderungen, wobei die therapeutischen Möglichkeiten limitiert sind. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Frage, ob sich die hippocampale Neurogenese nach fokalen kortikalen Hirninfarkten aktivitätsabhängig beeinflussen lässt und inwieweit sich daraus neue Behandlungsstrategien für die Schlaganfalltherapie ergeben.

Die Untersuchungen wurden tierexperimentell an der Ratte durchgeführt. Mit Hilfe des Photothrombosemodells wurden engumschriebene kortikale Hirninfarkte im sensomotorischen Vorderpfotenkortex induziert. Scheinoperierte Tiere dienten als Kontrollen. Vom 2. bis 6. postoperativen Tag erfolgte die Applikation des Proliferationszellmarkers Bromodesoxyuridin (BrdU). Das Studiendesign umfasste drei verschiedene Aktivitätsgruppen, wobei ein Teil der Tiere unter Standardbedingungen gehalten wurde, ein Teil war in einer reizreichen Umgebung untergebracht und ein Teil erhielt tägliches, wenige Minuten andauerndes Greiftraining der beeinträchtigten Vorderpfote. Zur Analyse der funktionellen

Auswirkungen wurden zwei Verhaltenstests in die Untersuchung integriert. Der Sprossen-Lauf-Test diente zur Evaluierung sensomotorischer Fertigkeiten und das Wasserlabyrinth nach Morris als ein kognitiver Test zur Bewertung der räumlichen Lernfähigkeit. Nach einem Beobachtungszeitraum von 42 Tagen wurde das Gewebe immunhistochemisch aufgearbeitet. Dabei zeigte sich, dass sowohl tägliches Greiftraining als auch die Unterbringung in einer reizreichen Umgebung die Neurogenese im Gyrus dentatus nach fokalen Hirninfarkten erhöhte. Interessanterweise steigerte tägliches sensomotorisches Vorderpfoten-Training bei Tieren ohne einen Hirninfarkt die Neurogenese am deutlichsten. Das durch Aktivität geförderte neurogene Potential scheint demnach unter ischämischen Bedingungen limitiert zu sein. Die Verhaltensanalysen zeigten im Wasserlabyrinth nach Morris eine gute Korrelation der Zahl der neuen Nervenzellen mit dem Lernerfolg. Im Sprossen-Lauf-Test waren die Tiere aus der reizreichen Umgebung dem Greiftraining motorisch tendenziell überlegen. Zusammengefasst legen unsere Befunde nahe, dass sich die hippocampale Neurogenese nach Hirninfarkten aktivitätsabhängig steigern lässt und die physiotherapeutische Behandlungsstrategie nicht nur positiv auf die neuronale Plastizität sondern auch auf die funktionelle Erholung auswirkt. Aus den Untersuchungen ergeben sich aber auch die Fragen, warum motorische Aktivität zu einer gesteigerten Neurogenese gerade im Hippocampus, einer Struktur mit vornehmlich kognitiven Funktionen, führt und welche Mechanismen diesem Prozess zugrunde liegen. Weiterführende Studien sind notwendig, um die Mechanismen und die funktionellen Auswirkungen der Stammzellproliferation nach Hirninfarkten besser zu verstehen und daraus neue Therapiestrategien abzuleiten.

2. Einleitung

Die einzigartige Fähigkeit des menschlichen Gehirns sich sowohl in seiner Struktur als auch Funktion veränderten Bedingungen anzupassen, bezeichnet man als neuronale Plastizität. Die Vorstellung, dass Aktivität und Erfahrung die Plastizität unseres Gehirns beeinflussen, ist alt. Der deutsche Arzt Samuel Thomas von Soemmering ging in einem Anatomiebuch von 1791 davon aus, dass mentale Übungen im Gehirn in gleicher Weise Veränderungen erzeugen, wie physische Übungen in den Muskeln. Fast 100 Jahre später stellte Ramon y Cajal die Hypothese auf, dass kognitives Training zum Anstieg der neuronalen Verzweigungen führt (Rosenzweig, 1996, 2003). Erfahrungen, die vom zentralen Nervensystem aufgenommen werden, können dieses in seiner Plastizität modulieren. Davon ging der kanadische Psychologe Donald Hebb 1949 in seinem Buch aus, in dem er u.a. beschrieb, dass die zeitgleiche Aktivität von Prä- und Postsynapse zur Verstärkung der Übertragungseigenschaft dieser Synapse führen könnte (Hebb Synapse). Das Äquivalent für diese Hypothese ist heute die Langzeitpotenzierung. Ferner beobachtete Hebb, dass Ratten aus seinem Labor, die sich für gewisse Zeit in seinem Haus aufhielten und dort die Möglichkeit hatten, Haus und Kinder zu explorieren, später bessere Problemlösefähigkeit zeigten (Hebb, 1949, Rosenzweig & Bennett, 1996, van Praag et al., 2000).

Die zelluläre Plastizität ist allerdings im erwachsenen Gehirn limitiert. Klinisch zeigen sich die Grenzen der zerebralen Regenerationsfähigkeit in verschiedenen neurologischen Krankheitsbildern. Der Schlaganfall ist ein weltweit dominierendes Krankheitsbild und zählt zur dritthäufigsten Todesursache nach Herz-Kreislauf- und Krebserkrankungen. Patienten, die einen Schlaganfall überleben, leiden häufig an beeinträchtigten motorischen Funktionen, zeigen sensorische Defizite und Gleichgewichtsstörungen, sind aphasisch, depressiv und kognitiv beeinträchtigt. Der Schlaganfall zählt mit zu den Hauptursachen für Langzeitbehinderungen. Die Kenntnisse über molekulare und biochemische Prozesse, die während der ischämischen Hirnläsion auftreten sind in den letzten Jahren gewachsen. Dennoch sind die Möglichkeiten zur Behandlung einer zerebralen Ischämie limitiert. Nur ein geringer Teil der Patienten kann von einer Thrombolyse profitieren, wenn die Therapie innerhalb eines Zeitfensters von 3 bis 6 Stunden nach Beginn der Symptomatik durchgeführt wird (Hacke et al., 1995, Brott & Bogousslavsky, 2000).

Deshalb ist es wichtig, andere potentielle Therapiestrategien für Schlaganfallpatienten zu untersuchen. Während sich die Thrombolyse nur auf einen geringen Patientenanteil beschränkt, bildet gegenwärtig die Rehabilitation den therapeutischen Mittelpunkt. Sobald der Schlaganfallpatient vital stabilisiert ist, wird noch in der Akutklinik mit einer intensiven physiotherapeutischen Beübung begonnen.

Bisher hatte man angenommen, dass die zelluläre Plastizität im adulten Gehirn nur auf der Ebene von Dendriten und Synapsen stattfindet. Entgegen den noch im letzten Jahrhundert vertretenen Konzepten von einer limitierten zellulären zerebralen Plastizität, weiß man heute, dass auch im adulten Hirn Neurogenese, die Bildung neuer Nervenzellen, stattfindet. Unter Neurogenese versteht man eine Serie von Entwicklungsschritten, die von einer teilungsaktiven neuronalen Stammzelle zu einer neuen Nervenzelle führt. Die Kette der neuronalen Entwicklung (Abb. 2.1.) beginnt mit der Zellteilung der Vorläuferzellen. Die überlebenden Tochterzellen migrieren, differenzieren sich und exprimieren phänotypische Proteine, senden Zellfortsätze aus, bilden Synapsen, bauen elektrophysiologische Eigenschaften auf und integrieren sich schließlich als funktionelle Nervenzellen in neuronale Schaltkreise (Cameron et al., 1993, Kuhn et al., 1996, Markakis & Gage, 1999, van Praag et al., 2002, Jessberger & Kempermann, 2003, Kempermann et al., 2003). Die Existenz der hippocampalen Neurogenese im erwachsenen Gehirn konnte schon bei Vögeln und Reptilien sowie bei Ratten, Mäusen, Affen und beim Menschen gezeigt werden (Kaplan & Hinds, 1977, Cameron et al., 1993, Kuhn et al., 1996, Kempermann et al., 1997 a, b, Kempermann et al., 1998 a, b, Eriksson et al., 1998, Gould et al., 1998), wobei ein Großteil der Untersuchungen an der Ratte durchgeführt wurde. Bereits um 1960 lieferte Altmann einen ersten Nachweis für sich teilende Zellen im erwachsenen zentralen Nervensystem bei verschiedenen Spezies (Altmann & Das, 1965, Altmann, 1966, Altmann & Das, 1967). Neurale Stammzellen lassen sich wahrscheinlich im gesamten adulten Gehirn nachweisen (Palmer et al., 1999), jedoch besitzen nach gegenwärtigem Verständnis nur zwei Regionen neurogene Eigenschaften, d.h. die Fähigkeit zur Bildung neuer Nervenzellen. Das ist zum einen die Subgranulärzone (SGZ) des Gyrus dentatus im Hippocampus (Abb. 2.1.) (Kaplan & Hinds, 1977, Cameron et al., 1993, van Praag et al., 2002) und zum anderen die Subventrikulärzone (SVZ), welche die Hirnkammern umschließt (Kaplan & Hinds, 1977, Alvarez-Buylla & Nottebohm, 1988, Lois & Alvarez-Buylla,

1993). Die in den Seitenwänden der Ventrikel gelegenen teilungsaktiven Zellen wandern über den rostralen Migrationsstrom zum Bulbus olfactorius, wo sie sich zu Nervenzellen ausdifferenzieren. Neben den beiden gut untersuchten neurogenen Zonen, geben einige Arbeiten auch Hinweise auf eine mögliche Neurogenese im Kortex (Gould et al., 1999, Gu et al., 2000, Magavi et al., 2000).

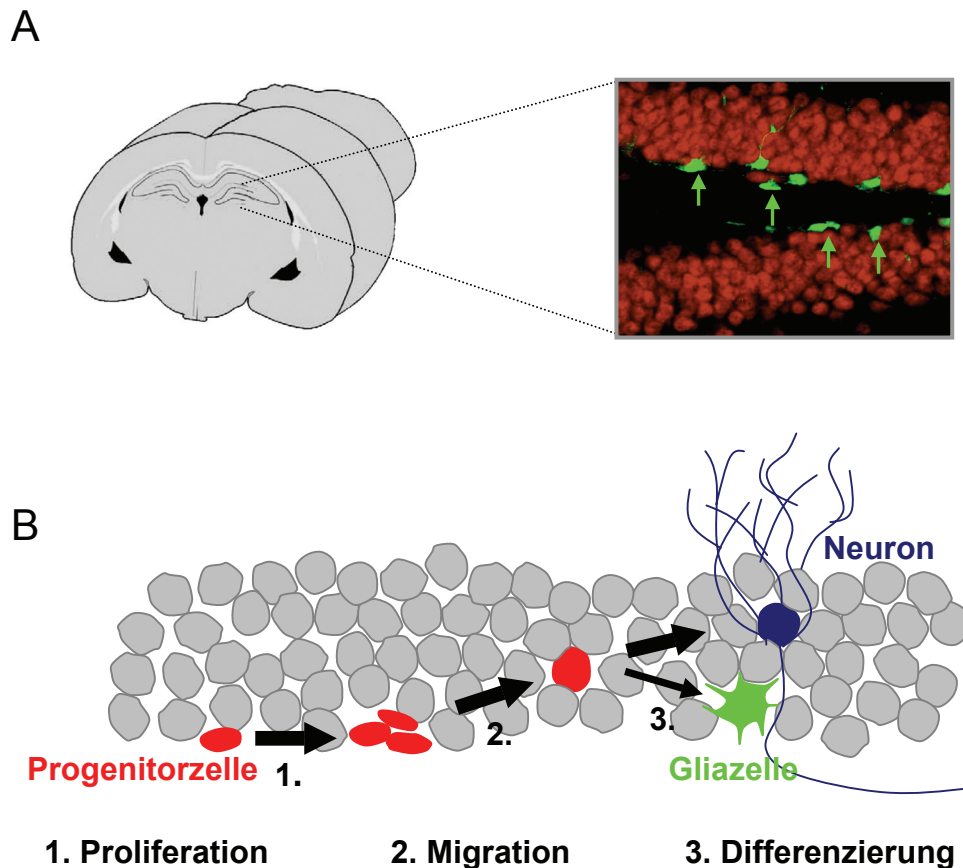


Abbildung 2.1. Schematische Darstellung der endogenen neuralen Stammzellen im Gyrus dentatus des Hippocampus. **A:** Links ist ein koronarer Anschnitt durch den Hippocampus dargestellt. Rechts ist ein fluoreszenzmarkierter Ausschnitt des Gyrus dentatus gezeigt (grün = Stammzellen, rot = Körnerzellen). **B:** Vereinfachte schematische Darstellung der neuronalen Entwicklung. In der Subgranulärzone entsteht aus der neuralen Stammzelle durch asymmetrische Zellteilung die Progenitorzelle, die sich durch symmetrische Zellteilung vermehrt. Die Progenitorzellen migrieren in die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus und differenzieren zu neuen Nervenzellen und Gliazellen.

Gegenstand derzeitiger Diskussionen ist die Frage nach der Identität der endogenen neuralen Stammzelle. Nach heutiger Auffassung geht man von der Existenz einer heterogenen Population von Vorläuferzellen aus, wobei interessanterweise die putative neurale Stammzelle einen glialen Charakter hat (Doetsch et al., 1997, 1999, Seri et al., 2001, Doetsch, 2003, Fillipov et al., 2003, Kempermann et al., 2004). In der adulten Subgranulärzone ist die putative Stammzelle eine sich langsam teilende Zelle, die morphologische Charakteristika einer radiären Gliazelle aufweist, neben dem Stammzellmarker Nestin den astrozytären Marker GFAP ("glial fibrillary acidic protein") exprimiert und elektrophysiologische Eigenschaften von Astrozyten zeigt (Seri et al., 2001, Fillipov et al., 2003, Fukuda et al., 2003). Man geht davon aus, dass durch asymmetrische Zellteilung aus der putativen Stammzelle über verschiedene Stufen zunächst postmitotisch unreife und nachfolgend reife neue Nervenzellen hervorgehen. Auf welcher Stufe der Entwicklung die Zellliniendeterminierung in Glia- bzw. Nervenzellen stattfindet und inwieweit Neurogenese und Gliogenese miteinander in Beziehung stehen, bleibt allerdings gegenwärtig noch weitgehend ungeklärt.

Nach derzeitigen Kenntnissen nehmen physiologische, pathophysiologische und pharmakologische Faktoren Einfluss auf die Modulation der Neurogenese. Die zugrundeliegenden molekularen Regulationsmechanismen der Neurogenese sind jedoch zum jetzigen Zeitpunkt noch nahezu unerforscht. Unter physiologischen Bedingungen kann die basale Proliferationsaktivität bzw. Neurogenese durch verschiedene exogene und endogene Faktoren moduliert werden. Dabei spielen insbesondere Alter, Stress, geschlechtsspezifische und saisonale Einflüsse und nicht zuletzt auch Erfahrung und Aktivität eine wesentliche Rolle (Gould et al., 1992, Seki & Arai, 1995, Kuhn et al., 1996, Gould et al., 1997, Kempermann et al., 1997a, b, 1998b, Kempermann & Gage 1999, Cameron & McKay, 1999, Galea & McEwen, 1999, van Praag et al., 1999a, b). Neurogenese findet aber nicht nur unter physiologischen Bedingungen statt, sondern wird auch infolge pathophysiologischer Ereignisse beobachtet. U.a. haben zerebrale Ischämien, traumatische Hirnläsionen und epileptische Anfälle einen Anstieg der Neurogenese zur Folge (Bengzon et al., 1997, Gould & Tanapat, 1997, Parent et al., 1997, Liu et al., 1998, Kokaia & Lindvall, 2003). Zur Untersuchung regulierender Einflüsse der Neurogenese unter pathophysiologischen Bedingungen sind Schlaganfallmodelle weit etabliert. Dabei ist zwischen fokaler und globaler Ischämie zu unterscheiden (Kokaia & Lindvall, 2003).

Globale Ischämien werden durch Okklusion der hirnersorgenden Gefäße erzeugt, was eine nahezu vollständige Unterbrechung des zerebralen Blutflusses zur Folge hat und vornehmlich die Pyramidenzellen der hippocampalen CA1 Region schädigt. Die Okklusion der Arteria cerebri media (MCAO) (Hunter et al., 1995) zählt zu einem weit verbreiteten fokalen Ischämiemodell, das im Gegensatz zur globalen Ischämie den Hippocampus nicht alteriert. Der Einfluss pharmakologischer Komponenten auf die Neurogenese ist hauptsächlich unter physiologischen Bedingungen untersucht. Neben zahlreichen Neurotrophen darunter BDNF ("brain derived neurotrophic factor"), NGF ("nerv growth factor", Nervenwachstumsfaktor) und FGF ("fibroblast growth factor", Fibroblastenwachstumsfaktor) modulieren auch Hormone, diverse Neurotransmitter und Pharmaka die Bildung neuer Nervenzellen (Neeper et al., 1996, Kuhn et al., 1997, Cameron et al., 1998, Brezun & Daszuta, 1999, Eisch et al., 2000, Malberg et al., 2000, Gomez-Pinilla et al., 2002, Santarelli et al., 2003).

Die ersten kontrollierten Studien über den Einfluss einer reizreichen Umgebung (RR) auf die neuronale Plastizität wurden 1960 von Rosenzweig und Mitarbeitern durchgeführt (Rosenzweig et al., 1962, Rosenzweig & Bennett, 1996, Rosenzweig, 1996, 2003). Die reizreiche Umgebung ist ein gut etabliertes Modell zur Untersuchung erfahrungsabhängiger Plastizität. In einer größeren Behausungsform, die zahlreiche stimulierende Objekte wie Leitern, Tunnelsysteme, Laufräder, Ketten, Versteckmöglichkeiten und diverse Spielzeuge enthält, bilden 6 bis 12 Tiere ein soziales Gefüge. Die Explorations- und Stimulationsobjekte werden täglich in ihrer Anordnung verändert. In verschiedenen Labors existieren allerdings verschiedene reizreiche Umgebungen. Eine reizreiche Umgebung stellt ein Zusammenspiel von körperlicher unspezifischer Aktivität, sozialer Interaktion und Explorationsverhalten dar. In umfangreichen Studien wurde der modulierende Einfluss der reizreichen Umgebung auf die zerebrale Plastizität untersucht. So werden u.a. Hirngewicht, die kortikale Dicke, die kortikale neuronale Dichte, die Komplexität dendritischer und synaptischer Verschaltungen sowie auch astrozytäre Funktionen beeinflusst (Bennett et al., 1964, Diamond et al., 1964, Greenough & Volkmar, 1973, Sirevaag & Greenough, 1991, Jones & Greenough, 1996). Die Kombination aus physischer und kognitiver Aktivität nimmt unter physiologischen Bedingungen lediglich im Gyrus dentatus Einfluss auf das Überleben neuer Nervenzellen, dagegen zeigen sich in der Subventrikulärzone keine Effekte auf die Neurogenese (Brown et al., 2003). Neben einer reizangereicherten Umgebung fördert auch physische Aktivität in Form von

Lauftraining die Proliferation und das Überleben neuer Nervenzellen im Gyrus dentatus.

Interessant ist der Zusammenhang von körperlicher Aktivität, adulter hippocampaler Neurogenese und der Funktion des Hippocampus. Die Frage, warum rein motorische Aktivität in Form von Lauftraining die Neurogenese im Hippocampus, einer Struktur mit vornehmlich kognitiven Funktionen, steigert, bleibt bisweilen unbeantwortet (van Praag et al., 1999a, b, Ra et al., 2002). Womöglich ist die Funktion des Hippocampus nicht nur auf den kognitiven Bereich begrenzt. Der Hippocampus spielt möglicherweise auch eine entscheidende Rolle beim Erwerb motorischer Fähigkeiten. Zahlreiche Regionen des Neokortex, einschließlich das Vorderpfotenareal, sind über den entorhinalen Kortex, der über den Tractus perforans zum Gyrus dentatus projiziert, mit dem Hippocampus verschaltet (Witter et al., 1989, Amaral & Witter, 1995, Witter & Amaral, 2004). Es ist denkbar, dass über diese Verbindung u.a. Proliferationsimpulse aus dem Kortex in den Hippocampus vermittelt werden. Der Verschaltungsweg zwischen Kortex und Hippocampus könnte somit zumindest zum Teil erklären, warum sensomotorische Aktivität zum Anstieg der hippocampalen Neurogenese führt. Nach derzeitiger Auffassung ist der Hippocampus zum einen an der Generierung und Modulation von Emotionen beteiligt zum anderen ist der Hippocampus eine wesentliche Struktur bei Lernprozessen und zum Aufbau von Gedächtnis. Zur Überprüfung der Hippocampusfunktion hat die von Morris 1984 entwickelte Wasserlabyrinthaufgabe, speziell zur funktionellen Testung des räumlichen Gedächtnisses, in vielen Untersuchungen eine weite Verbreitung gefunden (Morris, 1984). Für den Gedächtnisaufbau und insbesondere für die Konsolidierung ist die Interaktion zwischen Hippocampus und Neokortex über den entorhinalen Kortex von großer Notwendigkeit (McClelland et al., 1995). Es konnte gezeigt werden, dass durch eine Läsion des entorhinalen Kortex das räumliche Gedächtnis stark beeinträchtigt wird (Steffenach et al., 2005). Gegenwärtig offen bleiben allerdings die genauen Mechanismen der Gedächtnis- und Lernprozesse, die dabei zugrundeliegende Funktion der Hippocampusformation und des Neokortex sowie eine mögliche Rolle des Hippocampus beim Erwerb motorischer Fertigkeiten.

Wie die Studien von Kempermann und van Praag belegen (Kempermann et al., 1997b, 1998a, b, van Praag et al., 1999a, b), zeigt der Hippocampus unter physiologischen Bedingungen aktivitätsabhängig eine hohe zelluläre Plastizität. Sowohl unspezifische Aktivität in einer reizangereicherten Umgebung als auch

motorisches Training im Laufrad steigern die hippocampale neuronale Plastizität. Welchen Effekt hat aber spezifische versus unspezifische Aktivität auf die neuronale Plastizität und die Funktionserholung unter pathophysiologischen Bedingungen, z.B. nach einem Schlaganfall? Ziel der vorliegenden Studie ist es zu klären, inwieweit die Neurogenese im Gyrus dentatus des Hippocampus nach kortikalen Hirnläsionen aktivitätsabhängig beeinflusst wird und inwieweit sich dadurch gegebenenfalls neue Therapiestrategien für die Behandlung von Schlaganfallpatienten ergeben.

3. Fragestellung

Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um den Einfluss verschiedener Aktivierungsmaßnahmen auf die hippocampale Neurogenese nach fokalen kortikalen Hirninfarkten im Vorderpfotenkortex zu untersuchen. Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Lässt sich Neurogenese im Gyrus dentatus des Hippocampus nach fokaler zerebraler Ischämie aktivitätsabhängig modulieren?
2. Inwieweit beeinflussen nach einem Hirninfarkt im Vorderpfotenkortex spezifisches sensomotorisches Training der betroffenen Vorderpfote und unspezifische Aktivierung in einer reizreichen Umgebung die hippocampale Neurogenese?
3. Welche funktionellen Auswirkungen haben die verschiedenen Aktivierungsmaßnahmen?
4. Welche Konsequenzen lassen sich daraus für zukünftige physiotherapeutische Behandlungsstrategien ziehen?

4. Material und Methoden

4.1. Versuchstiere

Die experimentellen Untersuchungen wurden an adulten männlichen Wistar Ratten (n = 49) mit einem Körpergewicht von 270 bis 320 g durchgeführt. Die Tiere wurden im Institut für Versuchstierkunde der Friedrich-Schiller-Universität Jena gezüchtet. Die Haltung erfolgte unter konstanten, spezifisch keimfreien Bedingungen ("specific pathogen free"), bei einer Raumtemperatur von 22 bis 24 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 bis 80 %, einem Tag-Nacht-Rhythmus von je 12 Stunden und Nutrition ad libitum bis zum Versuchsbeginn. Im gesamten Versuchszeitraum wurde die Nahrung dann unter täglicher Gewichtsbestimmung kontrolliert zugeführt.

4.2. Anästhesie

Zur Induktion der Photothrombose wurden die Tiere mit einer Kombinationsnarkose aus Enfluran, Distickstoffmonoxid und Sauerstoff anästhesiert. Die Einleitung der Narkose erfolgte in einem Glaszylinder, der mit einem Gasgemisch aus 3,5 % Enfluran, 40 % Distickstoffmonoxid (N₂O) und 20 % Sauerstoff (O₂) geflutet wurde. Nach einer dreiminütigen Einleitungszeit wurden die Tiere aus dem Glaszylinder herausgenommen, mit dem Dorsum auf eine Wärmeplatte gelegt und an den Extremitäten fixiert. Im weiteren Fortgang des Eingriffes erfolgte die Anästhesie über eine Inhalationsmaske. Der Enflurananteil im Inhalationsmedium ist auf 2,5 % gesenkt worden. Zur Kontrolle der Körpertemperatur wurde dem Versuchstier ein elektronischer Thermofühler tief ins Rectum eingeführt. Die Körpertemperatur wurde durch einen Regelkreis konstant auf 37,0 °C gehalten. Nach Beendigung des Eingriffes wurde die Narkose mit 100 % Sauerstoff ausgeleitet.

