

Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Univ.-Prof. Dr. H. Potschka

**Neuronale Plastizität im limbischen System adulter Ratten
und deren Modifikation in Epilepsiemodellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Anton Pekcec
aus Bremen

München 2007

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
der Ludwigs-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

Referent: Univ.-Prof. Dr. H. Potschka

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Stangassinger
Univ.-Prof. Dr. Wanke
Priv. Doz. Dr. Kölle
Univ.-Prof. Dr. Müller

Tag der Promotion: 20.Juli 2007

Meinen Eltern und meiner Schwester

INHALTSVERZEICHNIS

1	Übersicht.....	1
2	Publikation I	39
3	Publikation II	53
4	Diskussion.....	69
5	Zusammenfassung	87
6	Summary.....	89

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ADD ₁	after-discharge duration 1 (Nachentladungsdauer 1)
ADD ₂	after-discharge duration 1 (Nachentladungsdauer 2)
A. dest.	Aqua destillata
ADT	after-discharge threshold (Nachentladungsschwelle)
BLA	basolaterale Amygdala
BrdU	Bromodesoxyuridin
bsp.	Beispiel
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
c	control (Kontrolle)
ca.	zirka
cm	Zentimeter
d	day (Tag)
DCX	Doublecortin
d.h.	das heißt
EEG	Elektroenzephalogramm
engl.	englisch
etc.	et cetera
evtl.	eventuell
Fa.	Firma
g	Gramm
GD	Gyrus dentatus
h	hour (Stunde)
HRP	horseradish peroxidase (Merrettichperoxidase)
Hz	Hertz
init.	initial
inkl.	inklusive
i.c.v.	intracerebroventriculär
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
Kap.	Kapitel
kg	Kilogramm
LTD	long term depression (Langzeitdepression)
LTP	long term potentiation (Langzeitpotenzierung)
M	Molar
max.	maximal
MES	Maximaler Elektroschock
MEZ	Mitteuropäische Zeit
mg	Milligramm
min	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

mm	Millimeter
ms	Millisekunden
NeuN	neural specific nuclear protein (neuronales Kernprotein)
Nr.	Nummer
o.g.	oben genannt
s	Sekunde
s.c.	subcutan
SD	seizure duration (Anfallsdauer)
SE	Status epilepticus
SEM	standard error of the mean (Mittelwertfehler)
SGZ	subgranuläre Zone
s.o.	siehe oben
SS	seizure severity (Anfallsschwere)
SSSE	self-sustained status epilepticus (sich selbsterhaltender Status epilepticus)
Std.	Stunde
s.u.	siehe unten
SVZ	subventrikuläre Zone
Syn.	Synonym
Tab.	Tabelle
TBS	TRIS-gepufferte Kochsalzlösung
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
v.a.	vor allem
μ A	Mikroampère
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

1 ÜBERSICHT

In den letzten Jahrzehnten hat die vergleichsweise neue Disziplin der klinischen Neurologie in der Tiermedizin erheblich an Bedeutung gewonnen [1]. Ein stetiger Wissenszuwachs über physiologische Prozesse neuronaler Plastizität aber auch über die neuropathologischen Charakteristika unterschiedlicher zentralnervöser Erkrankungen liefert dabei die Basis für eine permanente Weiterentwicklung der diagnostischen sowie therapeutischen Möglichkeiten. In der Tiermedizin profitieren infolge dessen insbesondere Hunde und Katzen aber auch Pferde von einer verbesserten Versorgung neurologischer Leiden [1]. Dennoch sind bei einer Vielzahl neurologischer Erkrankungen die derzeitigen pharmakologischen Therapiemöglichkeiten lediglich unzureichend. Dies gilt u. a. für die häufigste chronische neurologische Erkrankung von Hunden und Katzen, die Epilepsie [2-3]. Epilepsien treten bei diesen Spezies mit einer beim Menschen vergleichbaren Prävalenz von 1-2% auf [2]. Die Pharmakotherapie dieser Erkrankung beschränkt sich auf eine symptomatische Behandlung mit Antiepileptika, die jedoch bei 20-40% der behandelten Tiere nicht zu einer Reduktion der Anfallsfrequenz führt [2, 3]. Für die Entwicklung kausaler Behandlungsstrategien gegen diese und weitere neurologische Erkrankungen ist ein verbessertes Verständnis über die Bedeutung und Funktion plastischer Veränderungen im Nervensystem unter physiologischen sowie pathophysiologischen Bedingungen notwendig. In diesem Zusammenhang sind insbesondere neuere Studien von Interesse, die auf eine limitierte Regenerationsfähigkeit des adulten Gehirns in Erkrankungsmodellen hindeuten. Die Regeneration geht von undifferenzierten Zellen mit Charakteristika von Stammzellen aus. Die Entdeckung von Zellen im adulten Nervensystem von Tieren und Menschen, die die Fähigkeit besitzen neue Neurone hervorzubringen, hat die Liste plastischer Veränderungen des Nervensystems grundlegend erweitert. Zwar sind die regulierenden Faktoren der Nervenzellneubildung noch unvollständig aufgeklärt; die Möglichkeit einer Neuroregeneration könnte jedoch für eine zukünftige Therapie von unterschiedlichsten neurodegenerativen Erkrankungen und damit für die klinische Neurologie in der Tiermedizin von erheblicher Bedeutung sein.

Diverse Studien konnten einen komplexen Zusammenhang zwischen der

Nervenzellneubildung und physiologischen sowie pathologischen Gehirnprozessen aufdecken. Basierend auf diesen Verbindungen wird ein tieferes Verständnis dieser Form der Plastizität, deren funktionelle Bedeutung während der Entwicklung, während des Alterns und im Rahmen der Entstehung und Behandlung von neurologischen Erkrankungen, erreicht. Diese Erkenntnisse könnten letztlich dabei helfen, die neuronale Plastizität derart zu beeinflussen und zu modulieren, dass endogene Reparaturmechanismen für eine Therapie von neurologischen Erkrankungen nutzbar werden.

Definition der neuronalen Plastizität

Basierend auf den Untersuchungen des berühmten Neurowissenschaftlers Ramon y Cajal im 19. und 20. Jahrhundert wurde davon ausgegangen, dass das adulte Nervensystem von Säugetieren keine regenerative Fähigkeit besitzt. Stattdessen wurde eine statische neuronale Zytoarchitektur propagiert, deren fixe Netzwerkverbindungen nach der Ausreifung des Nervensystems lediglich geringe Adaptationen erlaubten. Diese Ansicht wurde durch die Erkenntnis ersetzt, dass sich die neuronalen Netzwerke adulter Säugetiere kontinuierlich in Reorganisation und Modifikation befinden [4-7]. Dabei handelt es sich um adaptive Veränderungen aufgrund von genetischen, epigenetischen und erfahrungsabhängigen Faktoren, die auf systemischer, zellulärer und molekularer Ebene ablaufen können. Abhängig von der Art der permissiven Veränderungen können weitere Subtypen der neuronalen Plastizität benannt werden [6]. Dabei werden morphologische Veränderungen von Neuronen, wie eine axonale und dendritische Reorganisation, auch als *strukturelle Plastizität* und Veränderungen von Membranproteinen auf subzellulärer Ebene als *molekulare Plastizität* bezeichnet. Modifikationen der synaptischen Transmission durch *long term potentiation* bzw. *depression* (LTP/ LTD) werden unter dem Begriff *synaptische Plastizität* zusammengefasst und häufig als Beispiel für eine *funktionelle* und *molekulare Plastizität* verwendet [7, 8].

Im Zentrum dieser Arbeit stehen Untersuchungen zur Neubildung von Nervenzellen

(= Neurogenese) im adulten Rattengehirn. Die Neurogenese im adulten Nervensystem ist eine Form der *strukturellen Plastizität* [9]. Sie steht vermutlich mit einer Reihe von funktionellen Eigenschaften im Zusammenhang, die sowohl für physiologische als auch für pathophysiologische Prozesse eine Bedeutung haben könnte [10-15]. Zudem wird die neurogeneseassoziierte Plastizität vielfach als neue Strategie zur Behandlung neurologischer Erkrankungen diskutiert [9, 10, 16-19].

Während der neuronalen Entwicklung entsteht das Nervensystem aus Stammzellen die sich teilen und zu Vorläuferzellen der neuronalen und glialen Linie ausdifferenzieren [20]. Im Gegensatz zu echten Stammzellen, die multipotent sind, können aus diesen Vorläuferzellen bei fortschreitender Differenzierung lediglich Zellen eines bestimmten Gewebetyps hervorgehen. Aus diesem Grunde spricht man von determinierten Vorläuferzellen. Obwohl das Säugetiergehirn nur eine äußerst limitierte regenerative Fähigkeit besitzt, konnte beginnend in den 60er Jahren die Existenz von Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften im adulten Nagergehirn nachgewiesen werden [21, 22]. Diese Stammzellen und determinierten neuronalen Vorläuferzellen sind für die kontinuierlich und lebenslang stattfindende Neubildung von Neuronen verantwortlich. In den letzten Jahren konnte die Neubildung von Nervenzellen im adulten Gehirn für diverse Labornager und Primaten, sowie für den Menschen nachgewiesen werden [9, 23-25]. Sie findet insbesondere in zwei Gehirnregionen statt: In der subgranulären Zone (SGZ) des Gyrus dentatus (GD) des Hippocampus (= hippocampale Neurogenese) und der Subventrikularzone (SVZ) des anterolateralen Seitenventrikels (= Neurogenese des olfaktorischen Systems) [10, 12, 20, 26-28]. Diese beiden Regionen werden aufgrund ihrer Eigenschaften auch als primäre neurogene Zonen bezeichnet und im Folgenden eingehend beschrieben.

Neurogenese im adulten olfaktorischen System

Aus der SVZ des adulten Säugetiergehirns gehen die meisten neugebildeten Neurone hervor [29]. Diverse Studien an Labornagern und Primaten konnten die Neubildung von

Neuroblasten in der anterioren Region des SVZ nachweisen. Diese wandern tangential und in Ketten angeordnet entlang von astrozytären Leittuben und bilden den sog. *rostral migratory stream* (RMS, Abb. 1A-B) [30]. Innerhalb des RMS teilen sich die Neuroblasten mehrfach und erreichen letztlich die Riechkolben (Bulbi olfactorii) [26, 31, 32]. Sie wandern radial in die granulären und periglomerulären Zellschichten der Bulbi ein, um sich hier zu granulären und periglomerulären GABAergen und dopaminergen inhibitorischen Interneuronen auszudifferenzieren [10, 12, 26, 31-34]. Im humanen olfaktorischen System existieren Hinweise für einen analogen Verlauf. Die Wanderung der Neuroblasten im humanen Gehirn bedarf aufgrund einer differierenden Zytoarchitektur im RMS keiner Leittuben [24, 35, 36].

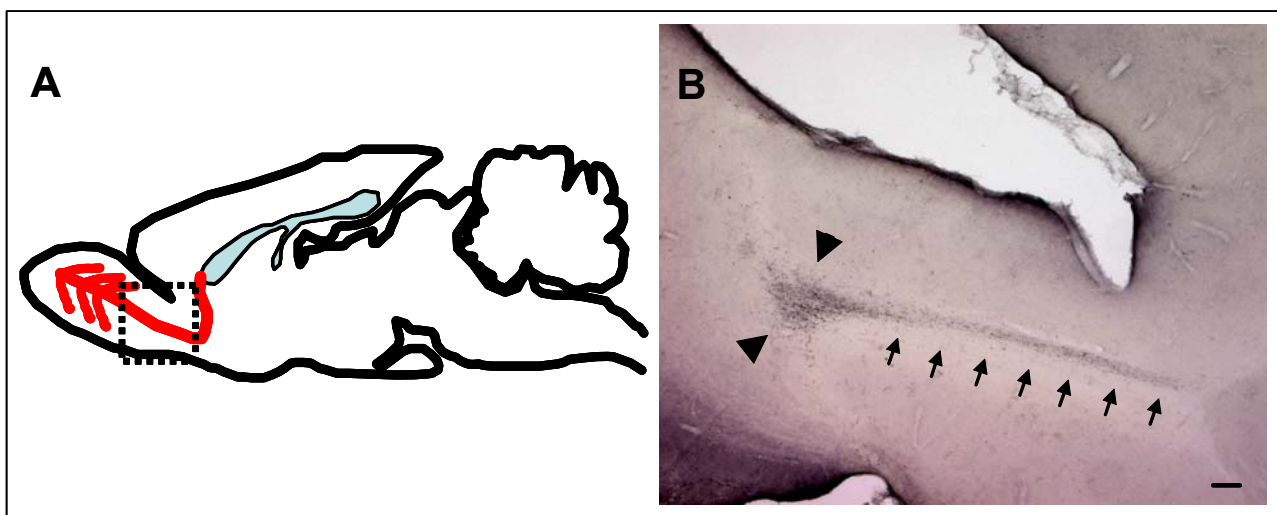


Abb. 1: Wanderroute der in der SVZ gebildeten Neuroblasten in Richtung der Riechkolben (A, B). Die Abbildung (A) zeigt eine schematische Seitenansicht des Gehirns einer Ratte. Der Bildungsort der Neuroblasten ist die SVZ des Seitenventrikels (blau). Unter weiterer Proliferation und zunehmender Differenzierung wandern die Neuroblasten entlang von astrozytären Leitröhrchen in die Riechkolben und bilden dabei den sog. RMS (rot). Im Riechkolben angelangt, verlassen die Neuroblasten den RMS und wandern in die oberflächlichen Schichten der Bulbi ein, um hier zu funktionellen neuen Neuronen auszudifferenzieren. Die Abbildung (B) zeigt den vergrößerten Ausschnitt des in Abbildung (A) markierten Bereiches eines immunhistologischen Präparates. Neuroblasten des RMS wurden durch die Verwendung von spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht (Pfeile). Im Riechkolben angekommen, schwärmt ein Teil dieser Zellen fächerförmig in die oberflächlichen Zellschichten aus (Dreiecke). Balken = 50 μ m.

Die Mehrzahl der neugebildeten Zellen geht zugrunde, noch bevor sie die Riechkolben erreicht haben. Lediglich ein kleiner Teil der im Überschuss produzierten Zellen differenziert sich vollständig aus und wird in das bestehende neuronale Netzwerk funktionell integriert [26, 37]. Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass die Zahl der integrierten neugebildeten Zellen und deren mittlere Überlebensrate mit dem Grad der sensorischen Eindrücke zunehmen [26]. Des Weiteren erlaubt diese Form der Plastizität eine effektive und einmalige Adaptation des neuronalen Netzwerkes an die sich permanent verändernden Umwelteinflüsse [26].

Die über den Riechnerv und die Riechkolben entgegengenommene Sinnesinformation wird im olfaktorischen Cortex weiterverarbeitet. Der piriforme Cortex (PC) ist das größte Areal des olfaktorischen Cortex der Säugetiere und Teil des limbischen Systems. Da der Bulbus olfactorius die Haupteingangsstruktur des PC darstellt, wird als Synonym für den PC häufig der Begriff „primärer olfaktorischer Cortex“ verwendet. Die Projektionen aus den Riechkolben erfolgen direkt über den lateralen olfaktorischen Trakt [38]. Der PC verfügt über eine einmalige intrinsische Faserbündelstruktur und besitzt zahlreiche afferente und efferente Verbindungen zu anderen Strukturen des limbischen Systems [38, 39]. Funktionell ist der PC für die Wahrnehmung und Unterscheidung von olfaktorischen Eindrücken relevant sowie für deren Verarbeitung im Rahmen der Gedächtnisbildung olfaktorischer Impressionen [40]. Es stellt sich daher die Frage, ob analog zum Bulbus olfactorius, auch auf der Ebene der Prozessierung olfaktorischer Sinneseindrücke Formen einer neurogeneseabhängigen neuronalen Plastizität auffindbar sind.

Adulte hippocampale Neurogenese

Kontinuierlich und lebenslang proliferieren neuronale Vorläuferzellen in der SGZ des GD im Hippocampus diverser Säugetiere und des Menschen [21-23, 25, 28, 31, 41]. Ein Großteil der neuentstandenen Zellen geht bereits in der SGZ zugrunde [42]. Die verbleibenden Zellen migrieren unter stetiger Proliferation und zunehmender Differenzierung in die über der SGZ liegende Körnerzellschicht (engl. granule cell layer,

GCL) und reifen zu funktionellen Körnerzellen aus [20, 22, 43, 44]. Die neugebildeten Körnerzellen senden ihre Dendriten in die Molekularschicht (Mol) des GD und nehmen axonal mit Pyramidenzellen des Hilus und der CA3-Region synaptischen Kontakt auf [41, 45-48]. Die Zellen integrieren sich dabei in das bestehende hippocampale neuronale Netzwerk und bleiben über Monate erhalten. Es wird vermutet, dass auf diese Weise jeden Monat bis zu 250.000 neue Neurone in die GCL funktionell eingefügt werden. Dies entspricht einem Turnover von etwa 6% aller Körnerzellen [49]. Der Ablauf der einzelnen Differenzierungsstadien ist in Abb. 2 dargestellt. In dieser Abbildung sind morphologische Unterschiede und das Expressionsmuster von spezifischen Markern als Kriterien für die Einteilung herangezogen worden. Die Ausgangszellen weisen viele Eigenschaften von Stammzellen auf. So können sich diese Zellen über eine lange Zeit durch symmetrische Zellteilungen selbsterhalten und sich zu Gliazellen und Neurone weiterentwickeln. Zudem besitzen sie einen relativ langsamen Zellzyklus. Im Gegensatz zu echten Stammzellen fehlen ihnen jedoch die ausgeprägte Multipotenz und die Fähigkeit einer unbegrenzten Selbsterhaltung. Daher werden diese Zellen als *stammzellartig* bezeichnet. Ein Teil der stammzellartigen Zellen differenziert sich zu schnell-teilenden neuronalen Vorläuferzellen aus. Diese besitzen in geringem Umfang die Möglichkeit einer Selbsterhaltung. Die Vorläuferzellen sind bereits in ihrer Entwicklung determiniert, so dass aus ihnen lediglich Neurone hervorgehen können. Die neuronalen Vorläuferzellen wandern unter weiterer Proliferation zunehmend in die GCL ein. Schließlich verlassen sie den Zellzyklus und gehen in eine transiente postmitotische Phase über. In dieser werden Neuriten und Synapsen ausgebildet und erste Verbindungen zu anderen Neuronen etabliert. Letztlich reifen diese Zellen dadurch zu neuen funktionellen Körnerzellen aus. Eingehende molekulare und elektrophysiologische Untersuchungen konnten eine vollständige funktionelle Integration der neugebildeten Körnerzellen bestätigen, die ausführlich in einer Studie von Lledo et al. (2006) zusammengefasst wurde [9]. Die Integration von neugebildeten Zellen in ein bereits bestehendes neuronales Netzwerk besitzt eine enorme funktionelle Bedeutung auf zellulärer und systemischer Ebene [17, 28]. Wiederholt wurde beschrieben, dass junge neugebildete Körnerzellen eine höhere synaptische Plastizität gegenüber älteren Körnerzellen aufweisen [50, 51].

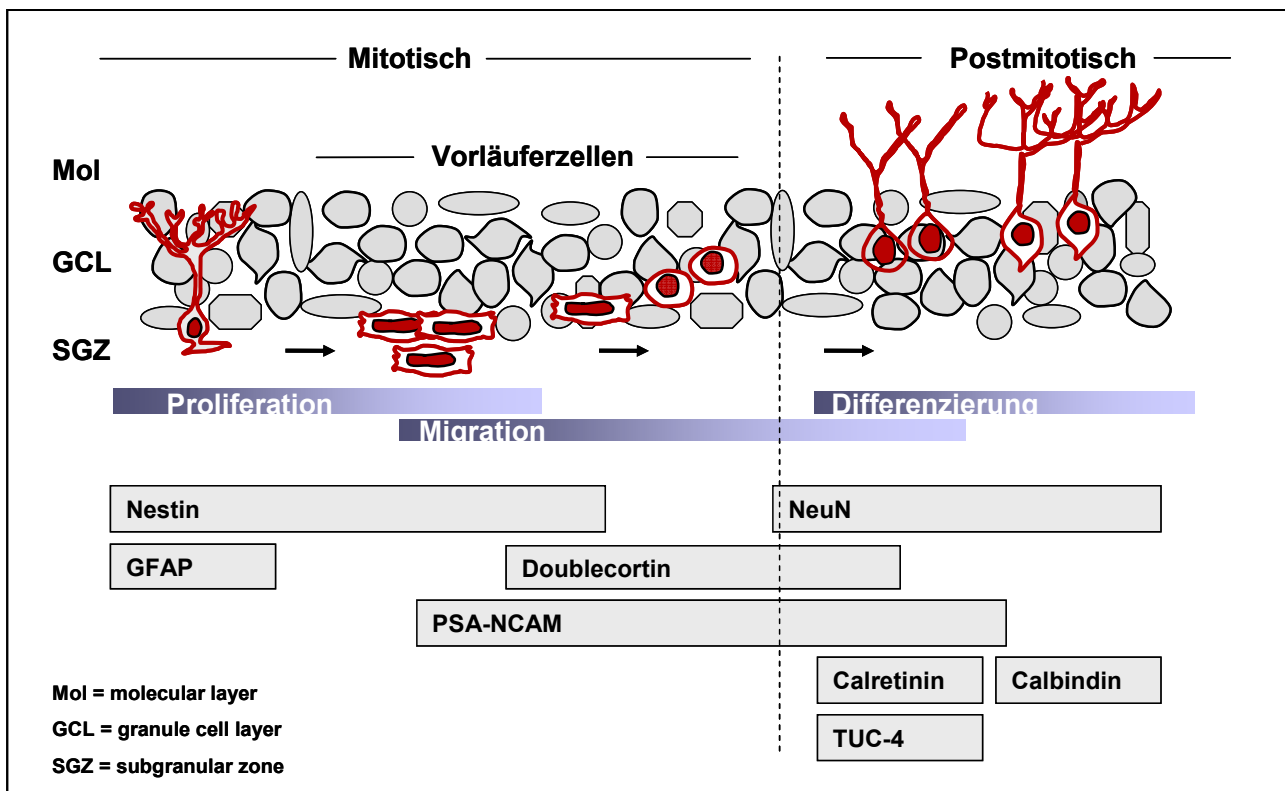


Abb. 2: Phasen der Körnerzellentstehung im adulten Hippocampus [41]. Eingeteilt auf der Basis der Morphologie, Proliferationsfähigkeit und der Expression verschiedener neuronaler Proteine. Modifizierte Abbildung von A. Pekcec und H. Potschka.