4.3. Induktion der Photothrombose

Kleine kortikale Infarkte (PT, $n = 24$) wurden mit Hilfe des von Watson und Mitarbeitern entwickelte Photothrombosemodells (Watson et al., 1985) in leicht modifizierter Form (Redecker et al., 2002, Shanina et al., 2005) im somatosensorischen Kortex induziert (Abb. 4.1.). Nach lokaler Desinfektion, Rasur und Hautschnitt wurde im Leistenbereich die linke Vena femoralis der anästhesierten Ratte freipräpariert. Mit Hilfe eines Fadens wurde der distale Anteil des Gefäßes abgebunden. Es erfolgte eine subtile Inzision der Vena femoralis, in die ein 3 cm langer Polyethylenkatheter ($\varnothing$ 0,61 cm) eingeführt wurde. Nach Fixation des Katheters wurde die Ratte in eine beheizte Wanne auf das Abdomen gelegt und der Schädel in einem stereotaktischen Rahmen fixiert. Nach longitudinaler Inzision der Kopfschwarte wurde die Kalotte freigelegt und eine Lichtleiterblende ($\varnothing$ 3 mm) im Vorderpfotenareal des somatosensorischen Kortex (Koordinaten vom Bregma: 0,5 μ m rostral, 3,7 μ m lateral) platziert (Zilles, 1985). Anschließend wurde die Kaltlichtquelle (Schott KL 1500, Jena) für 20 Minuten eingeschaltet und mit Beginn der Illumination 400 μ l Bengal rosa (Dinatriumsalz des 3,4,5,6,-Tetrachloro-2',4',5',7'-tetrajodo fluorescein, 1 % ig in 0,9 % iger Kochsalzlösung) über den Katheter appliziert. Die Lichtexposition und der intravenös applizierte Farbstoff Bengal rosa führten gemeinsam zu einer chemischen Reaktion im Vorderpfotenkortex mit konsekutiver Radikalfreisetzung. Ein durch die Radikalbildung verursachter Endothelschaden induzierte eine Thrombozytenaggregation mit nachfolgendem thrombotischen Gefäßverschluss und ischämischer Infarzierung des Expositionsareals. Nach Beendigung der Belichtungsphase wurde der Katheter entfernt, die Hautwunden vernäht, die Narkose ausgeleitet und die Tiere, nachdem sie sich schnell wieder erholten, in den Käfig zurückgesetzt. Die scheinoperierten Kontrolltiere (CTRL, $n = 25$) wurden in gleicher Weise behandelt, jedoch ohne Einschalten der Kaltlichtquelle.

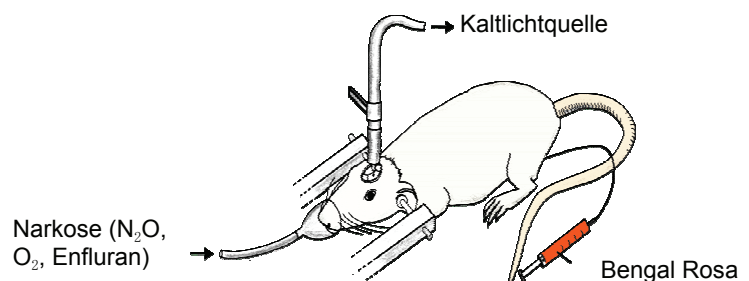


Abbildung 4.1. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Induktion photothrombotischer Infarkte.

4.4. Experimentelles Design

Das experimentelle Design (Abb. 4.5.) dieser Studie umfasste drei Gruppen, die jeweils im Standardkäfig (ST), in einer reizangereicherten Umgebung (RR) und im Standardkäfig mit zusätzlichen täglichen Greiftraining (GT) untergebracht waren.

4.4.1. Standardgruppe

Ein Teil der Tiere (PT: $n = 7$; CTRL: $n = 7$) wurde unter Standardbedingungen (Abb. 4.2) in einem 54 cm x 38 cm x 19 cm großen Standard-Plexiglaskäfig gehalten. Der Standardkäfig, in dem 4 bis 5 adulte Ratten gehalten wurden, stellt die typische Unterbringungsform von Versuchstieren im Labor dar.



Abbildung 4.2. Standardkäfig mit Futter- und Trinkstelle (54 cm x 38 cm x 19 cm).

4.4.2. Reizangereicherte Umgebung

Ein Teil der Tiere (PT: $n = 9$; CTRL: $n = 8$) lebte in einer reizangereicherten Umgebung (Abb. 4.3.). Auf einer größeren Behausungsfläche (85 cm x 75 cm x 40 cm) bildeten bis zu 8 Ratten ein soziales Gefüge. Zur Stimulation der physischen Aktivität und des Erkundungsverhalten haben wir den



Abbildung 4.3. Reizreiche Umgebung mit Kletter- und Rückzugsmöglichkeiten (85 cm x 75 cm x 40 cm).

Käfig mit einem umfangreichen Tunnelsystem, Ketten und Leitern zum Klettern, einer Wippe, einem Versteck und einer Abdeckung, worunter sich die Tiere zum Schlafen zurückziehen konnten, ausgestattet. Ein Laufrad war in unserer reizreichen Umgebung nicht enthalten.

Die Anordnung der Elemente wurde täglich individuell verändert, wobei Futter- und Trinkstelle konstant am gleichen Ort verblieben. Die reizangereicherte Umgebung ist keine standardisierte Behausungsform. Allgemein stellt die reizangereicherte Umgebung ein Zusammenspiel sozialer Interaktionen mit einer breiten Palette an unspezifischen physischen Aktivitätsmöglichkeiten auf einer größeren Behausungsfläche dar, die das explorative Lernverhalten der Tiere stimuliert.

4.4.3. Greiftraining

Ein Teil der Tiere (PT: $n = 8$; CTRL: $n = 10$) wurde im Standardkäfig gehalten, erhielt aber zusätzlich spezifisches Greiftraining der durch den photothrombotischen Infarkt beeinträchtigten Vorderpfote (Abb. 4.4.). Das spezifische Training wurde täglich in einer Greifbox durchgeführt, wobei die Tiere mit

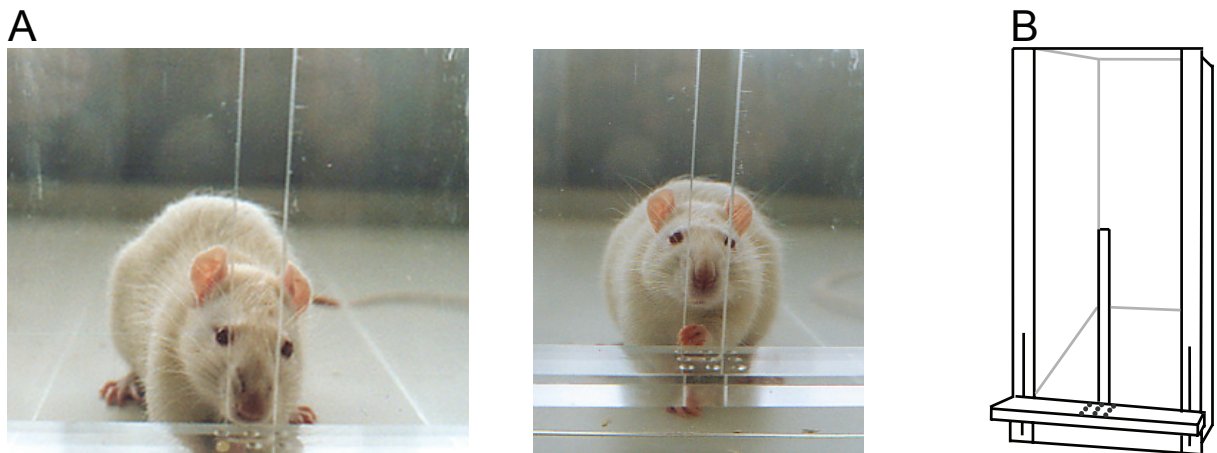


Abbildung 4.4. A: Tägliches Greiftraining in der Greifbox. Zunächst musste die Ratte die Position des Pellets aufspüren und sich entsprechend vor dem Spalt platzieren, um dann eine Anzahl von 100 Pellets ohne Unterbrechung mit der beeinträchtigten Vorderpfote zu greifen. Damit das Training nur mit der beeinträchtigten Vorderpfote gewährleistet war, wurde in den ersten Trainingstagen ein Plexiglaskeil in der Greifbox entsprechend positioniert. (Videosequenz auf der beiliegenden CD-ROM) **B:** Schematischer Aufbau der Greifbox. Die Greifbox ist eine 45 x 15 x 45 cm große Plexiglasapparatur. An der Vorderwand der Box befindet sich ein 1,5 cm breiter Spalt, vor dem eine höhenverstellbare Leiste mit Einkerbungen zur Ablage der Pellets befestigt ist.

der betroffenen Vorderpfote kontinuierlich zunächst 50 (ad diem 7) und später 100 Pellets (BioServ®, Dustless Precision Pellets 45 MG, USA) greifen mussten. Die Kontrolltiere trainierten entsprechend mit der unbeeinträchtigten Vorderpfote. Um den Erfolg des Greiftrainings zu garantieren, wurde in allen Experimentalgruppen die Nahrung kontrolliert zugeführt. Drei Tage präoperativ wurde die Greiftiergruppe zunächst an die Greifbox und Pellets gewöhnt und anschließend wurde die

Vorderpfotenpräferenz der Tiere bestimmt, um den Infarkt auf der entsprechend kontralateralen Hemisphäre auslösen zu können.

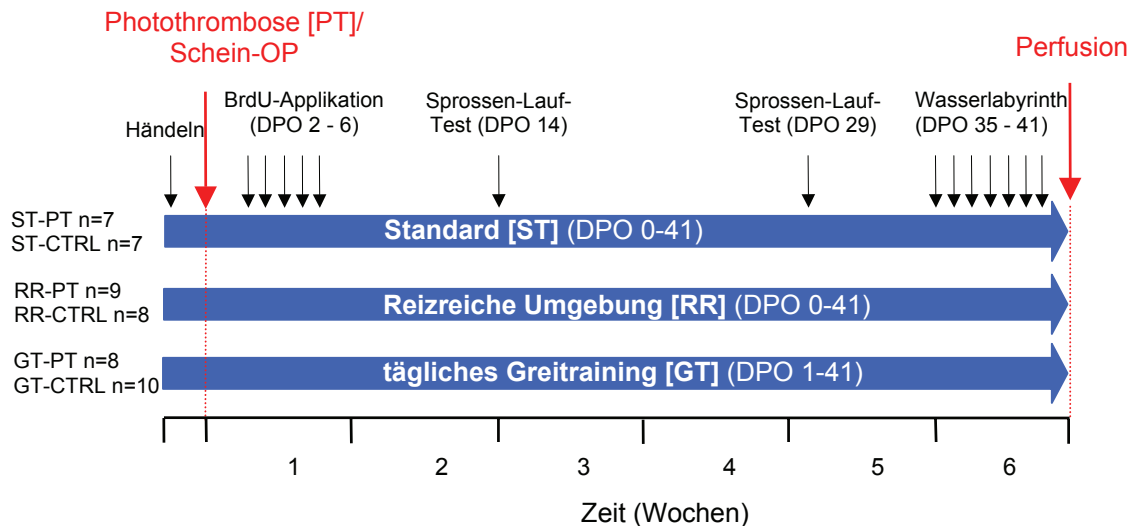


Abbildung 4.5. Schematische Darstellung des experimentellen Designs. Die drei horizontalen blauen Pfeile repräsentieren die Untersuchungsgruppen (Standardbedingungen, Reizreiche Umgebung, Greiftraining) und den zeitlichen Ablauf der Experimente. Nach Infarktinduktion erfolgte vom 2. bis 6. Tag in allen Gruppen eine tägliche BrdU-Injektion zur Markierung der endogenen Stammzellen. Zur Analyse der funktionellen Auswirkungen wurden zwei Verhaltenstests integriert. Der Sprossen-Lauf-Test diente zur Bewertung sensomotorischer Fertigkeiten und die Wasserlabyrinthaufgabe zur Evaluierung der räumlichen Lernfähigkeit. Nach 42 Tagen wurden die Ratten transkardial perfundiert.

4.4.4. Markierung proliferierender Zellen

Zur Detektion mitotisch aktiver Zellen wurde der von Gratzer 1982 entwickelte Proliferationsmarker 5'-Bromo-2'-desoxy-Uridin (BrdU) (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) eingesetzt. Wird das vom Uridin abgeleitete Thymidinanalogon Bromodesoxyuridin im Überfluss angeboten, konkurriert es in der Synthesephase des Zellzyklus kompetitiv mit der Pyrimidinbase Thymidin um den Einbau in die DNA und wird statt Thymidin in den neu synthetisierten Strang inkorporiert. Die Bioverfügbarkeit von BrdU liegt bei ca. 2 Stunden (Takahashi et al., 1992, Kuhn et al., 1996). Nicht eingebautes BrdU wird vom Körper schnell eliminiert. In mitotischen Zellen inkorporiertes BrdU lässt sich dann über Wochen und Monate mit Antikörpern detektieren. Die BrdU-Applikation (50 mg/kg KG in 1 ml 0.9 % iger Kochsalzlösung) erfolgte intraperitoneal über einen Zeitraum von fünf Tagen (2. bis

6. postoperativen Tag, DPO) als tägliche Einzelinjektion von 1 ml pro Tier. Vor jeder Injektion wurden die Tiere in einem Glaszylinder, der mit einem Gasgemisch aus 3,5 % Enfluran, 40 % Distickstoffmonoxid (N_2O) und 20 % Sauerstoff (O_2) geflutet worden war, für 3 Minuten anästhesiert.

4.5. Verhaltensuntersuchungen

4.5.1. Wasserlabyrinth nach Morris ("Morris Water Maze")

Zur Beurteilung der Hippocampusfunktion diente die Wasserlabyrinthaufgabe (Morris, 1984), ein kognitiver Test zur Evaluierung des zeitlich-räumlichen Gedächtnisses. Das Wasserbassin (Abb. 4.6.) für Ratten hatte einen Durchmesser von 180 cm, eine Tiefe von 50 cm und wurde bis zu einer Höhe von ungefähr 30 cm mit 20 bis 22 °C warmen Wasser täglich gefüllt. Das Bassin wurde nach den

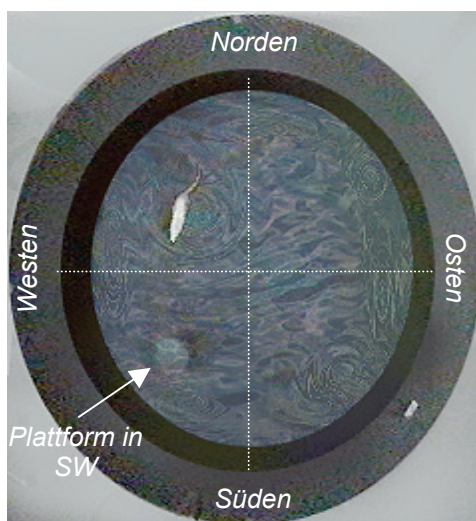


Abbildung 4.6. Wasserlabyrinthbassin mit Plattform im südwestlichen Quadranten. Die Ratte wurde im Norden in das Bassin gesetzt und steuert auf die Plattform zu. (Videosequenz auf der beiliegenden CD-ROM)

Himmelsrichtungen in 4 Quadranten aufgeteilt. In einem Quadranten war konstant über die gesamte Akquisitionszeit eine Plattform ca. 1 bis 2 cm unter der Wasseroberfläche positioniert. Ziel der Lernaufgabe im Morris Wasserlabyrinth war es, die Position der für das Tier nicht sichtbaren Plattform zu erlernen. Während der Versuchsdurchführung wurde der Raum abgedunkelt. Um die Aufgabe adäquat zu bewältigen, konnte das Versuchstier sich an sogenannten Hinweisreize aus der räumlichen Umgebung des Wasserbassins orientieren. Der Wasserlabyrinth Test wurde in allen drei Versuchsgruppen vom 35. bis 41. DPO durchgeführt. In randomisierter Abfolge wurde

das Tier von den 4 verschiedenen Startpunkten (Nord, Süd, Ost, West) ins Wasser gesetzt. Die Plattform befand sich während der siebentägigen Akquisitionszeit konstant im südwestlichen Quadranten. Zur Evaluierung des kognitiven Lernvermögens wurde die Zeit bis zum Erreichen der Plattform ermittelt. Jedes Tier hatte eine maximale Zeitspanne von 90 Sekunden die Plattform zu erreichen. Wurde

in dieser Zeit die Position der Plattform nicht aufgefunden, ist das Tier vom Versuchsleiter auf die Plattform gesetzt worden. Nach einer Pause von 20 Sekunden wurde das Tier vom nächsten Startpunkt aus ins Wasser gesetzt. Pro Tag und Tier wurden 4 Durchgänge durchgeführt. Die Aufzeichnung des Morris Wasserlabyrinth Tests erfolgte über eine Digitalkamera (Panasonic, Super Dynamic WV GP 450) und wurde mit Hilfe der Software Ethovision 2,3 (Noldus) computerisiert und ausgewertet.

4.5.2. Sprossen-Lauf-Test

Der Sprossen-Lauf-Test (Metz et al., 2002) wurde als ein sensibler Parameter zur quantitativen Bewertung lokomotorischer Bewegungen eingesetzt. Die Aufgabe in diesem Test bestand darin, eine horizontal positionierte Sprossenapparatur ohne Pause zu überqueren, wobei Vorder- und Hinterpfotenplatzierung auf den einzelnen Sprossen, die Koordination und Balance analysiert wurden.

Die Sprossenapparatur (Abb. 4.7.) ist 1 m lang und besteht aus zwei transparenten Plexiglaswänden, die durch Metallsprossen miteinander verbunden sind. Die Metallsprossen können sowohl regulär (Muster A) als auch irregulär (Muster B) angeordnet sein, wobei der Mindestabstand zwischen zwei Sprossen 1 cm betragen muss. Der Abstand der Leiter zum Boden beträgt ca. 30 cm. Am Startpunkt befindet sich ein leerer Standardkäfig und am Ziel der Heim-Standardkäfig. Nachdem präoperativ zunächst alle Tiere an die Sprossenapparatur gewöhnt wurden, erfolgte am 14. DPO und am 29. DPO die Durchführung des Sprossentests. Für alle Durchführungstage wurde jeweils das Muster B bezüglich der Metallsprossenordnung verwendet, um Lerneffekte auszuschließen. Pro Tier wurden jeweils 5 Durchgänge aufgenommen, wobei nur 3 Durchgänge in die Analyse einbezogen wurden. In die Auswertung fließen sowohl die Laufzeit als auch Vorder- und Hinterpfotenpositionierung auf den Metallsprossen ein. Die quantitative Analyse der Pfotenplatzierung erfolgt auf der Grundlage einer 7-stufigen Fehlerskala (Tab. 4.1.). Die Kategorien 0 bis 2 werden in der Bewertung als Fehler gerechnet. Dagegen sind die Kategorien 3 bis 6 Varianten der Pfotenplatzierung.

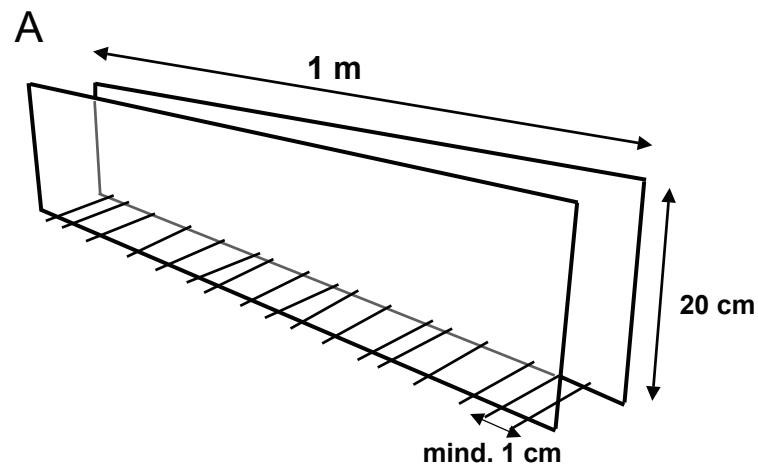
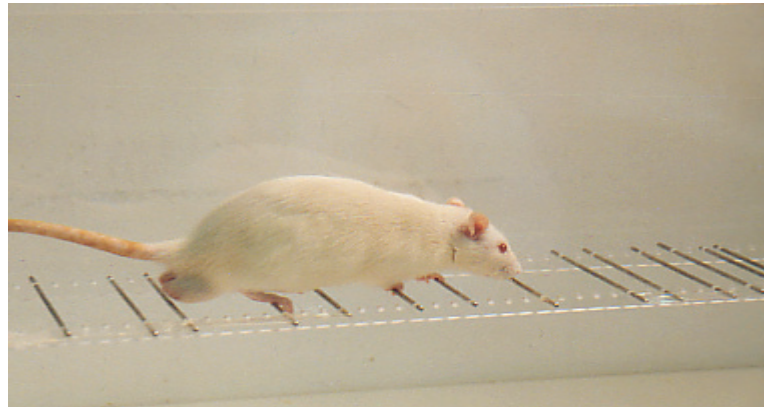
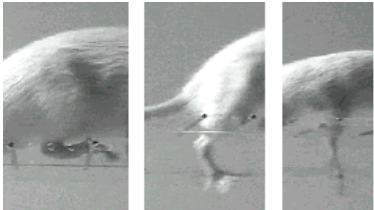
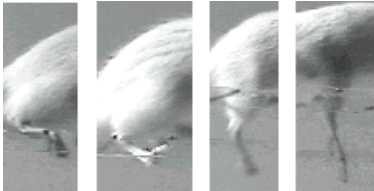
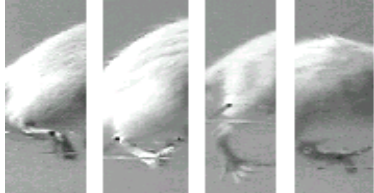
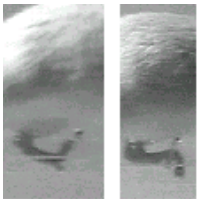
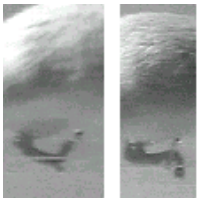
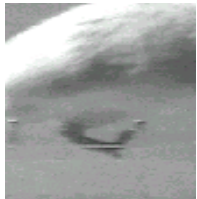
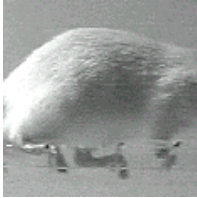
**Muster A****Muster B****B**

Abbildung 4.7. Der Sprossen-Lauf-Test evaluiert sensomotorische Fertigkeiten.

A: Schematische Darstellung der Sprossenapparatur. Die Sprossenapparatur besteht aus zwei parallelen Plexiglaswänden (100 x 20 cm), die durch Metallsprossen miteinander verbunden sind. Die Metallsprossen können regulär (Muster A) oder irregulär (Muster B) angeordnet werden, wobei eine irreguläre Sprossenordnung bei wiederholter Durchführung des Tests den Lerneffekt minimiert. **B:** Der Sprossen-Lauf wurde von allen Tieren am 14. und 29. postoperativen Tag in jeweils 5 Durchgänge videotecnisch aufgezeichnet und anschließend analysiert. (Videosequenz auf der beiliegenden CD-ROM)

Tabelle 4.1. Bewertungsskala der Pfotenplatzierung

Kategorie	Pfotenplatzierung		Charakteristika
0	Fehltritt		Sprosse wird verfehlt, Gleichgewichtsverlust, Abrutschen aller 4 Pfoten von den Sprossen, Unterbrechung des Laufes
1	tiefes Abrutschen		Abrutschen einer Pfote von der Sprosse mit tiefem Fall der Pfote, Unterbrechung des Laufes
2	leichtes Abrutschen		Abrutschen von der Sprosse ohne Balanceverlust und Unterbrechung des Laufes
3	Replatzierung		Pfote berührt nächste Sprosse, Platzierung mit Gewichtsverlagerung erfolgt auf einer nachfolgenden Sprosse
4	Korrektur		Pfotenplatzierung wird auf der selben Sprosse korrigiert
5	partielle Platzierung		Pfotenplatzierung entweder auf den Zehenspitzen oder auf dem Gelenk
6	korrekte Platzierung		Korrekte Platzierung auf der Pfotenmitte

4.6. Transkardiale Perfusion

Für die weitere Aufarbeitung wurde das Hirngewebe in folgender Weise fixiert. Am 42. DPO wurden die Ratten zunächst mit Diethylether tief anästhesiert, auf das Dorsum in eine Perfusionsschale gelegt und an den Extremitäten fixiert. Das Abdomen wurde bis zum Sternum durch einen Medianschnitt geöffnet, dann wurden der Thoraxraum und das Herz nach Durchtrennung der Rippen freigelegt. Nach Fixierung des Herzens an den Ventrikeln durch eine Klemme wurde die Herzspitze und das rechte Atrium punktiert. In den linken Ventrikel wurde eine Kanüle bis in die Aorta ascendens eingeführt und die Perfusionspumpe eingeschaltet. Mit Hilfe einer Perfusionspumpe (505S, Watson-Marlow, England) wurden die Tiere mit einer kontinuierlichen Flußgeschwindigkeit von 30 ml/min für 2 Minuten mit gekühlter Phosphat-gepufferte Normalsalzlösung (PBS) und anschließend für 12 Minuten mit 4 % iger Paraformaldehydlösung (PFA) perfundiert. Nach Beendigung der Perfusion wurde der dekapitierte Schädel vorsichtig eröffnet.

4.7. Gewebegewinnung

Das Kopffell wurde zunächst mit einem Skalpell in sagittaler Richtung durchtrennt. Ausgehend vom Foramen magnum wurde dann die Okzipitalschuppe mit einer Pinzette entfernt und der Schädelknochen beidseitig in frontaler Richtung durchtrennt, bis das Schädeldach abgehoben werden konnte. Anschließend erfolgte die Präparation des Gehirns. Hierzu wurde die Dura mater mit Pinzette von der Hirnoberfläche entfernt und das Gehirn mit einem gebogenen Spatel aus der Schädelgrube gehoben. Die präparierten Hirne wurden zunächst in Falcon Tubes, gefüllt mit 4 % iger Paraformaldehydlösung, über Nacht inkubiert. Zur Kryoprotektion wurden die Hirne am nächsten Tag für 3 bis 12 Stunden in 10 % ige Saccharose und nach Absinken für 24 bis 48 Stunden in 30 % ige Saccharoselösung überführt. Für die längere Aufbewahrung wurde das Gewebe bei einer Temperatur von ca. -35°C in Methyl-Butan eingefroren und dann bei -75°C gelagert. Für die immunhistochemischen Färbungen wurden am Gefrier-Schlittenmikrotom (Microm) 40 μm dicke koronare Schnitte durch das gesamte Hirn hergestellt und in Phosphat-gepufferte Normalsalzlösung überführt. Zur längeren Aufbewahrung von Hirnschnitten wurden die nicht unmittelbar benötigten Gewebeschnitte in

Gefrierschutz-Lösung (Natriumazid) gelegt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

4.8. Immunhistochemie

4.8.1. Peroxidase Technik

Zur Quantifizierung der Zellproliferation im Gyrus dentatus wurde eine immunhistochemische Färbung mit Antikörpern (Tab. 4.2.) gegen den Proliferationsmarker BrdU verwendet. Dabei wurde die Peroxidase Technik angewandt. Die Zellstrukturen, welche die Peroxidase aufgenommen haben, sind primär nicht sichtbar. Die Visualisierung proliferierender Zellen erfolgte über eine Redoxreaktion des Chromogens 3'-3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) unter dem Katalysator Peroxidase zu einem dunkelbraunen Phenazinpolymer.

1.Tag: Die $40\text{ }\mu\text{m}$ dicken in PBS gelagerten Schnitte wurden zunächst dreimal bzw. bei vorheriger Aufbewahrung in Gefrierschutzlösung sechsmal in Tris-gepufferter Normalsalzlösung (TBS) gewaschen und dann für 30 Minuten, zur Aufsättigung endogener Peroxidasen, mit 0,6 % igem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) behandelt. Nach weiteren dreimaligen Waschenvorgängen mit TBS erfolgte der Zellaufschluss bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 Minuten in 2 N Salzsäure (HCL) und anschließend eine zehnminütige Inkubation in 0,3 N Borsäure bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden abermals in TBS gewaschen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur in TBS plus (TBS + 0,1 % Triton + 3 % Eselserum) geblockt. Bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde das Hirngewebe über Nacht (24 Stunden) auf einem Schüttler mit dem primären Antikörper (monoclonal rat anti-BrdU, 1 : 500, Harlan Seralab, England) inkubiert (Tab. 4.2.). (Antikörper werden immer in TBS plus verdünnt).

2.Tag: Die Schnitte wurden zunächst zweimal in TBS gewaschen und dann für 15 Minuten bei Raumtemperatur in TBS plus geblockt. Anschließend wurden das Gewebe für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem biotinylierten sekundären Antikörper (Biotin-SP-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rate IgG, 1 : 500, Dianova, Hamburg, Deutschland) inkubiert (Tab. 4.2.). Abermals wurde dreimal gewaschen und dann für 1 Stunde mit dem ABC-Reagenz (Avidin Dehydrogenase / biotinylierte Peroxidase, Vectastain Elite kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA) bei Raumtemperatur inkubiert. Avidin ist ein Glykoprotein, das aus vier identischen Untereinheiten aufgebaut ist, wovon jede Untereinheit je ein Biotinmolekül binden

kann. Nach den letzten drei Waschphasen wurden die Schnitte in TBS platziert. Unter Zugabe von Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Wasserstoffperoxid-Lösung (DAB, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurde die Peroxidasereaktion gestartet, bei der DAB oxidierte und Wasserstoffperoxid reduziert wurde und als Reaktionsprodukt ein dunkelbraunes, amorphes, in Wasser und Ethanol unlösliches Phenazinpolymer entstanden ist. Die bearbeiteten Schnitte wurden nach dreimaligem Waschen in TBS mit 0,5 % iger Gelatine auf Objektträger aufgezogen und für ca. 1 Stunde lang getrocknet. Im letzten Schritt der Fixierung wurden die Schnitte in Toluol (Entellan[®] Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt. Nach einer Trocknungszeit von ca. 24 Stunden konnten die Schnitte ausgewertet werden.

4.8.2. Dreifach-Immunfluoreszenz-Technik

Die weitere Phänotypisierung der BrdU-positiven Zellen in gliale und neuronale Zellen erfolgte mit Hilfe immunzytochemischer Dreifachfärbungen mit Markern gegen Bromodesoxyuridin, den neuronalen Marker NeuN ("neuronal nuclei antigen"; Mullen et al., 1992, Magavi et al., 2000) und den glialen Marker S100 β (calciumbindendes Protein; Ghandour et al., 1981).

1.Tag: Die Schnitte wurden zunächst dreimal in TBS gewaschen und dann zum Zellaufschluss bei 37°C für 30 Minuten in 2 N Salzsäure (HCL) platziert. Anschließend erfolgte eine zehnminütige Inkubation in 0,3 N Borsäure bei Raumtemperatur. Abermals wurden die Schnitte in TBS gewaschen und in TBS plus für 30 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Bei 4°C wurde das Hirngewebe über 48 Stunden auf einem Schüttler mit den primären Antikörpern (Rat Anti-BrdU, 1 : 500, Harlan Seralab, England; Rabbit Anti-S100 β , 1 : 2500, Swant; Bellinzona, Schweiz; Mouse Anti-NeuN 1 : 500, Chemicon, Temecula USA) inkubiert (Tab. 4.2.).

3.Tag: Die Schnitte wurden zunächst zweimal in TBS gewaschen und dann für 15 Minuten bei Raumtemperatur in TBS plus geblockt. Bei 4°C wurden die Schnitte über Nacht lichtgeschützt auf einem Schüttler mit den sekundären Fluoreszenzantikörpern (Rhodamine Red Anti-Rat, 1 : 250, Dianova, Hamburg, Deutschland; Alexa Fluor 488 Anti-Rabbit, 1 : 250, Molecular Probes, Leiden, Niederlande; Cy5 Anti-Mouse ,1 : 250, Dianova, Hamburg, Deutschland) inkubiert (Tab. 4.2.).

4.Tag: Die bearbeiteten Schnitte wurden nach sechsmaligem Waschen in TBS mit 0,5 % iger Gelatine auf Objektträger aufgezogen und für ca. 1 Stunde lang getrocknet. Im letzten Schritt der Fixierung werden die Schnitte mit Mowiol (Calbiochem) eingedeckt. Nach einer Trocknungszeit von ca. 24 Stunden konnten die Schnitte ausgewertet werden.

Tabelle 4.2. Antikörper

Antikörper	Firma	Verdünnung
Primäre Antikörper		
Rat anti BrdU	Harlan Seralab, England	1 : 500
Rabbit anti S100β	Swant, Bellizona Schweiz	1 : 2500
Mouse anti NeuN	Chemicon, Terneculan USA	1 : 500
Sekundäre Antikörper		
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Donkey anti rat	Dianova, Hamburg Deutschland	1 : 500
Rhodamine red anti rat	Dianova, Hamburg Deutschland	1 : 250
Alexa Fluor 488 anti rabbit	Molecular Probes, Leiden NL	1 : 250
Cy5 anti mouse	Dianova, Hamburg Deutschland	1 : 250

4.9. Histologie

Zur Darstellung der Läsionsmorphologie wurden von jedem 4. Schnitt des Infarktareals Kresylviolettschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf gelatinisierte Objektträger aufgezogen und nach Lufttrocknung in einer absteigenden Alkoholreihe aus 96 % Ethanol, 80 % Ethanol und 60 % Ethanol für je 1 bis 5 Minuten inkubiert. Dann wurden die Schnitte kurz in Aqua dest. gewässert und 1 bis 10 Minuten in gepufferter Kresylviolettlösung gefärbt. Danach wurde sie in Acetatpuffer (pH 6,0) gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 % Ethanol, 90 % Ethanol, 96 % Ethanol und reinem Isopropanol) für jeweils 5 Minuten entwässert. Anschließend wurden die Schnitte zweimal je 1 bis 5 Minuten in Xylol inkubiert und im letzten Schritt der Fixierung in Toluol (Entellan® Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

4.10. Auswertung der immunhistochemischen Hirnschnitte

Das Ausmaß der Zellproliferation wurde anhand der durch die Peroxidase Technik angefärbt Hirnschnitte im Gyrus dentatus des Hippocampus bestimmt. Es wurde in jedem 6. Hippocampuschnitt der gesamte ventrale und dorsale Anteil des Gyrus dentatus ipsi- und kontralateral unter einem Mikroskop (Zeiss Axioplan 2 imaging) in 40 facher Vergrößerung ausgezählt. Zur Quantifizierung der Zellproliferation im gesamten Gyrus dentatus wurde die ermittelte Zellzahl mit dem Faktor 6 multipliziert.

Die Phänotypisierung neu entstandener Zellen in neuronale, gliale bzw. BrdU-positive Zelle erfolgte am konfokalen Laserscanning Mikroskop unter 40 facher Vergrößerung (Zeiss LSM 510). Die Fluorochrome der sekundären Antikörper (Rhodamine Red (554 nm), Alexa Fluor (488 nm), Cy5 (650 nm)) werden von den entsprechenden Lasern (Helium-Neon 1, Argon, Helium-Neon 2), die den Schnitt in seiner Z-Ebene jeweils durchscannen, angeregt. In der Verarbeitung werden die gescannten Ebenen eines Schnittes übereinander gelegt und durch Kolorisation in neuronale, gliale bzw. BrdU-positive Zellen differenziert. Für die Phänotypisierung wurde jeder 12. Schnitt des Gyrus dentatus im Hippocampus mittels der Dreifach-Immunfluoreszenz-Technik angefärbt. Jeweils ipsi- und kontralateral wurden 50 Zellen kolorisiert. Zur quantitativen Bestimmung der verschiedenen Zelltypen wurde die zuvor ermittelte Proliferationszellzahl mit dem prozentualen Anteil des jeweiligen Zelltyps multipliziert.

4.11. Volumetrie der Hirne

Ziel der volumetrischen Messungen war es, das Infarktvolumen und globale Hirnvolumen im Bereich Bregma 2,7 mm bis Bregma -5,3 mm aller Tiere zu ermitteln (Abb. 4.8.). Die Messung erfolgte an jedem 8. Kresylvioletschnitt der Photothrombose bzw. bei den Kontrolltieren an jedem 8. Schnitt des sensorischen Vorderpfotenareals. Die mit Kresylviolett gefärbten Schnitte wurden auf einen hellkeitsstabilisierenden Beleuchtungstisch (Imaging Research Inc., Model B90) aufgelegt, mit einer CCD Kamera aufgenommen und mit einem Computer (Macintosh) und einer Auswertungssoftware (NIH USA image Software) digitalisiert dargestellt. Durch Farbkodierungen (Abb. 4.8. B) wurde die Infarktfläche

und die globale Fläche des jeweiligen Schnittes bestimmt. Zur Ermittlung des Infarkt Volumens und des Hirnvolumens wurde anschließend die entsprechend gemessene Fläche pro Schnitt mit dem Faktor 8 und der Schnittdicke 40 µm multipliziert. Die Addition der jeweiligen Teilvolumina ergab das Infarktvolumen bzw. das globale Hirnvolumen pro Tier.

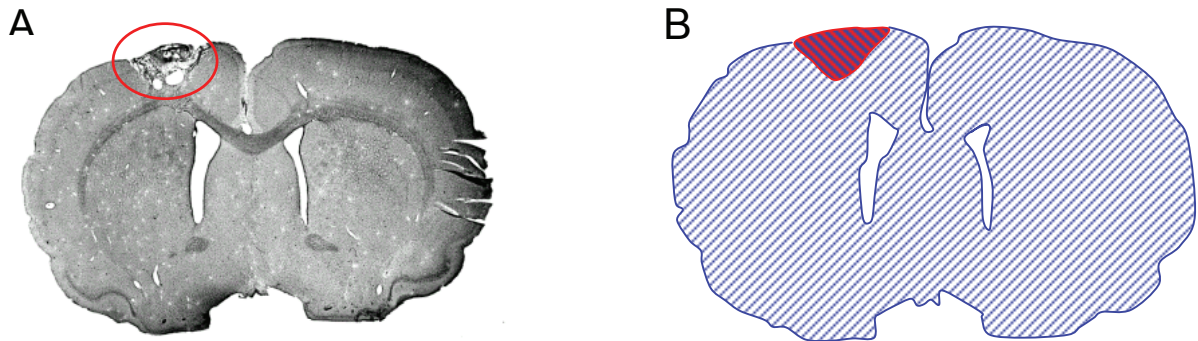


Abbildung 4.8. **A:** Histologischer koronarer Anschnitt in Höhe der Läsion. **B:** Volumetrie der photothrombotischen Läsion und des globalen Hirnvolumens (Bregma 2,7 mm bis Bregma – 5,3 mm). Mit Hilfe der entsprechenden Auswertungssoftware wurde an jedem 8. Kresylvioletschnitt (rotgestreift dargestellt) die Fläche der Läsion ermittelt. Zur Bestimmung des Photothrombosevolumens wurden die gemessenen Flächen pro Schnitt mit dem Faktor 8 und der Schnittdicke 40 µm multipliziert. Um das globale Hirnvolumen zu bestimmen wurde von jedem 8. kresylviolettgefärbten Schnitt die gesamte Fläche unter Aussparung der Ventrikel ermittelt (blaugestreift dargestellt) und mit dem Faktor 8 und der Schnittdicke 40 µm multipliziert.

4.12. Statistik

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung (SD) bzw. als Mittelwerte $\pm$ Standardfehler angegeben. Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS Version 12.0[®]. Zunächst wurden die Daten auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk geprüft. Im nächsten Schritt wurde ein Globaltest zur Evaluierung intergruppaler Signifikanzen durchgeführt. Bei einer parametrischen Datenverteilung wurde dabei die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA = Analysis Of Variance) und bei non-parametrischer Datenverteilung der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Ergaben sich aus dem Globaltest Signifikanzen ($p < 0,05$), so wurde die statistische Analyse mit einem Paartest fortgesetzt. Dabei wurde bei parametrischer Datenverteilung anhand des ungepaarte T-Test bzw. bei non-parametrischer Datenverteilung anhand des U-

(Mann-Whitney) Test geprüft. Eine Korrektur für multiple Vergleiche war angesichts der geringen Zahl der Vergleiche und des zuvor angewandten Globaltests nicht erforderlich. Der Vergleich der Resultate erfolgte innerhalb der Experimentalgruppen zwischen Photothrombose-Tieren und Kontrolltieren. In einem nächsten Schritt wurden jeweils Photothrombose-Tiere und Kontrolltiere zwischen den drei Hauptgruppen miteinander verglichen.

5. Ergebnisse

5.1. Morphologie und Volumetrie der kortikalen Infarkte

Alle Versuchstiere ($n = 49$) überlebten den Beobachtungszeitraum von 42 Tagen. Die Tiere ($n = 24$), bei denen eine fokale ischämische Läsion induziert wurde, zeigten über allen 6 Kortexschichten im sensomotorischen Vorderpfotenareal (FL, Nomenklatur nach

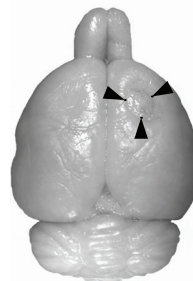


Abbildung 5.1. Rechtshemisphärische Läsion im sensomotorischen Vorderpfotenkortex.

Zilles, 1985) eine photothrombotische Infarzierung (Abb. 5.1.). Bei einigen Tieren schloss die photothrombotische Läsion zusätzlich einen minimalen Anteil des frontalen Kortex (Fr 1, Fr 2) ein. Die Kontrolltiere ($n = 25$) wiesen keine strukturellen Schädigungen auf.

Die Analyse des globalen Hirnvolumens (Abb. 5.2., Tab. 5.1.) im Bereich Bregma 2,7 mm bis Bregma $-5,3$ mm zeigte innerhalb der drei Experimentalgruppen keine volumetrischen Unterschiede zwischen läsionierten Tieren und Kontrollen. Interessanterweise beeinflussten allerdings sowohl Greiftraining als auch die reizreiche Umgebung das Hirnvolumen bei den Tieren mit kortikalen Infarkten sowie bei den scheinoperierten Kontrollen. Das Hirnvolumen der läsionierten Standardtiere ($264,25 \pm 13,09 \text{ mm}^3$) war im Vergleich zu den läsionierten Greiftieren ($347,46 \pm 28,61 \text{ mm}^3$) signifikant reduziert. Aufgrund der großen Streuung der volumetrischen Daten bei den Läsionstiere der reizreichen Umgebung ($309,15 \pm 102,80 \text{ mm}^3$), ließen sich weder ein tendenziell höheres Hirnvolumen gegenüber den Standardbedingungen noch ein tendenziell niedrigeres Hirnvolumen gegenüber dem Greiftraining statistisch nachweisen. Die scheinoperierten Kontrolltiere unterschieden sich im globalen Hirnvolumen (ST-CTRL $261,74 \pm 14,35 \text{ mm}^3$, RR-CTRL $279,86 \pm 15,92 \text{ mm}^3$, GT-CTRL $354,73 \pm 29,47 \text{ mm}^3$) jeweils signifikant voneinander.

Vergleicht man die Infarktgröße (Abb. 5.2., Tab. 5.1.) zwischen den unterschiedlichen Aktivitätsgruppen, ergaben sich bei einem Infarktvolumen von $4,77 \pm 1,16 \text{ mm}^3$ der ST-Gruppe, von $5,37 \pm 2,55 \text{ mm}^3$ der RR-Gruppe und

von $6,76 \pm 1,58 \text{ mm}^3$ der GT-Gruppe keine signifikanten Unterschiede. Der prozentuale Anteil des Photothrombosevolumens betrug in allen drei Aktivitätsgruppen annähernd 2 % am globalen Hirnvolumen.

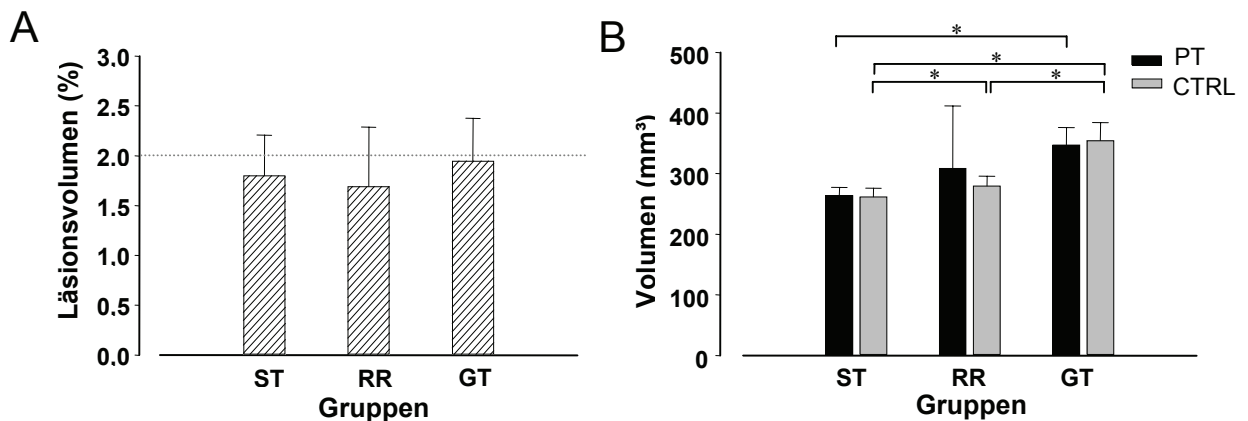


Abbildung 5.2. Volumetrische Analyse des Läsions- und Hirnvolumens in den verschiedenen Experimentalgruppen. **A:** Das Volumen der Photothrombose ist mit annähernd 2 % in allen drei Gruppen gleich. **B:** Die Analyse des globalen Hirnvolumens (Bregma 2,7 mm bis Bregma -5,3 mm) zeigt dagegen signifikante Unterschiede zwischen allen drei Experimentalgruppen. Die Balken repräsentieren Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung, $^*(p < 0,05)$.

Tabelle 5.1. Volumetrische Analyse des Läsions- und Hirnvolumens in den verschiedenen Experimentalgruppen.

		Standard	Reizreiche Umgebung	Greiftraining
		(n=7)	(n=9)	(n=8)
PT	Volumen (mm³)	264,25 $\pm$ 13,09	309,15 $\pm$ 102,80	347,46 $\pm$ 28,61
	Läsionsvolumen (mm³)	4,77 $\pm$ 1,16	5,37 $\pm$ 2,55	6,76 $\pm$ 1,58
		(n=7)	(n=8)	(n=10)
CTRL	Volumen (mm³)	261,74 $\pm$ 14,35	279,86 $\pm$ 15,92	354,73 $\pm$ 29,47

(Angabe von Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)

5.2. Überleben BrdU-positiver Zellen im Gyrus dentatus

In den Versuchstiergruppen zeigten sich erhebliche Unterschiede im Überleben der BrdU-positiven Zellen im Gyrus dentatus des Hippocampus (Abb. 5.3., Abb. 5.4., Tab. 5.2.). Diese Effekte waren immer bilateral ausgeprägt, d.h. der ipsi- und kontralaterale Gyrus dentatus unterschieden sich im Zellüberleben nicht voneinander (Tab. 5.3.).

Vergleicht man die drei läsionierten Aktivitätsgruppen (Abb. 5.3., Tab. 5.2.) untereinander, so war das Zellüberleben durch eine reizreiche Umgebung im Vergleich zu den Standardbedingungen um 29 % signifikant gesteigert ($p = 0,028$). Tägliches Greiftraining steigerte die Zellzahl gegenüber den Standardbedingungen um 46 %. Dieser Anstieg ließ sich auf einem Signifikanzniveau von $p = 0,004$ statistisch sichern. GT-Gruppe und RR-Gruppe zeigten lediglich einen tendenziellen Unterschied ohne statistische Relevanz.

Bei den scheinoperierten Kontrolltieren (Abb. 5.3., Tab. 5.2.) war die Steigerung der Zellzahl durch tägliches Greiftraining weit stärker ausgeprägt. Im Vergleich zu den Standardbedingungen stieg die Zahl der BrdU-positiven Zellen signifikant um 132 % ($p = 0,001$) an. Ebenfalls zeigte sich eine um 95 % signifikant gesteigerte Zellzahl im Vergleich zur reizreichen Umgebung ($p = 0,002$). Zwischen den Tieren der Standardgruppe und den Tieren in der reizreichen Umgebung stellten sich interessanterweise in dieser Studie keine statistisch relevanten Unterschiede im Zellüberlebens dar.