Die typische Verschaltung der Neurone im Hippocampus wird häufig als tri-synaptisches Netzwerk bezeichnet (Abb. 3). Innerhalb des tri-synaptischen hippocampalen Netzwerkes ($\rightarrow \text{DG} \rightarrow \text{CA3} \rightarrow \text{CA1} \rightarrow$) findet die Neubildung von Nervenzellen in einer sog. Flaschenhalsposition statt, da sehr viele Neurone des entorhinalen Cortex und weiteren hippocampalen Eingangsstrukturen via dem *perforant path* auf lediglich sehr wenige Körnerzellen des GD projizieren (bei der Maus z. B. 250.000 Körnerzellen). Diese Körnerzellen sind mit einer noch geringeren Anzahl an CA3-Pyramidenzellen verbunden, die wiederum über Projektionen durch Pyramidenzellen der CA1-Region mit corticalen Zellen verschaltet sind. Damit findet die Neubildung der Nervenzellen an der schmalsten Stelle innerhalb des tri-synaptischen Netzwerkes statt, in der die Integration weniger Zellen bereits einen großen Einfluss auf das gesamte neuronale Netzwerk haben könnte [17].

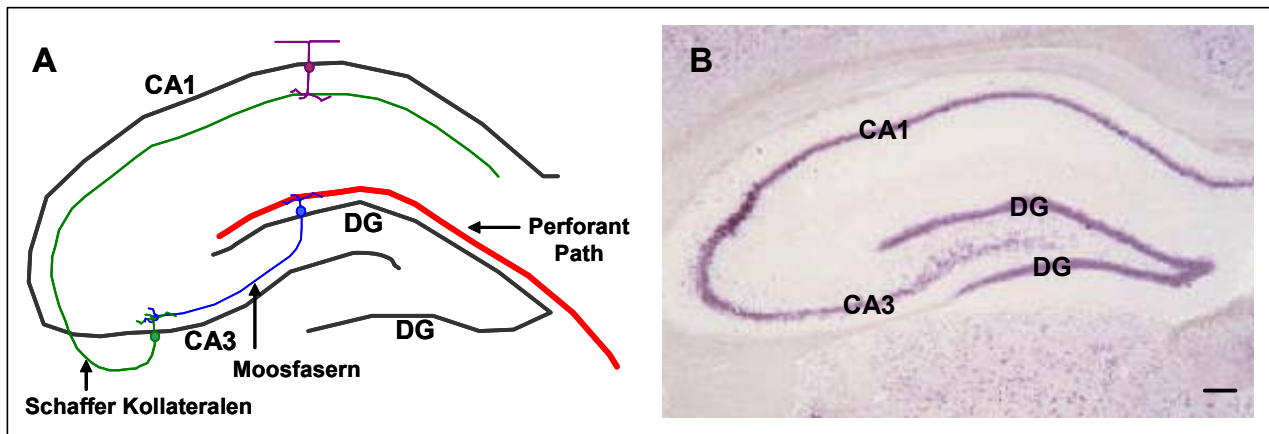


Abb. 3: Schematische Darstellung der tri-synaptischen Verschaltung im Hippocampus (A) und Nissl-gefärbter coronaler Hippocampuschnitt in der Übersicht (B). Die Haupteingangsbahn des Hippocampus stellt der sog. *perforant path* (rot) dar, dessen Fasern insbesondere Axone des entorhinalen Cortex beinhaltet. Körnerzellen (blau) des Gyrus dentatus (GD) stehen über ihren Dendriten mit dem *perforant path* in synaptischem Kontakt. Die Axone der Körnerzellen, die als Moosfasern bezeichnet werden, ziehen zu den Pyramidenzellen der CA3-Region (grün). Die Axone dieser Zellen werden als Schaffer Kollateralen bezeichnet und sind ihrerseits mit Pyramidenzellen der CA1-Region (violett) des Hippocampus verbunden. Die CA-1 Pyramidenzellen sind axonal mit Zellen corticaler Regionen verbunden. Die Abbildung (B) gibt einen Überblick über die wichtigsten Subregionen des Hippocampus. In der Nissl-Färbung stellen sich in einer geringen Vergrößerung die Somata der Zellen als Banden dar. Balken = 50 μ m.

Als physiologisches Korrelat dieser Permissivität wurde eine grundlegende Bedeutung für Lern- und Gedächtnisprozesse postuliert [14, 17, 27, 28, 52-54]. Diese Hypothese ist eng mit der physiologischen Bedeutung des Hippocampus verbunden. Der Hippocampus wird häufig als „Tor zum Gedächtnis“ bezeichnet. Diese metaphorische Bezeichnung soll verdeutlichen, dass der Hippocampus insbesondere an der Bildung eines Langzeitgedächtnisses beteiligt ist. Zwar besitzt der Hippocampus eine geringe Kapazität an Informationsspeicherung, die für das Kurzzeitgedächtnis von Bedeutung ist; seine Hauptfunktion besteht jedoch eher darin, Informationen für das Langzeitgedächtnis zu bearbeiten und für eine „Speicherung“ in corticalen Regionen vorzubereiten [15, 55]. Somit könnte eine Integration von neuen Körnerzellen (und damit von neuen Verarbeitungseinheiten) innerhalb der Flaschenhalposition des tri-synaptischen hippocampalen Netzwerkes, von Relevanz für die Funktion des Hippocampus sein [55].

Zahlreiche endogene Faktoren und Umwelteinflüsse wirken sich auf die Proliferations- und Integrationsrate sowie die Überlebensdauer von Neuronen aus. Die Überlebensrate von sich neubildenden Körnerzellen steigt aufgrund physischer Aktivität [56] und durch die Exposition mit vielfältigen Umgebungseindrücken [13, 57, 58], während Stress einen gegenteiligen Effekt besitzt [59]. Diese und weitere Modulationen sollen unter physiologischen wie auch pathologischen Bedingungen eine Bedeutung für hippocampusabhängige Lern- und Gedächtnisaufgaben besitzen [17, 53, 54, 60]. Viele dieser Daten sind jedoch widersprüchlich und nicht reproduzierbar [9, 61]. Daher kann derzeit keine allgemeingültige Aussage bezüglich der Relevanz neurogeneseassoziiierter Plastizität für Lern- und Gedächtnisfunktionen getroffen werden. Vielmehr ist eine differenzierte Betrachtung notwendig, da der Grad der Nervenzellneubildung, die Überlebensrate neugebildeter Zellen und die Differenzierung der Zellen stark von der Art der Lern- und Gedächtnisaufgaben abhängig sind [62, 63].

Neurogenese außerhalb der primär neurogenen Gehirnregionen

In der SGZ des Hippocampus und der SVZ des lateralen Seitenventrikels von Säugetieren entsteht lebenslang und kontinuierlich eine große Anzahl an Neuronen. Daher werden diese beiden Regionen häufig als primäre neurogene Zonen bezeichnet [64]. Diverse Studien wiesen darüber hinaus eine Neubildung von Nervenzellen in weiteren Gehirnregionen adulter naiver Säugetiere nach [65-74]. Da die Anzahl der neugebildeten Zellen im Vergleich zur SGZ und SVZ gering ist und deren Existenz vielfach angezweifelt wird, wird in diesem Zusammenhang häufig von einer Neurogenese außerhalb der primär neurogenen Zonen gesprochen [64].

Die Arbeitsgruppe von Elizabeth Gould erbrachte wiederholt den Nachweis einer transienten Neurogenese im präfrontalen, temporalen, und parietalen Neocortex von naiven Primaten und Ratten [65, 66]. Andere Arbeitsgruppen konnten wiederum keine Hinweise auf eine transiente Neurogenese in diesen Hirnregionen finden [31, 64, 75, 76]. Diese kontroversen Daten entfachten daher eine seither anhaltende Diskussion über die

Existenz von neuronaler Vorläuferzellen und neugebildeter Neurone in diesen Regionen [43, 64, 77-78].

Neben dem Neocortex konnte eine Neubildung von Neuronen in der Amygdala und der Substantia nigra von naiven Primaten [69, 71], im Nucleus caudatus und Cerebellum von Kaninchen [73, 74], in der CA-1 Region des Hippocampus [67] und im Hypothalamus von Mäusen [72] sowie im Hirnstamm und Rückenmark von Ratten [68, 70] demonstriert werden. Alle diese Daten stehen in Kontrast zu anderen Studien, die zwar die Existenz lokaler endogener multipotenter Vorläuferzellen einräumen, jedoch keine kontinuierliche Nervenzellneubildung beobachten konnten [64, 79-83]. Multipotente Vorläuferzellen konnten bisher in verschiedenen Regionen außerhalb der primär neurogenen Zonen von Säugetieren und aus humanem Gewebe isoliert und *in vitro* kultiviert werden [84-89]. Interessanter Weise zeigen diese Zellen ein analoges Verhalten zu den Stammzellen und Vorläuferzellen der SVZ. So generieren Vorläuferzellen, die aus dem Rückenmark gewonnen und in den Hippocampus implantiert wurden, Körnerzellen. Hingegen entwickeln sich nach Reimplantation *in situ* lediglich Gliazellen und keine Neurone [90, 91]. Lie et al. (2002) haben multipotente Vorläuferzellen aus der Substantia nigra isoliert und mit unterschiedlichen trophischen Faktoren ko-inkubiert, so dass sich daraus Neurone entwickelten [91]. Diese Daten bestärken die gängige Vermutung einer Abhängigkeit neurogeneseassoziiertes Plastizität vom lokalen Mikromillieu. Multipotente neuronale Vorläuferzellen ließen sich ebenfalls aus dem Cortex humaner Patienten isolieren [85].

Die Existenz von endogenen multipotenten Vorläuferzellen außerhalb der primären neurogenen Zonen wird durch eine Reihe von Studien bestärkt, in denen eine Neubildung von Nervenzellen durch pathologische Insulte induziert werden konnte [92-98]. Magavi et al. (2000) lösten die Apoptose spezifischer corticothalamischer Projektionsneurone im anterioren Neocortex von adulten Mäusen mit einer chromophorabhängigen Laserphotolyse aus [92]. In dieser Gehirnregion findet normalerweise keine Nervenzellneubildung statt. Infolge der induzierten Apoptose bildeten sich jedoch neue Zellen, die zu Neuronen ausdifferenzierten und ebenfalls corticothalamische Verbindungen aufwiesen. Da diese Zellen über Monate überlebten, gehen die Autoren von einer

zelltodinduzierten funktionellen Regeneration aus, die vermutlich von endogenen, lokalen multipotenten Vorläuferzellen ausgeht [92, 96]. Die Arbeitsgruppe konnte zu einem späteren Zeitpunkt ebenfalls eine apoptoseinduzierte Nervenzellneubildung von Zellen des corticospinalen Traktes nachweisen [95]. Eine Induktion der Neurogenese ausgehend von ortsgebundenen multipotenten Vorläuferzellen könnte im Zusammenhang mit der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien für verschiedene neurodegenerative Erkrankungen des Nervensystems von entscheidender Bedeutung sein [93, 94]. Dies wird durch eine aktuelle Arbeit von Nakatani et al. (2002) bestätigt, in der eine Regeneration hippocampaler Pyramidenzellen in der CA-1 Region beschrieben wird, die von endogenen, multipotenten Vorläuferzellen ausgeht [98].

Ausgehend von endogenen, ortsständigen Vorläuferzellen können Neuroblasten neben dieser *in situ* Neurogenese ebenfalls aus der SVZ in geschädigte Gehirnbereiche einwandern und untergegangene Neurone funktionell ersetzen. Arvidsson et al. (2002) und Parent et al. (2002) zeigten zeitgleich in Rattenmodellen für Schlaganfälle, dass zerstörte striatale Neurone durch rekrutierte Neuroblasten der SVZ ersetzt werden [97, 99]. Die Autoren schließen jedoch eine *in situ* Neurogenese aus endogenen, multipotenten Vorläuferzellen innerhalb des Striatums nicht aus [97]. Ausgehend von den erwähnten Daten von Magavi et al. [92, 96] ist es von Interesse, dass im Bereich von schlaganfallinduzierten Läsionen im parietalen Cortex keine neugebildeten Nervenzellen gefunden werden konnten. Dieses negative Ergebnis in Bezug auf eine fehlende *in situ* Neurogenese könnte auf Speziesunterschieden beruhen, oder aufzeigen, dass die Art der Schädigung für die Induktion einer regenerativen Neurogenese von Bedeutung sein könnte. Im parietalen Cortex humaner Schlaganfallpatienten konnten hingegen Hinweise auf die Neubildung von Nervenzellen gewonnen werden [100]. Die Herkunft dieser Zellen ist aufgrund methodischer Limitationen bei Verwendung humanen Gewebes derzeit nicht genauer identifizierbar. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass excitotoxininduzierte Läsionen im Striatum mit der Rekrutierung von SVZ-Neuroblasten einhergehen [101]. Jedoch ist hier eine zeitgleiche Neurogenese *in situ* nicht auszuschließen.

Die Daten belegen die Existenz endogener, lokaler, multipotenter Vorläuferzellen in diversen Gehirnregionen außerhalb der primären neurogenen Areale. Sie werden darüber

hinaus durch komplementäre Ergebnisse einer läsionsinduzierten Regeneration außerhalb der primär neurogenen Zonen gestützt. Weitere Studien deuten zudem auf eine transient ablaufende Neurogenese in einigen dieser Hirnregionen hin. Diese erscheint im direkten Vergleich mit der hippocampalen und olfaktorischen Neurogenese erheblich geringer zu sein. Aufgrund vielfach divergierender Ergebnisse ergibt sich ein erhöhter Bedarf an Untersuchungen, die die Lokalisation, den Umfang und die funktionelle Bedeutung dieser Form der neurogeneseabhängigen Plastizität weiter aufklären.

Neurogeneseabhängige Plastizität im epileptischen Gehirn

Epilepsien sind definiert durch das wiederholte und spontane Auftreten von Anfällen zentralen Ursprungs. Epilepsien zählen zu den häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen von Menschen sowie Hunden und Katzen und treten mit einer Prävalenz von bis zu 2% in der Bevölkerung auf [102-104]. Die Entstehung und Manifestation einer Epilepsie (= Epileptogenese) geht mit zahlreichen neuropathologischen plastischen Veränderungen des Nervensystems einher [105-107]. Die häufigste Epilepsieform des Menschen hat ihren Ursprung im Temporallappen und wird daher auch als Temporallappenepilepsie bezeichnet. Aufgrund der besonderen pathophysiologischen Bedeutung des Hippocampus für diese Form der Epilepsie werden im Folgenden die neuronalen Veränderungen in dieser Gehirnregion betrachtet und insbesondere die neurogeneseabhängigen Aberrationen der neuronalen Plastizität herausgestellt.

Für die Entstehung und Erhaltung eines epileptischen, neuronalen Netzwerkes werden unterschiedliche plastische Mechanismen mitverantwortlich gemacht, die sowohl für die Anfallsinduktion und Anfallsausbreitung entscheidend sein könnten, als auch für die Beeinträchtigung physiologischer hippocampaler Funktionen von Relevanz sind [107, 108]. So konnten wiederholt hippocampusabhängige kognitive und psychiatrische Störungen bei epileptischen Patienten und in experimentellen Studien festgestellt werden [17, 109-113].

Diese plastischen Veränderungen sind die Grundlage für eine Beeinträchtigung inhibitorischer neuronaler Systeme und/oder einer überschießenden Aktivität excitatorischer Systeme. Der dominierende inhibitorische Transmitter im Nervensystem ist GABA [114]. Es existieren eindeutige Hinweise für eine Vielzahl von anfallsassoziierten Aberrationen der Funktion des GABAergen Systems [108, 114, 115]. Zudem konnten unterschiedliche neuronale plastische Veränderungen mit einer gesteigerten Aktivität excitatorischer Systeme in Zusammenhang gebracht werden. So wurden vielfach Veränderungen der glutamatergen Transmission in tierexperimentellen Studien und im Gehirngewebe humaner Epilepsiepatienten nachgewiesen [108]. Diese betreffen zum einen die gesteigerte präsynaptische Freisetzung des excitatorischen Transmitters Glutamat und zum anderen dessen gestörte Wiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt sowie Veränderungen in der Zusammensetzung, Dichte und Expression von Glutamatrezeptoren [108]. Die massiv gesteigerte Glutamatfreisetzung ist wesentlich an dem Verlust von Neuronen im Hippocampus und anderen besonders vulnerablen Gehirnregionen, wie dem PC, beteiligt und kann durch den spezifischen NMDA-Rezeptorantagonisten MK-801 verhindert werden [116, 117]. Die Neurodegeneration im Hippocampus wird als relevant für die Entstehung der Hyperexcitabilität gesehen [106, 118, 119]. Eine tierexperimentelle Studie konnte jedoch zeigen, dass MK-801 keinen antiepileptogenen Effekt besitzt [120]. Dieses Ergebnis impliziert, dass weitere plastische Veränderungen an der Hyperexcitabilität beteiligt sein müssen.

Die Bildung neuer neuronaler Netzwerke wird ebenfalls als plastische Veränderung angesehen, die an der Ausbildung und dem Erhalt der Hyperexcitabilität beteiligt ist. Grundlage dieser Netzwerkneubildung ist die Sprossung von Körnerzellaxonen, den sog. Moosfasern, sowie dendritische Reorganisationen, die von einer Synapsenneubildung begleitet wird. Diese Prozesse treten infolge einer gesteigerten neuronalen Aktivität auch unabhängig von einer Neurodegeneration auf [108] und könnten weiterhin in funktionellen, rückläufigen excitatorischen Feedbackkreisläufen resultieren. Es wird diskutiert, dass derartige Feedbackkreisläufe an der Initiierung und Propagation spontaner epileptischer Anfälle beteiligt sein könnten [121]. Die Unterdrückung der mit Epilepsien einhergehenden massiven axonalen und dendritischen Reorganisation, die an der Ausbildung aberranter

synaptischer Verbindungen beteiligt ist [121-124], wird daher als eine mögliche Strategie zur Behandlung diverser Epilepsieformen diskutiert [124]. Neben diesen rein neuronalen Veränderungen treten ebenfalls strukturelle Veränderungen von Gliazellen auf, die an prokonvulsiven Umbauprozessen beteiligt sein können [125, 126].

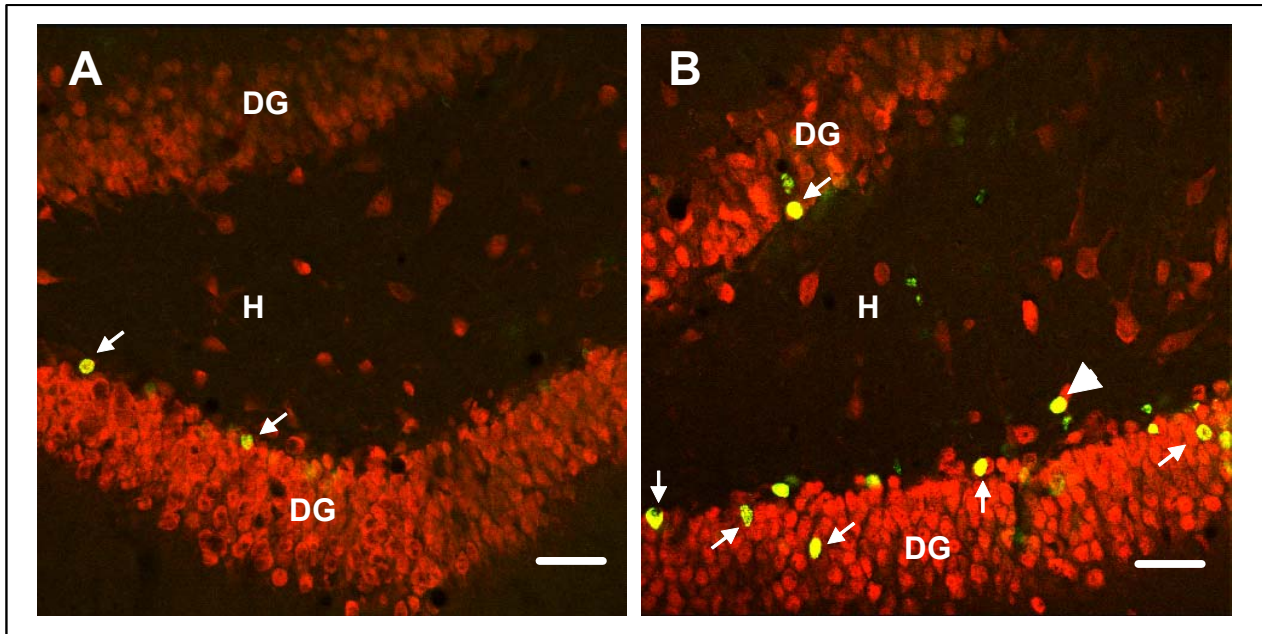


Abb. 4: Immunhistologische Abbildung des Hippocampus einer Kontrollratte (A) und einer Ratte in der Frühphase der Epileptogenese (B). In rot stellen sich Neurone dar, die mit einem spezifischen neuronalen Marker (NeuN) immunhistologisch angefärbt wurden. Das Thymidinanalogon Bromodesoxyuridin (BrdU) wurde immunhistologisch angefärbt (grün). BrdU wurde den Ratten vor Versuchsbeginn intraperitoneal appliziert und von sich teilenden Zellen in die DNA eingebaut. Zellen, die BrdU inkorporiert haben und den neuronalen Marker NeuN co-exprimieren, können folglich als neugebildete Neurone identifiziert werden. Solche doppelmarkierte Zellen erscheinen gelb (weiße Pfeile). Während in Kontrollratten lediglich vereinzelt neugebildete Neurone im Gyrus dentatus (GD) sichtbar sind (A), weisen Ratten in der Frühphase der Epileptogenese eine deutliche Induktion der Körnerzellneurogenese auf (weiße Pfeile, B). Darüber hinaus sind bei diesen Tieren zusätzlich einige neugebildete Neurone ektopisch im Bereich des Hilus (H) lokalisiert (weißes Dreieck).

An der Ausbildung neuer neuronaler Netzwerke könnten ebenfalls neurogeneseabhängige plastische Umstrukturierungen beteiligt sein. Sowohl im Tiermodell als auch in Hippocampi

humaner Patienten sind wiederholt massive neurogeneseassoziierte Veränderungen beschrieben worden. Eine häufig beobachtete Aberration ist dabei eine Induktion der Körnerzellneubildung (Abb. 4A-B), die insbesondere in der Frühphase der Erkrankung beschrieben wurde [127-131]. Diese anfallsinduzierte Steigerung der hippocampalen Neurogenese ist sowohl spezies- als auch modellabhängig und variiert insbesondere in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt. In der chronischen Phase der Erkrankung wurde hingegen von vielen Autoren eine Suppression der hippocampalen Neurogenese beobachtet [132-135]. Ungeachtet davon ist die hippocampale Neurogenese im epileptischen Gehirn mit atypischen Charakteristika verbunden, die die Morphologie, die Lokalisation und das elektrophysiologische Profil der Zellen betreffen und als Teil einer prokonvulsiven Plastizität gewertet werden [121, 136-145]. So bilden neuentstandene Körnerzellen im epileptischen Nagerhirn aberrierende Axone aus (= Moosfasersprossung), die sich an dem prokonvulsivem Umbauprozess beteiligen [146, 147]. Analoge Veränderungen sind ebenfalls in reseziertem Humangewebe nachgewiesen worden [148-150].

Darüber hinaus weisen einige der neuronale Vorläuferzellen im epileptischen Gehirn eine Störung ihres Migrationsprofils auf. Anfallsinduziert wandern neuronale Vorläuferzellen in den Hilus und die Molekularschicht des Hippocampus ein, oder persistieren im Bereich der SGZ (Abb. 4B). Diese Zellen werden als ektopische Körnerzellen bezeichnet. Sie differenzieren sich trotz fehlerhafter Lokalisation zu Körnerzellen aus, die in diesen Regionen sonst nicht zu finden sind und bilden aberrante synaptische Verbindungen mit anderen Zellen aus [131, 142, 151, 152]. Aufgrund der Persistenz, einer hohen Anzahl dieser Zellen und deren funktionelle Integration in limbische Schaltkreisen kann von einer wesentlichen Bedeutung für das Anfallsgeschehen ausgegangen werden [145]. Elektrophysiologische Untersuchungen stützen diese Hypothese, da sich ektopische Körnerzellen sowohl orthodrom über den *perforant path* (der Eingangsstruktur des Hippocampus, siehe Abb. 3A), als auch antidrom über eine Moosfaserstimulation aktivieren lassen und ein abnormes spontanes Entladungsmuster (= *burst firing*) aufweisen [141-144].

Ein großer Anteil der neugebildeten ektopischen Neurone ist durch das gehäufte Auftreten persistierender basaler Dendriten charakterisiert (Abb. 5A, B) [47, 138, 139, 153-159]. Während der Entwicklung von Körnerzellen im adulten Gehirn bilden neuronale Vorläuferzellen kurze Dendriten an der Basis des Zellkörpers aus, die lediglich für einen kurzen Zeitraum erhalten bleiben [139]. Als erste Arbeitsgruppe wiesen Spigelman et al. (1998) das Auftreten von in den Hilus ziehenden persistierenden basalen Dendriten bei epileptischen Ratten nach. Nach ihren Schätzungen bildeten 5-16% der Körnerzellen abnorme Dendriten aus. Die Entdeckung wurde später in drei weiteren Epilepsiemodellen bestätigt [153, 159, 160] und durch die Erkenntnis erweitert, dass diese von sich neubildenden ektopischen Körnerzellen ausgehen [156].

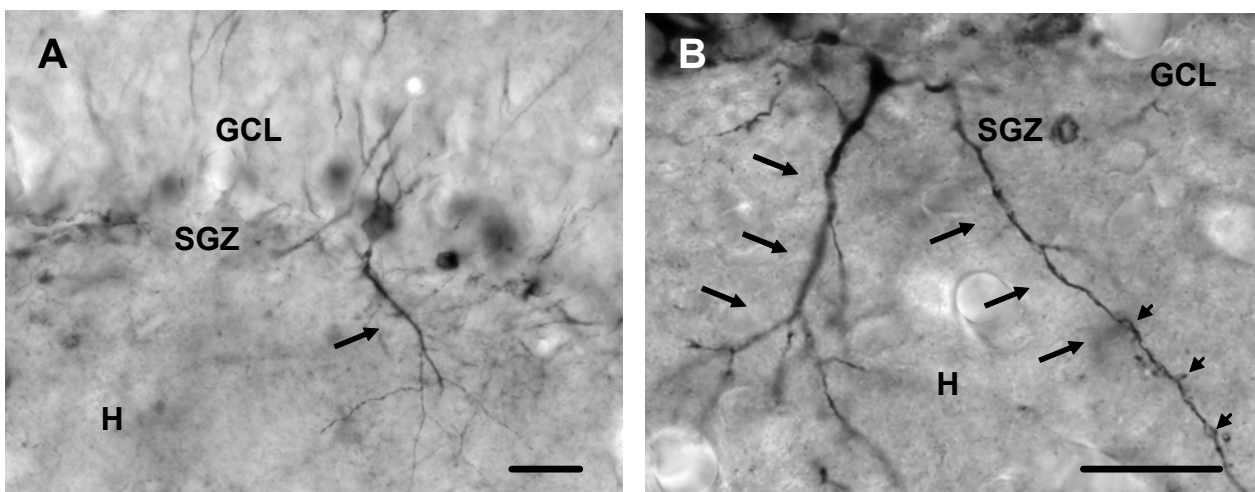


Abb. 5: Persistierende basale Dendriten von sich neubildenden Körnerzellen im Hippocampus epileptischer Ratten (A, B). In (A) ist eine neuronale Vorläuferzelle sichtbar, die aus der subgranulären Zone (SGZ) in die Körnerzellschicht (GCL) eingewandert ist. An der Basis dieser Zelle entspringt ein persistierender basaler Dendrit, der weit in den Hilus (H) des Hippocampus zieht und sich dabei mehrfach verzweigt (Pfeil). (B) zeigt zwei persistierende basale Dendriten, die am Übergang der SGZ/ GCL entspringen und weit in den Hilus hineinziehen (große Pfeile). Diese Dendriten weisen dornenartige Fortsätze (kleine Pfeile) für synaptische Zellverbindungen auf und sind ebenfalls multipel verzweigt. Balken = 25 μ m.

Die anfallsinduzierte Bildung erfolgt bereits binnen weniger Tage, als eine relativ schnelle Form der epilepsieassoziierten Plastizität und ist weiterhin durch eine starke Verlängerung

der Dendriten im Vergleich zu den transient gebildeten Dendriten normaler Körnerzellen charakterisiert [156]. Zudem besitzen sie eine erhöhte Anzahl excitatorischer Synapsen [138, 154, 156]. Als Ursache der Migrationsstörung und der morphologischen Veränderungen neugebildeter Körnerzellen im epileptischen Gehirn wird ein anfallsinduzierter Verlust der eins-zu-eins Verknüpfung zwischen neugebildeten Zellen und benachbarten spezialisierten Astrozyten vermutet [139]. Diese Hypothese basiert auf elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Seki (2002) und Shapiro et al. (2005), die eine enge räumliche und zeitliche Verbindung von sich neubildenden Körnerzellen und besonderen Astrozyten, den radialen Gliazellen, entdeckten [161, 162]. Ein anfallsinduzierter Verlust dieser Verbindung soll weiterhin für das Aussprossen und Persistieren von basalen Dendriten sich neubildender Körnerzellen verantwortlich sein [139].

Neugebildete ektopische Körnerzellen weisen in Bezug auf ihre Morphologie, Netzwerkorganisation und funktionellen Charakteristika Veränderungen auf, die an der Ausbildung und der Erhaltung eines epileptischen Netzwerkes beteiligt sein könnten. Insbesondere das Auftreten persistierender basaler Dendriten und die gesteigerte Anzahl excitatorischer Synapsen könnten weiterhin zur Reduktion der Krampfschwelle und somit zur Anfallsgenerierung beitragen. Es wird vermutet, dass das Auftreten persistierender basaler Dendriten auf eine direkte Anfallsaktivität zurückzuführen ist; jedoch fehlen genauere Untersuchungen der induzierenden Faktoren, die die Störungen dieser neurogeneseabhängigen Plastizität verursachen.

Zusammenfassung und Zielsetzung der Untersuchungen

In den letzten Jahren erweiterten die Entdeckungen von endogenen Stammzellen und multipotenten Vorläuferzellen im adulten Säugetiergehirn die bisherigen Vorstellungen über die Möglichkeiten der Mechanismen neuronaler Plastizität. Eine kontinuierlich stattfindende Neuronenneubildung aus Zellen mit Stammzeleigenschaften konnte sowohl in der SVZ des olfaktorischen Systems, als auch in der SGZ des Hippocampus

nachgewiesen werden. Zwar sind die einzelnen Entwicklungsstufen und molekularen Mechanismen der Nervenzellentstehung bereits hinreichend bekannt, jedoch sind spezifische Aussagen über die exakte physiologische Relevanz dieses Phänomens trotz intensiver Untersuchungen unklar. Neben der kontinuierlich ablaufenden Neurogenese in diesen beiden Regionen existieren multipotente Vorläuferzellen in weiten Teilen des übrigen Nervensystems. Unter verschiedenen experimentellen Bedingungen konnte eine von diesen Zellen ausgehende Neurogenese nachgewiesen werden. Es ist derzeit jedoch unklar, ob diese Zellpopulation im naiven Gehirn in einem ruhenden Zustand verweilt, oder zu einem sehr geringen Grad ebenfalls neue Neurone hervorbringt. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden Untersuchungen im PC naiver Ratten durchgeführt. Dieser nimmt den größten Bereich des olfaktorischen Cortex ein. Da es sich um den entwicklungsgeschichtlich ältesten Anteil des Neocortex handelt, wird er ebenfalls als Paleocortex bezeichnet. Neurogeneseabhängige Modifikationen im Bulbus olfactorius könnten ein analoges nachgeschaltetes Korrelat an Plastizität auf einer nachgeschalteten Ebene erfordern. Da der PC die Hauptagangsstruktur des Bulbus olfactorius darstellt und somit eine neurogeneseabhängige Plastizität in dieser Gehirnregion am wahrscheinlichsten erscheint, wurde bei den durchgeführten Untersuchungen insbesondere diese Gehirnregion berücksichtigt. Der PC besitzt zudem eine große physiologische Bedeutung für die Verarbeitung und die Gedächtnisbildung von Sinneseindrücken sowie eine pathologische Bedeutung im Rahmen von verschiedenen neurologischen Erkrankungen, wie der Epilepsie [39, 163, 164]. So ist der PC ein Multiplikator neuronaler Exzitationen im Anfallsgeschehen und unterliegt einer Vielzahl von plastischen Veränderungen während der Epileptogenese [39, 163-167].

Die Untersuchungen haben den Zweck die Mechanismen neurogeneseassoziiertter Plastizität aufzudecken (siehe Publikation 1). Die Aufklärung dieser Mechanismen kann weiterführend eine Basis für das Verständnis pathophysiologischer Veränderungen der neuronalen Plastizität liefern, die für die Entwicklung von neuen therapeutischen Strategien oder der Prophylaxe von neurologischen Erkrankungen wie der Epilepsie von Bedeutung sein können.

Die Existenz von Stammzellen und multipotenten Vorläuferzellen im adulten Säugetiergehirn impliziert die Möglichkeit zerstörtes Nervengewebe durch endogenen

Ersatz zu regenerieren. Neben diesem regenerativen Potential wird jedoch ebenfalls eine Beteiligung der neurogeneseassoziierten Plastizität in der Pathophysiologie diverser neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen, darunter Epilepsien, diskutiert. Spezifische Aberrationen in der Entwicklung sich neubildender hippocampaler Zellen im Zusammenhang mit Epilepsien wurden in diversen experimentellen Tiermodellen als auch in reseziertem Gewebe und post mortem Gewebe humaner Patienten beschrieben. Das Auftreten vieler dieser Veränderungen wurde direkt auf epileptische Anfälle zurückgeführt, jedoch fehlt vielfach die Evidenz für diese Hypothese. So ist derzeit unklar, ob neurogeneseabhängige Veränderungen eine direkte Folge einer anhaltenden Anfallsaktivität sind, oder ob derartige morphologische Veränderungen Teil eines hyperexcitablen Netzwerkes darstellen und somit unabhängig von einer Anfallsaktivität entstehen können. Letzteres impliziert, dass eine Erkrankungsprogression ebenfalls in Phasen der Abwesenheit von Anfällen stattfinden kann. Aus diesem Grunde sollen weiterführende Untersuchungen die Mechanismen der epilepsieassoziierten Störungen der neurogeneseabhängigen Plastizität im Hippocampus von Ratten aufklären (siehe Publikation 2).

Referenzen

- [1] Frankenhauser R, Vandeveld M. Veterinary Neurology – Past, Present and Future. **J Comp Path** 1988; 98:175-286.
- [2] Löscher W. Neue Antiepileptika – Ein Fortschritt für die Behandlung epileptischer Tiere? **Kleintierpraxis** 1994; 39: 239-258.
- [3] Platt SR, Adams V, Garosi S, Abramson CJ, Penderis J, De Stefani A, Matiasek L. Treatment with gabapentin of 11 dogs with refractory idiopathic epilepsy. **The Veterinary Record** 2006; 23/30.
- [4] Huether G, Doering S, Ruger U, Ruther E, Schussler G. The stress-reaction process and the adaptive modification and reorganization of neuronal networks. **Psychiatry Res** 1999; 87:83-95.
- [5] Katz LC, Shatz CJ. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. **Science** 1996; 274:1133-1138.
- [6] Zilles K. Neuronal plasticity as an adaptive property of the central nervous system. **Ann Anat** 1992.
- [7] Dityatev A, Schachner M. Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. **Nat Rev Neurosci** 2003; 4:456-468
- [8] Kandel ER. The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. **Biosci Rep** 2001; 21:565-611.
- [9] Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. **Nat Rev Neurosci** 2006; 7:179-193.

- [10] Hack MA, Saghatelian A, de CA, Pfeifer A, Shery-Padan R, Lledo PM et al. Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. **Nat Neurosci** 2005; 8:865-872.
- [11] Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. **Nature** 2006; 441:1094-1096.
- [12] Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone. **J Neurosci** 2002; 22:629-634.
- [13] Bruel-Jungerman E, Laroche S, Rampon C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. **Eur J Neurosci** 2005; 21:513-521.
- [14] Winocur G, Wojtowicz JM, Sekeres M, Snyder JS, Wang S. Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function. **Hippocampus** 2006; 16:296-304.
- [15] Wiskott L, Rasch MJ, Kempermann G. A functional hypothesis for adult hippocampal neurogenesis: avoidance of catastrophic interference in the dentate gyrus. **Hippocampus** 2006; 16:329-343.
- [16] Taupin P. The therapeutic potential of adult neural stem cells. **Curr Opin Mol Ther** 2006; 8:225-231.
- [17] Kempermann G, Wiskott L, Gage FH. Functional significance of adult neurogenesis. **Curr Opin Neurobiol** 2004; 14:186-191.
- [18] Alonso M, Viollet C, Gabellec MM, Meas-Yedid V, Olivo-Marin JC, Lledo PM. Olfactory discrimination learning increases the survival of adult-born neurons in the olfactory bulb. **J Neurosci** 2006; 26:10508-10513.

- [19] Kempermann G, Kronenberg G. Depressed new neurons--adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. **Biol Psychiatry** 2003; 54:499-503.
- [20] Kuhn HG, Palmer TD, Fuchs E. Adult neurogenesis: a compensatory mechanism for neuronal damage. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci** 2001; 251:152-158.
- [21] Altman J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. **J Comp Neurol** 1969; 137:433-457.
- [22] Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **J Comp Neurol** 1965; 124:319-335.
- [23] Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nat Med** 1998; 4:1313-1317.
- [24] Bedard A, Parent A. Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb. **Brain Res Dev Brain Res** 2004; 151:159-168.
- [25] Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, Fuchs E. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1999; 96:5263-5267.
- [26] Lledo PM, Saghatelian A. Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: joining the network, life-death decisions, and the effects of sensory experience. **Trends Neurosci** 2005; 28:248-254.
- [27] Aimone JB, Wiles J, Gage FH. Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. **Nat Neurosci** 2006; 9:723-727.

- [28] Abrous DN, Koehl M, Le MM. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. **Physiol Rev** 2005; 85:523-569.
- [29] Luskin MB. Neuroblasts of the postnatal mammalian forebrain: their phenotype and fate. **J Neurobiol** 1998; 36:221-233.
- [30] Doetsch F, varez-Buylla A. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1996; 93:14895-14900.
- [31] Kornack DR, Rakic P. The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:4752-4757.
- [32] Lois C, varez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. **Science** 1994; 264:1145-1148.
- [33] Bedard A, Levesque M, Bernier PJ, Parent A. The rostral migratory stream in adult squirrel monkeys: contribution of new neurons to the olfactory tubercle and involvement of the antiapoptotic protein Bcl-2. **Eur J Neurosci** 2002; 16:1917-1924.
- [34] Pencea V, Bingaman KD, Freedman LJ, Luskin MB. Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. **Exp Neurol** 2001; 172:1-16.
- [35] Quinones-Hinojosa A, Sanai N, Soriano-Navarro M, Gonzalez-Perez O, Mirzadeh Z, Gil-Perotin S et al. Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. **J Comp Neurol** 2006; 494:415-434.
- [36] Sanai N, Tramontin AD, Quinones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S et al. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. **Nature** 2004; 427:740-744.

- [37] Winner B, Cooper-Kuhn CM, Aigner R, Winkler J, Kuhn HG. Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. **Eur J Neurosci** 2002; 16:1681-1689.
- [38] Shipley MT, Ennis M. Functional organization of olfactory system. **J Neurobiol** 1996; 30:123-176.
- [39] Loscher W, Ebert U. The role of the piriform cortex in kindling. **Prog Neurobiol** 1996; 50:427-481.
- [40] Shipley MT MJEM. The olfactory system. In *The rat nervous system* . G.Paxinos (editor). San Diego: **Academic Press**; 2006. pp. 899-928.
- [41] Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. **Trends Neurosci** 2004; 27:447-452.
- [42] Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. **Development** 2003; 130:391-399.
- [43] Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. **Neuroscience** 1993; 56:337-344.
- [44] Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. **J Neurosci** 1996; 16:2027-2033.
- [45] Hastings NB, Gould E. Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. **J Comp Neurol** 1999; 413:146-154.

- [46] Markakis EA, Gage FH. Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. **J Comp Neurol** 1999; 406:449-460.
- [47] Shapiro LA, Upadhyaya P, Ribak CE. Spatiotemporal profile of dendritic outgrowth from newly born granule cells in the adult rat dentate gyrus. **Brain Res** 2006.
- [48] van PH, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. **Nature** 2002; 415:1030-1034.
- [49] Cameron HA, McKay RD. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. **J Comp Neurol** 2001; 435:406-417.
- [50] Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. **Nature** 2004; 429:184-187.
- [51] Wang S, Scott BW, Wojtowicz JM. Heterogenous properties of dentate granule neurons in the adult rat. **J Neurobiol** 2000; 42:248-257.
- [52] Laack NN, Brown PD. Cognitive sequelae of brain radiation in adults. **Semin Oncol** 2004; 31:702-713.
- [53] Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. **Nature** 2001; 410:372-376.
- [54] Shors TJ, Townsend DA, Zhao M, Kozorovitskiy Y, Gould E. Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. **Hippocampus** 2002; 12:578-584.
- [55] Kempermann G. Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. **J Neurosci** 2002; 22:635-638..

- [56] van PH, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nat Neurosci** 1999; 2:266-270.
- [57] Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature** 1997; 386:493-495.
- [58] Kempermann G, Gast D, Gage FH. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold in induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. **Ann Neurol** 2002; 52:135-143.
- [59] Mirescu C, Gould E. Stress and adult neurogenesis. **Hippocampus** 2006; 16:233-238.
- [60] van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1999; 96:13427-13431.
- [61] Meshi D, Drew MR, Saxe M, Ansorge MS, David D, Santarelli L et al. Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. **Nat Neurosci** 2006; 9:729-731.
- [62] Dobrossy MD, Drapeau E, Arousseau C, Le MM, Piazza PV, Abrous DN. Differential effects of learning on neurogenesis: learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date. **Mol Psychiatry** 2003; 8:974-982.
- [63] Leuner B, Gould E, Shors TJ. Is there a link between adult neurogenesis and learning? **Hippocampus** 2006; 16:216-224.
- [64] Emsley JG, Mitchell BD, Kempermann G, Macklis JD. Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. **Prog Neurobiol** 2005; 75:321-341.