Vergleicht man innerhalb der Experimentalgruppen (Abb. 5.3., Tab. 5.2.), so war die Zahl der BrdU-positiven Zellen unter Standardbedingungen bei den Tieren mit kortikalen Infarkten und den Kontrollen annähernd gleich. In der reizreichen Umgebung zeigte sich ein tendenziell gesteigertes Zellüberleben der Infarkttiere (18 %) gegenüber den scheinoperierten Kontrollen, wobei dieser Trend statistisch nicht gesichert werden konnte ($p = 0,13$). Durch tägliches Greiftraining hingegen war der Unterschied der Zellzahl zwischen Tieren mit kortikalen Infarkten und scheinoperierten Kontrollen deutlich stärker ausgeprägt. Die Kontrolltiere zeigten eine um 42 % signifikant gesteigerte Zahl BrdU-positiver Zellen ($p = 0,037$) gegenüber den Läsionstieren.

Die Daten der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass sowohl tägliches sensomotorisches Greiftraining als auch die Unterbringung in einer reizreichen Umgebung nach fokalen kortikalen Infarkten das Zellüberleben im Gyrus dentatus

gegenüber den Standardbedingungen signifikant steigerten. Des Weiteren wurde gezeigt, dass das Zellüberleben durch tägliches Greiftraining noch deutlich stärker anstieg, wenn keine Ischämie induziert wurde.

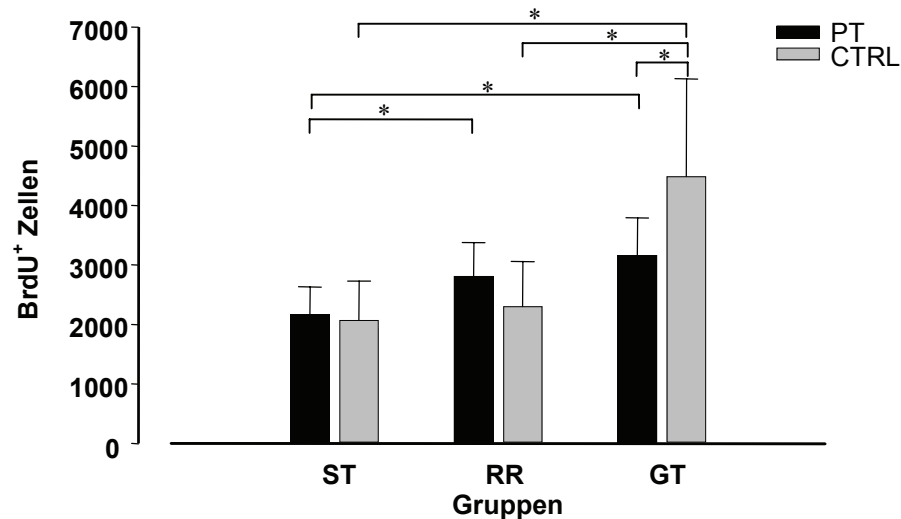


Abbildung 5.3. Gesamtzahl BrdU-positiver Zellen im Gyrus dentatus in den verschiedenen Experimentalgruppen. Sowohl Greiftraining als auch eine reizangereicherte Umgebung führen zu einer signifikanten Steigerung BrdU-positiver Zellen, wobei Greiftraining ohne Hirninfarkt die Zellzahl am deutlichsten steigert. Die Balken repräsentieren Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung, $^*(p < 0,05)$.

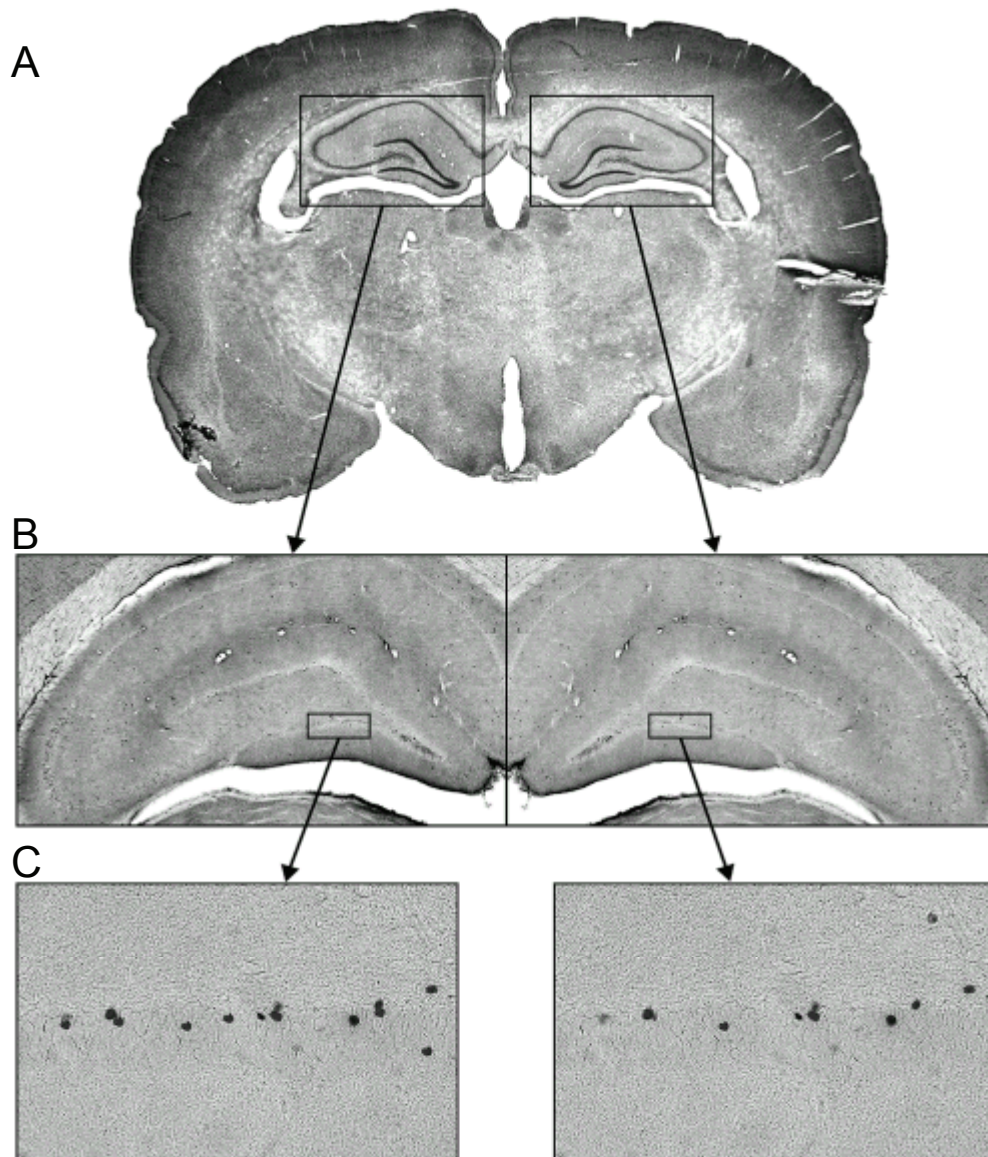


Abbildung 5.4. Verteilung BrdU-positiver Zellen im Gyrus dentatus. Die koronaren Schnitte durch den Gyrus dentatus wurden immunhistochemisch mit Antikörpern gegen den Proliferationsmarker BrdU angefärbt. **A:** Überblick über BrdU-markierte Zellen im Gyrus dentatus im gesamtem koronaren Schnitt. **B:** Ipsi- und kontralateraler Gyrus dentatus in einer stärkeren Vergrößerung. **C:** Ausschnitt aus dem ipsi- und kontralateralen Gyrus dentatus in 40 facher Vergrößerung.

5.3. Differenzierung BrdU-positiver Zellen im Gyrus dentatus

Die Differenzierung BrdU-positiver Zellen (Abb. 5.6.) in neuronale und gliale Zellen im Gyrus dentatus des Hippocampus zeigte zwischen beiden Hemisphären keine Unterschiede (Tab. 5.3.). Nach fokaler Ischämie war der prozentuale Anteil neuer Nervenzellen an der Gesamtzahl BrdU-positiver Zellen unter Standardbedingungen, in reizreicher Umgebung und durch tägliches Greiftraining in allen drei Aktivitätsgruppen mit ca. 89 % annähernd gleich (Tab. 5.2., Abb. 5.5. A). Allein bei den Kontrolltieren, die tägliches Greiftraining erhielten, fand sich eine signifikante Steigerung der neuronalen Differenzierung auf $95,1 \pm 2,56 \%$ ($p = 0,001$) im Vergleich zu den Standardbedingungen. Der Anteil neuer Nervenzellen zwischen der ST-CTRL Gruppe ($90,4 \pm 1,95 \%$) und RR-CTRL Gruppe ($91,47 \pm 5,01 \%$) stellte sich nahezu gleich dar. Die tendenziell gesteigerte neuronale Differenzierung der GT-CTRL Gruppe gegenüber der RR-CTRL Gruppe zeigte mit $p = 0,093$ lediglich einen Trend (Tab. 5.2., Abb. 5.5. A).

Vergleicht man den prozentualen Anteil der neuronalen Differenzierung innerhalb der Experimentalgruppen, so fanden sich durch tägliches Greiftraining erhebliche Unterschiede zwischen Tieren mit kortikalen Infarkten und scheinoperierten Kontrolltiere. Die Kontrollen zeigten eine signifikant gesteigerte Neurogenese ($p = 0,0003$) im Vergleich zu den Infarkttieren. Der Vergleich innerhalb ST-Gruppe und RR-Gruppe befand keine Unterschiede in der neuronalen Phänotypisierung (Tab. 5.2., Abb. 5.5. A).

In allen Versuchstiergruppen hatten ca. 1 bis 2 % der BrdU-positiven Zellen eine gliale Identität (Tab. 5.2., Abb. 5.5. B). Es verblieben somit annähernd 8 bis 9 % weder NeuN noch S100 β positive Zellen in der ST-Gruppe, RR-Gruppe und bei den Tieren mit kortikalen Infarkten der GT-Gruppe. Bei den Kontrolltieren, die tägliches Greiftraining erhielten, war dieser Anteil mit $4,5 \pm 2,3 \%$ gegenüber den Läsionstieren der Gruppe und den Kontrollen der ST-Gruppe signifikant reduziert, was darauf hindeutet, dass in dieser Gruppe der Zuwachs an neuen Nervenzellen aus den weder NeuN- noch S100 β -positiven Zellen rekrutiert wurde (Tab. 5.2., Abb. 5.5. C).

Da die Zahl der überlebenden BrdU-positiven Zellen im gesamten Gyrus dentatus bestimmt wurde, ließen sich aus den prozentualen Anteilen der unterschiedlichen Zelltypen die absoluten Zellzahlen im Gyrus dentatus hochrechnen. Dabei ergab sich für die Zahl neuer Neurone ein ähnliches Bild wie dies bereits für die Gesamtzahl überlebender BrdU-positiver Zellen beschrieben

wurde (Tab. 5.2., Abb. 5.5. A). Lediglich in der Gruppe der scheinooperierten Kontrolltiere, die Greiftraining erhielten, wuchs durch die Steigerung der neuronalen Differenzierung auch die absolute Zahl neuer Nervenzellen noch weiter an. Der Anstieg neuer Nervenzellen durch tägliches Greiftraining betrug in der scheinooperierten Kontrolltiergruppe im Vergleich zu den Standardbedingungen 121 % ($p = 0,001$) und im Vergleich zur reizreichen Umgebung 102 % ($p = 0,003$). Zwischen den Kontrollen der ST-Gruppe und RR-Gruppe stellten sich nahezu keine Unterschiede in der neuronalen Differenzierung dar.

Vergleicht man die Läsionstiere aller drei Aktivitätsgruppen untereinander (Tab. 5.2., Abb. 5.5. A), so war der absolute Anteil an neuen Nervenzellen durch eine reizreiche Umgebung um 29 % und durch tägliches Greiftraining sogar um 43 % im Vergleich zu den Standardbedingungen jeweils signifikant gesteigert ($p = 0,049$ und $p = 0,008$). Die Gruppe der Greiftiere und die Tiere in einer reizreichen Umgebung zeigten lediglich einen tendenziellen Unterschied ohne statistische Relevanz.

Innerhalb der Experimentalgruppen (Tab. 5.2., Abb. 5.5. A) fanden sich in der Gruppe der Standardtiere und in der Gruppe der reizreichen Umgebung keine Unterschiede hinsichtlich neuentstandenen Nervenzellen zwischen Läsionstieren und den Kontrollen. Durch tägliches Greiftraining hingegen war der Unterschied der neuen Nervenzellen zwischen Tieren mit kortikalen Infarkten und scheinooperierten Kontrollen deutlich ausgeprägt. Die Kontrolltiere zeigten eine um 54 % signifikant gesteigerte Neuronenzahl ($p = 0,021$) gegenüber den Läsionstieren.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass nach fokaler kortikaler Ischämie sowohl eine reizreiche Umgebung als auch tägliches Greiftraining die Entstehung neuer maturer Nervenzellen, d.h. die adulte Neurogenese steigerte. Durch tägliches sensomotorisches Greiftraining bei nicht infarzierten Tieren war diese Steigerung bei weitem am effektivsten. Die Entstehung neuer Gliazellen wurde in allen Aktivitätsgruppengruppen nicht beeinflusst.

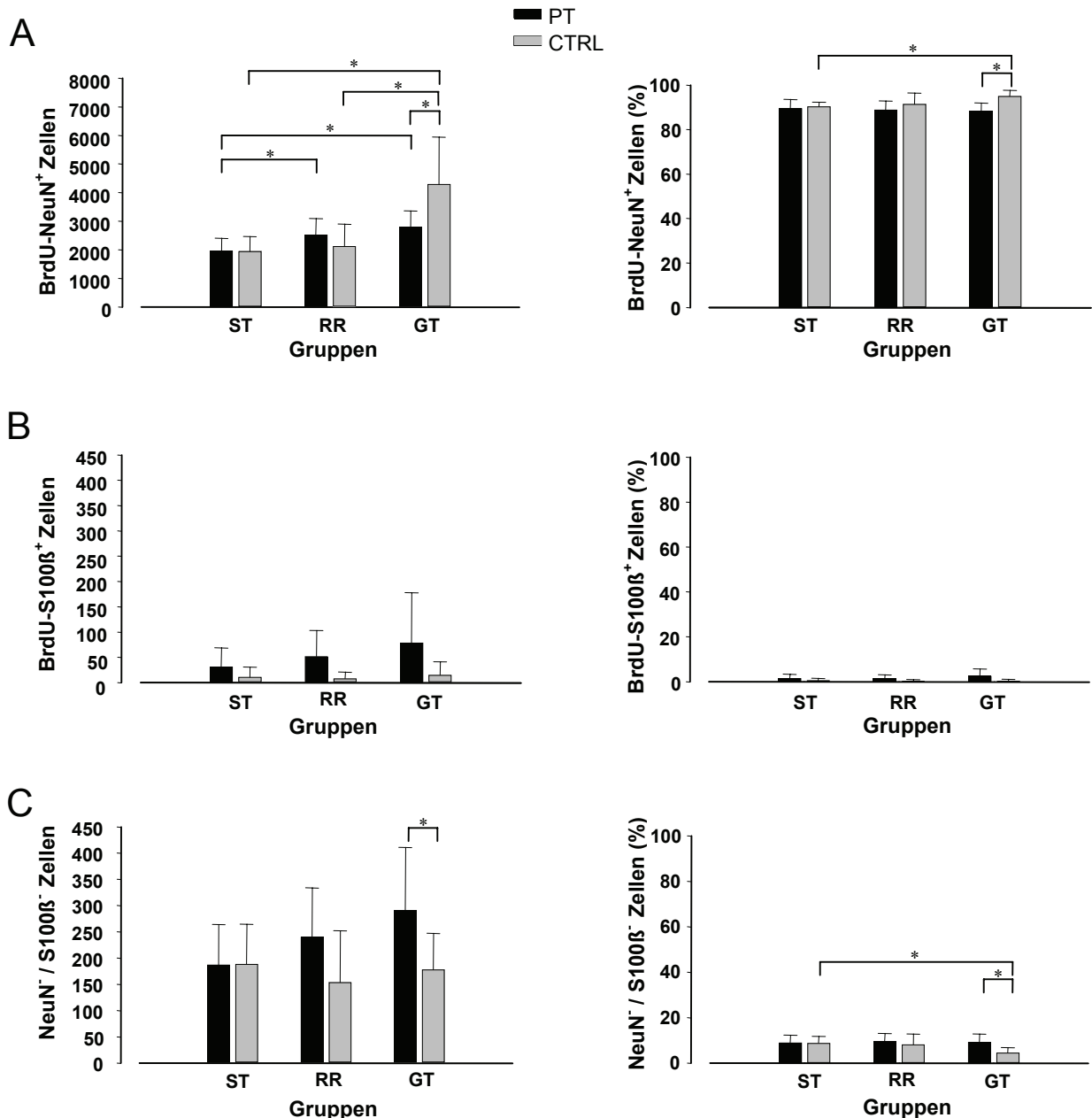


Abbildung 5.5. Phänotypisierung BrdU-positiver Zellen im Gyrus dentatus in den verschiedenen Experimentalgruppen.

A: Das linke Diagramm zeigt die Gesamtzahl neuer Nervenzellen. Sowohl Greiftraining als auch eine reizangereicherte Umgebung steigern die Zahl BrdU-NeuN⁺ Zellen signifikant, wobei Greiftraining ohne Hirninfarkt zum deutlichsten Anstieg neuer Nervenzellen führt. Im rechten Diagramm ist die neuronale Differenzierung prozentual dargestellt. Dabei führt Greiftraining ohne Hirninfarkt zum signifikanten Anstieg neuer Nervenzellen. **B:** Die beiden Diagramme repräsentieren das Ausmaß der glialen Differenzierung. Die Zahl BrdU-S100β⁺ Zellen unterscheiden sich weder absolut (links dargestellt) noch prozentual (rechts dargestellt) zwischen den Experimentalgruppen. **C:** Das linke Diagramm zeigt die Gesamtzahl weder NeuN noch S100β positiver Zellen. Im rechten Diagramm ist der prozentuale Anteil NeuN/S100β⁻ Zellen abgebildet. Da Greiftraining ohne Hirninfarkt zur höchsten neuronalen Differenzierung führt (s. **A**), ist bei annähernd gleicher prozentualer Verteilung der Gliazellen (s. **B**) der Anteil NeuN/S100β⁻ Zellen entsprechend am geringsten. Die Balken repräsentieren Mittelwerte ± Standardabweichung, *(p<0,05).

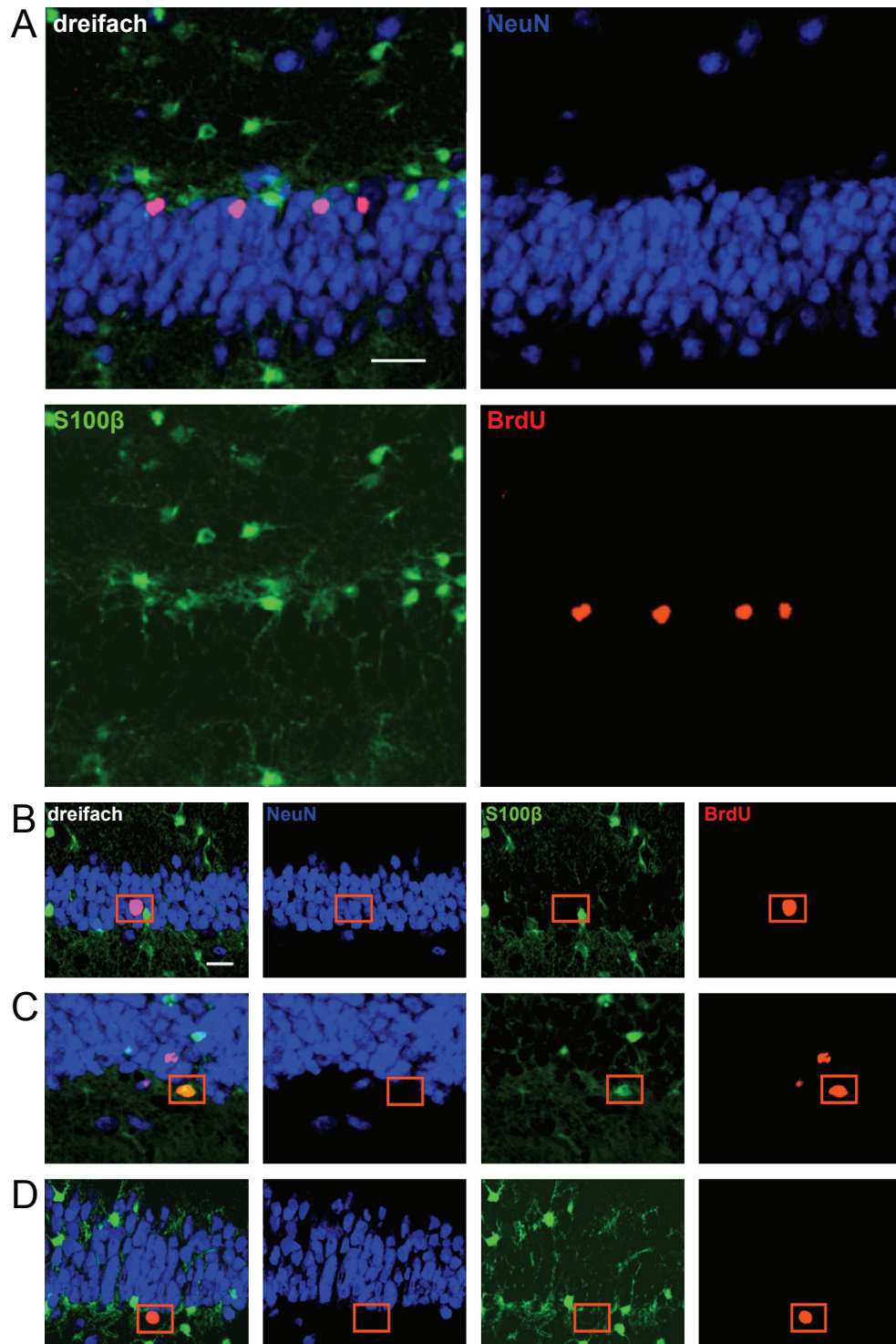


Abbildung 5.6. Dreifach-Immunfluoreszenz gefärbte Schnitte durch den Gyrus dentatus. **A:** Dreifachfärbung mit Antikörpern gegen den Proliferationsmarker BrdU (rot), den glialen Marker S100 β (grün) und den muren neuronalen Marker NeuN (blau). Im konfokalen Laser Scanning Mikroskop wird durch die Kolokalisation dieser verschiedenen Marker der immunhistochemische Phänotyp BrdU-positiver Zellen (rot) bestimmt. Dabei stellen sich neue Nervenzellen pinkfarben (Kolokalisation von rot und blau) und neue Gliazellen gelb (Kolokalisation von rot und grün) dar. Der Balken repräsentiert 400 μ m. **B-D:** Vergrößerte Ausschnitte aus der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus mit **(B)** einer muren neuen Nervenzelle (BrdU-NeuN+, pink), **(C)** einer neuen Gliazelle (BrdU-S100 β +, gelb) und **(D)** einer weder NeuN+ noch S100 β + Zelle (rot). Der Balken repräsentiert 40 μ m.

Tabelle 5.2. Quantitative Phänotypisierung der Gesamtzahl BrdU-positiver Zellen im Gyrus dentatus

		Standard	Reizreiche Umgebung	Greiftraining
		gesamt	gesamt	gesamt
		(n=7)	(n=9)	(n=8)
PT	BrdU ⁺ (absolut)	2175 ± 455	2816 ± 565	3165 ± 627
	NeuN ⁺ (%)	89,57 ± 3,95	89,22 ± 3,99	88,25 ± 3,78
	S100β ⁺ (%)	1,57 ± 1,81	1,45 ± 1,59	2,50 ± 3,29
	NeuN ⁺ /S100β ⁺ (%)	8,86 ± 3,44	9,33 ± 3,57	9,25 ± 3,49
		(n=7)	(n=8)	(n=10)
CTRL	BrdU ⁺ (gesamt)	2150 ± 560	2306 ± 757	4489 ± 643
	NeuN ⁺ (%)	90,40 ± 1,95	91,47 ± 5,01	95,1 ± 2,56
	S100β ⁺ (%)	0,57 ± 0,98	0,41 ± 0,57	0,4 ± 0,70
	NeuN ⁺ /S100β ⁺ (%)	9,03 ± 2,62	8,12 ± 4,61	4,5 ± 2,27

(Angabe von Mittelwert ± Standardabweichung)

Tabelle 5.3. Quantitative Phänotypisierung BrdU-positiver Zellen im ipsi- und kontralateralen Gyrus dentatus

		Standard		Reizreiche Umgebung		Greiftraining	
		ipsi	kontra	ipsi	kontra	ipsi	kontra
		(n=7)		(n=9)		(n=8)	
PT	BrdU ⁺	1128 ± 241	1047 ± 237	1422 ± 246	1394 ± 336	1679 ± 381	1486 ± 255
	NeuN ⁺	1008 ± 236	949 ± 241	1292 ± 261	1231 ± 323	1679 ± 358	1342 ± 225
	S100β ⁺	18 ± 18	14 ± 20	22 ± 28	1231 ± 36	46 ± 59	33 ± 48
	NeuN ⁺ /S100β ⁺	102 ± 53	84 ± 44	108 ± 57	133 ± 71	184 ± 135	111 ± 56
		(n=7)		(n=8)		(n=10)	
CTRL	BrdU ⁺	969 ± 198	1181 ± 365	1085 ± 388	1221 ± 400	2219 ± 782	2270 ± 888
	NeuN ⁺	865 ± 186	1080 ± 337	986 ± 400	1148 ± 415	2112 ± 785	2184 ± 895
	S100β ⁺	0 ± 0	12 ± 21	8 ± 12	0 ± 0	7 ± 24	8 ± 17
	NeuN ⁺ /S100β ⁺	104 ± 38	89 ± 51	91 ± 48	73 ± 37	100 ± 39	78 ± 50

(Angabe von Mittelwert ± Standardabweichung)

5.4. Funktionelle Auswirkung

Um den Einfluss neuer Nervenzellen im Gyrus dentatus sowohl auf kognitive als auch motorische Leistungen zu analysieren, wurden Verhaltenstests durchgeführt. Das hippocampale System ist ein notwendiges Substrat für den Aufbau des räumlich-zeitlichen Gedächtnisses (Barnes, 1988, McNamara & Skelton, 1993, Gallagher et al., 1994). Zur Evaluierung des räumlichen Lernens diente das Wasserlabyrinth nach Morris (Morris, 1984), ein kognitiver Test. Der Sprossen-Lauf-Test hingegen ist ein sensomotorischer Test zur quantitativen Bewertung lokomotorischer Bewegungen unter Einbeziehung von Koordination und Balance.

5.4.1. Räumliche Gedächtnisleistung im Wasserlabyrinth

Im Morris Wasserlabyrinth wurde über 7 Tage das räumliche Lernvermögen analysiert, indem die Latenzzeiten bis zum Erreichen der Plattform ermittelt wurden (Abb. 5.7). Es ließ sich so eine Lernkurve erstellen, die einen sigmoiden Charakter hatte. Der sigmoide Charakter signalisiert, dass in den ersten 3 Tagen das Lernvermögen gesteigert war, während etwa ab dem 4. Tag ein Plateau erreicht wurde. Zur Auswertung dieser Lernkurven wurde in einem nächsten Schritt aus jeder Kurve die Fläche unter der Kurve („area under the curve“ [AUC]) errechnet und dann pro Gruppe gemittelt (Matthews et al., 1990). Um so kleiner die Fläche unter der Kurve, desto besser war die Lernfähigkeit der Ratten.

Innerhalb der Experimentalgruppen (Tab. 5.4., Abb. 5.8.), explizit in der Standardgruppe und in der Gruppe der Greiftiere, zeigten die jeweiligen scheinoperierten Kontrolltiere aufgrund eines steileren Verlaufs der Lernkurven ein besseres Lernvermögen als die dazugehörigen Tiere mit kortikalen Infarkten. Diese bessere Lernfähigkeit bezüglich des räumlichen Gedächtnisses konnte innerhalb der Gruppe der Greiftiere auf einem Signifikanzniveau von $p = 0,001$ statistisch gesichert werden. Bei den Tieren, die in einer reizreichen Umgebung lebten, stellen sich die Ergebnisse konträr im Vergleich zu Standard- und Greiftieren dar. Hier zeigten interessanterweise die Läsionstiere eine eindeutig bessere ($p = 0,046$) kognitive Lernfähigkeiten als die Kontrolltiere.

Zwischen den scheinoperierten Kontrolltieren (Tab. 5.4., Abb. 5.9.) der 3 Experimentalgruppen konnte ganz deutlich gezeigt werden, dass durch tägliches Greiftraining signifikant die beste Leistung im Wasserlabyrinth erreicht wurde.

Standardtiere und Tiere in einer reizreichen Umgebung unterschieden sich hinsichtlich ihres Lernvermögens nicht.

Beim Vergleich zwischen den Tieren mit kortikalen Infarkten der 3 Experimentalgruppen (Tab. 5.4., Abb. 5.10.) stellte sich ganz eindeutig heraus, dass ein 6-wöchiger Aufenthalt in einer reizreichen Umgebung zur besten räumlichen Gedächtnisleistung führte. Tendenziell zeigte sich durch Greiftraining ein besseres Lernvermögen als unter Standardbedingungen, jedoch konnte dieser Trend aufgrund der großen Streuung der Daten statistisch nicht verifiziert werden.

Im Hinblick auf die Differenzierungsdaten lässt sich auf der Grundlage einer Korrelationsanalyse nach Pearson folgende Aussage treffen (Tab. 5.5.), die Anzahl der neuentstandenen Neurone korrelierte negativ ($P = -0,310$) mit der Fläche unter der Kurve („area under the curve“ [AUC]) auf einem Signifikanzniveau von $p = 0.03$. Das bedeutet, um so mehr Neurone, desto geringer die Fläche unter der Kurve und demzufolge um so besser das räumliche Lernvermögen. Die Zahl der neuentstandenen Neurone konnte weitestgehend mit der Lernleistung im Wasserlabyrinth assoziiert werden.

Tabelle 5.4. Wasserlabyrinth nach Morris, Quantifizierung von Schwimmlatenzen und dem Integral der Lernkurven (AUC)

		Standard		Reizreiche Umgebung		Greiftraining	
		Latenz (sec)	AUC	Latenz (sec)	AUC	Latenz (sec)	AUC
		(n=7)		(n=9)		(n=8)	
PT	1. Tag	69,61 ± 17,61	180,70 ± 132,87	51,69 ± 20,73	85,21 ± 28,59	53,03 ± 15,30	121,73 ± 31,98
	2. Tag	41,21 ± 24,62		20,83 ± 14,03		32,84 ± 20,67	
	3. Tag	24,64 ± 32,04		13,06 ± 9,07		20,75 ± 11,35	
	4. Tag	26,36 ± 22,29		9,14 ± 5,67		17,06 ± 8,38	
	5. Tag	23,57 ± 30,57		6,11 ± 2,30		9,84 ± 4,30	
	6. Tag	20,21 ± 22,94		6,94 ± 4,94		10,56 ± 7,52	
	7. Tag	27,87 ± 31,21		6,56 ± 2,76		8,31 ± 6,68	
		(n=7)		(n=8)		(n=10)	
CTRL	1. Tag	60,81 ± 15,08	131,29 ± 33,84	53,66 ± 17,70	149,14 ± 77,54	42,68 ± 19,08	72,99 ± 24,28
	2. Tag	35,98 ± 16,30		35,34 ± 19,91		19,43 ± 12,96	
	3. Tag	19,65 ± 11,52		30,09 ± 17,96		12,35 ± 6,67	
	4. Tag	9,85 ± 6,12		22,94 ± 24,92		7,03 ± 3,97	
	5. Tag	9,77 ± 11,38		19,06 ± 21,35		6,20 ± 2,26	
	6. Tag	9,40 ± 6,24		8,13 ± 6,32		4,50 ± 1,41	
	7. Tag	7,85 ± 2,26		13,50 ± 19,10		4,30 ± 0,99	

(Angabe von Mittelwert ± Standardabweichung)

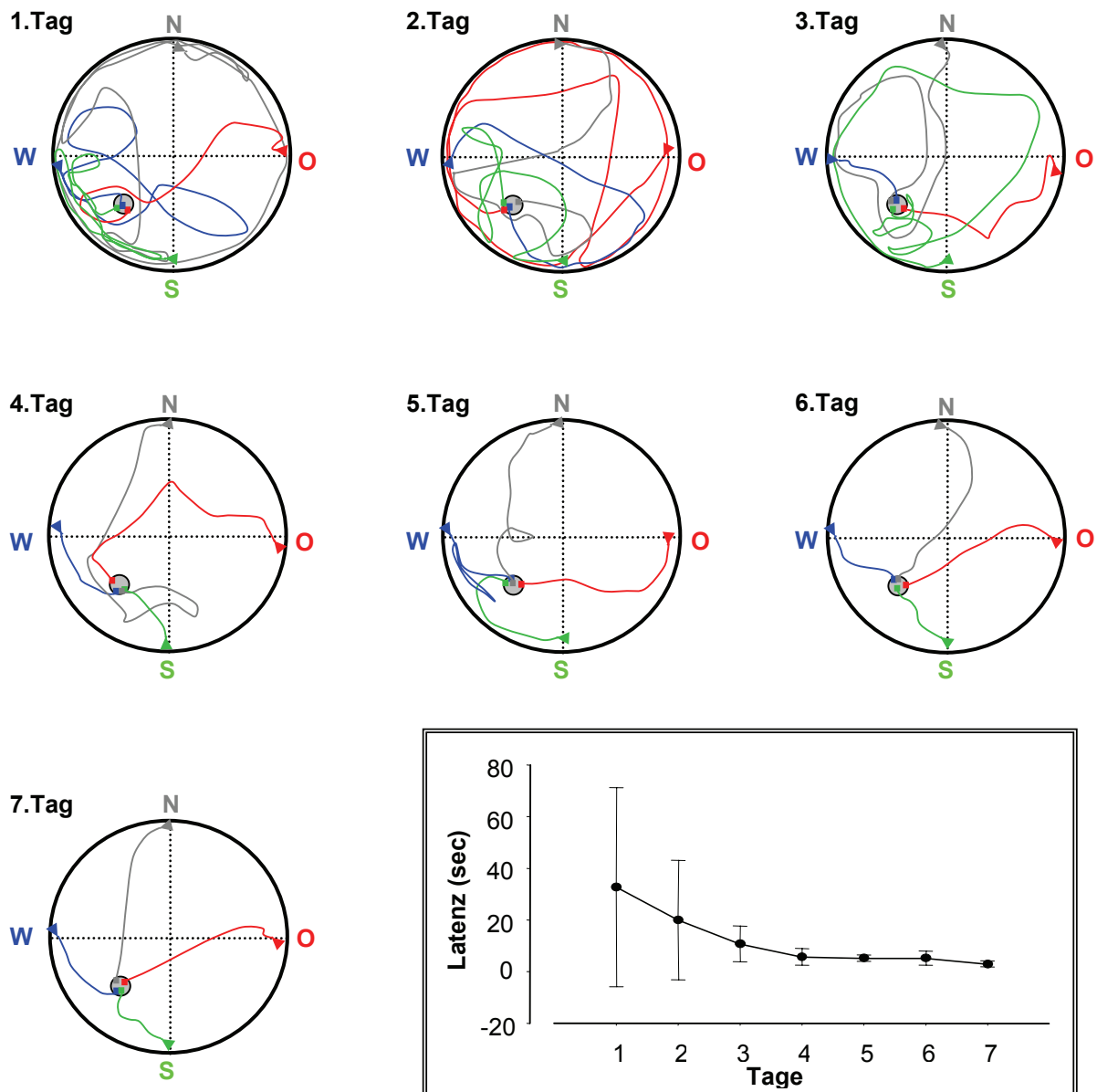


Abbildung 5.7. Schematische Darstellung des räumlichen Lernverhaltens im Wasserlabyrinth-Test. Die Ratte wird über einen Zeitraum von 7 Tagen täglich in randomisierter Abfolge von 4 Startpunkten (O = Ost, W = West, S = Süd, N = Nord) ins Wasser gesetzt. Die Zeit und der Weg bis zum Erreichen der Plattform, die sich konstant im südwestlichen Quadranten befindet, werden aufgezeichnet. Die schematischen Darstellungen zeigen die Schwimmwege (vom jeweiligen Startpunkt zur Plattform) einer Ratte, die im Verlauf der 7 täglichen Lernzeit immer kürzer gewählt werden. Der Verlauf der Lernkurve im darunter abgebildeten Diagramm demonstriert ferner eine sich allmählich verkürzende Schwimmzeit im Beobachtungszeitraum.

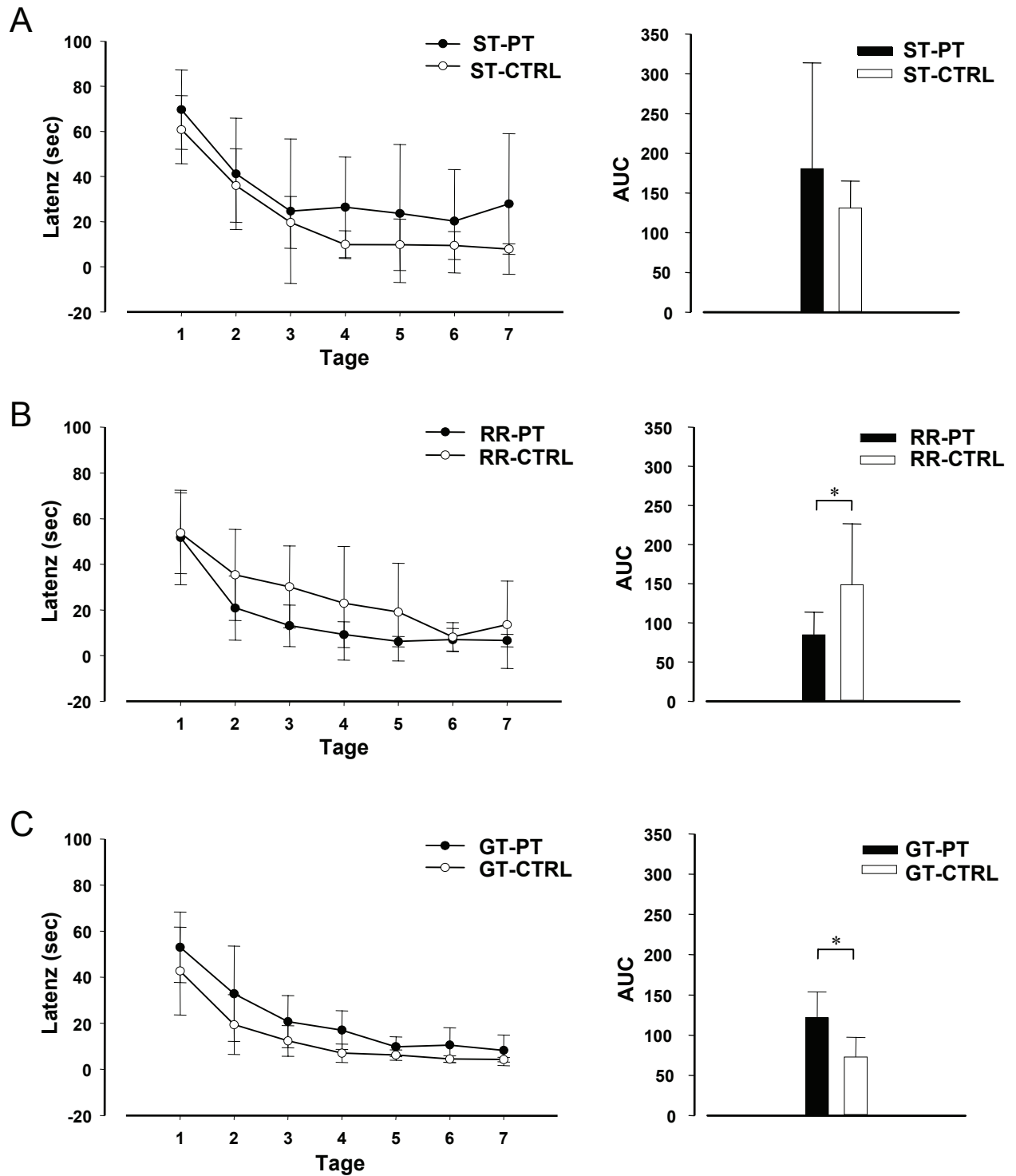


Abbildung 5.8. Analyse des räumlichen Lernvermögens im Wasserlabyrinth nach Morris innerhalb der drei Experimentalgruppen. In der linken Spalte sind die Lernkurven dargestellt und rechts daneben die jeweils zugehörigen Flächen unter den Kurven (AUC) [um so kleiner die AUC, desto besser das räumliche Lernvermögen]. **A:** Standardbedingungen: Photothrombosierte Tiere und Kontrollen unterscheiden sich nicht signifikant. **B:** Reizreiche Umgebung: Die Photothrombosierte Tiere zeigen ein deutlich besseres räumliches Lernvermögen im Vergleich zu den Kontrollen. **C:** Greiftraining: Die Kontrollen sind den Photothrombosierte Tieren eindeutig überlegen. Darstellung von Mittelwerten $\pm$ Standardabweichung, $^*(p < 0,05)$.

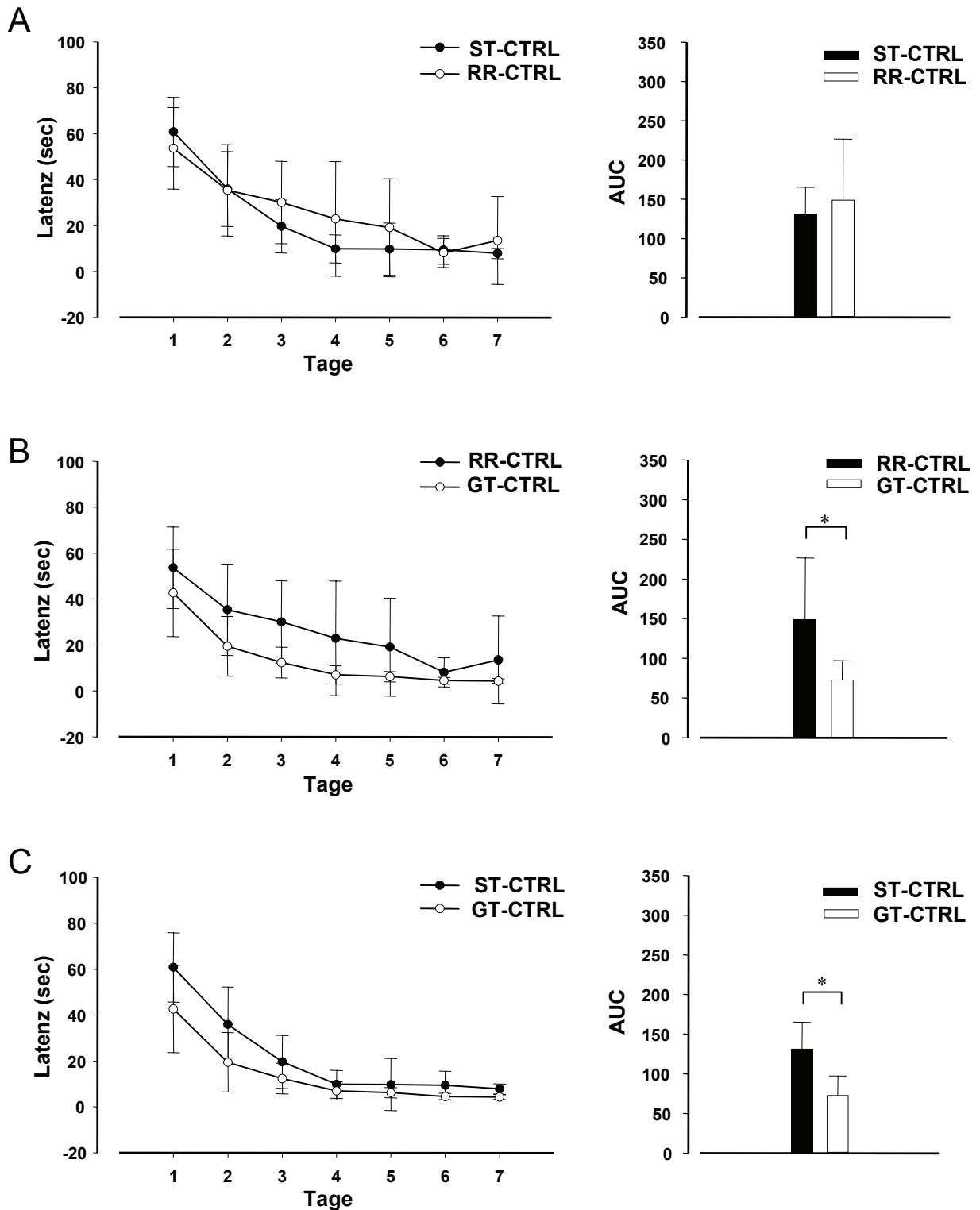


Abbildung 5.9. Analyse des räumlichen Lernvermögens im Wasserlabyrinth nach Morris zwischen den Kontrolltieren. In der linken Spalte sind die Lernkurven dargestellt und rechts daneben die jeweils zugehörigen Flächen unter den Kurven (AUC) [um so kleiner die AUC, desto besser das räumliche Lernvermögen]. **A:** Tiere unter Standardbedingungen und in reizreicher Umgebung unterscheiden sich in ihrem räumlichen Lernerfolg nicht signifikant. **B:** Greiftraining dagegen führt zum deutlich besseren räumlichen Lernvermögen im Vergleich zur reizreichen Umgebung und. **C:** im Vergleich zu den Tieren unter Standardbedingungen. Darstellung von Mittelwerten $\pm$ Standardabweichung, $^*(p < 0,05)$.

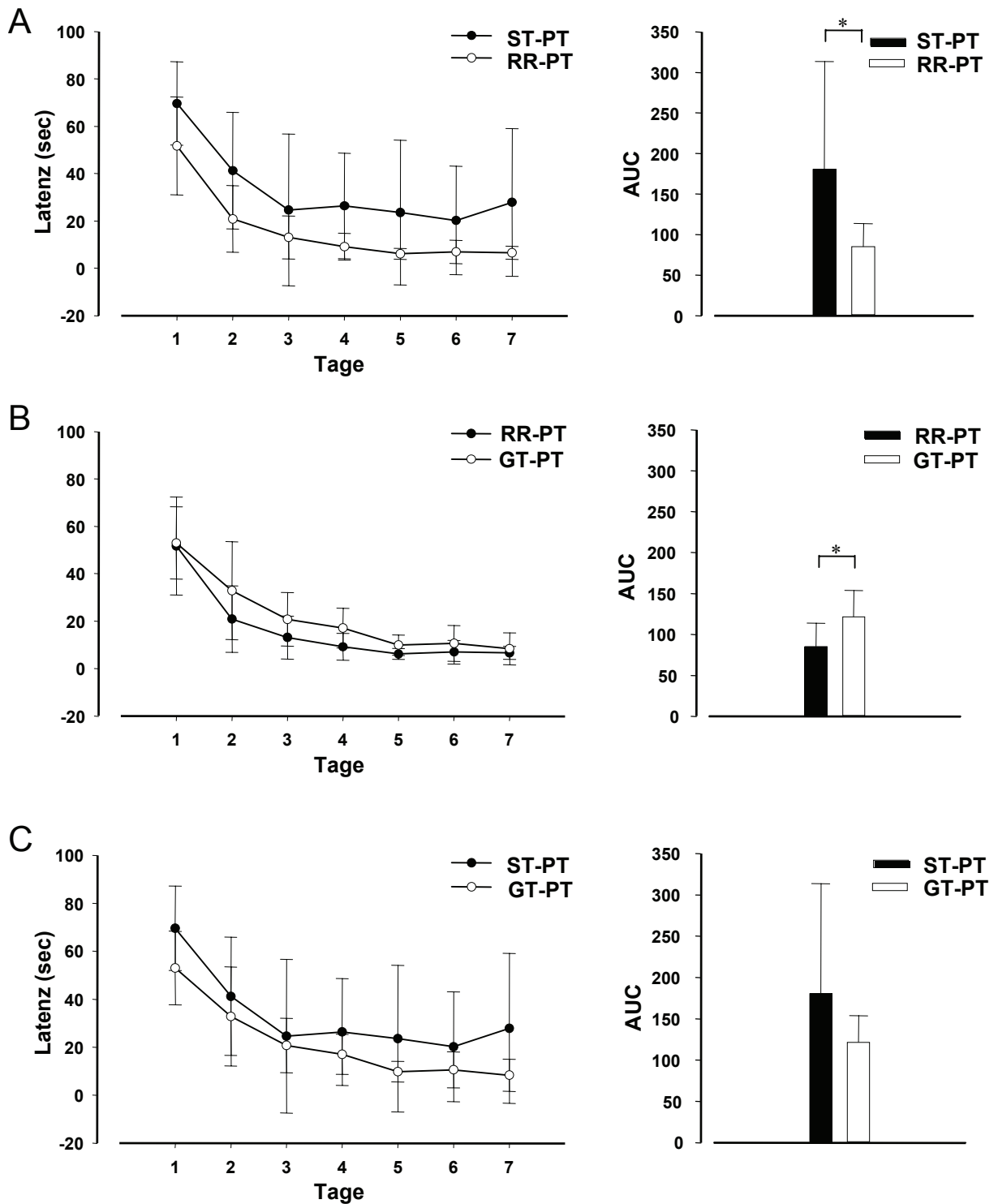


Abbildung 5.10. Analyse des räumlichen Lernvermögens im Wasserlabyrinth nach Morris zwischen den Photothrombositieren. In der linken Spalte sind die Lernkurven dargestellt und rechts daneben die jeweils zugehörigen Flächen unter den Kurven (AUC) [um so kleiner die AUC, desto besser das räumliche Lernvermögen]. **A:** Die Unterbringung in einer reizreichen Umgebung führt zu einem signifikant verbesserten räumlichen Lernvermögen im Vergleich zu den Tieren unter Standardbedingungen. **B:** Durch tägliches Greiftraining wird in der Wasserlabyrinthaufgabe eine signifikant bessere Leistung erreicht als durch den Aufenthalt in einer reizreichen Umgebung. **C:** Dagegen unterscheiden sich Standardbedingungen und Greiftraining nicht statistisch signifikant. Darstellung von Mittelwerten $\pm$ Standardabweichung, $^*(p < 0,05)$.