- [65] Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG. Neurogenesis in the neocortex of adult primates. **Science** 1999; 286:548-552.
- [66] Gould E, Vail N, Wagers M, Gross CG. Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:10910-10917.
- [67] Rietze R, Poulin P, Weiss S. Mitotically active cells that generate neurons and astrocytes are present in multiple regions of the adult mouse hippocampus. **J Comp Neurol** 2000; 424:397-408.
- [68] Yamamoto S, Yamamoto N, Kitamura T, Nakamura K, Nakafuku M. Proliferation of parenchymal neural progenitors in response to injury in the adult rat spinal cord. **Exp Neurol** 2001; 172:115-127.
- [69] Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB et al. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2003; 100:7925-7930.
- [70] Bauer S, Hay M, Amilhon B, Jean A, Moyse E. In vivo neurogenesis in the dorsal vagal complex of the adult rat brainstem. **Neuroscience** 2005; 130:75-90.
- [71] Bernier PJ, Bedard A, Vinet J, Levesque M, Parent A. Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2002; 99:11464-11469.
- [72] Kokoeva MV, Yin H, Flier JS. Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. **Science** 2005; 310:679-683.
- [73] Luzzati F, De MS, Fasolo A, Peretto P. Neurogenesis in the caudate nucleus of the adult rabbit. **J Neurosci** 2006; 26:609-621.

- [74] Ponti G, Peretto P, Bonfanti L. A subpial, transitory germinal zone forms chains of neuronal precursors in the rabbit cerebellum. **Dev Biol** 2006; 294:168-180.
- [75] Koketsu D, Mikami A, Miyamoto Y, Hisatsune T. Nonrenewal of neurons in the cerebral neocortex of adult macaque monkeys. **J Neurosci** 2003; 23:937-942.
- [76] Rakic P. Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. **Nat Rev Neurosci** 2002; 3:65-71.
- [77] Cooper-Kuhn CM, Kuhn HG. Is it all DNA repair? Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain. **Brain Res Dev Brain Res** 2002; 134:13-21.
- [78] Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. **J Comp Neurol** 2000; 425:479-494.
- [79] Frielingsdorf H, Schwarz K, Brundin P, Mohapel P. No evidence for new dopaminergic neurons in the adult mammalian substantia nigra. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2004; 101:10177-10182.
- [80] Horner PJ, Power AE, Kempermann G, Kuhn HG, Palmer TD, Winkler J et al. Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. **J Neurosci** 2000; 20:2218-2228.
- [81] Lie DC, Dzieczapolski G, Willhoite AR, Kaspar BK, Shults CW, Gage FH. The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. **J Neurosci** 2002; 22:6639-6649.
- [82] Gensert JM, Goldman JE. In vivo characterization of endogenous proliferating cells in adult rat subcortical white matter. **Glia** 1996; 17:39-51.

- [83] Gensert JM, Goldman JE. Heterogeneity of cycling glial progenitors in the adult mammalian cortex and white matter. **J Neurobiol** 2001; 48:75-86.
- [84] Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. **J Neurosci** 1999; 19:8487-8497.
- [85] Arsenijevic Y, Villemure JG, Brunet JF, Bloch JJ, Deglon N, Kostic C et al. Isolation of multipotent neural precursors residing in the cortex of the adult human brain. **Exp Neurol** 2001; 170:48-62.
- [86] Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. **J Neurosci** 1992; 12:4565-4574.
- [87] Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. **Science** 1992; 255:1707-1710.
- [88] Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson AC et al. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. **J Neurosci** 1996; 16:7599-7609.
- [89] Palmer TD, Schwartz PH, Taupin P, Kaspar B, Stein SA, Gage FH. Cell culture. Progenitor cells from human brain after death. **Nature** 2001; 411:42-43.
- [90] Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, Gage FH. Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. **J Neurosci** 2000; 20:8727-8735.
- [91] Shihabuddin LS, Ray J, Gage FH. FGF-2 is sufficient to isolate progenitors found in the adult mammalian spinal cord. **Exp Neurol** 1997; 148:577-586.

- [92] Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. **Nature** 2000; 405:951-955..
- [93] Arlotta P, Magavi SS, Macklis JD. Induction of adult neurogenesis: molecular manipulation of neural precursors in situ. **Ann N Y Acad Sci** 2003; 991:229-236.
- [94] Arlotta P, Magavi SS, Macklis JD. Molecular manipulation of neural precursors in situ: induction of adult cortical neurogenesis. **Exp Gerontol** 2003; 38:173-182.
- [95] Chen J, Magavi SS, Macklis JD. Neurogenesis of corticospinal motor neurons extending spinal projections in adult mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2004; 101:16357-16362.
- [96] Magavi SS, Macklis JD. Manipulation of neural precursors in situ: induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. **Neuropsychopharmacology** 2001; 25:816-835.
- [97] Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. **Nat Med** 2002; 8:963-970.
- [98] Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N et al. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. **Cell** 2002; 110:429-441.
- [99] Parent JM, Vexler ZS, Gong C, Derugin N, Ferriero DM. Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. **Ann Neurol** 2002; 52:802-813.
- [100] Jin K, Wang X, Xie L, Mao XO, Zhu W, Wang Y et al. Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2006; 103:13198-13202.

- [101] Collin T, Arvidsson A, Kokaia Z, Lindvall O. Quantitative analysis of the generation of different striatal neuronal subtypes in the adult brain following excitotoxic injury. **Exp Neurol** 2005; 195:71-80.
- [102] Löscher. Neue Antiepileptika - Ein Fortschritt für die Behandlung epileptischer Kleintiere? **Kleintierpraxis** 39, 238-258. 1994.
- [103] Loscher W, Potschka H. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. **Nat Rev Neurosci** 2005; 6:591-602.
- [104] Pitkanen A. Drug-mediated neuroprotection and antiepileptogenesis: animal data. **Neurology** 2002; 59:S27-S33.
- [105] Dalby NO, Mody I. The process of epileptogenesis: a pathophysiological approach. **Curr Opin Neurol** 2001; 14:187-192.
- [106] Pitkanen A, Sutula TP. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. **Lancet Neurol** 2002; 1:173-181.
- [107] Pitkanen A, McIntosh TK. Animal models of post-traumatic epilepsy. **J Neurotrauma** 2006; 23:241-261.
- [108] Morimoto K, Fahnestock M, Racine RJ. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. **Prog Neurobiol** 2004; 73:1-60.
- [109] Gilliam F, Hecimovic H, Sheline Y. Psychiatric comorbidity, health, and function in epilepsy. **Epilepsy Behav** 2003; 4 Suppl 4:S26-S30.
- [110] Hermann B, Seidenberg M. Epilepsy and cognition. **Epilepsy Curr** 2007; 7:1-6.

- [111] Herman B. Memory and its reorganization in temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Curr** 2004; 4:139-140.
- [112] Kanner AM. Depression in epilepsy: prevalence, clinical semiology, pathogenic mechanisms, and treatment. **Biol Psychiatry** 2003; 54:388-398.
- [113] Majak K, Pitkanen A. Do seizures cause irreversible cognitive damage? Evidence from animal studies. **Epilepsy Behav** 2004; 5 Suppl 1:S35-S44.
- [114] Fritschy JM, Kiener T, Bouilleret V, Loup F. GABAergic neurons and GABA(A)-receptors in temporal lobe epilepsy. **Neurochem Int** 1999; 34:435-445.
- [115] Gutierrez R, Heinemann U. Co-existence of GABA and Glu in the hippocampal granule cells: implications for epilepsy. **Curr Top Med Chem** 2006; 6:975-978.
- [116] Clifford DB, Olney JW, Benz AM, Fuller TA, Zorumski CF. Ketamine, phencyclidine, and MK-801 protect against kainic acid-induced seizure-related brain damage. **Epilepsia** 1990; 31:382-390.
- [117] Rice AC, DeLorenzo RJ. NMDA receptor activation during status epilepticus is required for the development of epilepsy. **Brain Res** 1998; 782:240-247.
- [118] Nairismagi J, Grohn OH, Kettunen MI, Nissinen J, Kauppinen RA, Pitkanen A. Progression of brain damage after status epilepticus and its association with epileptogenesis: a quantitative MRI study in a rat model of temporal lobe epilepsy. **Epilepsia** 2004; 45:1024-1034.
- [119] Henshall DC, Simon RP. Epilepsy and apoptosis pathways. **J Cereb Blood Flow Metab** 2005; 25:1557-1572.

[120] Brandt C, Potschka H, Loscher W, Ebert U. N-methyl-D-aspartate receptor blockade after status epilepticus protects against limbic brain damage but not against epilepsy in the kainate model of temporal lobe epilepsy. **Neuroscience** 2003; 118:727-740.

[121] Ratzliff AH, Santhakumar V, Howard A, Soltesz I. Mossy cells in epilepsy: rigor mortis or vigor mortis? **Trends Neurosci** 2002; 25:140-144.

[122] Covolan L, Ribeiro LT, Longo BM, Mello LE. Cell damage and neurogenesis in the dentate granule cell layer of adult rats after pilocarpine- or kainate-induced status epilepticus. **Hippocampus** 2000; 10:169-180.

[123] Wuarin JP, Dudek FE. Electrographic seizures and new recurrent excitatory circuits in the dentate gyrus of hippocampal slices from kainate-treated epileptic rats. **J Neurosci** 1996; 16:4438-4448.

[124] Koyama R, Ikegaya Y. Mossy fiber sprouting as a potential therapeutic target for epilepsy. **Curr Neurovasc Res** 2004; 1:3-10.

[125] D'Ambrosio G, Samani F, Cancian M, De MC. Practice of opportunistic prostate-specific antigen screening in Italy: data from the Health Search database. **Eur J Cancer Prev** 2004; 13:383-386.

[126] Bernardino L, Ferreira R, Cristovao AJ, Sales F, Malva JO. Inflammation and neurogenesis in temporal lobe epilepsy. **Curr Drug Targets CNS Neurol Disord** 2005; 4:349-360.

[127] Crespel A, Rigau V, Coubes P, Rousset MC, de BF, Okano H et al. Increased number of neural progenitors in human temporal lobe epilepsy. **Neurobiol Dis** 2005; 19:436-450.

- [128] Ferland RJ, Gross RA, Applegate CD. Increased mitotic activity in the dentate gyrus of the hippocampus of adult C57BL/6J mice exposed to the flurothyl kindling model of epileptogenesis. **Neuroscience** 2002; 115:669-683.
- [129] Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. **J Neurosci** 1997; 17:3727-3738.
- [130] Scott BW, Wang S, Burnham WM, De BU, Wojtowicz JM. Kindling-induced neurogenesis in the dentate gyrus of the rat. **Neurosci Lett** 1998; 248:73-76.
- [131] Parent JM, Elliott RC, Pleasure SJ, Barbaro NM, Lowenstein DH. Aberrant seizure-induced neurogenesis in experimental temporal lobe epilepsy. **Ann Neurol** 2006; 59:81-91.
- [132] Heinrich C, Nitta N, Flubacher A, Muller M, Fahrner A, Kirsch M et al. Reelin deficiency and displacement of mature neurons, but not neurogenesis, underlie the formation of granule cell dispersion in the epileptic hippocampus. **J Neurosci** 2006; 26:4701-4713.
- [133] Kralic JE, Ledergerber DA, Fritschy JM. Disruption of the neurogenic potential of the dentate gyrus in a mouse model of temporal lobe epilepsy with focal seizures. **Eur J Neurosci** 2005; 22:1916-1927.
- [134] Ledergerber D, Fritschy JM, Kralic JE. Impairment of dentate gyrus neuronal progenitor cell differentiation in a mouse model of temporal lobe epilepsy. **Exp Neurol** 2006; 199:130-142.
- [135] Hattiangady B, Rao MS, Shetty AK. Chronic temporal lobe epilepsy is associated with severely declined dentate neurogenesis in the adult hippocampus. **Neurobiol Dis** 2004; 17:473-490.

- [136] Cavazos JE, Zhang P, Qazi R, Sutula TP. Ultrastructural features of sprouted mossy fiber synapses in kindled and kainic acid-treated rats. **J Comp Neurol** 2003; 458:272-292.
- [137] Ribak CE, Dashtipour K. Neuroplasticity in the damaged dentate gyrus of the epileptic brain. **Prog Brain Res** 2002; 136:319-328.
- [138] Ribak CE, Tran PH, Spigelman I, Okazaki MM, Nadler JV. Status epilepticus-induced hilar basal dendrites on rodent granule cells contribute to recurrent excitatory circuitry. **J Comp Neurol** 2000; 428:240-253.
- [139] Shapiro LA, Ribak CE. Integration of newly born dentate granule cells into adult brains: hypotheses based on normal and epileptic rodents. **Brain Res Brain Res Rev** 2005; 48:43-56.
- [140] Buckmaster PS, Zhang GF, Yamawaki R. Axon sprouting in a model of temporal lobe epilepsy creates a predominantly excitatory feedback circuit. **J Neurosci** 2002; 22:6650-6658.
- [141] Scharfman HE, Sollas AL, Goodman JH. Spontaneous recurrent seizures after pilocarpine-induced status epilepticus activate calbindin-immunoreactive hilar cells of the rat dentate gyrus. **Neuroscience** 2002; 111:71-81.
- [142] Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL. Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. **J Neurosci** 2000; 20:6144-6158.
- [143] Scharfman HE, Smith KL, Goodman JH, Sollas AL. Survival of dentate hilar mossy cells after pilocarpine-induced seizures and their synchronized burst discharges with area CA3 pyramidal cells. **Neuroscience** 2001; 104:741-759.

- [144] Scharfman HE, Sollas AE, Berger RE, Goodman JH, Pierce JP. Perforant path activation of ectopic granule cells that are born after pilocarpine-induced seizures. **Neuroscience** 2003; 121:1017-1029.
- [145] McCloskey DP, Hintz TM, Pierce JP, Scharfman HE. Stereological methods reveal the robust size and stability of ectopic hilar granule cells after pilocarpine-induced status epilepticus in the adult rat. **Eur J Neurosci** 2006; 24:2203-2210.
- [146] Mikkonen M, Soininen H, Kalvianen R, Tapiola T, Ylinen A, Vapalahti M et al. Remodeling of neuronal circuitries in human temporal lobe epilepsy: increased expression of highly polysialylated neural cell adhesion molecule in the hippocampus and the entorhinal cortex. **Ann Neurol** 1998; 44:923-934.
- [147] Sato K, Iwai M, Nagano I, Shoji M, Abe K. Changes of localization of highly polysialylated neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) in rat hippocampus with exposure to repeated kindled seizures. **Brain Res** 2002; 946:323-327.
- [148] Babb TL, Kupfer WR, Pretorius JK, Crandall PH, Levesque MF. Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. **Neuroscience** 1991; 42:351-363.
- [149] Houser CR, Miyashiro JE, Swartz BE, Walsh GO, Rich JR, gado-Escueta AV. Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in human hippocampal epilepsy. **J Neurosci** 1990; 10:267-282.
- [150] Sutula T, Cascino G, Cavazos J, Parada I, Ramirez L. Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. **Ann Neurol** 1989; 26:321-330.
- [151] Dashtipour K, Yan XX, Dinh TT, Okazaki MM, Nadler JV, Ribak CE. Quantitative and morphological analysis of dentate granule cells with recurrent basal dendrites from normal and epileptic rats. **Hippocampus** 2002; 12:235-244.

- [152] Jessberger S, Romer B, Babu H, Kempermann G. Seizures induce proliferation and dispersion of doublecortin-positive hippocampal progenitor cells. **Exp Neurol** 2005; 196:342-351.
- [153] Buckmaster PS, Dudek FE. In vivo intracellular analysis of granule cell axon reorganization in epileptic rats. **J Neurophysiol** 1999; 81:712-721.
- [154] Dashtipour K, Wong AM, Obenaus A, Spigelman I, Ribak CE. Temporal profile of hilar basal dendrite formation on dentate granule cells after status epilepticus. **Epilepsy Res** 2003; 54:141-151.
- [155] Spigelman I, Yan XX, Obenaus A, Lee EY, Wasterlain CG, Ribak CE. Dentate granule cells form novel basal dendrites in a rat model of temporal lobe epilepsy. **Neuroscience** 1998; 86:109-120.
- [156] Shapiro LA, Korn MJ, Ribak CE. Newly generated dentate granule cells from epileptic rats exhibit elongated hilar basal dendrites that align along GFAP-immunolabeled processes. **Neuroscience** 2005; 136:823-831.
- [157] Shapiro LA, Ribak CE. Newly born dentate granule neurons after pilocarpine-induced epilepsy have hilar basal dendrites with immature synapses. **Epilepsy Res** 2006; 69:53-66.
- [158] Shapiro LA, Korn MJ, Shan Z, Ribak CE. GFAP-expressing radial glia-like cell bodies are involved in a one-to-one relationship with doublecortin-immunolabeled newborn neurons in the adult dentate gyrus. **Brain Res** 2005; 1040:81-91.
- [159] Wenzel HJ, Robbins CA, Tsai LH, Schwartzkroin PA. Abnormal morphological and functional organization of the hippocampus in a p35 mutant model of cortical dysplasia associated with spontaneous seizures. **J Neurosci** 2001; 21:983-998.

- [160] Dashtipour K, Tran PH, Okazaki MM, Nadler JV, Ribak CE. Ultrastructural features and synaptic connections of hilar ectopic granule cells in the rat dentate gyrus are different from those of granule cells in the granule cell layer. **Brain Res** 2001; 890:261-271.
- [161] Seki T. Hippocampal adult neurogenesis occurs in a microenvironment provided by PSA-NCAM-expressing immature neurons. **J Neurosci Res** 2002; 69:772-783.
- [162] Shapiro LA, Korn MJ, Shan Z, Ribak CE. GFAP-expressing radial glia-like cell bodies are involved in a one-to-one relationship with doublecortin-immunolabeled newborn neurons in the adult dentate gyrus. **Brain Res** 2005; 1040:81-91.
- [163] Gale K. Subcortical structures and pathways involved in convulsive seizure generation. **J Clin Neurophysiol** 1992; 9:264-277.
- [164] McIntyre DC, Kelly ME. The parahippocampal cortices and kindling. **Ann N Y Acad Sci** 2000; 911:343-354.
- [165] Bolkvadze T, Dzhaparidze ND, Zhvaniya MG, Kotariya NT, Tsitsishvili AS. Cellular composition of the piriform cortex of the rat brain in experimental epilepsy. **Neurosci Behav Physiol** 2006; 36:271-274.
- [166] Freichel C, Potschka H, Ebert U, Brandt C, Loscher W. Acute changes in the neuronal expression of GABA and glutamate decarboxylase isoforms in the rat piriform cortex following status epilepticus. **Neuroscience** 2006; 141:2177-2194.
- [167] Gavrilovici C, D'Alfonso S, Dann M, Poulter MO. Kindling-induced alterations in GABAA receptor-mediated inhibition and neurosteroid activity in the rat piriform cortex. **Eur J Neurosci** 2006; 24:1373-1384.

2 PUBLIKATION I

Neurogenesis in the adult rat piriform cortex

Anton **Pekcec**, Wolfgang **Löscher**, and Heidrun **Potschka**

Published in NeuroReport 2006 17:571-574

Abstract

Multipotent neural precursors have been suggested to exist in many parts of the adult mammalian brain. In the present study, we characterized the neurogenic potential in the piriform cortex of adult rats. Proliferation rates as detected by BrdU-labeling proved to be low as compared to the major neurogenic brain regions, i.e. the hippocampus and the subventricular zone. BrdU/NeuN-labeling in accordance with doublecortin-, PSA-NCAM-, and TUC-4-labeling indicated that neuronal differentiation of newborn cells occurs predominantly in layer II of the piriform cortex. Many of the cells exhibited a pyramidal cell morphology. Lack of BrdU/NeuN-labeled cells twelve weeks after BrdU-administration argued against long-term survival of newborn neurons in the piriform cortex.

Key words: neurogenesis, piriform cortex, doublecortin, PSA-NCAM, TUC-4

Introduction

Throughout life new neurons are generated from progenitor cells in specific brain regions of various species, including man [1, 2]. A high neurogenic potential has been described for the dentate gyrus of the hippocampus and for the subventricular zone from where newborn cells migrate to the olfactory bulb. In addition, neurogenesis with a low turnover rate has been suggested for other brain regions, including the cortex [3, 4, 5].

The piriform cortex is the largest area of the mammalian olfactory cortex which is characterized by direct input from the olfactory bulb via the lateral olfactory tract [6]. With its unique intrinsic associative fiber system and its various connections to and from other limbic structures the piriform cortex has been implicated in many functional studies [7]. Besides an obvious involvement in olfactory sensory processing, the piriform cortex has gained attention with regard to its potential involvement in memory processing, and in pathological processes like spread of epileptic seizure activity [7]. Due to these physiological and pathological functional implications, and due to the pronounced neurogenesis-associated plasticity in the olfactory bulb, it is of special interest to

investigate the neuronal plasticity in the olfactory bulbs major output structure, i.e. the piriform cortex. In the present study, we characterized the neurogenic potential in the adult rat piriform cortex including a thorough analysis of the distribution of neuronal progenitor cells within the different layers of the piriform cortex. The existence of neuronal progenitor cells in the piriform cortex was substantiated by immunostaining of various molecular markers of neuronal progenitor cells and by BrdU/NeuN double-labeling.

Methods

Male Sprague-Dawley rats were purchased at a body weight of 200-220g (Harlan-Winkelmann, Borchon, Germany). All experiments were done in compliance with the German Animal Welfare Act. All efforts were made to minimize pain or discomfort of the animals used.

As a thymidine analog, BrdU is incorporated into the DNA during the S phase of the cell cycle [8]. Each injection of BrdU labels those proliferating cells that are in the DNA-synthetic phase of the cell cycle (S phase). BrdU is available for about 30 min and thus labels a proportion of dividing cells which are in the S phase during this period [9]. Rats received a total of eight intraperitoneal injections of 50 mg/kg BrdU. The administration was started in the late afternoon. At the next three days the animals received twice daily administrations in the morning and in the late afternoon with an interval of 8 hours. The last BrdU administration was given in the morning of the fourth day. Rats were killed two hours later (n=4). Another group of rats also received 8 intraperitoneal injections of 50 mg/kg BrdU, administered in the morning and afternoon of four consecutive days. This group of rats (n=4) was killed 12 weeks (84 days) after the last BrdU injection.

Following transcardial perfusion of the animals with a fixative, the brains were removed and 40 µm coronal brain sections were cut on a sliding microtome (Frigomobil, Leica, Germany).