Tabelle 5.5. Korrelationsanalyse

		BrdU⁺ Zellen	BrdU⁺ Neurone	WL¹ (AUC)
BrdU⁺ Zellen	Korrelation nach Pearson	1	0,996(**)	-0,321(*)
	Signifikanz (2-seitig)		0,000	0,024
	N	49	49	49
BrdU⁺ Neurone	Korrelation nach Pearson	0,996(**)	1	-0,310(*)
	Signifikanz (2-seitig)	0,000		0,030
	N	49	49	49
WL¹ (AUC)	Korrelation nach Pearson	-0,321(*)	-0,310(*)	1
	Signifikanz (2-seitig)	0,024	0,030	
	N	49	49	49

** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant

¹ WL = Wasserlabyrinth

5.4.2. Sprossen-Lauf-Test

Die Sprossen-Lauf Aufgabe ist ein Test zur Evaluierung sensomotorischer Fähigkeiten anhand einer 7-stufigen Bewertungsskala. In der Baseline wurden die Tiere an den Test gewöhnt und trainiert den Balken weitgehend fehlerfrei zu passieren. Am 14. und 29. postoperativen Tag erfolgt eine Re-Evaluierung der sensomotorischen Leistung, wobei jede einzelne Pfote auf der Grundlage des prozentualen Fehlers pro Schritt bewertet wurde (Tab. 5.6., Abb. 5.11.).

Die Tiere in der reizreichen Umgebung überquerten an beiden Evaluierungstagen nahezu fehlerfrei den Balken. Bei Standardtieren und Greiftieren traten im wesentlichen die Defizite in der ipsi- und kontralateralen Hinterpfote auf, wobei die Greiftiere tendenziell sensomotorisch geschickter waren als die Standardtiere. Scheinoperierte Kontrollen und Läsionstiere unterschieden sich innerhalb der jeweiligen Experimentalgruppen nicht signifikant voneinander. Im folgenden sind die sensomotorischen Leistungen detailliert für jede einzelne Pfote beschrieben.

a) Kontralaterale Vorderpfote (= läsionierte Vorderpfote)

Sowohl 14 als auch 29 Tage nach Infarktinduktion zeigten sowohl scheinoperierte Kontrollen als auch Tiere mit kortikalen Infarkten, die in einer reizangereicherten Umgebung untergebracht waren, keinerlei Fehler beim

Überqueren des Balkens (Tab. 5.6., Abb. 5.11.). In der Gruppe der Standardtiere lag bei den Läsionstieren der prozentuale Fehleranteil pro Schritt am 14. postoperativen Tag bei $3,54 \pm 0,94 \%$ und war am 29. postoperativen Tag auf $1,68 \pm 1,68 \%$ gesunken. Die dazugehörigen Kontrolltiere überquerten den Balken am 14. postoperativen Tag fehlerfrei, wohingegen 29 Tage nach Infarktinduktion eine Fehlerrate von $0,79 \pm 0,79 \%$ auftrat, die aber unter dem Fehlerniveau der Läsionstiere ($1,68 \pm 1,68 \%$) lag. Die Greiftiere nahmen eine Mittelposition ein, d.h. sie zeigten eine bessere Leistung als die Standardtiere, waren aber sensomotorisch nicht so geschickt wie die Tiere in der reizreichen Umgebung.

b) Ipsilaterale Vorderpfote

Die sensomotorische Geschicklichkeit der ipsilateralen Vorderpfote (Tab. 5.6., Abb. 5.11.) präsentierte sich in den 3 Experimentalgruppen ähnlich der kontralateralen Vorderpfote. Auch hier zeigten die Tiere der reizreichen Umgebung weder am 14. noch am 29. postoperativen Tag einen Fehler beim Überqueren des Balkens. Am 14. postoperativen Tag lag der prozentuale Fehleranteil pro Schritt bei Standardtieren und Greiftiere annähernd gleich bei 1% , wobei 29 Tage nach Infarktinduktion die Greiftiere sensomotorisch tendenziell besser waren.

c) Kontralaterale Hinterpfote

Mit den Hinterpfoten wird das Gleichgewicht ausbalanciert. Hier zeigten die Tiere der reizreichen Umgebung sowohl am 14. als auch am 29. postoperativen Tag die größten sensomotorischen Fertigkeiten bei einem etwa 1 bis 2% igen Fehleranteil pro Schritt, der sich auch signifikant von Standard- und Greiftieren unterschied (Tab. 5.6., Abb. 5.11.). Unter Standardbedingungen lag die Fehlerrate am 14. postoperativen Tag sowohl bei den Tieren mit kortikalen Infarkten als auch bei den Kontrollen bei ca. 7% pro Schritt. Die geringste motorische Fertigkeit zeigten die läsierten Greiftiere mit einer Fehlerrate von $24,30 \pm 2,83 \%$ pro Schritt. Die dazugehörigen Kontrolltiere hingegen befanden sich auf einem Fehlerniveau von ca. 3 bis 4% . 29 Tage nach Infarktinduktion wiesen die Tiere der reizreichen Umgebung nach wie vor die geringste prozentuale Fehlerquote beim Überqueren des Balkens auf, gefolgt von den Kontrolltieren der Greiftiergruppe. Die Läsionstiere der Greiftiergruppe waren mit einer Fehlerrate von 21% auch am 29. postoperativen Tag die Gruppe, die am wenigsten das Gleichgewicht ausbalancieren konnte. Innerhalb der Standardgruppe waren die Kontrolltiere tendenziell besser als die Läsionstiere. Insgesamt zeigten die Standardtiere eine geringere motorische Geschicklichkeit als

die Tiere der reizreichen Umgebung jedoch eine bessere als die Greiftiere nach ischämischer Läsion.

d) Ipsilaterale Hinterpfote

Die motorische Leistung der ipsilateralen Hinterpfote (Tab. 5.6., Abb. 5.11.) aller 3 Experimentalgruppen stellte sich annähernd parallel jedoch auf einem niedrigeren Fehlerniveau zu den Leistungen der kontralateralen Hinterpfote dar. Die Tiere der reizreichen Umgebung konnten sowohl am 14. als auch am 29. postoperativen Tag ihr Gleichgewicht auf der Leiter am besten ausbalancieren, gefolgt von den Standardtieren. Für die Greiftiere hingegen erwies es sich als schwieriger den Balken zu überqueren.

Zusammenfassend lassen sich aus der detaillierten Einzelanalyse der 4 Pfoten folgende Rückschlüsse ziehen: die Tiere, die in einer reizangereicherten Umgebung für 42 Tage gelebt haben, d.h. die kontinuierlich die Möglichkeit für aktive motorische Betätigungen hatten, zeigte insgesamt die beste motorische Leistung und konnten auch am besten ihr Gleichgewicht ausbalancieren. Tiere, die täglich für kurze Zeit sensomotorisch mit der Vorderpfote trainiert wurden, zeigten gegenüber den Tieren der reizreichen Umgebung tendenziell eine schlechtere motorische Fertigkeit sowie ein weniger stabiles Gleichgewicht beim Überqueren des Balkens. Die Standardtiere die ohne zusätzliche motorische Betätigung in ihren Käfigen untergebracht waren, zeigten mit den Vorderpfoten tendenziell die schlechteste Leistung. Das Gleichgewicht hingegen konnte jedoch besser als bei den Greiftieren ausbalanciert werden. Zusammenfassend kann man davon ausgehen, dass kontinuierliche motorische Aktivität in der vorliegenden Studie zu den besten Leistungen im Sprossen-Lauf-Test führte.

Tabelle 5.6. Sprossen-Lauf-Test, Quantifizierung der prozentualen Fehlerrate pro Schritt am 14. und 29. postoperativen Tag

		Standard		Reizreiche Umgebung		Greiftraining	
		14. DPO	29.DPO	14. DPO	29.DPO	14. DPO	29.DPO
		(n=7)		(n=9)		(n=8)	
PT	i HP ¹	4,61 ± 1,76	1,97 ± 1,27	0,69 ± 0,69	0,69 ± 0,69	4,73 ± 1,90	7,68 ± 2,71
	k HP ²	7,21 ± 2,35	7,46 ± 3,97	1,60 ± 1,10	1,85 ± 1,85	24,30 ± 2,83	21,69 ± 5,91
	i VP ³	1,37 ± 0,90	0,84 ± 0,84	0 ± 0	0 ± 0	1,16 ± 0,76	0,63 ± 0,63
	k VP ⁴	3,54 ± 0,94	1,68 ± 1,68	0 ± 0	0 ± 0	2,65 ± 1,36	1,44 ± 0,95
		(n=7)		(n=8)		(n=10)	
CTRL	i HP ¹	2,27 ± 1,53	4,94 ± 2,50	0,89 ± 0,84	2,45 ± 1,74	6,21 ± 1,91	4,18 ± 1,17
	k HP ²	6,72 ± 2,17	4,29 ± 2,30	0,83 ± 0,79	0 ± 0	3,16 ± 1,73	3,60 ± 1,57
	i VP ³	1,10 ± 1,10	1,35 ± 0,91	0 ± 0	0 ± 0	1,06 ± 0,70	0,45 ± 0,45
	k VP ⁴	0 ± 0	0,79 ± 0,79	0 ± 0	0 ± 0	1,59 ± 1,20	0,99 ± 0,67

(Angaben von Mittelwert ± Standardfehler in %)

¹i HP = ipsilaterale Hinterpfote²k HP = kontralaterale Hinterpfote³i VP = ipsilaterale Vorderpfote⁴k VP = kontralaterale Vorderpfote

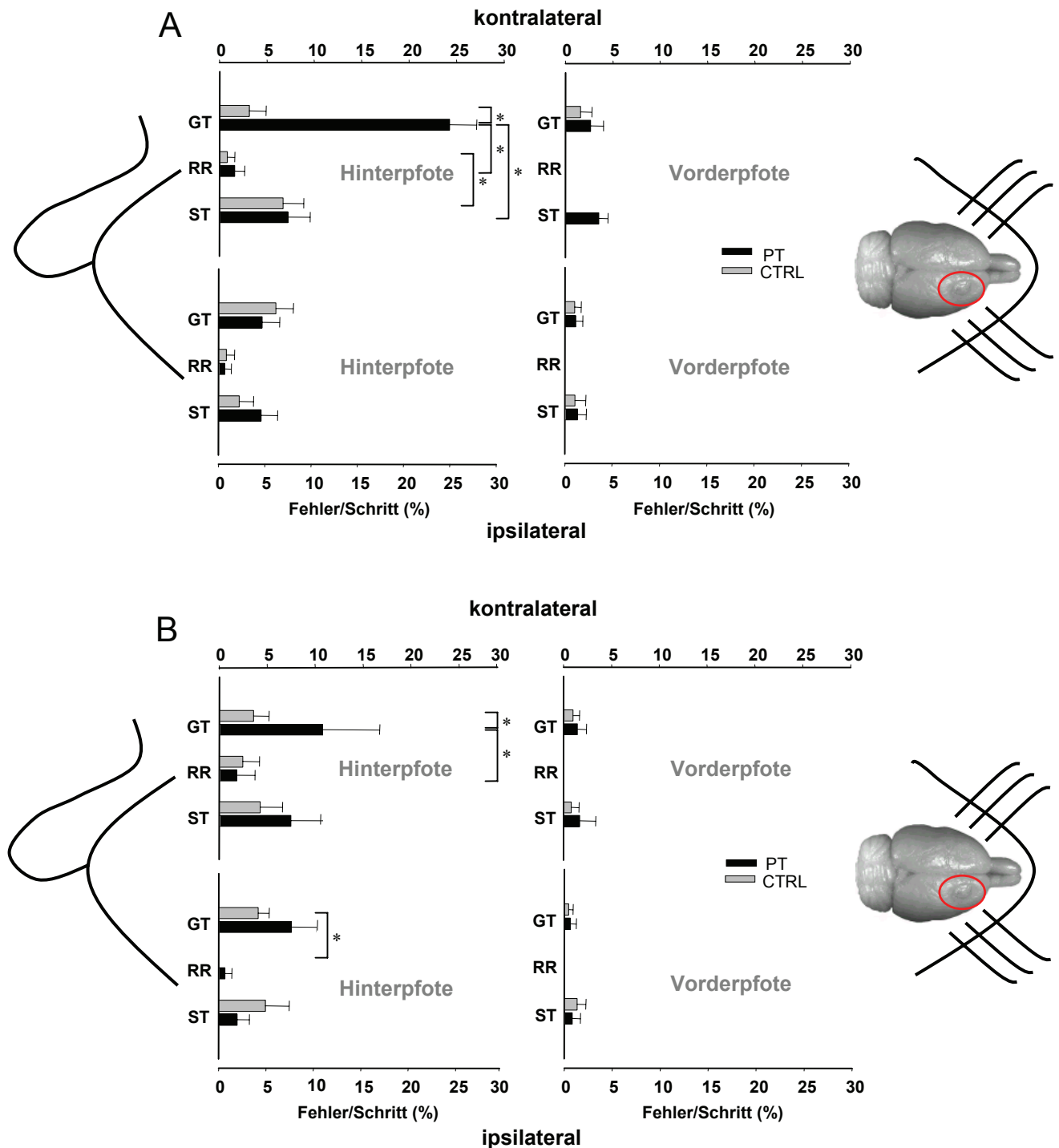


Abbildung 5.11. Analyse der sensomotorischen Fähigkeiten im Sprossen-Lauf-Test. **A:** 14. postoperativer Tag: Keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der sensomotorischen Geschicklichkeit der betroffenen Vorderpfote (Diagramm rechts oben). Tendenziell zeigen Tiere in reizreicher Umgebung die beste sensomotorische Leistung. **B:** 29. postoperativer Tag: Keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der sensomotorischen Geschicklichkeit der betroffenen Vorderpfote (Diagramm rechts oben). Sowohl am 14. als auch am 29. postoperativen Tag zeigen sich keine erheblichen sensomotorischen Unterschiede mit der betroffenen Vorderpfote. Dagegen werden zwischen den Experimentalgruppen deutliche Differenzen beim Gebrauch der kontralateralen Hinterpfote, die u.a. auch für die Balance verantwortlich ist, beobachtet. Darstellung von Mittelwerten $\pm$ Standardfehler, $^*(p < 0,05)$.

6. Diskussion

Mit der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass sowohl tägliches Greiftraining als auch die Unterbringung in einer reizreichen Umgebung die Neurogenese im Gyrus dentatus nach fokalen Hirninfarkten steigerte. Das Ausmaß der Neurogenese unterschied sich zwischen beiden Aktivitätsgruppen nicht wesentlich voneinander. Die neuronale Differenzierung war allerdings durch Greiftraining leicht gesteigert. Interessanterweise steigerte tägliches sensomotorisches Vorderpfotenttraining bei Tieren ohne einen Hirninfarkt die Neurogenese am deutlichsten und führte zu einer Verdopplung der neuen Nervenzellen. Hingegen konnten zwischen den Tieren der reizreichen Umgebung und denen, die unter Standardbedingungen gehalten wurden, keine Unterschiede in der Zahl der neuen Nervenzellen beobachtet werden. Die Zahl der neuen Nervenzellen korrelierte mit der Leistung im Wasserlabyrinth nach Morris, einem Test zur Bewertung der kognitiven Fähigkeiten. Die Tiere ohne Infarkt, die tägliches Greiftraining erhielten, zeigten entsprechend den größten Lernerfolg. Im Gegensatz dazu waren die Tiere aus der reizreichen Umgebung im Sprossen-Lauf-Test, einem Test zur Evaluierung sensomotorischer Fertigkeiten, den Tieren, die tägliches Greiftraining erhielten, tendenziell motorisch überlegen.

6.1. Auswirkung von körperlicher Aktivität auf Neurogenese nach fokalen Hirninfarkten

Mit unserer Untersuchung konnte gezeigt werden, dass durch körperliche Aktivität die Neurogenese im Gyrus dentatus nach kortikalen Infarkten gesteigert werden kann.

Hong und Mitarbeiter (2004) untersuchten den Einfluss einer reizangereicherten Umgebung und täglicher sensomotorischer Aktivität im Laufrad auf endogene Vorläuferzellen im Gyrus dentatus bei Ratten nach Okklusion der A. cerebri media (MCAO). Nach einem Beobachtungszeitraum von 8 Wochen zeigte sich analog zu unserer Studie ein deutlich gesteigertes Zellüberleben und eine vermehrte neuronale Differenzierung durch körperliche Aktivität. Eine weitere Studie von Briones und Mitarbeiter (2005) beschäftigte sich mit dem Einfluss körperlicher

Aktivität auf die Neurogenese im Gyrus dentatus nach globaler Ischämie. Die Einteilung der Experimentalgruppen war nahezu mit unserer Studie identisch, wobei anstelle von Greiftraining täglich im Laufrad trainiert wurde. Im Gegensatz zu unserer Untersuchung wurde in der reizreichen Umgebung neben zahlreichen Explorationsobjekten ein Laufrad integriert. In dieser Studie bewirkte körperliche Aktivität nach zerebraler Ischämie keine Steigerung der Neurogenese. Da die Tiere allerdings nahezu im gesamten Verlauf des Experimentes BrdU-Injektionen erhielten und schon nach 18 Tagen immunhistochemisch aufgearbeitet wurden, war der Beobachtungszeitraum zu kurz, um das Ausmaß der einige Wochen dauernden Differenzierung zu reifen Neuronen (Cameron et al., 1993, Hasting & Gould, 1999, Markakis & Gage, 1999) zu beurteilen. Es wurde somit im wesentlichen gezeigt, dass physische Aktivität die Proliferation der Vorläuferzellen nicht beeinflusst. Diese Befunde stehen im Einklang mit ergänzenden Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe (Grass et al., 2004, Wurm et al., 2004), aus denen hervorgeht, dass sich die Zahl der Vorläuferzellen und immaturer neuronaler Zellen 10 Tage nach dem Infarkt zwischen körperlicher Aktivität und Standardbedingungen nicht unterscheiden. Zusammen mit den Untersuchungen von Briones et al. legen diese Befunde nahe, dass körperliche Aktivität nach einem ischämischen Insult nicht die Proliferation der Vorläuferzellen, sondern überwiegend das Überleben und zum Teil auch die neuronale Differenzierung beeinflusst.

Komitova et al. (2002) untersuchten an adulten männlichen Ratten den Effekt einer reizangereicherten Umgebung auf die endogenen Vorläuferzellen im Gyrus dentatus nach kortikalen Infarkten am Modell der MCAO. Die reizreiche Umgebung war mit zahlreichen Explorationsobjekten ausgestattet, enthielt aber kein Laufrad. Mit diesem experimentellen Ansatz zeigte sich lediglich eine veränderte Gliogenese. Nach 35 Tagen war durch unspezifische körperliche Aktivität die Neubildung von Gliazellen gegenüber Standardbedingungen gesteigert. Eine Steigerung der Neurogenese nach fokalen Hirninfarkten konnte hingegen nicht beobachtet werden. Trotz eines ähnlich angelegten Studiendesigns fand sich in unserer Studie ein eindeutiger Anstieg der Neurogenese durch eine reizangereicherte Umgebung nach zerebraler Ischämie. Diese unterschiedlichen Befunde im Vergleich zu unserer Studie könnten zum einen auf das andere Ischämiemodell, aber auch auf genetische Unterschiede in den Rattenspezies (Kempermann et al., 1997a) und nicht zuletzt auf die variierende Ausstattung der reizreichen Umgebung, die keine standardisierte

Behausungsform darstellt, zurückgeführt werden.

Der Einfluss von Aktivität auf die Neurogenese im Gyrus dentatus unter physiologischen Bedingungen wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht (Kempermann et al., 1997b, 1998a, b, van Praag et al., 1999a, b). Die aktivitätsabhängige Regulation adulter Neurogenese ist ein komplexer Prozess, der genetischer Disposition unterliegt (Kempermann et al., 1997a; 1998a) und durch verschiedene intrinsische und extrinsische Stimuli beeinflusst wird. Kempermann's Studien zählen zu den ersten Arbeiten (Kempermann et al., 1997b, 1998a, b), die zeigten, dass adulte Neurogenese im Gyrus dentatus bei Säugern durch Umweltreize stimulierbar ist und das Ausmaß der adulten Neurogenese mit Lernparametern assoziiert. In diesen Untersuchungen wurden Mäuse in einer reizangereicherten Umgebung gehalten, die mehr Bewegungsraum und Laufräder für eine höhere physische Aktivität sowie zahlreiche Objekte zur Exploration und größere Gruppen zur Stärkung der sozialen Interaktion bot. Sowohl bei jungen (Kempermann et al., 1997b) als auch bei adulten (Kempermann et al., 1998b) Tieren war die Neurogenese im Gyrus dentatus gegenüber den Tieren unter Standardbedingungen deutlich gesteigert. Dieser Effekt ließ sich nicht auf eine gesteigerte Proliferation der Vorläuferzellen zurückführen, sondern es war vielmehr ein verbessertes Überleben neuentstandener Zellen festzustellen. In weiteren Untersuchungen wurden Mäuse in reizreicher Umgebung gehalten, danach aber für 3 Monate in den Standardkäfig zurückgesetzt (Kempermann & Gage, 1999). Auf Entzug der komplexen Stimuli zeigten die Mäuse erneut eine Zunahme der proliferierenden Zellen im Gyrus dentatus gegenüber den Kontrollen und den Tieren, die 6 Monate in der reizreichen Umgebung lebten. Der überlebensfördernde Effekt der reizreichen Umgebung scheint somit nicht nur auf potentiell neue Nervenzellen zu wirken, sondern auch auf Stamm- und Vorläuferzellen. Dabei spielt die Neuartigkeit des Stimulus eine entscheidende Rolle.

Da die reizangereicherte Umgebung aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Stimuli besteht, stellt sich die Frage, welche dieser Reize für die Auslösung des stimulierenden Effektes auf die Neurogenese von Bedeutung sind. Van Praag und Mitarbeiter (van Praag et al., 1999b) untersuchten in einer weiteren Studie, inwiefern Lauftraining allein die Neurogenese beeinflusst. Dabei zeigten Mäuse, die ungehinderten Zugang zum Laufrad in einem spartanisch eingerichteten Standardkäfig (ohne weitere Explorationsmöglichkeiten und soziale Interaktionen)

hatten, eine Verdopplung der proliferierenden Zellen im Gyrus dentatus im Vergleich zu den Tieren in der reizreichen Umgebung mit integriertem Laufrad. Das Überleben proliferierender Zellen und damit die Neurogenese waren somit durch freiwilliges Laufen im Laufrad weit mehr erhöht als durch eine Aktivierung in der reizreichen Umgebung. Diese Befunde werfen die Fragen auf, ob motorische Aktivität der wesentliche Regulator der Neurogenese in einer reizangereicherten Umgebung mit größerem Lebensraum und vielfältigen Explorationsmöglichkeiten in sozialer Interaktion ist.