Cells which incorporated BrdU and express the neuronal marker NeuN were identified by immunohistological BrdU/NeuN double-labeling. Following washing, pretreatment and

blocking of the sections, they were incubated in an antibody mixture containing rat anti-BrdU (Oxford Biotechnology, Oxfordshire, UK), 1:20, and anti-NeuN (Chemicon, Hofheim, Germany), 1:500 at 4°C overnight. After washing the sections, biotinylated goat anti-mouse (DAKO, Hamburg, Germany) and carbocyanin2-labeled goat anti-rat (Jackson Immunoresearch Laboratories, USA), 1:1000 were applied for 60 minutes. The sections were washed again and incubated in carbocyanin3-labeled streptavidin (Sigma, Taufkirchen, Germany), 1:1000 for 60 minutes. Finally all sections were washed, mounted onto glass slides, air dried, dehydrated, and coverslipped with Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). Fluorescent signals from double-labeled sections were analyzed using a confocal microscope (Leica TCS SP2; Leica, Bernstein, Germany). Double-labeling was verified by careful analysis of confocal z-series of multiple cells per animal. Images were processed with Adobe Photoshop 6.0. Only general adjustment was carried out, but images were not otherwise digitally manipulated.

For immunostaining of doublecortin, PSA-NCAM, and TUC-4 the sections were washed, preincubated, and then transferred into primary antiserum and incubated overnight at 4°C. The primary antibodies used in this study were: monoclonal mouse anti-PSA-NCAM (kindly provided by Rita Gerardy-Schahn, Dept. Cellular Chemistry, Medical University Hannover, Germany), 1:750; polyclonal guinea pig anti-doublecortin (Jackson Immunoresearch Laboratories, USA), 1:3000; polyclonal rabbit anti-TUC-4, 1:1000 (Chemicon, Hofheim, Germany). Sections were washed again and placed in biotin-labeled secondary antiserum. The following secondary antibodies were used: biotinylated donkey anti-guinea pig (Jackson Immunoresearch Laboratories, USA), 1:750; biotinylated rabbit anti-mouse, 1:500; biotinylated pig anti-rabbit, 1:500 (both from DAKO, Hamburg, Germany). Sections were rinsed again in TBS and incubated 60 minutes in horseradish peroxidase-labeled streptavidin (DAKO, Hamburg, Germany), 1:375. Finally, the nickel-intensified diaminobenzidine (DAB) reaction (0.05% 3,3- diaminobenzidine, 0.01%, nickel ammonium sulphate; both from Sigma, Taufkirchen, Germany, and 0.01% H₂O₂) was performed.

Results

The number of newborn cells in the piriform cortex as assessed by BrdU-labeling proved to be low (Table 1). Scattered BrdU-immunoreactive cells were predominantly localized in layer I and II of the piriform cortex. In contrast only single BrdU-immunoreactive cells were detectable in layer III in some of the analyzed sections. At the fourth day of BrdU-administration some of the cells that incorporated BrdU already developed a neuronal phenotype as indicated by double-labeling with the neuronal marker NeuN (Table 1, Fig.1A-D). BrdU/NeuN double-labeling was verified by careful confocal z-scanning. The majority of the double-labeled cells were detectable in layer II and close to the border between layer I and II (Table 1). With regard to the rostro-caudal dimensions of the piriform cortex BrdU-labeled as well as BrdU/NeuN double-labeled cells appeared to be diffusely distributed.

Doublecortin has proven to be a marker for neuronal progenitor cells, which is transiently expressed during adult hippocampal granule cell as well as olfactory neurogenesis [10, 11, 12]. In the piriform cortex, cells expressing the neuronal progenitor marker doublecortin were predominantly identified in layer II (Fig.1E). Some doublecortin-immunoreactive cells were localized close to the border between layer II and layer III. Many of the doublecortin-immunoreactive cells clearly exhibited a pyramidal cell morphology with branched dendritic trees. Apical dendrites of these cells extended to layer I and basal dendrites extended to layer III (Table 1, Fig. 1E).

PSA-NCAM, the polysialylated form of the adhesion molecule NCAM is long known to mark a stage of progenitor cells in adult hippocampal and olfactory neurogenesis [12, 13]. In the piriform cortex PSA-NCAM-immunoreactivity was detectable in cells with a comparable morphology and localization as that of doublecortin-immunoreactive cells (Table 1, Fig.1F). The predominant localization of PSA-NCAM-immunoreactive cells was in layer II with some of the cells close to the border to layer III. The number and length of neurites varied. Whereas some of the PSA-NCAM-immunoreactive cells were multipolar with a branched dendritic tree extending to layer I and III, other cells only presented single neurites.

The synaptic vesicle protein TUC-4 (TOAD-64) has been reported to be transiently

expressed during adult neurogenesis in postmitotic immature cells [14, 15]. In the piriform cortex, we identified TUC-4-immunoreactive cells in layer II (Fig.1G). Most of the cells exhibited a clear pyramidal cell morphology with branched dendritic trees extending to layer I and III. Analysis of TUC-4-immunoreactive cells in 19 brain sections in two animals revealed a mean number of 4.5 ± 0.72 and 14.9 ± 1.53 labeled cells in the piriform cortex per section.

When animals were killed 12 weeks after the BrdU administration, the analysis of at least 10 brain sections per animal did not result in the detection of BrdU-immunoreactive cells except for one animal (data not shown). In this animal three BrdU-immunoreactive cells were identified, but none of these cells proved to express NeuN.

Discussion

By analyzing integration of BrdU with concomitant expression of the neuronal cell marker NeuN, and by analyzing the expression of various neuronal progenitor markers, we demonstrate cell proliferation with subsequent differentiation into a neuronal phenotype in the piriform cortex of naïve adult Sprague-Dawley rats.

Careful analysis of BrdU-labeled cells by confocal z-scanning verified BrdU/NeuN double-labeling of cells in layer II of the piriform cortex. These BrdU/NeuN double-labeled cells were already detectable at day 4 following the first BrdU administration. In the hippocampus, occurrence of postmitotic immature neurons which have incorporated BrdU and already express NeuN has also been described as early as four days following the first BrdU administration [16]. Based on our data, such a fast development also occurs in the piriform cortex with rapid differentiation of a subpopulation of newborn cells into a neuronal phenotype. This differentiation was further substantiated by immunostaining of doublecortin, PSA-NCAM, and TUC-4, which are known to be transiently expressed markers of lineage-determined neuronal progenitors in the hippocampal dentate gyrus and the olfactory bulb [10, 11, 12, 13, 14, 15]. Doublecortin and PSA-NCAM have already been demonstrated to be expressed in the rat piriform cortex in earlier studies [17, 13],

whereas to our knowledge TUC-4 immunoreactivity has not been studied up to now in this brain region of rats. Doublecortin-, PSA-NCAM-, and TUC-4-immunoreactivity in cells with a comparable morphology and localization indicates that these molecules may also be specific for neuronal progenitor cells in the piriform cortex. This is further substantiated by the fact that BrdU/NeuN double-labeled cells occur in the same localization in layer II as the cells labeled with these markers. When comparing the number of labeled cells between these markers, differences in the numbers were obvious. These may reflect differences in the sensitivity of the immunohistological detection, but also differences in the specificity of the markers for certain stages of neuronal development. PSA-NCAM-immunoreactivity of cells with single short neurites indicates that polysialylation of NCAM occurs early during the differentiation process. This may explain why the number of PSA-NCAM-positive cells exceeded that with doublecortin expression.

Whereas the present study is to our knowledge the first thorough analysis of the neurogenic potential of the rat piriform cortex, constitutively-occurring neurogenesis has already been reported for specific cortical regions in different species [4]. In primates, the addition of new neurons has been described for the prefrontal, inferior temporal, posterior parietal cortex and the piriform cortex [3, 4]. New neurons appeared to originate in the subventricular zone and to migrate to their target region [3, 4]. The more-or-less continuous pathway has been referred to by Bernier et al. [3] as the so called temporal stream. A comparable migration may also exist in the rat brain, and may be the origin of the newborn cells that we identified in the rat piriform cortex. However, we can not exclude that newborn cells detected in the present study resulted from cells with mitotic potential within the piriform cortex.

The observation that doublecortin-, PSA-NCAM-, and TUC-4-immunoreactive cells are predominantly localized in layer II of the piriform cortex, and present a pyramidal cell morphology, indicates that newborn cells in the piriform cortex can differentiate into superficial pyramidal cells. In view of developmental neuronal migration patterns, it is surprising that most immature cells were found at the border of layers 2 and 3 while mature neurons are localized at the border of layer 1 and 2.

The piriform cortex superficial pyramidal cells are considered to be glutamatergic cells [18], which receive an afferent input from the olfactory bulb neurons via the lateral olfactory

tract [7]. It has been suggested that neurogenesis in the olfactory bulb adjusts functioning of the adult bulbar network to new flows of relevant odor information, thereby reflecting and mediating experience-dependent morpho-functional changes in adult circuits [19]. As outlined in the introduction the olfactory bulb is the major source of input for the piriform cortex [6], which is intensely involved in olfactory processing. Thus, it would not be surprising, if proliferation and differentiation in the piriform cortex are triggered by neurogenesis-associated plasticity in the olfactory bulb and may reflect necessary adjustment at the network level of the olfactory processing system.

The lack of BrdU/NeuN double-labeled cells 12 weeks after BrdU administration indicated that the newborn cells or their vast majority degenerates. This lack of longterm survival may suggest that the neurogenic potential of the adult rat piriform cortex has no functional influence. On the other hand, it is possible that specific circumstances may enhance neurogenesis and the survival rate, e.g. we can not exclude that the survival rate is low due to a lack of rich environmental and especially novel olfactory stimuli under the controlled laboratory conditions. Longterm survival of new olfactory bulb neurons has already been described to depend on novel sensory inputs [20]. In this context, it is also of interest that we recently noticed enhanced proliferation rates and neurogenesis in the rat piriform cortex following seizure activity in epilepsy models [unpublished data].

Conclusions

The rat piriform cortex is characterized by a small population of newborn cells and by a neurogenic potential, which can result in the differentiation of new pyramidal cells in layer II. The fact that a longterm survival of the newborn neurons could not be demonstrated in the naïve rat brain at first glance argues against a functional impact of the neurogenic potential. However, survival rates may be enhanced under enriched environmental conditions. Furthermore, manipulations to enhance the neurogenic potential and the survival rate may be one means to boost repair in the piriform cortex following brain damage.

Acknowledgements

Michael Weissing is acknowledged for his technical assistance. We are grateful to Rita Gerardy-Schahn for providing the PSA-NCAM antibody. The study was supported by a scholarship (to Anton Pekcec) of the Center for Systems Neuroscience (Hannover, Germany).

Table 1

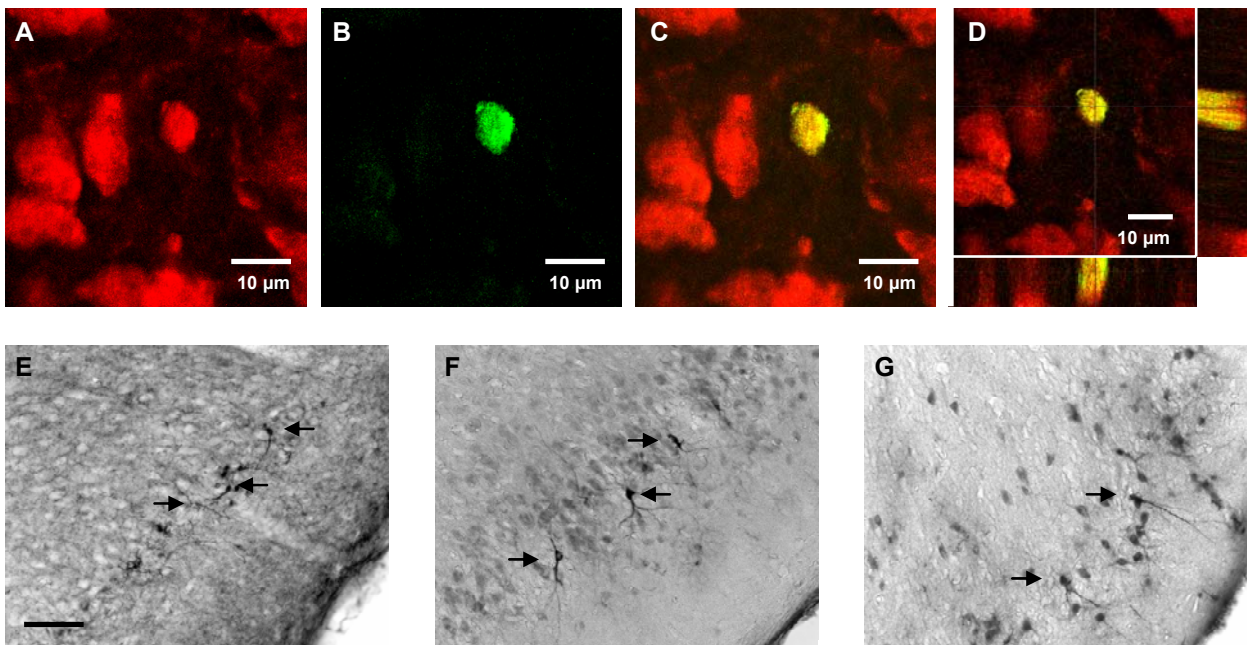
marker	localization	Number of cells per section				
		animal 1	animal 2	animal 3	animal 4	mean \pm SEM
BrdU	L 1	7.2 \pm 3.26	6.0 \pm 0.82	4.0 \pm 2.40	0.8 \pm 0.37	4.6 \pm 1.48
	L 2	5.8 \pm 1.66	5.0 \pm 0.92	2.4 \pm 0.68	2.6 \pm 0.51	3.9 \pm 0.85
	L 3	1.8 \pm 0.97	3.0 \pm 0.41	1.4 \pm 0.75	0.4 \pm 0.25	1.7 \pm 0.54
	total	14.8 \pm 5.20	14 \pm 1.16	7.8 \pm 1.66	3.8 \pm 0.80	10.1 \pm 2.61
BrdU/ NeuN	L 1	1.6 \pm 0.98	0.3 \pm 0.25	0.2 \pm 0.20	0.0 \pm 0.00	0.5 \pm 0.36
	L 2	1.2 \pm 0.37	1.0 \pm 0.82	0.0 \pm 0.00	1.6 \pm 0.51	1.0 \pm 0.34
	L 3	0.0 \pm 0.00	0.3 \pm 0.25	0.2 \pm 0.20	0.4 \pm 0.24	0.2 \pm 0.09
	total	2.8 \pm 0.97	2.4 \pm 0.93	0.4 \pm 0.24	2.0 \pm 0.55	1.9 \pm 0.53
DCX	pyr. morph.	8.0 \pm 1.50	5.9 \pm 1.01	4.3 \pm 0.87	12.7 \pm 1.71	7.7 \pm 1.82
	total	10.3 \pm 2.91	10.5 \pm 1.54	6.2 \pm 1.02	23.4 \pm 3.57	12.6 \pm 3.73
PSA-NCAM	total	42.2 \pm 7.97	60.8 \pm 11.06	58.9 \pm 6.29	49.2 \pm 6.56	52.8 \pm 4.35

The table presents the distribution and total number of neuronal progenitor cells and newborn neurons in the rat piriform cortex of four individual animals. The mean and SEM values of these animals are given in the last column. Data are given as number of cells per section (mean \pm SEM) by analyzing at least 5 consecutive sections for BrdU and at least 19 consecutive sections for doublecortin and PSA-NCAM.

The proliferative activity is expressed as the number of BrdU-positive nuclei in the three layers (L1, L2, L3) of the piriform cortex. BrdU-positive nuclei are identified as nuclei of

immature or mature neurons by colocalization with the neuron-specific marker NeuN. Putative neuronal progenitor cells are identified by doublecortin and PSA-NCAM immunolabeling. The number of doublecortin-positive cells with a pyramidal cell morphology (pyr. morph.) indicating undifferentiated neurons or a more mature neuronal progenitor state are listed separately.

Figure 1



(A-C) Representative BrdU (green) and NeuN (red) double-labeled immunofluorescence micrographs of the rat piriform cortex. (A): Cells that expressed the neuronal marker NeuN. (B): Cell that incorporated the proliferation marker BrdU. (C): BrdU/NeuN double-labeling: cell that incorporated BrdU and that expressed NeuN. (D): Corresponding confocal three-dimensional image of a BrdU/NeuN double-labeled cell. (E) Doublecortin-immunoreactive cells in layer II of the rat piriform cortex. (F) PSA-NCAM-immunoreactive

cells in layer II of the rat piriform cortex. (G) TUC-4 immunoreactive cells in layer II of the rat piriform cortex.

References

- [1] Momma S, Johansson CB, Frisen J. Get to know your stem cells. **Curr Opin Neurobiol** 2002; 10: 45-49.
- [2] Gage FH. Neurogenesis in the adult brain. **J Neurosci** 2002; 22: 612-613.
- [3] Bernier PJ, Bedard A, Vinet J, Levesque M, Parent A. Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. **Proc Natl Acad Sci USA** 2002; 99: 11464-11469.
- [4] Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG. Neurogenesis in the neocortex of adult primates. **Science** 1999; 286: 548-552.
- [5] Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB, et al. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003; 100: 7925-7930.
- [6] Shipley MT, McLean JH, Ennis M. The olfactory system. In: G. Paxinos (ed). The rat nervous system Vol.2, **Academic Press**: San Diego Vol.2, pp. 899-928
- [7] Löscher W, Ebert U. The role of the piriform cortex in kindling. **Prog Neurobiol** 1996; 50: 427-481.

[8] del Rio JA, Soriano E. Immunocytochemical detection of 5'-bromodeoxyuridine incorporation in the central nervous system of the mouse. **Brain Res.Dev.Brain Res.** 1989; 49: 311-317.

[9] Packard DS, Menzies RA, Skalko RG. Incorporation of thymidine and its analogue, bromodeoxyuridine, into embryos and maternal tissues of the mouse. **Differentiation** 1973; 1:397-404.

[10] Rao MS, Shetty AK. Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. **Eur J Neurosci** 2004; 19: 234-246.

[11] Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, et al. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. **Eur J Neurosci** 2005; 21: 1-14.

[12] Hack MA, Saghatelian A, Chevigny de A, Pfeiffer A, Ashery-Padan R, Lledo PM, Götz M. Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. **Nat. Neurosci** 2005; Jul 8(7):865-72.

[13] Seki T, Arai Y. Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat. **J Neurosci** (1993); 13: 2351-2358.

[14] Quinn CC, Gray GE, Hockfield S. A family of proteins implicated in axon guidance and outgrowth. **J Neurobiol** 1999; 41: 158-164.

[15] Redard A , Levesque M, Bernier PJ, Parent A. The rostral migratory stream in adult squirrel monkeys: contribution of new neurons to the olfactory tubercle and involvement of the antiapoptotic protein Bcl-2. **Eur J Neurosci.** 2002; 16(10):1917-24.

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

[17] Nacher J, Crespo C, McEwen BS. Doublecortin expression in the adult rat telencephalon. **Eur J Neurosci** 14: 629-644

[18] Watanabe K, Kawana E. Selective retrograde transport of tritiated D-aspartate from the olfactory bulb to the anterior olfactory nucleus of the lateral tract in the rat. **Brain Res** 1984; 295: 148-151

[19] Lledo PM, and Saghatelian A. Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: joining the network, life-death decisions, and the effects of sensory experience. **Trends Neurosci** 2005; 28: 248-254

[20] Petreanu L, and Alvarez-Buylla A. Maturation and death of adult born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. **J Neurosci** 2002; 22: 6106-6113

3 PUBLIKATION II

Newborn neurons with hilar basal dendrites hallmark epileptogenic networks

Anton **Pekcec** and Heidrun **Potschka**

NeuroReport 2007, *in press*

Abstract

Basal dendrites are transiently present on developing newborn granule cells in adult rats. In epileptic rats basal dendrites often fail to retract resulting in the generation of persisting hilar basal dendrites that have been proposed to contribute to hyperexcitability.

Here, we demonstrate that the formation of hilar basal dendrites does also occur in the absence of seizures following induction of an epileptogenic neuronal network by amygdala kindling. The number of newborn neurons with hilar basal dendrites was significantly increased 6-8 weeks following the last kindled seizure. Thus, even in periods without seizure activity, persistence of hilar basal dendrites presents as a hallmark of hyperexcitable epileptogenic networks in the rodent brain and may contribute to disease progression.

Introduction

Newly generated neurons in the adult rat dentate gyrus undergo a programmed progression of dendritic processes as they migrate from the subgranular zone into the granule cell layer [1, 2]. Basal dendrites are transiently formed during migration and development of rat granule cells. Seizure activity in rodents frequently results in a failure to retract these basal dendrites resulting in persistence of basal dendrites that extend into the hilus [3-6]. Granule cell basal dendrites receive asymmetric, excitatory synaptic contacts from mossy fibers [5, 6]. Thus, granule cell basal dendrites provide a potential route for recurrent excitation between granule cells. In contrast to rodents, human and non-human primate adult granule cells regularly exhibit basal dendrites [7]. Based on the putative excitatory function, the existence of basal dendrites in primate brains has been suggested to result in increased levels of recurrent excitation as compared to rats [8]. Their further increase in number that was observed in temporal lobe epilepsy patients is discussed to contribute to the hyperexcitability of the epileptic brain [9, 10].

Based on several studies in rat status epilepticus models, it is currently presumed that

seizure activity induces the increase in basal dendrites in the epileptic brain. However, this has not been proven experimentally by now. Here, we addressed the question whether enhanced persistence of basal dendrites does also occur in the absence of seizures once an epileptogenic network has been generated. The formation of a hyperexcitable network was induced in rats by amygdala kindling. Effects of an epileptogenic network with spontaneous recurrent seizure activity on the morphology of newly born neurons were moreover taken into comparative consideration by use of a post-status epilepticus model. In order to identify newborn granule cells, we analyzed expression of doublecortin which is transiently expressed for about 2 weeks during granule cell migration and development [11]. The morphology and orientation of newborn granule cell dendrites was studied 6-8 weeks after the last seizure.

Materials and Methods

Twenty nine male Sprague-Dawley rats at the age of 9-10 weeks were anesthetized with chloral hydrate (360 mg/kg, i.p.) for chronic implantation of a bipolar (stimulation and recording) electrode into the right basolateral amygdala (BLA) (stereotaxic coordinates derived from the atlas of Paxinos and Watson [12] in millimeter relative to Bregma: AP -2.2 L -4.7 DV -8.4). The BLA-electrode and additional screws were embedded in dental acrylic cement. After surgery, the animals were allowed to recover for a period of at least 2 weeks.

For kindling the initial after-discharge threshold (ADT) was determined by an ascending stair step procedure [13]. Then, electrical stimulations were applied once daily and five times per week until 15 generalized seizures according to Racine [14] were elicited, using individual current stimulations 20% above the determined pre-kindling ADT (1 ms, monophasic square-wave pulses, 50 Hz for 1 s). Eight sham-implanted control rats were handled with the identical daily procedure as the six kindled rats.

Analogous to the amygdala-kindling model, an electrically induced status epilepticus model was used. In this model a self-sustained status epilepticus (SSSE) is induced by

prolonged stimulation of the amygdala [15]. Protocol in short: stimulus duration 25 min, stimulus consisting of 100 ms trains of 1 ms alternating positive and negative square-wave pulses (given at a frequency of 2/s, intra-train pulse frequency 50/s, peak pulse intensity 700 μ A). Development and duration of SSSE were monitored by 5 minutes EEG recording following the end of stimulation and by 3.35 h behavioral observation. SSSE was limited to a duration of 4 hours (including the 25 min of BLA stimulation) by up to three injections of diazepam (10 mg/kg i.p.) every three minutes until motor seizure activity was completely suppressed and the EEG was normalized. The vast majority of the animals responded to the first injection. Seven electrode-implanted control rats were subjected to all handling and experimental procedures associated with the stimulation procedure and also received an injection of diazepam. During the entire study, all spontaneous seizures which occurred during handling of the eight epileptic animals or which were observed by coincidence were noted. Six weeks following induction of SSSE rats were continuously monitored over a period of 2 weeks using a combined video- and EEG-detection system as described before [15]. For detection of spontaneous seizures, the EEG-recordings were analyzed for characteristic seizure-like activity as described already in detail [16, 17]. To evaluate the severity of motor seizure activity during a seizure in the EEG, the corresponding video-recording was analyzed. The rats were continuously monitored for 24 h/day for 7 days a week.

As all rats used in this study served as vehicle-treated control animals in another study (publication in preparation), they received a bilateral intracerebroventricular microinjection of sterile artificial cerebrospinal fluid using a modified protocol of a previously described method [18]. All rats received a total of ten injections of BrdU (50 mg/kg i.p.) and all rats were evaluated in the same behavioral paradigms, including the openfield, light-dark box, and the Morris-water maze.

Thirteen weeks after the beginning of kindling and 13 weeks after the induction of the SSSE rats were deeply anesthetized with chloralhydrate, transcardially perfused with saline followed by 4% paraformaldehyde for immunhistology. The brains were cut in 40 μ m coronal sections on a sliding microtome (Frigomobil, Leica, Germany). Electrode localizations were verified in thionin-stained sections. Doublecortin expression was detected using a polyclonal guinea pig anti-doublecortin antibody (Jackson

Immunoresearch Laboratories, USA). The sections were processed for immunolabeling as described previously [19]. The signals of the diaminobenzidine-stained sections were captured with a computer-assisted imaging system. The captured images were 1300×1030 pixels in dimension and were processed using the image analysis software KS400 (Windows Release 3.0; Carl Zeiss Vision, Hallbergmoos, Germany). Image analysis was done in a blinded fashion, i.e., the experimenter was not aware whether sections were from kindled, epileptic or control rats.

Due to Gaussian's distribution, differences between groups were analyzed by Student's *t*-test (two-sided) using GraphPad Prism4. For all statistical evaluations $p < 0.05$ was considered significant.

Results

All rats were successfully kindled until 15 generalized stage 5 seizures were elicited. 21.67 ± 1.86 stimulations (mean \pm SEM) were necessary to reach this fully kindled state. 6-8 weeks after the last kindled seizure (13 weeks after kindling onset) the number of doublecortin-labeled cells in the dentate gyrus did not differ between kindled rats and non-kindled control rats (Fig. 1a). Whereas hilar basal dendrites were not detectable in newborn granule cells of the eight control animals, $6.0 \pm 0.17\%$ of the doublecortin-labeled cells in the six kindled rats exhibited basal dendrites that extend into the hilus (Fig. b). Doublecortin-labeled cells often occurred as clusters at the base of the granule cell layer or were individually distributed throughout the granule cell layer. Rarely, doublecortin-labeled cells were dislocated in the hilus (Fig. 2c). Hilar basal dendrites arised from the base of the cells, extend through the subgranular zone deeply into the hilus and were in some cases multiply branches (Fig. 2d-f). In high magnification photographs persistent basal dendrites appeared to be spiny.

For comparison, we analyzed the number of doublecortin-labeled cells in the chronic phase of a post-status epilepticus model with spontaneous seizures (Fig. 1a). By constant EEG/video monitoring for two weeks seizrues were detected in all animals of the group

used for this investigation with a mean of 2.4 ± 1.7 spontaneous seizures per animal. The number of doublecortin-labeled cells did not differ in a significant manner between epileptic rats and control rats (Fig. 1d). Whereas only a small percentage of newborn granule cells of the seven control rats exhibited basal dendrites, $11.68 \pm 3.17\%$ of the doublecortin-labeled cells in the eight epileptic rats show basal dendrites that extend into the hilus (Fig. 1d). Morphology of hilar basal dendrites was comparable to that observed in previously kindled rats (Fig. 2g-i).

Discussion

Newly born neurons in the developing and adult dentate gyrus exhibit transient basal dendrites. Following seizure activity in rodents, these dendrites at the base of granule cells can persist and then extend into the hilus for variable distances [1]. Persistence of hilar basal dendrites has so far been described in three different models of epilepsy in rats [1, 4, 5] and in an epileptic mouse mutant [6]. As expected from these data, we also identified hilar basal dendrites in epileptic rats with spontaneous seizures. Previous studies have used models with induction of status epilepticus by chemoconvulsants as a trigger for subsequent epileptogenesis and the development of spontaneous seizures after a latency period of several weeks. Dashtipour et al. [20] described that hilar basal dendrites form on granule cells as early as 1 week following prolonged seizure activity. However, formation of hilar basal dendrites were most often studied at later time points, e.g. 4 weeks following status epilepticus [3, 21, 22]. In the present study, status epilepticus was elicited by electrostimulation of the amygdala and the morphological analysis of newborn granule cells was performed 13 weeks after the initial insult, i.e. late in the chronic phase with spontaneous seizures. Our data demonstrate that the generation of basal dendrites occurs independently of the trigger of the status epilepticus and remains to be a hallmark of the epileptic brain throughout the chronic phase with spontaneous seizures.

The temporal and spatial profile of the occurrence of hilar basal dendrites in rodent epilepsy models generally indicated that most or all hilar basal dendrites arise from

seizure-induced newborn granule cells [1, 20, 22]. Shapiro and Ribak [21] described that seizure-induced neurogenesis results in loss of the one-to-one relationship between newborn neurons and adjacent astrocytes. They suggested that the disturbance in this cellular relationship promotes the ectopic growth of basal dendrites into the hilus. These data raise the question whether persistence of basal dendrites on newborn neurons depends on ongoing seizure activity or does also occur in the absence of seizures once a hyperexcitable epileptogenic network has been generated. Amygdala kindling is a widely used model of temporal lobe epilepsy [23]. Repeated kindling stimulations result in the formation of a permanent hyperexcitable network with reduced seizure thresholds. Here, we demonstrated that in the absence of seizures the chronic changes in the kindled brain are associated with the ongoing formation of hilar basal dendrites. Due to the fact that doublecortin is expressed for up to 2 weeks during migration and development of newborn granule cells [11, 24], the doublecortin-labeled cells with hilar basal dendrites must have been generated *de novo* long after the last seizure that was elicited 6-8 weeks before analysis. Whereas kindling is known to increase neurogenesis during the stimulation phase [25-28], the rate of neurogenesis was not different from control at this late time point. Thus, we can exclude that enhanced proliferation and disturbance of the one-to-one relationship between newborn granule cells and astrocytes contributes to the ongoing formation of hilar basal dendrites in the kindled brain. In comparison, the percentage of doublecortin-labeled cells exhibiting hilar basal dendrites tended to be higher in the post-status epilepticus model, i.e. in rats with spontaneous seizures, as compared to kindled rats. These data indicate that seizure activity can further enhance the formation of hilar basal dendrites that *per se* occurs in the rodent hippocampus that became part of a hyperexcitable network.

Granule cell basal dendrites receive excitatory synaptic contacts from mossy fibers and can thus, contribute to recurrent excitatory circuitry [5]. Auck and Buckmaster [8] showed that the circuitry involving hilar basal dendrites is involved in increased bursting of granule cells. Enhanced formation of hilar basal dendrites that has also been described in tissue from epileptic patients [9, 10] is thus discussed to contribute to epilepsy development and progression. This is however speculative as newly born neurons are presumably minimally connected.

The present data give evidence that ongoing formation of hilar basal dendrites is a characteristic of a hyperexcitable epileptogenic network that even in the absence of seizures may contribute to disease progression.

Conclusions

The generation of a hyperexcitable network that involves the hippocampal formation can function as a trigger for the development of persistent hilar basal dendrites in the rodent brain. Ongoing seizure activity is not a presupposition for the persistence of hilar basal dendrites, but seems to further enhance the occurrence of this morphological characteristic. Based on the suggested contribution of hilar basal dendrites to hyperexcitability in the epileptic brain, the data indicate that the aberrant growth of these dendrites may promote progression of the epilepsy even in phases without seizure activity.

Acknowledgements

We thank Christiane Bartling and Meriame Nassiri for their professional technical assistance. The study was supported by a scholarship (to Anton Pekcec) of the Center for Systems Neuroscience (Hannover, Germany).

Figure 1

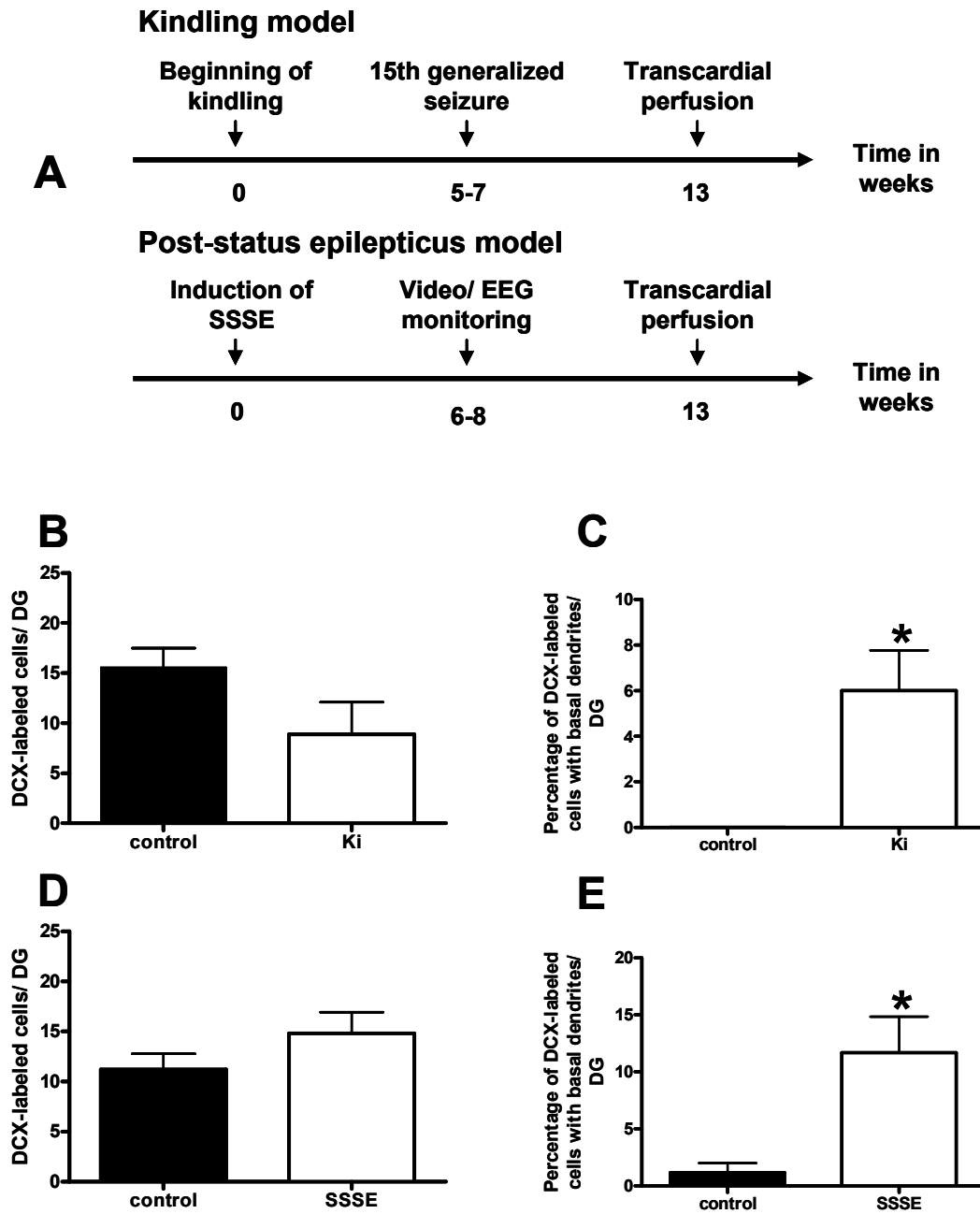
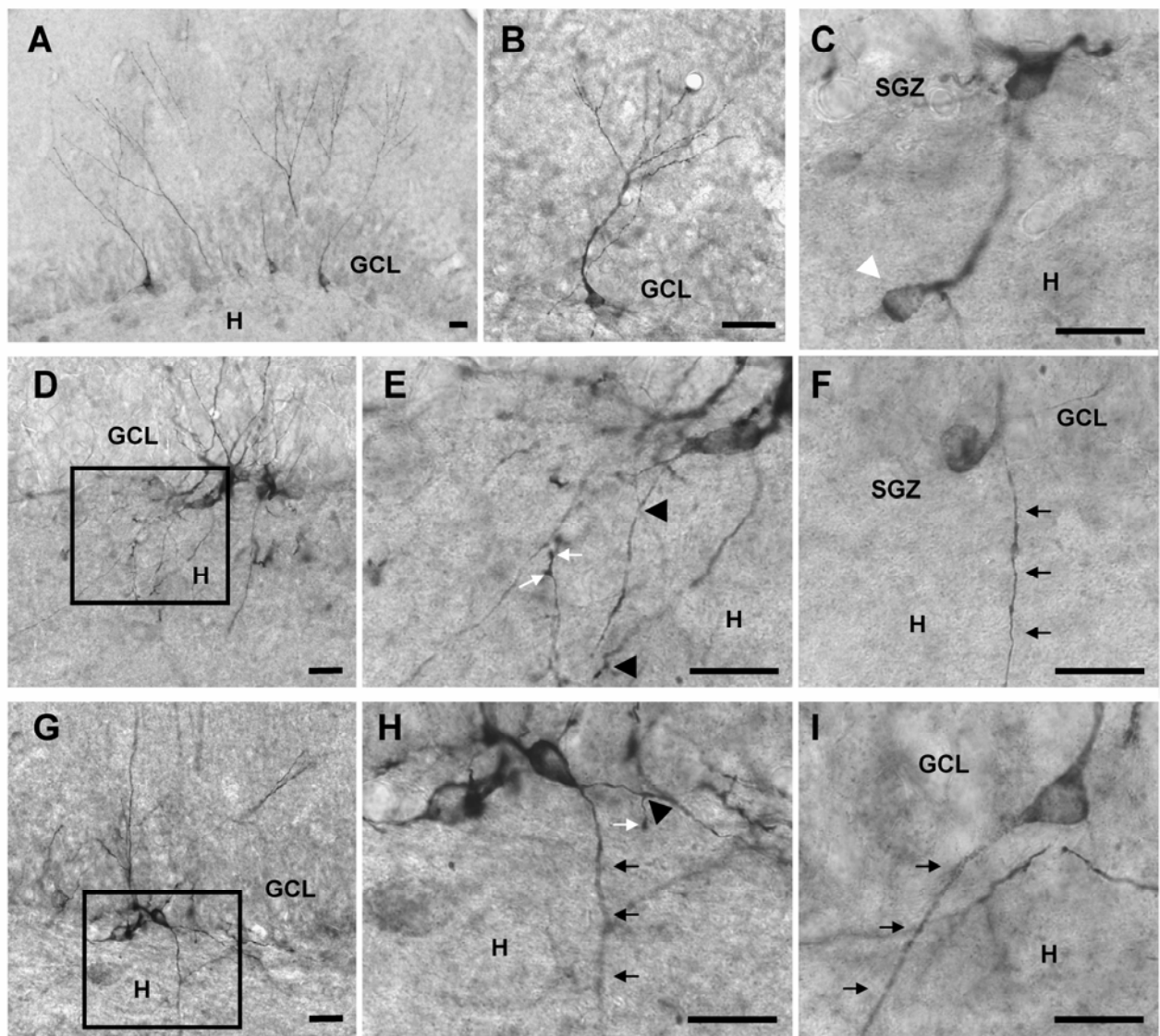


Figure 2



Legend to figure 1

Diagram of the experimental setups of the used models (A) and number of doublecortin-expressing cells (B, D) per dentate gyrus (DG) and subset of doublecortin-expressing cells with persistent basal dendrites (C, E) per DG in six kindled and eight non-kindled rats (B, C) as well as in eight epileptic rats and seven non-epileptic rats (D, E). Data are given as means \pm SEM. The total number of doublecortin-labeled cells with persistent basal

dendrites was increased in both, kindled animals (C) as well as epileptic animals (E) as compared to their controls.

Legend to figure 2

Light photomicrographs of doublecortin-labeled cells of non-kindled (A, B), kindled (C-F), and epileptic (G-I) rats. (A) shows a low magnification photograph of several DCX-labeled cells in the granule cell layer (GCL) of a non-kindled animal. Some of these newborn neurons extend apical dendrites into the molecular layer, while persistent basal dendrites are lacking. (B) is a high magnification photograph of a normally developed newborn neuron. (C-F) represent doublecortin-labeled cells of kindled animals. (C) shows a cell dislocated in the hilus. (D) Cluster of cell bodies at the base of the GCL and hilar basal dendrites arising from some of the cell bodies of the cluster. In (E) a detail of figure (D) is shown at a higher magnification. Note the arborisation of some of the hilar basal dendrites (black triangles) and the spiny processes (white arrowheads). In (F) a single doublecortin-labeled cell at the base of the GCL is shown. This cell has a spiny basal process extending through the subgranular zone (SGZ) deep into the hilus (black arrowheads). (G-I) represent doublecortin-labeled cells of epileptic rats. A cluster of cell bodies at the base of the GCL and a hilar basal dendrite that arises from one of the cell bodies of the cluster, extends through the subgranular zone deep into the hilus is shown in (G). In (H) the display detail of figure (G) is shown at a higher magnification. The basal dendrites (black arrowheads) are branched (black triangle) and exhibit spiny processes (white arrowhead). (I) shows a bipolar cell in the GCL with a long persistent basal dendrite extending into the hilus. Scale bar = 50 μm .

References

- [1] Shapiro LA, Ribak CE. Integration of newly born dentate gyrus granule cells into adult brains: hypotheses based on normal and epileptic rodents. *Brain Res Brain Res Res* 2005;48:43-56.
- [2] Jones SP, Rahimi O, O'Boyle MP, Diaz DL, Claiborne BJ. Maturation of granule cell dendrites after mossy fiber arrival in hippocampal field CA3. **Hippocampus** 2003; 13:413-427.
- [3] Spigelman I, Yan XX, Obenaus A, Lee EY, Wasterlain CG, Ribak CE. Dentate granule cells form novel basal dendrites in a rat model of temporal lobe epilepsy. **Neuroscience** 1998; 86:109-120.
- [4] Buckmaster PS, Dudek FE. In vivo intracellular analysis of granule cell axon reorganization in epileptic rats. **J Neurophysiol** 1999; 81:712-721.
- [5] Ribak CE, Tran PH, Spigelman I, Okazaki MM, Nadler JV. Status epilepticus-induced hilar basal dendrites on rodent granule cells contribute to recurrent excitatory circuitry. **J Comp Neurol** 2000; 428:240-253.
- [6] Wenzel HJ, Robbins CA, Tsai LH, Schwartzkroin PA. Abnormal morphological and functional organization of the hippocampus in a p35 mutant model of cortical dysplasia associated with spontaneous seizures. **J Neurosci** 2001; 21:983-998.

[7] Seress L, Mrzljak L. Basal dendrites of granule cells are normal features of the fetal and adult dentate gyrus of both monkey and human hippocampal formations. **Brain Res** 1987; 405:169-174.

[8] Austin JE, Buckmaster PS. Recurrent excitation of granule cells with basal dendrites and low interneuron density and inhibitory postsynaptic current frequency in the dentate gyrus of macaque monkeys. **J Comp Neurol** 2004; 476:205-218.

[9] Franck JE, Pokorny J, Kunkel DD, Schwartzkroin PA. Physiologic and morphologic characteristics of granule cell circuitry in human epileptic hippocampus. **Epilepsia** 1995; 36:543-558.

[10] von CG, Spencer DD, de Lanerolle NC. Morphology of dentate granule cells in the human epileptogenic hippocampus. **Hippocampus** 1997; 7:472-488.