Der von Kempermann und van Praag beschriebene neurogenesesteigernde Effekt durch eine reizreiche Umgebung konnte in unserer Studie nicht repliziert werden. A priori könnte dieser konträre Befund allein darauf zurückgeführt werden, dass in unserer Arbeit kein Laufrad in die reizreiche Umgebung integriert wurde. Der Vergleich der drei Kontrollgruppen zeigte, dass sich Tiere unter Standardbedingungen und in reizreicher Umgebung hinsichtlich der Neurogenese nicht unterschieden. Dagegen war die Neurogenese durch tägliches Greiftraining, einer täglichen wenige Minuten andauernden sensomotorischen Aktivierung, eindeutig sowohl gegenüber den Standardbedingungen als auch gegenüber der reizreichen Umgebung gesteigert. Sensomotorisches Training war demnach ein effektiver Stimulus der hippocampalen Neurogenese. Hingegen bewirkte lediglich ein größerer Lebensraum mit Explorationsoptionen und sozialer Interaktion unter physiologischen Bedingungen noch keinen neurogenesesteigernden Effekt im Gyrus dentatus. Bereits Ferchmin, Rosenzweig und Renner (Ferchmin & Bennett, 1975; Rosenzweig et al., 1978; Renner & Rosenzweig, 1987) haben beschrieben, dass weder visuelle Stimulationen noch soziale Interaktion den Einfluss einer reizreichen Umgebung auf die zelluläre Plastizität erklären können. Es ist unbestritten, dass eine reizreiche Umgebung positiv auf die Funktionserholung bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen wirkt (Johannsson & Ohlson, 1996), die kognitive Leistungsfähigkeit (Doty, 1972, Greenough et al., 1979; Mohammed et al., 1990, Janus et al., 1995, Nilsson et al., 1999) verbessert und auch die neurale Plastizität fördert (Bennett et al., 1964, Diamond et al., 1964, Diamond et al., 1966, Greenough & Volkmar, 1973, Black et al., 1987, Beaulieu & Colonnier, 1989, Sirevaag & Greenough, 1991, Jones & Greenough, 1996). Um jedoch einen neurogenesesteigernden Effekt zu erzielen, reichen scheinbar eine größere Behausungsform mit Explorationsobjekten und sozialer Interaktion noch nicht aus,

sondern hier scheint primär motorische körperliche Aktivität von Bedeutung zu sein. Zu den gut untersuchten sensomotorischen Aktivitäten zählt das Lauftraining. Studien der Neurogenese in Verbindung mit sensomotorischen Greiftraining sind dagegen rar. Obwohl beide Trainingsformen unter sensomotorischer körperlicher Aktivität subsumiert werden können, bleibt es offen, inwieweit die bereits erhobenen Befunde zum Lauftraining auf das Greiftraining übertragbar sind bzw. ob Lauftraining und Greiftraining einen ähnlich starken Stimulus auf die Neurogenese haben.

Es ist bekannt, dass unter physiologischen Bedingungen physische Aktivität die Neurotrophinausschüttung fördert (Mac Rae et al., 1987, Fordyce & Farrar, 1991, Neeper et al., 1995, 1996, Gomez-Pinilla et al., 1997, 1998, 2002, Vaynman et al., 2003, 2004). Zu den bereits in zahlreichen Arbeiten untersuchten Neurotrophinen zählen BDNF, FGF-2 und NGF (Neeper et al., 1996, Oliff et al., 1998, Gomez-Pinilla et al., 1997), deren Ausschüttung überwiegend im Hippocampus durch körperliche Aktivität gefördert wird. Mit weiteren Studien konnten gezeigt werden, dass BDNF die adulte Neurogenese steigert (Benraiss, 2001, Pencea, 2001), die Funktion und das Überleben von Neuronen unterstützt (Neeper et al., 1995) und durch seinen retrograden Transport vom Hippocampus den Erhalt cholinergischer Neurone fördert (Morse et al., 1993, Widmer et al., 1993, Neeper et al., 1995), um somit einen effektiven Beitrag zum Schutz vor Degeneration und Verletzungen zu leisten. Ferner gehen Kitamura und Mitarbeiter (Kitamura et al., 2003) davon aus, dass die neurogenesesteigernde Wirkung durch körperliche Betätigung auf einem BDNF-vermittelten Effekt beruht, der vermutlich über NMDA-Rezeptoren gesteuert wird. Was bislang aber noch ungeklärt bleibt, ist, inwieweit sich die BDNF Ausschüttung zwischen rein motorischer Aktivität und reizreicher Umgebung ohne Laufrad unterscheidet. Neben einem Neurotrophin-vermittelten Einfluss auf die Neurogenese könnte körperliche Aktivität aber auch über Serotonin-getriggerte Effekte (Jakobs & Fornal, 1997, Gould, 1999, Brezun & Daszuta, 1999, 2000) auf die Teilungsaktivität von Vorläuferzellen in der subgranulären Zone wirken und somit die Neurogenese erhöhen. Deisseroth und Mitarbeiter (2004) gelang es, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu zeigen, dass exzitatorische Stimuli, vermittelt über Calcium-Kanäle, unmittelbar an neuronalen Vorläuferzellen wirken und durch die Expression neuronaler Regulatorgene und Inhibition glialer Regulatorgene die Neurogenese fördern. Es besteht demnach unter physiologischen Bedingungen eine direkte Kopplung von exzitatorischer neuraler Aktivität und Neurogenese.

Welche Mechanismen regulieren aber die Neurogenese unter pathophysiologischen Bedingungen? Der bereits in zahlreichen Studien beschriebene neurogenesesteigernde Effekt der Ischämie (Liu et al., 1998, Takagi et al., 1999, Jin et al., 2001, Kee et al., 2001, Yagita et al., 2001, Arvidsson et al., 2002, Nakatomi et al., 2002,) konnte in der Gruppe, der im Standardkäfig untergebrachten Tiere, nicht gezeigt werden. Argumente für diese zunächst gegensätzlichen Resultate könnten auf das Ischämiemodell zurückgeführt werden. Durch die Okklusion der Arteria cerebri media (MCAO) wird ein weitaus größeres Areal im Gehirn infarziert im Vergleich zur Photothrombose und die globale Ischämie führt zu einer Schädigung im Hippocampus, speziell in der CA1 Region (Hunter et al., 1995, Kokaia & Lindvall, 2003). Das von uns verwandte Photothrombosemodell induziert kleine engumschriebene kortikale Infarkte, wovon sich die Tiere schnell erholen. Im Vergleich zur MCAO ist durch eine photothrombotische Läsion die Schädigung des umgebenden Gewebes weitaus geringer (Redecker et al., 2002, Frahm et al., 2004). Weitere Studie unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass sich das Ausmaß der hippocampalen Neurogenese durch photothrombotische Infarkte im sensomotorischen Vorderpfotenkortex geringer darstellt als im sensomotorischen Hinterpfotenkortex (Kluska et al., 2005). Ferner könnten die abweichenden Daten aber auch auf unterschiedliche BrdU-Applikationsprotokolle zurückgeführt werden, da für die Vergleichbarkeit von Befunden Applikationszeitraum und BrdU-Dosis von entscheidender Bedeutung sind.

Interessanterweise zeigte unsere Studie, dass zum einen tägliches sensomotorisches Vorderpfotentraing nach dem Infarkt die Neurogenese deutlich steigerte, zum anderen aber die Neurogenese durch Greiftraining noch weitaus mehr gesteigert werden konnte, wenn keine Ischämie induziert wurde. Infarkte scheinen die aktivitätsabhängige zelluläre Plastizität im Gyrus dentatus zu hemmen. Möglicherweise spielen inflammatorische Prozesse als Inhibitoren der Neurogenese nach Photothrombose eine wichtige Rolle. Es ist bekannt, dass Entzündungsprozesse im Mikromilieu der endogenen neuralen Stammzellen die Neurogenese inhibieren (Ekdahl et al., 2003, Monje et al., 2003). Mikrogliazellen, die Mediatoren der zerebralen Inflammation, werden durch ischämische Infarzierung aktiviert, wobei ihre schädigende Wirkung auf massive Zytokinausschüttung (u.a. IL-1, IL-6, TNF α) zurückzuführen ist (Giulian & Vaca, 1993, Giulian et al., 1994, Gebicke-Haerter, 2001). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass durch die

Verabreichung des nicht-steroidalen-antiinflammatorischen Medikaments Indometazin die Aktivierung der Mikrogliazellen deutlich minimiert werden konnte (Ek Dahl et al., 2003, Monje et al., 2003). Kluska et al (2005) beobachteten nach kortikalen photothrombotischen Infarkten eine gegenüber unbehandelten infarzierten Tieren eindeutige Verdopplung der Neurogenese durch die Applikation des COX I-Inhibitors Indometazin. Neben den inflammatorischen Prozessen könnte auch ein NMDA-Rezeptor vermittelter Mechanismus an der Regulation der Neurogenese nach kortikaler Ischämie beitragen. Da jedoch die zugrundeliegenden Mechanismen an der Regulation der Neurogenese sowohl unter physiologischen als auch unter pathophysiologischen Bedingungen noch nahezu unverstanden sind, bedarf es noch weiterer Untersuchungen zur detaillierten Klärung der regulierenden Einflüsse bei der Bildung neuer Nervenzellen, insbesondere auf molekulargenetischer Ebene.

6.2. Funktionelle Auswirkungen einer gesteigerten Neurogenese im Gyrus dentatus

Die von Morris 1984 entwickelte Wasserlabyrinthaufgabe, die zur funktionellen Bewertung der Hippocampusformation weit etabliert ist, dient zur Evaluierung des räumlichen Lernens und Gedächtnisses bei Laborratten. Das räumliche Gedächtnis wird unter der großen Gruppe des deklarativen Gedächtnisses subsumiert (Steffenach et al., 2005). Im Gegensatz zum prozeduralen Gedächtnis beruht die Funktion des deklarativen Gedächtnisses überwiegend auf den Strukturen des Hippocampus (Birbaumer & Schmidt, 1997). Nach gegenwärtigem Verständnis spielt der Hippocampus (O'Keefe & Nadel, 1978, Morris et al., 1982, Brandeis et al., 1989, Benhamou & Poucet, 1996, Bures et al., 1997, Silva et al., 1998, Ekstrom et al., 2003) und speziell auch der Gyrus dentatus (Eichbaum et al., 1999) sowie der entorhinale Kortex (McClelland et al., 1995, Steffenach et al., 2005), als Verbindung zwischen Hippocampus und Kortex, eine wichtige Rolle in der Ausbildung des räumlichen Gedächtnisses. Zahlreiche Studien legen nahe, dass sowohl globale Hippocampusläsionen (Morris et al., 1982; Mumby et al., 1999, Debiec et al., 2002) als auch lediglich eine Läsion des Gyrus dentatus (McNaughton et al., 1989, Xavier et al., 1999, Gilbert et al., 2001) oder des entorhinalen Kortex (Steffenach et al., 2005) zu ausgeprägten Defiziten im Aufbau des räumlichen Gedächtnisses und Lernens führen. Trotz umfangreicher wissenschaftlicher Bemühungen sind zum

jetzigen Zeitpunkt die genaue Funktion der Hippocampusformation bei Gedächtnis- und Lernprozessen und die dabei zugrundeliegenden Mechanismen noch nicht vollständig verstanden.

Unsere Befunde zeigen eine gute Korrelation der Zahl der neuen Nervenzellen mit der Leistung im Wasserlabyrinth. Als Maß für den räumlichen Lernerfolg haben wir in unserer Studie die Latenz bis zum Erreichen der Plattform verwendet. Die Tiere mit den meisten neuen Nervenzellen zeigten die beste Leistung im Morris Wasserlabyrinth, indem sie schneller die Plattform erreichten.

Unter physiologischen Bedingungen ist diese korrelative Beziehung zwischen kognitivem Lernvermögen im Wasserlabyrinth und Neurogenese bereits in zahlreichen Arbeiten untersucht worden (Kempermann et al., 1997b, 1998a, b, van Praag et al., 1999a; Drapeau et al., 2003). Kempermann zeigte, dass sowohl bei jungen (Kempermann et al., 1997b) als auch adulten (Kempermann et al., 1998b) Mäusen, die in einer reizreichen Umgebung untergebracht waren, die Zahl der neuen Nervenzellen mit der Leistung im Wasserlabyrinth korrelierte. Neben Kempermann fanden auch van Praag und Mitarbeiter (1999a), dass eine gesteigerte Neurogenese durch motorische Aktivität in Form von Lauftraining zur verbesserten Leistung im Wasserlabyrinth führte. Bereits aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass eine reizreiche Umgebung die räumliche Orientierung verbessert (Pacteau et al., 1989; Wainwright et al., 1993) und dass physische Aktivitäten kognitive Funktionen begünstigen (Blomquist & Danner, 1987, Fordyce & Wehner, 1993, Kramer et al., 1999). Mit der vorliegenden Studie ist es uns gelungen, den bereits unter physiologischen Bedingungen mehrfach beschriebenen korrelativen Zusammenhang zwischen Neurogenese und räumlichem Lernerfolg im Morris Wasserlabyrinth, erstmals auch unter pathophysiologischen Bedingungen zu zeigen.

Das Ausmaß der Neurogenese und die Leistung im Wasserlabyrinth hatte in den bisherigen Untersuchungen lediglich korrelativen Charakter. Inwieweit sind nun aber neue Neurone im Gyrus dentatus direkt an der Modulation von Gedächtnisfunktionen beteiligt? Vorläuferzellen aus der Subgranulärzone migrieren zur Körnerzellschicht, entwickeln morphologische und biochemische Eigenschaften maturer Neurone und werden unter physiologischen Bedingungen funktionell in die existierenden Schaltkreise integriert (Cameron et al., 1993, Hasting & Gould, 1999, Markakis & Gage, 1999, Carlen et al., 2002, van Praag et al., 2002). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass die neuen Nervenzellen an einigen

Formen hippocampusabhängiger Lernprozesse beteiligt sind (Shors et al., 2001, Madsen et al., 2003, Raber et al., 2004, Snyder et al., 2005). Es ist denkbar, dass durch den Einbau dieser neuen funktionellen Neurone in existierende Schaltkreise die zelluläre Plastizität durch neue synaptische Verbindungen erweitert wird und diese somit die Aufnahme neuer Informationen in das Gedächtnis unterstützen (Wang et al., 2000, Snyder et al., 2001, van Praag et al., 2002, Schmidt-Heiber et al., 2004). Der Beweis für die funktionelle Relevanz der neuen Nervenzellen an der Gedächtnisformation bleibt bisweilen offen. Ein experimenteller Ansatz, der gezielt neue Nervenzellen mit ihren synaptischen Verbindungen ausschalten würde, ohne dabei die bestehende neuronale Plastizität zu alterieren, könnte uns der Antwort dieser Frage ein Stück näher bringen.

Ein nicht berücksichtigtes Kriterium in unserer Auswertung des Wasserlabyrinthes ist die Schwimmgeschwindigkeit. Hypothetisch könnte man zum einen davon ausgehen, dass die Schwimmgeschwindigkeit bei den infarzierten Tieren aufgrund der beeinträchtigten motorischen Pfotenfunktion geringer ist im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren. Zum anderen könnte aber auch die Schwimmgeschwindigkeit im Sinne einer sensomotorischen Komponente erklären, warum kontinuierliche physische Aktivität zu einer besseren Leistung im Wasserlabyrinth führt. Kritisch betrachtet, stellt sich die Frage, welchen Einfluss die Motorik auf die Leistung im Wasserlabyrinth hat und ob es sich wirklich nur um einen rein kognitiven Test handelt. Ist demnach das Morris Wasserlabyrinth ein geeigneter Test zur Beurteilung des räumlichen Lernvermögens und sind die nicht-kognitiven Faktoren lediglich als ein vernachlässigbares Epiphänomen zu werten? Bereits Kempermann (Kempermann et al., 1998a) schloss eine Beteiligung physischer Faktoren in der Wasserlabyrinthaufgabe nicht aus. Evaluierung von Geschwindigkeit und Distanz aber auch ein detailliertes Verständnis der hippocampalen Funktion könnten diese Frage klären. Nach gegenwärtigem Wissensstand gilt die Wasserlabyrinthaufgabe als ein weit etablierter Test zur Prüfung des räumlichen Gedächtnisses.

Unsere Untersuchungsbefunde im Sprossen-Lauf-Test, einem Test, der nicht die hippocampale Funktion, sondern die sensomotorischen Fertigkeiten einschätzt, zeigten, dass kontinuierlicher Zugang zu einer reizangereicherten Umgebung die motorische Funktionserholung tendenziell begünstigte. Die detaillierte statistische Analyse der Pfoten im Sprossen-Lauf-Test nach photothrombotischer Infarzierung

ergab sowohl am 14. als auch am 29. postoperativen Tag weder einen signifikanten Unterschied zwischen ipsi- und kontralateralen Pfoten noch zwischen den Gruppen. Ein Nachteil sensomotorischer Verhaltenstests ist, dass Tiere nach einem gewissen postischämischen Zeitfenster beginnen, ihre Defizite zu kompensieren und es somit deutlich schwieriger ist, bestehende Beeinträchtigungen aufzudecken (Riek-Burchardt et al., 2004, Metz et al., 2005). Mehrere Studien deuten darauf hin, dass die Pfotenfunktion bereits innerhalb von 1 bis 2 Wochen nach ischämischer Läsion wieder hergestellt ist (Moyanova et al., 2003, Riek-Burchardt et al., 2004). Da auf der Grundlage dieser Studien davon auszugehen ist, dass 2 Wochen postoperativ (unser erster Zeitpunkt zur Re-Evaluierung der sensomotorischen Fertigkeiten) schon Erholung oder Kompensation der Defizite soweit eingetreten sind, scheint der Sprossen-Lauf-Test nicht mehr sensibel genug zu sein, bestehende Defizite aufzudecken und statistisch zu manifestieren. Unsere Befunde im Sprossen-Lauf-Test, die statistisch gesehen lediglich einen diskreten Unterschied zwischen den Gruppen zeigten, geben somit einen Hinweis darauf, dass die Schwimmgeschwindigkeiten im Wasserlabyrinth in allen Gruppen annähernd ähnlich sein sollten.

Zusammengenommen zeigen beide Verhaltensanalysen gegensätzliche Befunde. Im Morris Wasserlabyrinth, einen kognitiven Test, hatten die täglich motorisch trainierten Tiere den besten Lernerfolg. Im Gegensatz dazu waren im Sprossen-Lauf-Test die Tiere der reizreichen Umgebung, einem Zusammenspiel aus körperlicher und kognitiver Komponente, den anderen Tieren motorisch tendenziell überlegen. Van Praag und Mitarbeiter (1999a) zeigten in ihren Untersuchungen, dass Laufradtraining, eine verhältnismäßige monotone motorische Aktivitätsform, zur besten Leistung im Morris Wasserlabyrinth führte. Es scheint, dass die hippocampale Plastizität u.a. auch durch motorische Aktivität reguliert wird. Denn, warum wird nach kortikalen Läsionen Neurogenese gerade im unbeschädigten Hippocampus gesteigert und warum wird diese insbesondere durch sensomotorisches Training in einer Struktur zum Aufbau von Gedächtnis am meisten gefördert? Neben dem Hippocampus ist die zweite neurogene Region die Subventrikulärzone. Weder sensomotorische Aktivität noch kognitives Training haben in dieser Hirnregion einen Einfluss auf die Neurogenese (Gould et al., 1999b, Brown et al., 2003). Es liegt also nahe, dass die zelluläre Plastizität spezifisch im Gyrus dentatus durch motorische Aktivität beeinflusst wird und dieser somit möglicherweise auch eine Rolle beim

motorischen Lernen spielt. Unterstützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass der entorhinale Kortex, die strukturelle Verbindung zwischen Neokortex und Hippocampus, über entsprechende Impulssignale auf die hippocampale Plastizität modulierend einwirken könnte. Auf der Grundlage unserer Untersuchungsbefunde ist anzunehmen, dass die neuen Nervenzellen im Gyrus dentatus die Lernprozesse im Hippocampus wesentlich beeinflussen. Die genaue Funktion der Hippocampusformation, die zugrundeliegenden Mechanismen bei Lernprozessen und die Beziehung von Sensomotorik und Kognition sind allerdings Gegenstand weiterer Studien.

6.3. Klinische Implikationen

Welche Bedeutung hat Neurogenese im Gyrus dentatus nach kortikalen Hirninfarkten? Die Neurogenese ist ein langsam ablaufender Prozess. Vorläuferzellen benötigen 4 bis 6 Wochen, um zu reifen funktionellen Nervenzellen zu differenzieren (Cameron et al., 1993, Kuhn et al., 1997, Hasting & Gould, 1999, Markakis & Gage, 1999, Winner et al., 2002). Dieser bilateral ablaufende Prozess spricht für einen adaptiven Vorgang. Dabei stellt sich die Frage, ob es sich um ein maladaptives Geschehen handelt oder ob die Funktionserholung durch neue Nervenzellen gefördert wird? Maladaptation kann z.B. durch falsche synaptische Konnektivität das Gleichgewicht von Inhibition und Exzitation stören und somit die Entwicklung einer Epilepsie fördern. Andererseits könnte aber auch die Neurogenese nach Hirninfarkten als eine reaktive Maßnahme des Organismus verstanden werden, welche die Anpassung an die durch die Läsion hervorgerufenen veränderten Bedingungen erleichtert.

Unsere Untersuchungsbefunde unterstützten die Tatsache, dass Neurogenese die Funktionserholung begünstigt und infolgedessen die Anpassung an die veränderte Situation erleichtert werden könnte. Insbesondere intensive physische Aktivität nach kortikalen Infarkten fördert primär die hippocampale Neurogenese (Brown et al., 2003, Gould et al., 1999b). Der Hippocampus scheint demnach neben seiner kognitiven Funktion auch eine wesentliche Rolle in der sensomotorischen Funktionserholung nach kortikalen Infarkten einzunehmen. Umfangreiche Studien haben bereits den rehabilitativen Effekt von körperlicher Aktivität auch in Kombination mit kognitiven Aufgaben sowohl auf die zelluläre als auch auf die

behaviorale Plastizität beschrieben (Jones & Schallert, 1994, Grabowski et al., 1995, Johansson & Ohlson, 1996, Jones et al., 1999, Johansson, 2000, Risedal et al., 2002, Johansson & Belichenko, 2002, DeBow et al., 2003, Biernaskie & Corbett, 2001, Biernaskie et al., 2004). Zusammengenommen ist die Physiotherapie gegenwärtig eine entscheidende und effektive therapeutische Maßnahme im Behandlungskonzept des Schlaganfalls. Das optimale Zeitfenster für physiotherapeutische Maßnahmen ist hingegen noch nicht sicher bekannt.

Mit der vorliegenden Studie konnten wir zum weiteren Verständnis aktivitätsabhängiger Plastizität im erwachsenen Gehirn unter pathophysiologischen Bedingungen beitragen. Nach ischämischen Hirnläsionen findet die zelluläre Plastizität nicht nur auf der Ebene von Synapsen und Dendriten statt, sondern aktivitätsabhängig werden auch im adulten Hirn neue Nervenzellen gebildet und integriert. Weiterhin unterstreicht unsere Studie die Bedeutung der physiotherapeutischen Behandlung für die zelluläre Plastizität und die funktionelle Erholung nach Hirninfarkten.

7. Schlussfolgerungen

Unserer Befunde zeigten, dass sowohl tägliches Greiftraining als auch die Unterbringung in einer reizreichen Umgebung die Neurogenese im Gyrus dentatus nach fokalen Hirninfarkten steigerte. Intensive Physiotherapie scheint demnach im Gegensatz zu moderater körperlicher Betätigung einen positiveren Effekt auf die neuronale Plastizität nach ischämischen Insult zu haben. Interessanterweise förderte tägliches sensomotorisches Vorderpfotenttraining bei Tieren ohne einen Hirninfarkt die Neurogenese am deutlichsten. Infarkte scheinen folglich die aktivitätsabhängige zelluläre Plastizität im Gyrus dentatus zu hemmen, wobei möglicherweise inflammatorische Prozesse als Inhibitoren der Neurogenese eine wesentliche Rolle spielen. Da gegenwärtig die Physiotherapie zu den wichtigsten therapeutischen Maßnahmen in der Rehabilitation von Schlaganfallpatienten zählt, konnten wir mit unserer Arbeit belegen, dass intensives Training sowohl die zelluläre Plastizität fördert als auch die funktionelle Erholung begünstigt. Offen bleibt allerdings die Frage nach dem optimalen Zeitfenster für die physiotherapeutische Beübung. Weitere Studien werden notwendig sein, um zu klären, welche Mechanismen Neurogenese unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen auf molekulargenetischer Ebene regulieren und inwieweit neue Nervenzellen sich funktionswirksam in das bestehende Netzwerk integrieren können. Ein besseres Verständnis der Mechanismen und der funktionellen Auswirkungen der Stammzellproliferation nach Hirninfarkten wird möglicherweise die Entwicklung neuer effizienter Therapiestrategien für die Rehabilitation von Schlaganfallpatienten erleichtern.

8. Literaturverzeichnis

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

Altmann J (1966) Proliferation and migration of undifferentiated precursors cells in the rat during postnatal gliogenesis. *Exp Neurol* 16:263-278.

Altmann J, Das GD (1967) Postnatal neurogenesis in the guinea-pig. *Nature* 214:1098-1101.

Alvarez-Buylla A, Nottebohm F (1988) Migration of young neurons in adult avian brain. *Nature* 335:353-354.

Amaral DG, Witter MP: Hippocampal formation. In: Paxinos G (Hrsg.): The rat nervous system. Academic Press, Sydney (1995), S 443-493.

Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O (2002) Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8:963-970.

Barnes CA (1988) Spatial learning and memory processes: the search for their neurobiological mechanism in the rat. *Trends Neurosci* 11:163-169.

Beaulieu C, Colonnier M (1989) Number and size of neurons and synapses in the motor cortex of cats raised in different environmental complexities. *J Comp Neurol* 289:178-181.

Bengzon J, Kokaia Z, Elmer E, Nanobashvili A, Kokaia M, Lindvall O (1997) Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10432-10437.

Benhamou S, Poucet B (1996) A comparative analysis of spatial memory processes. *Behav Processes* 35:113-126.

Bennett EL, Diamond MC, Krech D, Rosenzweig MR (1964) Chemical and anatomical plasticity of the brain. *Science* 146:610-619.

Benraiss A, Chmielnicki E, Lerner K, Roth D, Goldman SA (2001) Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *J Neurosci* 21:6718-6731.

Biernaskie J, Corbett D (2001) Enriched rehabilitative training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury. *J Neurosci* 21:5272-5280.

Biernaskie J, Chernenko G, Corbett D (2004) Efficacy of rehabilitative experience declines with time after focal ischemic brain injury. *J Neurosci* 24:1245-1254.

Birbaumer N, Schmidt RF: Lernen und Gedächtnis. In: Schmidt RF, Thews G (Hrsg.): Physiologie des Menschen. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg (1997), S. 154-166.

Black JE, Sirevaag AM, Greenough WT (1987) Complex experience promotes capillary formation in young rat visual cortex. *Neurosci Lett* 83:351-355.

Blomquist KB, Danner F (1987) Effects of physical conditioning on information-processing efficiency. *Percept Mot Skills* 65:175-186.

Brandreis R, Brandys Y, Yehuda S (1989) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. *Int J Neurosci* 48:29-69.

Brezun JM, Daszuta A (1999) Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience* 89:999-1002.

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* 12:391-396.

Briones TL, Suh E, Hattar H, Wadowska M (2005) Dentate gyrus neurogenesis after cerebral ischemia and behavioral training. *Biol Res Nurs* 6:167-179.

Brott T, Bogousslavsky J (2000) Treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 343:710-722.

Brown J, Cooper-Kuhn CM, Kempermann G, Van Praag H, Winkler J, Gage FH, Kuhn HG (2003) Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb Neurogenesis. *Eur J Neurosci* 17:2042-2046.

Bures J, Fenton AA, Kaminsky Y, Zinyuk L (1997) Place cells and place navigation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:343-350.

Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E (1993) Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56:337-344.

Cameron HA, Hazel TG, McKay RD (1998) Regulation of Neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *J Neurobiol* 36:287-306.

Cameron HA, McKay RD (1999) Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci* 2:894-897.

Carlen M, Cassidy RM, Brismar H, Smith GA, Enquist LW, Frisen J (2002) Functional integration of adult-born neurons. *Curr Biol* 12:606-608.

Debiec J, Ledoux JE, Nader K (2002) Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron* 35:527-538.

DeBow SB, Davies ML, Clarke HL, Colbourne F (2003) Constraint-induced movement therapy and rehabilitation exercises lessen motor deficits and volume of brain injury after striatal hemorrhagic stroke in rats. *Stroke* 34:1021-1026.

- Deisseroth K, Singla S, Toda H, Monje M, Palmer TD, Malenka RC (2004) Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells. *Neuron* 42:535-552.
- Diamond MC, Krech D, Rosenzweig MR (1964) The effects of an enriched environment on the histology of rat cerebral cortex. *J Comp Neurol* 123:111-120.
- Diamond MC, Law F, Rhodes H, Lindner B, Rosenzweig MR, Krech D, Bennett EL (1966) Increases in cortical depth and glia numbers in rats subjected to enriched environment. *J Comp Neurol* 128:117-126.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17:5046-5061.
- Doetsch F, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703-716.
- Doetsch F (2003) The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci* 6:1127-1134.
- Doty BA (1972) The effect of cage environment upon avoidance responding of aged rats. *J Gerontol* 27:358-360.
- Drapeau E, Mayo W, Aurousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN (2003) Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:14385-14390.
- Eichbaum H, Dudchenko P, Wood E, Shapiro M, Tanila H (1999) The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or memory space? *Neuron* 23:209-226.
- Eisch AJ, Barrot M, Schad CA, Self DW, Nestler EJ (2000) Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7579-7584.
- Ekdahl CT, Classen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O (2003) Inflammation is detrimental for Neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13632-13637.
- Ekstrom AD, Kahana MJ, Caplan JB, Fields TA, Isham EA, Newman EL, Fried I (2003) Cellular network underlying human spatial navigation. *Nature* 425:184-188.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313-1317.
- Ferchmin PA, Bennett EL (1975) Direct contact with enriched environment is required to alter cerebral weights in rats. *J Comp Physiol Psychol* 88:360-367.
- Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, Yamaguchi M, Kettenmann H, Kempermann G (2003) Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 23:373-382.

Fordyce DE, Wehner JM (1993) Physical activity enhances spatial learning performance with an associated alteration in hippocampal protein kinase C activity in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Brain Res* 619:111-119.

Fordyce DE, Farrar RP (1991) Physical activity effects on hippocampal and parietal cortical cholinergic function and spatial learning in F344 rats. *Behav Brain Res* 43:115-123.

Frahm C, Haupt C, Weinandy F, Siegel G, Bruehl C, Witte OW (2004) Regulation of GABA transporter mRNA and protein after photothrombotic infarct in rat brain. *J Comp Neurol* 478:176-188.

Fukuda S, Kato F, Tozuka Y, Yamaguchi M, Miyamoto Y, Hisatsune T (2003) Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci* 23:9357-9366.

Galea LA, McEwens BS (1999) Sex and seasonal differences in the rate of cell proliferation in the dentate gyrus of adult wild meadow voles. *Neuroscience* 89:955-964.

Gallagher M, Nagahara AH, Burwell RD: Cognition and hippocampal systems in aging: animal models. In: McGaugh JL, Weinberger N, Lynch G (Hrsg.): Brain and memory: modulation and mediation of neuroplasticity. Oxford University Press, New York (1994), S. 103-126.

Gebicke-Haerter PJ (2001) Microglia in neurodegeneration: molecular aspects. *Microsc Res Tech* 54:47-58.

Ghandour MS, Langley OK, Labourdette G, Vincendon G, Gombos G (1881) Specific and artefactual cellular localizations of S100 protein: an astrocyte marker in rat cerebellum. *Dev Neurosci* 4:66-78.

Gilbert PE, Kesner RP, Lee I (2001) Dissociating hippocampal subregions: double dissociation between dentate gyrus and CA1. *Hippocampus* 11:626-636.

Giulian D, Vaca K (1993) Inflammatory glia mediate delayed neuronal damage after ischemia in the central nervous system. *Stroke* 24:184-190.

Giulian D, Li J, Leara B, Keenen C (1994) Phagocytic microglia release cytokines and cytotoxins that regulate the survival of astrocytes and neurons in culture. *Neurochem Int* 25:227-233.

Gomez-Pinilla F, Dao L, So V (1997) Physical exercise induce FGF-2 and its mRNA in the hippocampus. *Brain Res* 764:1-8.

Gomez-Pinilla F, So V, Kesslak JP (1998) Spatial learning and physical activity contribute to the induction of fibroblast growth factor: neural substrates for increased cognition associated with exercise. *Neuroscience* 85:53-61.

Gomez-Pinilla F, Ying Z, Roy RR, Molteni R, Edgerton VR (2002) Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. *J Neurophysiol* 88:2187-2195.

Gould E, Cameron HA, Daniels DC, Woolley CS, McEwen BS (1992) Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J Neurosci* 12:3642-3650.

Gould E, Tanapat P (1997) Lesion-induced proliferation of neuronal progenitor cells in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 80:427-436.

Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E (1997) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci* 17:2492-2498.

Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E (1998) Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3168-3171.

Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG (1999a) Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 286:548-552.

Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ (1999b) Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature Neurosci* 2:260-265.

Gould E (1999) Serotonin and hippocampal Neurogenesis. *Neuropsychopharmacology* 21:46-51.

Grabowski M, Sorensen JC, Mattsson B, Zimmer J, Johansson BB (1995) Influence of an enriched environment and cortical grafting on functional outcome in brain infarcts of adult rats. *Exp Neurol* 40:491-504.

Grass S, Wurm F, Kunze A, Witte OW, Redecker C (2004) Effects of enriched environment on progenitor cell proliferation and differentiation in the dentate gyrus after focal cortical infarcts. *Soc Neurosci Abstr* 792.3.

Greenough WT, Volkmar FR (1973) Pattern of dendritic branching in occipital cortex of rats reared in complex environments. *Exp Neurol* 40:491.

Greenough WT, Juraska JM, Volkmar FR (1979) Maze training effects of dendritic branching on occipital cortex of old rats. *Behav Neural Biol* 26:287-297.

Gu W, Brannström T, Wester P (2000) Cortical Neurogenesis in the adult rats after reversible photothrombotic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:1166-1173.

Hebb DO: The Organization of Behaviour. Wiley, New York (1949).

Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, Boysen G, Bluhmki E, Hoxter G, Mahagne MH (1995) Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Akute Stroke Study (ECASS). *Jama* 247: 1017-1025.

- Hasting NB, Gould E (1999) Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J Comp Neurol* 413:146-154.
- Hong S, Matsumori Y, Fan Y, Liu Z, Kayama T, Weinstein PR, Hsu CY, Liu J (2004) Enriched environment and physical activity enhance the survival of newborn cells in the hippocampus after focal ischemia in rats. *Soc Neurosci Abstr* 382.21.
- Hunter AJ, Green AR, Cross AJ (1995) Animal models of acute ischemic stroke: can they predict clinically successful neuroprotective drugs? *Trends Pharmacol* 16:123-128.
- Jakobs BL, Fornal CA (1997) Serotonin and motor activity. *Curr Opin Neurobiol* 7:820-825.
- Janus C, Copervas JS, Janus M, Roder J (1995) Rearing environment and radial maze exploration in mice. *Behav Processes* 34:129-140.
- Jessberger S, Kempermann G (2003) Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *Eur J Neurosci* 18:2702-2712.
- Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Batteur S, Simon RP, Greenberg DA (2001) Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4710-4715.
- Johannsson BB, Ohlson AL (1996) Environment, social interaction, and physical activity as determinants of functional outcome after cerebral infarction in the rat. *Exp Neurol* 139:322-327.
- Johannsson BB (2000) Brain plasticity and stroke rehabilitation. *Stroke* 31:223-230.
- Johannsson BB, Belichenko PV (2002) Neuronal plasticity and dendritic spines: effect of environmental enrichment on intact and postischemic rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:89-96.
- Jones TA, Schallert T (1994) Use-dependent growth of pyramidal neurons after neocortical damage. *J Neurosci* 14:2140-2152.
- Jones TA, Chu CJ, Grande LA, Gregory AD (1999) Motor skills training enhances lesion-induced structural plasticity in the motor cortex of adult rats. *J Neurosci* 19:10153-10163.
- Jones TA, Greenough WT (1996) Ultrastructural evidence for increased contact between astrocytes and synapses in rats reared in a complex environment. *Neurobiol Learn Mem* 65:48-56.
- Kaplan MS, Hinds JW (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197:1092-1094.
- Kee NJ, Preston E, Wotjowicz JM (2001) Enhanced Neurogenesis after transient global ischemia in the dentate gyrus of the rat. *Exp Brain Res* 136:313-320.

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

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

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

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

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

Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH (2003) Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* 130:391-399.

Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G (2004) Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27:447-452.

Kitamura T, Mishina M, Sugiyama H (2003) Enhancement of Neurogenesis by running wheel exercises is suppressed in mice lacking NMDA receptor $\epsilon 1$ subunit. *Neurosci Res* 47:55-63.

Kluska MM, Witte OW, Bolz J, Redecker C (2005) Neurogenesis in the adult dentate gyrus after cortical infarcts: effects of infarct location, NMDA receptor blockade and anti-inflammatory treatment. *Neuroscience* (in Druck).

Kokaia Z, Lindvall O (2003) Neurogenesis after ischemic brain insult. *Curr Opin Neurobiol* 13:127-132.

Komitova M, Perfilieva E, Mattsson B, Eriksson PS, Johansson BB (2002) Effects of cortical ischemia and postischemic environmental enrichment on hippocampal cell genesis and differentiation in the adult rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:852-860.

Kramer AF, Hahn S, Cohen NJ, Banich MT, McAuley E, Harrison CR, Chason J, Vakil E, Bardell L, Boileau RA, Colcombe A (1999) Ageing, fitness and neurocognitive function. *Nature* 400:418-419.

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

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* 17:5820-5829.

- Lois C, Alvarez-Buylla A (1993) Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2074.
- Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR (1998) Increased Neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci* 18:7768-7778.
- MacRae PG, Spirduso WW, Cartee GD, Farrar RP, Wilcox RE (1987) Endurance training effects on striatal D2 dopamine receptor binding and striatal dopamine metabolite levels. *Neurosci Lett* 79:138-144.
- Madsen TM, Kristjansen PEG, Bolwig TG, Wortwein G (2003) Arrested neuronal proliferation and impaired hippocampal function following fractionated brain irradiation in the adult rat. *Neuroscience* 119:635-642.
- Magavi S, Leavitt B, Macklis J (2000) Induction of Neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 405:951-955.
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS (2000) Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20:9104-9110.
- Markakis E, Gage FH (1999) Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to the field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J Comp Neurol* 406:449-460.
- Matthews JNS, Altman DG, Campbell MJ, Royston P (1990) Analysis of serial measurements in medical research. *Br Med J* 300:230-235.
- McClelland JL, McNaughton BL, O'Reilly RC (1995) Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. *Psychol Rev* 102:419-457.
- McNamara RK, Skelton RW (1993) The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. *Brain Res Rev* 18:33-49.
- McNaughton BL, Barnes CA, Meltzer J, Sutherland RJ (1989) Hippocampal granule cells are necessary for normal spatial learning but not for spatially-selective pyramidal cell discharge. *Exp Brain Res* 76:485-496.
- Metz GA, Wishaw IQ (2002) Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and co-ordination. *J Neurosci Methods* 115:169-179.
- Metz GA, Antonow-Schlorke J, Witte OW (2005) Motor improvements after focal cortical ischemia in adult rats are mediated by compensatory mechanisms. *Behav Brain Res* 162:71-82.
- Mohammed AH, Winblad B, Ebendal T, Larkfors L (1990) Environmental influence on behaviour and nerve growth factor. *Brain Res* 528:62-72.

- Monje ML, Toda H, Palmer TD (2003) Inflammatory blockade restores adult hippocampal Neurogenesis. *Science* 302:1760-1765.
- Morris RGM, Garrud P, Rawlins JNP, O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 279:681-683.
- Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11:47-60.
- Morse JK, Wiegand SJ, Anderson K, You Y, Cai N, Carnahan J, Miller J, DiStefano PS, Altar CA, Lindsay RM, et al. (1993) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) prevents the degeneration of medial septal cholinergic neurons following fimbria transection. *J Neurosci* 13:4146-4156.
- Moyanova S, Kirov R, Kortenska L (2003) Multi-unit activity suppression and sensorimotor deficits after endothelin-1-induced middle cerebral artery occlusion in conscious rats. *J Neurol Sci* 212:59-67.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116:201-211.
- Mumby DG, Astur RS, Weisend MP, Sutherland RJ (1999) Retrograde amnesia and selective damage to the hippocampal formation: memory for places and object discriminations. *Behav Brain Res* 106:97-107.
- 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* 110:429-441.
- Neeper SA, Gomez-Pinilla F, Choi J, Cotman CW (1995) Exercise and brain neurotrophins. *Nature* 373:109.
- 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* 726:49-56.
- Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson PS (1999) Enriched environment increases Neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improve spatial memory. *J Neurobiol* 39:569-578.
- O'Keefe J, Nadel L: The Hippocampus as a Cognitive Map. Clarendon Press, Oxford (1978).
- Oliff HS, Berchtold NC, Isackson P, Cotman CW (1998) Exercise-induced regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transcripts in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 61:147-153.
- Pacteau C, Einon D, Sinden J (1989) Early rearing environment and dorsal hippocampal ibotenic acid lesions: long-term influences on spatial learning and alternation in the rat. *Behav Brain Res* 34:79-96.

Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH (1999) Fibroblast Growth Factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci* 19:8487-8497.

Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH (1997) Dentate gyrus cell Neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 17:3727-3738.

Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB (2001) Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci* 21:6706-6717.

Ra SM, Kim H, Jang MH, Shin MC, Lee TH, Lim BV, Kim CJ, Kim EH, Kim KM, Kim SS (2002) Treadmill running and swimming increase cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus rats. *Neurosci Lett* 333:123-126.

Raber J, Rola R, LeFevour A, Morhardt D, Curley J, Mizumatsu S, Vandenberg SR, Fike JR (2004) Radiation-induced cognitive impairments are associated with changes in indicators of hippocampal Neurogenesis. *Radiat Res* 162:39-47.

Redecker C, Wang W, Fritschy JM, Witte OW (2002) Widespread and long-lasting alterations in GABAA receptor subtypes following focal cortical infarcts in rats: mediation by NMDA-dependent processes. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:1463-1475.

Renner MJ, Rosenzweig MR (1987) The golden-mantled ground squirrel (*Spermophilus lateralis*) as a model for effects of environmental enrichment in solitary animals. *Dev Psychobiol* 20:19-24.

Riek-Burchardt M, Heinrich-noack P, Metz GA, Reymann KG (2004) Detection of chronic impairments in the ladder rung walking task in rats with endothelin-1-induced mild focal ischemia. *J Neurosci Methods* 137:227-233.

Risedal A, Mattsson B, Dalqvist P, Nordborg C, Olsson T, Jahannsson BB (2002) Environmental influences on functional outcome after a cortical infarct in the rat. *Brain Res Bull* 58:315-321.

Rosenzweig MR, Krech D, Bennett EL, Diamond MC (1962) Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy. *J Comp Physiol Psychol* 55:429-437.

Rosenzweig MR, Bennett EL, Herbert M, Morimoto H (1978) Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environment. *Brain Res* 153:563-576.

Rosenzweig MR (1996) Aspects of the search for neural mechanisms of memory. *Annu Rev Psychol* 47:1-32.

Rosenzweig MR, Bennett EL (1996) Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav Brain Res* 78:57-65.

- Rosenzweig MR (2003) Effects of differential experience on the brain and behavior. *Dev Neuropsychol* 24:523-540.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003) Requirement of hippocampal Neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301:805-809.
- Schmidt-Heiber C, Jonas P, Bischofberger J (2004) Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429:184-187.
- Seki T, Arai Y (1995) Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus. *Neuroreport* 6:2479-2482.
- Seri B, Garcia-Verdugo J, McEwen B, Alvarez-Buylla A (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 21:7153-7160.
- Shanina EV, Redecker C, Reinecke S, Schallert T, Witte OW (2005) Long-term effects of sequential cortical infarcts on scar size, brain volume and cognitive function. *Behav Brain Res* 158:69-77.
- Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E (2001) Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 414:372-376.
- Silva AJ, Giese KP, Fedorov NB, Frankland PW, Kogan JH (1998) Molecular, cellular, and neuroanatomical substrates of place learning. *Neurobiol Learn Mem* 70:44-61.
- Sirevaag AM, Greenough WT (1991) Plasticity of GFAP-immunoreactive astrocyte size and number in visual cortex of rats reared in complex environments. *Brain Res* 540:273-278.
- Snyder JS, Kee N, Wojtowicz JM (2001) Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. *J Neurophysiol* 85:2423-2431.
- Snyder JS, Hong NS, McDonald RJ, Wojtowicz JM (2005) A role of adult Neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience* 130:843-852.
- Steffenach HA, Witter M, Moser MB, Moser EI (2005) Spatial Memory in the rat requires the dorsolateral band of the entorhinal cortex. *Neuron* 45:301-313.
- Takagi Y, Nozaki K, Takahashi J, Yodoi J, Ishikawa M, Hashimoto N (1999) Proliferation of neuronal precursor cells in the dentate gyrus is accelerated after transient forebrain ischemia in mice. *Brain Res* 831:283-287.
- Takahashi M, Nowakowski RS, Caviness VS (1992) BUdR as an S-phase marker for quantitative studies of cytokinetic behaviour in the murine cerebral ventricular zone. *J Neurocytol* 21:185-197.
- Van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH (1999a) Running enhances neurogenesis, learning and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13427-13431.

- Van Praag H, Kempermann G, Gage FH (1999b) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2:266-270.
- Van Praag, Kempermann G, Gage FH (2000) Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Reviews* 1:191-198.
- Van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030-1034.
- Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2003) Interplay between BDNF and signal transduction modulators in the regulation of the effects of exercise and synaptic plasticity. *Neurosci* 122:647-657.
- Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2004) Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci* 20:2580-2590.
- Wainwright PE, Levesque S, Kremulec L, Bulman-Fleming B, McCutcheon D (1993) Effects of environmental enrichment on cortical depth and Morris-maze performance in B6D2F2 mice exposed prenatally to ethanol. *Neurotoxicol Teratol* 15:11-20.
- Wang S, Scott BW, Wojtowicz JM (2000) Heterogenous properties of dentate granule neurons in the adult rat. *J Neurobiol* 42:248-257.
- Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD (1985) Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol* 17:497-504.
- Widmer HR, Knusel B, Hefti F (1993) BDNF protection of basal forebrain cholinergic neurons after axotomy: complete protection of p75NGFR-positive cells. *Neuroreport* 4:363-366.
- Winner B, Cooper-Kuhn CM, Aigner R, Winkler J, Kuhn HG (2002) Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 16:1681-1689.
- Witter MP, Groenewegen HJ, Lopes da Silva FH, Lohman AHM (1989) Functional organization of extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Prog Neurobiol* 33:161-254.
- Witter MP, Amaral DG: The hippocampal formation. In: Paxinos G (Hrsg.): The rat nervous system. Elsevier Academic Press, San Diego (2004), S. 637-703.
- Wurm F, Grass S, Kunze A, Witte OW, Redecker C (2004) Effects of sensorimotor forelimb training on progenitor cell proliferation and differentiation in the dentate gyrus after focal cortical infarcts. *Soc Neurosci Abstr* 792.5.
- Xavier GF, Oliveira-Filho FJ, Santos AM (1999) Dentate gyrus-selective cilchicine lesion and disruption of performance in spatial tasks: difficulties in "place strategy" because of a lack of flexibility in the use of environmental cues? *Hippocampus* 9:668-681.

Yagita Y, Kitagawa K, Ohtsuki T, Takasawa K, Miyata T, Okano H, Hori M, Matsumoto M (2001) Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus. *Stroke* 32:1890-1896.

Zilles K: The Cortex of the Rat. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg (1985).

9. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Privatdozenten Dr. med. Christoph Redecker für die Anregung zu dieser Arbeit und die Überlassung des Themas. Er nahm sich immer Zeit, mich mit wertvollen Ratschlägen und konstruktiver Kritik zu unterstützen. Seine hervorragende Betreuung und die kompetente Unterstützung haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Professor O.W. Witte danke ich für die freundliche Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten zur Durchführung der Experimente in seinem Labor.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Arbeitsgruppe „Endogene neurale Stammzellen“, die mich immer wieder bei methodischen Problemen unterstützten.

Die Phänotypisierung BrdU-positiver Zellen am konfokalen Laserscanning Mikroskop hätte ich ohne die freundliche Unterstützung durch Herrn Dr. R. rer. nat. Gräbner am Institut für vaskuläre Medizin nicht durchführen können.

Ferner möchte ich mich bei Frau A. Brandstädt für die Beratung und Hilfe bei der statistischen Auswertung bedanken.

Von ganzen Herzen danke ich meinem Freund Oded Niv und meiner Familie, ohne deren fortwährende Ermutigung, emotionale und auch finanzielle Unterstützung so vieles nicht möglich gewesen wäre.

10. Lebenslauf

Name: Fanny Wurm
Geburtsdatum: 23.06.1978
Geburtsort: Leipzig
Familienstand: ledig

Schul Ausbildung

1985 – 1991 Polytechnische Oberschule Sangerhausen
1991 – 1997 Geschwister-Scholl-Gymnasium Sangerhausen
1997 Leistungsstipendium von der POK Pühringer Privatstiftung Wien
1997 Abitur

1997 – 1998 Auslandsaufenthalt als Au Pair in Israel

Hochschulausbildung

1998 – 2005 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
2000 Ärztliche Vorprüfung
2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Promotion

2003 – 2005 Promotion in der Klinik für Neurologie /Jena in der Arbeitsgruppe „Endogene neurale Stammzellen“ von Herrn PD Dr. C. Redecker
2003 – 2004 Promotionsstipendium vom Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) Jena
Oktober 2004 Teilnahme und Posterpräsentation der Promotionsdaten auf der Jahrestagung der „Society for Neuroscience“ in San Diego, USA

10. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. med. C. Redecker, Dr. med. Albrecht Kunze, Dr. rer. nat. Martin M. Kluska, Dipl.-Pharm. Silke Graß, Dipl.-Biol. Elena Shanina, Frau N. Manthei, Dr. rer. nat. R. Gräbner und Frau A. Brandstädt,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 23.08.2005