[11] Rao MS, Shetty AK. Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. **Eur J Neurosci** 2004; 19:234-246.

[12] Paxinos, Watson. The rat brain in stereotactic coordinates. Academic Press, Sydney, 1998.

[13] Freeman FG, Jarvis MF. The effect of interstimulation interval on the assessment and stability of kindled seizure thresholds. **Brain Res Bull** 1981; 7:629-633.

[14] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. **Electroencephalogr Clin Neurophysiol** 1972; 32:281-294.

[15] Brandt C, Gastens AM, Sun MZ, Hausknecht M, Loscher W. Treatment with valproate after status epilepticus: Effect on neuronal damage, epileptogenesis, and behavioral alterations in rats. **Neuropharmacology** 2006.

[16] Brandt C, Glien M, Potschka H, Volk H, Loscher W. Epileptogenesis and neuropathology after different types of status epilepticus induced by prolonged electrical stimulation of the basolateral amygdala in rats. **Epilepsy Res** 2003; 55:83-103.

[17] Brandt C, Potschka H, Loscher W, Ebert U. N-methyl-D-aspartate receptor blockade after status epilepticus protects against limbic brain damage but not against epilepsy in the kainate model of temporal lobe epilepsy. **Neuroscience** 2003; 118:727-740.

[18] Schwabe K, Ebert U, Loscher W. The central piriform cortex: anatomical connections and anticonvulsant effect of GABA elevation in the kindling model. **Neuroscience** 2004; 126:727-741.

[19] Pekcec A, Loscher W, Potschka H. Neurogenesis in the adult rat piriform cortex. **Neuroreport** 2006; 17:571-574.

[20] Dashtipour K, Wong AM, Obenaus A, Spigelman I, Ribak CE. Temporal profile of hilar basal dendrite formation on dentate granule cells after status epilepticus. **Epilepsy Res** 2003; 54:141-151.

[21] Shapiro LA, Ribak CE. Newly born dentate granule neurons after pilocarpine-induced epilepsy have hilar basal dendrites with immature synapses. **Epilepsy Res** 2006; 69:53-66.

[22] Shapiro LA, Korn MJ, Ribak CE. Newly generated dentate granule cells from epileptic rats exhibit elongated hilar basal dendrites that align along GFAP-immunolabeled processes. **Neuroscience** 2005; 136:823-831.

[23] Loscher W, Ebert U. Basic mechanisms of seizure propagation: targets for rational drug design and rational polypharmacy. **Epilepsy Res Suppl** 1996; 11:17-43.

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

[25] Nakagawa E, Aimi Y, Yasuhara O, Tooyama I, Shimada M, McGeer PL et al. Enhancement of progenitor cell division in the dentate gyrus triggered by initial limbic seizures in rat models of epilepsy. **Epilepsia** 2000; 41:10-18.

[26] Parent JM, Janumpalli S, McNamara JO, Lowenstein DH. Increased dentate granule cell neurogenesis following amygdala kindling in the adult rat. **Neurosci Lett** 1998; 247:9-12.

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

[28] Scott BW, Burnham WM. Kindled seizures enhance young neuron survival in the adult rat dentate gyrus. **Acta Neuropathol (Berl)** 2006; 111:364-371.

4 DISKUSSION

Obwohl in zwei regional begrenzten Gehirnbereichen, den primär neurogenen Zonen, eine lebenslange kontinuierliche Neubildung von Nervenzellen in extrem hoher Anzahl erfolgt, erscheint die Fähigkeit neue Neurone hervorzubringen im adulten Säugetiernervensystem generell gering. In den vergangenen Jahrhunderten wurde spekuliert, dass ein fehlendes Regenerationsvermögen der evolutionäre Preis für eine wachsende und komplexere Verarbeitungsleistung des Gehirns sei, die ein stabiles Netzwerkgefüge als grundlegende Voraussetzung hätte [1]. Diese Theorie wurde durch die Entdeckung der permanenten und massiven strukturellen Plastizität, dem das Gehirn ständig unterliegt, verworfen. Einen Teil dieser Permissivität stellen neurogeneseabhängige Veränderungen neuronaler Netzwerke dar.

Im ersten Teil dieser Arbeit (Publikation 1) wurde die mögliche Existenz einer Nervenzellneubildung außerhalb der primär neurogenen Zonen im naiven Gehirn adulter Ratten untersucht und damit ein Beitrag zur Aufklärung dieser Form von plastischen Veränderungen bei Säugetieren geliefert. Im Fokus der Untersuchung stand der PC, der Teil des primären olfaktorischen Cortex ist und als ältester Anteil des Cortex auch als Paleocortex bezeichnet wird (Abb. 1A). Als wichtigstes Ergebnis konnte eine geringe Anzahl neugebildeter Zellen mit neuronalen Charakteristika identifiziert werden, die vornehmlich im Layer II des PC lokalisiert sind. Zudem konnten Zellen in dieser Region gefunden werden, die verschiedene spezifische Vorläuferzellmarker exprimieren und daher als direkte Vorläuferzellen dieser Neurone in Frage kommen. Die Lokalisation der neugebildeten Neurone sowie deren morphologische Eigenschaften lassen vermuten, dass es sich um superficiale Pyramidenzellen handelt, die glutamaterge Zellen darstellen (Abb. 1B) [2].

Die exakte Herkunft der neuronalen Vorläuferzellen bleibt derzeit weiter unklar. Es wäre denkbar, dass Neuroblasten auf dem Weg ihrer Wanderung entlang des RMS in Richtung Bulbus olfactorius „frühzeitig“ den RMS verlassen, um in den PC einzuwandern. Chemotaktische Faktoren des PC könnten ein vom Bedarf abhängiges Einwandern der

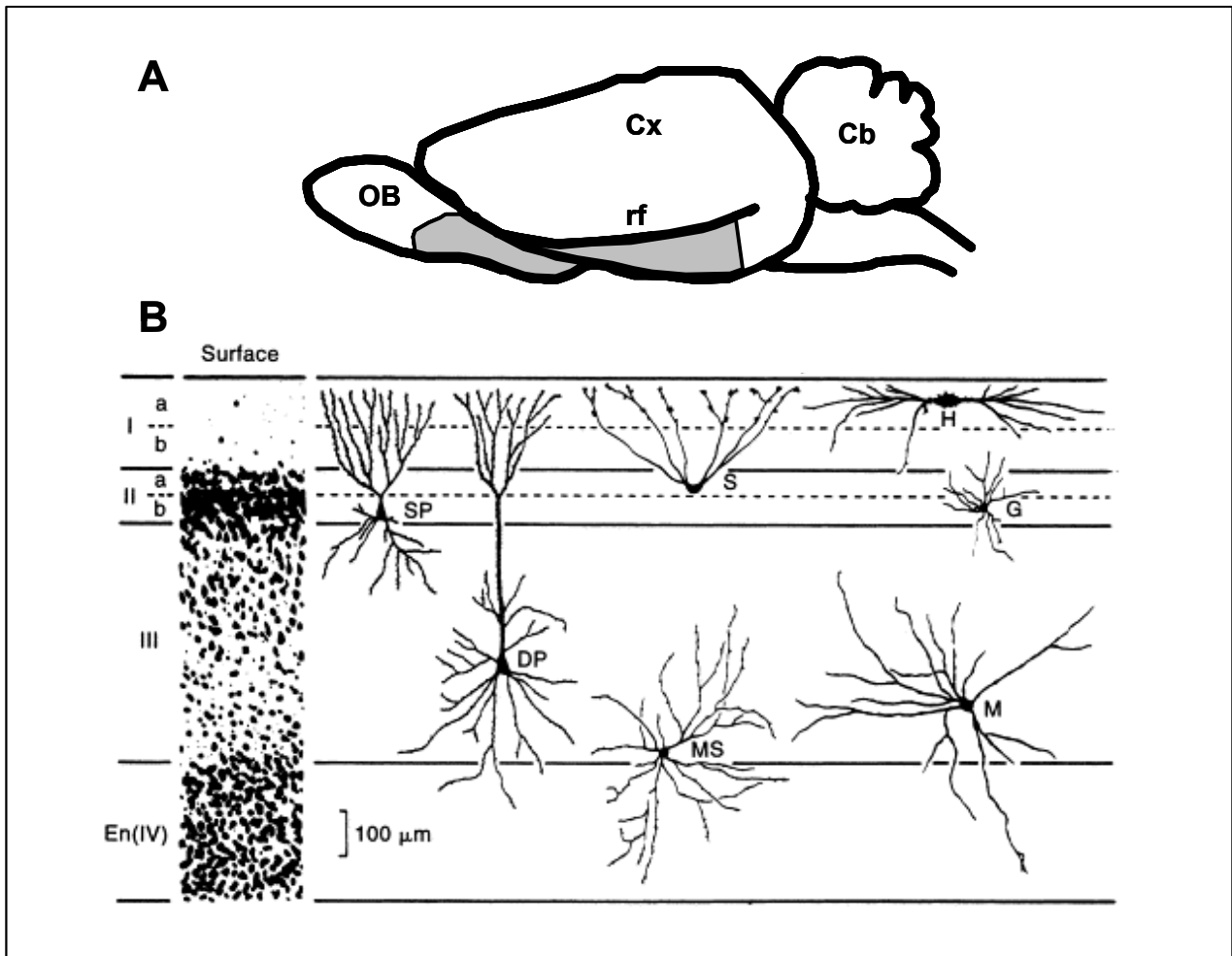


Abb. 1: Anatomische Lokalisation des piriformen Cortex (PC) im Rattengehirn (A) und Zellschichtung innerhalb des PC (B). Abbildung (A) zeigt eine Seitenansicht des Gehirns einer Ratte. Die Topographie des PC ist in grau dargestellt. Abkürzungen: Cx = Cortex, OB = Bulbus olfactorius, Cb = Cerebellum, rf = Fissura rhinalis. Die Abbildung (B) gibt den Aufbau des PC und dessen dominierende Zelltypen schematisch wieder (modifizierte Darstellung aus Haberly (1990)). Die römischen Zahlen zeigen die Bezeichnungen der einzelnen Schichten (Layer I-IV) an. Die 4. Schicht des PC wird auch als endopiriformer Nucleus (En) bezeichnet. Abkürzungen: SP = superficiale Pyramidenzelle, DP = tiefliegende Pyramidenzelle, S = semilunare Zelle, MS = multipolare Zelle mit dornigen Dendriten, M = multipolare Zelle mit glatten Dendriten, H = superficiale Horizontalzelle, G = globuläre Zelle. Während G in allen Schichten zu finden sind, ist das Vorkommen von MS und M auf die Zellschichten III und IV begrenzt. Alle übrigen benannten Zelltypen treten lediglich in den zugeordneten Zellschichten auf.

Neuroblasten steuern. Dieses wäre insbesondere für die rostralen Anteile des PC denkbar, da der RMS diesem dicht benachbart liegt. In den Untersuchungen dieses Teils der Arbeit konnten neugebildete Neurone jedoch ebenfalls in den caudalen Anteilen des PC gefunden werden. Da der RMS und die caudalen Anteilen des PC topographisch relativ weit entfernt liegen, erscheint eine Auswanderung der Neuroblasten in diese Abschnitte des PC unwahrscheinlich. Es kann daher vermutet werden, dass die neugebildeten Zellen aus endogenen ortsständigen neuronalen Vorläuferzellen entstehen, die eine geringe mitotische Aktivität aufweisen.

Die Bedeutung dieser Form neuronaler Plastizität könnte an die Funktion der neugebildeten Neurone im Bulbus olfactorius gekoppelt sein. Zwar ist die funktionelle Relevanz nicht vollständig geklärt, es wird jedoch vermutet, dass die hohe Turnoverrate an Rezeptorzellen im olfaktorischen Riechepithel ein analoges Korrelat an Plastizität auf der Ebene der synaptischen Zielzellen im Bulbus olfactorius erfordert [3]. In Funktionalitätsuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Zahl der integrierten neugebildeten Zellen und deren mittlere Überlebensrate mit dem Grad der sensorischen Eindrücke zunehmen [4]. Das bedeutet, dass erfahrungsabhängig morphofunktionelle Veränderungen auf der Netzwerkebene ablaufen, die auf Insertion von neuen zellulären Einheiten beruht. Neurogeneseabhängige Modifikationen im Bulbus olfactorius könnten wiederum ein analoges nachgeschaltetes Korrelat an Plastizität auf der Prozessierungsebene erfordern. Die Prozessierung erfolgt auf der Ebene des PC, der die Hauptagangsstruktur des Bulbus olfactorius darstellt [5]. Ein Teil der im PC erforderlichen plastischen Adaptationen, könnte somit in Analogie zum Bulbus olfactorius, durch die Insertion neuer Verarbeitungselemente in Form neuer Neurone erfolgen. Es ist weiterhin denkbar, dass die Proliferation und Differenzierung der neugebildeten Neurone im piriformen Cortex durch neurogeneseabhängige plastische Netzwerkveränderungen im Bulbus olfactorius getriggert werden.

Die Untersuchungen dieser Arbeit ergaben, dass die neugebildeten Nervenzellen im PC nach 12 Wochen nicht mehr auffindbar waren. Das Ergebnis deutet auf einen frühen Untergang dieser Zellpopulation hin und lässt daher vermuten, dass die neu entstandenen Neurone ohne direkte funktionelle Relevanz für das Netzwerk sind. Es ist jedoch zu

betonen, dass konventionell gehaltene Labornager in einer relativ deprivierten Umwelt aufwachsen. Diese erlaubt nur wenige neue sensorische Umwelteindrücke. Zukünftige Experimente müssen daher klären, ob die Überlebensrate der neugebildeten Zellen im PC unter Umweltbedingungen mit gesteigerten Sinneseindrücken erhöht ist (analog zur Neurogenese im Bulbus olfactorius [4]) und ein Absterben auf einen Mangel an neuen Umweltreizen rückzuführen ist. Eine Adjustierung des neuronalen Netzwerkes auf der Prozessierungsebene olfaktorischer Sinneseindrücke würde auch erklären, warum der Grad der Nervenzellneubildung im PC im Vergleich zur Netzwerkintegration im Bulbus um ein Vielfaches geringer ist. Die Insertion komplett neuer zellulärer Einheiten im Bulbus olfactorius könnte bereits eine so maßgebliche Netzwerkveränderung implizieren, dass lediglich geringe Adaptationen von verarbeitenden Downstream-Elementen erforderlich wären.

Vermutlich liegt ein grundlegender Unterschied des PC sowie weiterer Gehirnregionen zu den beiden primären neurogenen Zonen darin, dass sie ein inhibiertes System darstellen. So könnten permissive neurogeneseabhängige Veränderungen prinzipiell möglich sein und/oder im geringen Umfang transient ablaufen und durch Aufhebung der Inhibition gesteigert werden. Diese Hypothese wird durch die Tatsache gestützt, dass bei einer Reihe pathologischer Prozesse eine Aktivierung ruhender endogener, multipotenter Vorläuferzellen induziert wird [6-11]. So könnte über schnellwirksame Mechanismen eine Entkopplung der Inhibition erfolgen. Interessant ist, dass neben dieser *in situ* Neurogenese ebenfalls eine Rekrutierung von Neuroblasten aus den primären neurogenen Regionen möglich ist [8, 12]. Welche der beiden regenerativen Formen neuronaler Plastizität überwiegt, ist vermutlich von der Art des Insults, der Lokalisation und einer Reihe von weiteren bisher unbekanntem Faktoren abhängig. Die Hypothese eines inhibierten Nervenzellbildungssystems könnte weiterhin eine Erklärung liefern, weshalb einige Arbeitsgruppen eine Nervenzellbildung außerhalb der primär neurogenen Regionen finden [13-23] und andere nicht [24-27]. Ein massiver Einfluss diverser physiologischer umwelt- und/oder erfahrungsabhängiger Faktoren auf die hippocampale und olfaktorische Neurogenese konnte wiederholt für die primären neurogenen Regionen gezeigt werden [4, 28-29]. Analog dazu könnten bereits kleine physiologische Umwelteinflüsse (wie auch

für bestimmte pathologische Bedingungen bereits beschrieben) die Inhibition in spezifischen Gehirnregionen verringern und eine zumindest transiente Nervenzellneubildung *in situ* zulassen. Zukünftige Untersuchungen sollten dieser Frage nachgehen und damit eine breitere und weitsichtigere Interpretationsgrundlage für eine neurogeneseabhängige Plastizität außerhalb der primären neurogenen Zonen liefern.

Im zweiten Teil dieser Arbeit (Publikation 2) sind die pathophysiologischen Mechanismen neurogeneseabhängiger plastischer Veränderungen im Hippocampus zweier chronischer Rattenmodelle, denen eine Epileptogenese zugrunde liegt, charakterisiert worden. Während der Entwicklung von hippocampalen Neuronen im adulten Säugetiergehirn weisen die Zellen kurze basale Dendriten auf. In diversen Epilepsiemodellen an Ratten und Mäusen sowie in humanem Gewebe konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass diese basalen Dendriten nach Anfällen persistieren und sich weit in den Hilus hinein verlängern [30-40]. Unklar blieb, ob das Auftreten der persistierenden basalen Dendriten direkt durch die Anfallsaktivität verursacht wird, oder ob diese Veränderung der neurogeneseassoziierten Plastizität durch ein übererregbares neuronales Netzwerk und damit auch unabhängig von Anfällen zustande kommt. Es wurden Untersuchungen in der chronischen Phase in zwei verschiedenen Tiermodellen der Temporallappenepilepsie (Kindling-Modell und Post-Status epilepticus-Modell) durchgeführt. Das Post-Status epilepticus-Modell ist durch spontane wiederkehrende Anfälle in der chronischen Phase gekennzeichnet [41]. Das Kindling-Modell ist ein exzellentes Modell für die Untersuchung der Epileptogenese und weist eine hohe Prädiktivität auf, jedoch treten in diesem Modell in der Regel keine wiederkehrenden spontanen Anfälle auf [42]. Unter Verwendung des spezifischen neuronalen Vorläuferzellmarkers Doublecortin konnte die Formation persistierender basaler Dendriten in gekindelten Tieren 6-8 Wochen nach der letzten Anfallsinduktion nachgewiesen werden. Ein Vergleich mit chronisch epileptischen Tieren ergab, dass die aberrante Dendritenpersistenz durch wiederkehrende epileptische Anfälle gesteigert wird.

Persistierende basale Dendriten gehen insbesondere von sich neubildenden Nervenzellen im epileptischen Gehirn aus [30]. Es konnte nachgewiesen werden, dass bereits eine Woche nach einer langanhaltenden Anfallsaktivität neuentstehende hippocampale Körnerzellen persistierende basale Dendriten aufweisen [30]. Während die meisten Studien auf Aberrationen der Bildung basaler Dendriten in der Frühphase der Epileptogenese (~4 Wochen nach dem epilepsieauslösenden Insult) fokussierten [31-34], sind bis zu diesem Zeitpunkt keine Daten über mögliche Veränderungen in der chronischen Phase vorhanden. Daher wurden Untersuchungen in der chronischen Phase, 13 Wochen nach dem epilepsieauslösenden Insult bzw. dem Kindling-Beginn (\approx 6-8 Wochen nach Abschluss des Kindlings), durchgeführt.

Funktionelle Untersuchungen neugebildeter Körnerzellen mit persistierenden basalen Dendriten deuten auf Veränderungen hin, die Auswirkungen auf die Epilepsieprogression haben könnten [35-40]. So erhalten Körnerzellen über persistierende basale Dendriten excitatorische Afferenzen von Moosfasern und tragen damit zur Ausbildung erregender Netzwerke bei. Darüber hinaus sind sie an *burst*-artigen Entladungen von Körnerzellen des GD beteiligt und weisen eine erhöhte Anzahl excitatorischer Synapsen auf [35-38]. Aus diesem Grunde wird diskutiert, dass das Persistieren von Dendriten an der Epilepsieentstehung und dem Fortschreiten der Erkrankung beteiligt ist [37, 40].

Als Ursache der Aberration der hippocampalen Neurogenese im epileptischen Gehirn ist ein Verlust einer eins-zu-eins Verbindung von neuronalen Vorläuferzellen und benachbarten Astrozyten vermutet worden [37]. Der Verlust dieser Verbindung könnte daher die ektopische Navigation der basalen Dendriten in den Hilus forcieren [37]. Es wurde spekuliert, dass der Verlust dieses engen Kontaktes von neuronalen Vorläuferzellen und benachbarten Astrozyten durch Anfälle induziert wird [37]. Als wichtigstes Ergebnis dieses Teils der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bildung von persistierenden basalen Dendriten ein Charakteristikum eines hyperexcitablen epileptogenen Netzwerkes darstellt und eine zusätzliche Anfallsaktivität keine Voraussetzung für die Bildung ist. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass der Verlust der eins-zu-eins Verbindung von neuronalen Vorläuferzellen und benachbarten Astrozyten wiederum nicht die direkte Folge von Anfällen sein kann. Das Auftreten von spontanen wiederkehrenden Anfällen besitzt jedoch einen additiven Effekt auf die Persistenz hilarer Dendriten. Während der

Entstehung des übererregbaren neuronalen Netzwerkes bilden sich chronische Veränderungen des Gehirns aus. Diese könnten mit irreparablen Störungen der Mikroumgebung und Mikroarchitektur in der SGZ einhergehen, die als Ursache des erwähnten Verlustes der eins-zu-eins Verbindung in Betracht gezogen werden kann. Daneben könnten jedoch auch weitere Faktoren von Bedeutung sein. In den in dieser Arbeit verwendeten chronischen Tiermodellen (Kindling-Modell und dem Post-Status epilepticus-Modell) sowie weiteren analogen Tiermodellen der Temporallappenepilepsie des Menschen sind eine Reihe von plastischen pathophysiologischen Aberrationen im Hippocampus beschrieben worden. Darunter fallen apoptotische Prozesse [43-45], axonale und dendritische Reorganisationen [46, 47], die Verstärkung erregender neuronaler Schaltkreise (z. B. durch eine erhöhte Expression von glutamatergen Rezeptoren [48, 49] und eine Fehlfunktion inhibitorischer Netzwerke [50]). Diese Prozesse könnten sich negativ auf den Ablauf der hippocampalen Neubildung von Körnerzellen auswirken. Zudem könnten epileptogeneseassoziierte Aberrationen der astrozytären Mikrostruktur ebenfalls zu einer irreparablen Veränderung der hippocampalen Gesamtarchitektur beitragen und damit dauerhaft den Prozess der Neurogenese stören. Neurotrophe Faktoren und axonale Navigationsfaktoren modulieren die Anzahl des Neuritenwachstums. Ein verändertes Freisetzungsprofil neurotropher Faktoren ist in unterschiedlichen Epilepsiemodellen festgestellt worden, die eine Beteiligung an neurogeneseassoziierten prokonvulsiven Netzwerkveränderungen vermuten lässt [50-53]. Hingegen ist die Beteiligung der axonalen Navigationsfaktoren an diesen Netzwerkreorganisationen weitestgehend unbekannt [50]. Aufgrund ihrer physiologischen Relevanz für die Neurogenese und insbesondere für die Neuritenausbildung und Verknüpfung im juvenilen sowie adulten Gehirn erscheint eine Beteiligung an alterierten plastischen Netzwerkveränderungen, die mit der Neurogenese verbunden sind, wahrscheinlich.

Auch wenn die genauen Mechanismen der neurogeneseabhängigen plastischen Umstrukturierung noch unklar sind, bleibt festzustellen, dass die Formation persistierender hilarer Dendriten im epileptischen Gehirn nicht die unmittelbare Folge von Anfällen ist. Wiederkehrende spontane epileptische Anfälle forcieren jedoch die Ausbildung dieser

Aberrationen. Persistierende basale Dendriten sind vermutlich wesentlich an der Entstehung von Epilepsien beteiligt. Aus diesem Grunde lassen die Daten vermuten, dass die ektopische Bildung basaler Dendriten die Epilepsieprogression fördert und damit die Steigerung der Erkrankungsschwere auch in Phasen ohne spontan wiederkehrende epileptische Anfälle begünstigt.

Schlussbetrachtungen

Der PC von naiven Ratten ist durch eine kleine Population von sich transient neubildenden Nervenzellen und einem damit einhergehenden neurogenen Potential gekennzeichnet. Neben der biologischen Bedeutung der Neurogenese in dieser Gehirnregion und der damit verbundenen Plastizität im adulten Säugetiergehirn ist die grundlegende Aufklärung der Struktur und Funktion dieser Form von Plastizität aus Sicht einer möglichen Therapie diverser neurologischer Erkrankungen bei Tieren und Menschen von Interesse. Neurodegenerative Prozesse sind häufig die Ursache oder eine Begleiterscheinung vieler neurologischer Erkrankungen. Das endogene Reservoir multipotenter Vorläuferzellen könnte daher für einen funktionellen Ersatz dieser erkrankungsbedingt-untergegangenen Neurone verwendet werden und der klinischen Neurologie in der Tiermedizin neue Behandlungsmöglichkeiten eröffnen.

Neben diesem regenerativen Potential wird eine pathophysiologische Bedeutung der neurogeneseassoziierten Plastizität im Rahmen verschiedener psychiatrischer und neurologischer Erkrankungen, wie der Epilepsie diskutiert. Die weiterführende Charakterisierung und die Aufklärung der funktionellen Relevanz der Neurogenese lassen wesentliche Erkenntnisse über die neuronalen plastischen Mechanismen im Allgemeinen und insbesondere für die Pathophysiologie von Epilepsien erwarten. Epilepsien zählen zu den häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen bei Hunden und Katzen. Die Pharmakotherapie dieser Erkrankung beschränkt sich derzeit auf eine lebenslange symptomatische Behandlung mit Antikonvulsiva, mit denen sich jedoch vielfach das gewünschte Behandlungsziel einer deutlich reduzierten Anfallsfrequenz nicht erreichen

lässt. Aufgrund ungünstiger pharmakokinetischer Eigenschaften können zudem neuere humanmedizinisch verwendete Antikonvulsiva in der Tiermedizin nicht eingesetzt werden. Daher besteht insbesondere in der Tiermedizin ein erheblicher Bedarf an neuen therapeutischen Strategien zur Behandlung und/oder der Prophylaxe von Epilepsien. Die Erkenntnisse über die pathophysiologische Bedeutung der neurogeneseassoziierten Plastizität für die Epilepsie könnten zukünftig für die Entwicklung einer kausalen Therapie sowie der Entwicklung einer Epilepsieprophylaxe von Bedeutung sein.

Referenzen

- [1] Rakic P. Limits of neurogenesis in primates. **Science** 1985; 227:1054-1056.
- [2] Watanabe K, Kawana E. Selective retrograde transport of tritiated D-aspartate from the olfactory bulb to the anterior olfactory nucleus, pyriform cortex and nucleus of the lateral olfactory tract in the rat. **Brain Res** 1984; 296:148-151.
- [3] Petreanu L, varez-Buylla A. Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. **J Neurosci** 2002; 22:6106-6113.
- [4] Lledo PM, Saghatelian A. Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: joining the network, life-death decisions, and the effects of sensory experience. **Trends Neurosci** 2005; 28:248-254.
- [5] Shipley MT MJEM. The olfactory system. In *The rat nervous system*. G.Paxinos (editor). San Diego: Academic Press; 2006. pp. 899-928.
- [6] Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. **Nature** 2000; 405:951-955.
- [7] Magavi SS, Macklis JD. Manipulation of neural precursors in situ: induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. **Neuropsychopharmacology** 2001; 25:816-835.
- [8] Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. **Nat Med** 2002; 8:963-970.
- [9] Arlotta P, Magavi SS, Macklis JD. Induction of adult neurogenesis: molecular manipulation of neural precursors in situ. **Ann N Y Acad Sci** 2003; 991:229-236.

- [10] Arlotta P, Magavi SS, Macklis JD. Molecular manipulation of neural precursors in situ: induction of adult cortical neurogenesis. **Exp Gerontol** 2003; 38:173-182.
- [11] Chen J, Magavi SS, Macklis JD. Neurogenesis of corticospinal motor neurons extending spinal projections in adult mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2004; 101:16357-16362.
- [12] Parent JM, Vexler ZS, Gong C, Derugin N, Ferriero DM. Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. **Ann Neurol** 2002; 52:802-813.
- [13] Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG. Neurogenesis in the neocortex of adult primates. **Science** 1999; 286:548-552.
- [14] Rietze R, Poulin P, Weiss S. Mitotically active cells that generate neurons and astrocytes are present in multiple regions of the adult mouse hippocampus. **J Comp Neurol** 2000; 424:397-408.
- [15] Gould E, Vail N, Wagers M, Gross CG. Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:10910-10917.
- [16] Yamamoto S, Yamamoto N, Kitamura T, Nakamura K, Nakafuku M. Proliferation of parenchymal neural progenitors in response to injury in the adult rat spinal cord. **Exp Neurol** 2001; 172:115-127.
- [17] Bernier PJ, Bedard A, Vinet J, Levesque M, Parent A. Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2002; 99:11464-11469.

- [18] Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB et al. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2003; 100:7925-7930.
- [19] Bauer S, Hay M, Amilhon B, Jean A, Moyse E. In vivo neurogenesis in the dorsal vagal complex of the adult rat brainstem. **Neuroscience** 2005; 130:75-90.
- [20] Kokoeva MV, Yin H, Flier JS. Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. **Science** 2005; 310:679-683.
- [21] Pekcec A, Loscher W, Potschka H. Neurogenesis in the adult rat piriform cortex. **Neuroreport** 2006; 17:571-574.
- [22] Luzzati F, De MS, Fasolo A, Peretto P. Neurogenesis in the caudate nucleus of the adult rabbit. **J Neurosci** 2006; 26:609-621.
- [23] Ponti G, Peretto P, Bonfanti L. A subpial, transitory germinal zone forms chains of neuronal precursors in the rabbit cerebellum. **Dev Biol** 2006; 294:168-180.
- [24] Kornack DR, Rakic P. The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:4752-4757.
- [25] Rakic P. Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. **Nat Rev Neurosci** 2002; 3:65-71.
- [26] Koketsu D, Mikami A, Miyamoto Y, Hisatsune T. Nonrenewal of neurons in the cerebral neocortex of adult macaque monkeys. **J Neurosci** 2003; 23:937-942.
- [27] Emsley JG, Mitchell BD, Kempermann G, Macklis JD. Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. **Prog Neurobiol** 2005; 75:321-341.

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

[29] van Praag, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nat Neurosci** 1999; 2:266-270.

[30] Shapiro LA, Ribak CE. Integration of newly born dentate gyrus granule cells into adult brains: hypotheses based on normal and epileptic rodents. **Brain Res Brain Res Res** 2005;48:43-56.

[31] Buckmaster PS, Dudek FE. In vivo intracellular analysis of granule cell axon reorganization in epileptic rats. **J Neurophysiol** 1999; 81:712-721.

[32] Ribak CE, Tran PH, Spigelman I, Okazaki MM, Nadler JV. Status epilepticus-induced hilar basal dendrites on rodent granule cells contribute to recurrent excitatory circuitry. **J Comp Neurol** 2000; 428:240-253.

[33] Wenzel HJ, Robbins CA, Tsai LH, Schwartzkroin PA. Abnormal morphological and functional organization of the hippocampus in a p35 mutant model of cortical dysplasia associated with spontaneous seizures. **J Neurosci** 2001; 21:983-998.

[34] Franck JE, Pokorny J, Kunkel DD, Schwartzkroin PA. Physiologic and morphologic characteristics of granule cell circuitry in human epileptic hippocampus. **Epilepsia** 1995; 36:543-558.

[35] von CG, Spencer DD, de Lanerolle NC. Morphology of dentate granule cells in the human epileptogenic hippocampus. **Hippocampus** 1997; 7:472-488.

[36] Austin JE, Buckmaster PS. Recurrent excitation of granule cells with basal dendrites and low interneuron density and inhibitory postsynaptic current frequency in the dentate gyrus of macaque monkeys. **J Comp Neurol** 2004; 476:205-218.

[37] Shapiro LA, Ribak CE. Newly born dentate granule neurons after pilocarpine-induced epilepsy have hilar basal dendrites with immature synapses. **Epilepsy Res** 2006; 69:53-66.

[38] Spigelman I, Yan XX, Obenaus A, Lee EY, Wasterlain CG, Ribak CE. Dentate granule cells form novel basal dendrites in a rat model of temporal lobe epilepsy. **Neuroscience** 1998; 86:109-120.

[39] Dashtipour K, Wong AM, Obenaus A, Spigelman I, Ribak CE. Temporal profile of hilar basal dendrite formation on dentate granule cells after status epilepticus. **Epilepsy Res** 2003; 54:141-151.

[40] Shapiro LA, Korn MJ, Ribak CE. Newly generated dentate granule cells from epileptic rats exhibit elongated hilar basal dendrites that align along GFAP-immunolabeled processes. **Neuroscience** 2005; 136:823-831.

- [41] Brandt C, Glien M, Potschka H, Volk H, Loscher W. Epileptogenesis and neuropathology after different types of status epilepticus induced by prolonged electrical stimulation of the basolateral amygdala in rats. **Epilepsy Res** 2003; 55:83-103.
- [42] Loscher W, Ebert U. Basic mechanisms of seizure propagation: targets for rational drug design and rational polypharmacy. **Epilepsy Res Suppl** 1996; 11:17-43
- [43] Bengzon J, Kokaia Z, Elmer E, Nanobashvili A, Kokaia M, Lindvall O. Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1997; 94:10432-10437.
- [44] Pretel S, Applegate CD, Piekut D. Apoptotic and necrotic cell death following kindling induced seizures. **Acta Histochem** 1997; 99:71-79.
- [45] Roux PP, Colicos MA, Barker PA, Kennedy TE. p75 neurotrophin receptor expression is induced in apoptotic neurons after seizure. **J Neurosci** 1999; 19:6887-6896.
- [46] Cavalheiro EA, Riche DA, Le Gal La SG. Long-term effects of intrahippocampal kainic acid injection in rats: a method for inducing spontaneous recurrent seizures. **Electroencephalogr Clin Neurophysiol** 1982; 53:581-589.
- [47] Cavazos JE, Golarai G, Sutula TP. Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development, progression, and permanence. **J Neurosci** 1991; 11:2795-2803.

[48] Mathern GW, Bertram EH, III, Babb TL, Pretorius JK, Kuhlman PA, Spradlin S et al. In contrast to kindled seizures, the frequency of spontaneous epilepsy in the limbic status model correlates with greater aberrant fascia dentata excitatory and inhibitory axon sprouting, and increased staining for N-methyl-D-aspartate, AMPA and GABA(A) receptors. **Neuroscience** 1997; 77:1003-1019.

[49] Wuarin JP, Dudek FE. Electrographic seizures and new recurrent excitatory circuits in the dentate gyrus of hippocampal slices from kainate-treated epileptic rats. **J Neurosci** 1996; 16:4438-4448.

[50] Morimoto K, Fahnestock M, Racine RJ. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. **Prog Neurobiol** 2004; 73:1-60.

[51] Hagihara H, Hara M, Tsunekawa K, Nakagawa Y, Sawada M, Nakano K. Tonic-clonic seizures induce division of neuronal progenitor cells with concomitant changes in expression of neurotrophic factors in the brain of pilocarpine-treated mice. **Brain Res Mol Brain Res** 2005; 139:258-266.

[52] Newton SS, Collier EF, Hunsberger J, Adams D, Terwilliger R, Selvanayagam E et al. Gene profile of electroconvulsive seizures: induction of neurotrophic and angiogenic factors. **J Neurosci** 2003; 23:10841-10851.

[53] Scharfman H, Goodman J, Macleod A, Phani S, Antonelli C, Croll S. Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. **Exp Neurol** 2005; 192:348-356.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Anton Pekcec

Neuronale Plastizität im limbischen System adulter Ratten und deren Modifikation in Epilepsiemodellen

In den letzten Jahrhunderten wurde postuliert, dass der komplexen Verarbeitungsleistung des adulten Säugetiergehirns ein stabiles Netzwerkgefüge zugrunde liegen würde. Diese Hypothese wurde kontinuierlich durch die Erkenntnis ersetzt, dass adulte Säugetiergehirne permanent einer massiven strukturellen und synaptischen Plastizität unterliegen. Teil dieser Plastizität ist eine lebenslang in hohem Maße stattfindende Neubildung von Nervenzellen in zwei regional begrenzten Gehirnarealen, den primären neurogenen Zonen. Daneben existieren multipotente neuronale Vorläuferzellen in diversen Bereichen des adulten Säugetiergehirns deren Potential neue Neurone im naiven Gehirn zu bilden, vielfach diskutiert wird.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit (Publikation 1) wurde das neurogene Potential des piriformen Cortex (PC) adulter Ratten untersucht. Der PC ist der größte Anteil des olfaktorischen Cortex und entscheidend an der Verarbeitung verschiedener Riecheindrücke beteiligt. Es konnte eine Zellneubildung mit neuronalen Charakteristika im PC nachgewiesen werden, die im Vergleich zu den beiden primären neurogenen Zonen jedoch um ein Vielfaches geringer war. Weiterhin konnte die Existenz von neuronalen Vorläuferzellen abgesichert werden, aus denen sich die neugebildeten Neurone direkt bilden könnten. Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass die neugebildeten Zellen jedoch nicht über einen langen Zeitraum erhalten bleiben. Im Vergleich zu freilebenden Tieren werden Laborratten unter deprivierten Bedingungen gehalten. Da in der Vergangenheit gezeigt wurde, dass eine Umwelt mit gesteigerten Sinneseindrücken die Überlebensrate von neugebildeten Neuronen in den primären neurogenen Zonen steigert, kann weiterhin vermutet werden, dass die Überlebensdauer der neugebildeten Zellen im

PC unter natürlichen Umweltbedingungen ebenfalls gesteigert ist.

Im zweiten Teil der Arbeit (Publikation 2) wurden spezifische pathophysiologische Mechanismen neurogeneseabhängiger plastischer Veränderungen im Hippocampus zweier Rattenmodelle mit Epileptogenese charakterisiert. Während ihrer Entwicklung bilden neuronale Vorläuferzellen im adulten Säugetierhippocampus transient kurze basale Dendriten aus. In epileptischen Tieren und in Epilepsiepatienten persistieren diese Dendriten und weisen weitere morphofunktionelle Eigenschaften auf, die als prokonvulsive plastische Netzwerkveränderungen interpretiert werden. Daher wurde die Generierung dieser sog. hilaren oder persistierenden basalen Dendriten direkt mit dem Auftreten von epileptischen Anfällen in Verbindung gebracht. Genauere Untersuchungen, die diese Vermutung stützen, fehlen jedoch. Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen, dass persistierende basale Dendriten charakteristisch für ein chronisches epileptogenes, neuronales Netzwerk und nicht unmittelbar eine Folge von epileptischen Anfällen sind. Spontane wiederkehrende Anfälle resultieren jedoch in einer weiteren Steigerung der Anzahl dieser Dendriten. Basierend auf der Hypothese, dass die Persistenz der Dendriten die Epilepsieprogression und den Erkrankungsgrad steigert, kann weiterhin gefolgert werden, dass auch in Phasen der Anfallsfreiheit diese Form aberranter neurogeneseabhängige Plastizität zu einer Progression der Epilepsie beiträgt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen demonstrieren einheitlich die weit reichende Bedeutung neurogeneseabhängiger plastischer Veränderungen limbischer Strukturen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen. Eine weiterführende Aufklärung des regenerativen Potentials der transienten Nervenzellneubildung im PC ist aus Sicht einer möglichen Therapie diverser neurologischer Erkrankungen von Relevanz. Das endogene Reservoir multipotenter Vorläuferzellen in dieser und weiterer Gehirnregionen könnte für den funktionellen Ersatz erkrankungsbedingt untergegangener Neurone verwendet werden. Neben diesem regenerativen Potential existieren Hinweise auf eine pathophysiologische Bedeutung der neurogeneseassoziierten Plastizität bei Epilepsien. Die weiterführende Charakterisierung und die Aufklärung der funktionellen Relevanz dieser permissiven Alterationen sind für die Entwicklung einer kausalen Therapie sowie einer Epilepsieprophylaxe von Bedeutung.

6 SUMMARY

Anton Pekcec

Neuronal plasticity in the adult rats' limbic system and its modification by epilepsy

A static nature of the adult mammalian brain as a presupposition for its complex computational power has been proposed over the last centuries. While challenging this dogma, constant structural and synaptic reorganization of neural circuits is now generally accepted. Recent work in neuroscience demonstrated a continuous generation of new neurons in two specific regions of the adult mammalian brain, the primary neurogenic zones, as part of this plasticity. Moreover, there are significant numbers of multipotent neural precursors throughout the adult mammalian brain, thus, suggesting the potential for neurogenesis in additional areas of the brain.

The possibility of the adult rats' piriform cortex (PC) to generate new neurons was studied in the first part of this thesis (publication 1). The PC is the largest area of the olfactory cortex and receives direct input from the olfactory bulb. It is intensely involved in olfactory sensory and memory processing.

Generation of new neurons was demonstrated for the PC. This generation was low compared to the primary neurogenic zones. Neuronal progenitor cells have moreover been confirmed, which could preserve a pool for continuous birth of new neurons. However, there was a lack of long-term survival of these neurons. It is possible that specific circumstances may enhance neurogenesis and the survival duration, e.g. we can not exclude that the long-term survival is low due to a lack of rich environmental and especially novel olfactory stimuli under the controlled laboratory conditions. In this context, it is noteworthy that prolonged survival of new olfactory bulb neurons has already been described to depend on novel sensory inputs.

In the second part of this thesis (publication 2) pathophysiological mechanisms of aberrant hippocampal neurogenesis have been studied in two rat models of epileptogenesis. Basal dendrites are transiently formed during migration and development of granule cells. Seizure activity frequently results in a failure to retract these basal dendrites resulting in persistence of basal dendrites that extend into the hilus. The morpho-functional aberrations of these granule cells are suggested to contribute to proconvulsive plastic changes of neuronal circuits, and thus, to progression of epilepsy. It has been presumed that seizure activity induces the increase in basal dendrites in the epileptic brain. However, this has not yet been proven.

It was demonstrated that the formation of hilar basal dendrites occurs in the epileptogenic brain even in the absence of seizures. Thus, formation of hilar basal dendrites does not directly depend on seizure activity. However, seizure activity can further enhance the formation of aberrant dendrites that per se occurs in the rodent hippocampus that became part of a hyperexcitable network. Based on the suggested contribution of hilar basal dendrites to hyperexcitability in the epileptic brain, the data indicate that the aberrant growth of these dendrites may promote progression of epilepsy even in phases without seizure activity.

In conclusion, the data of this thesis uniformly indicate the impact of neurogenesis-associated plasticity of limbic brain structures on physiological as well as pathophysiological conditions. In view of the regenerative capacity of the PCs' neurogenesis in different neurological diseases, a better understanding of its underlying cellular and molecular mechanisms is important. The existence of endogenous multipotent precursors throughout the adult mammalian brain may yield new therapeutic approaches for repopulating damaged or diseased areas of the nervous system. Besides this regenerative potential of neural stem and/or precursor cells, aberration of neurogenesis-associated plasticity is suggested to be involved in the pathophysiology of different diseases including epilepsy. Therefore, the functional relevance of altered neurogenesis has to be further clarified in view of new therapeutic approaches for the treatment and prophylaxis of epilepsy.

Publikationen zu dieser Arbeit

Veröffentlichungen in internationalen Zeitschriften:

Pekcec A, Löscher W, Potschka H. Neurogenesis in the adult rat piriform cortex. **NeuroReport** 2006; 17:571-574

Pekcec A, Potschka H. Newborn neurons with hilar basal dendrites hallmark epileptogenic networks. **NeuroReport** 2007; *in press*

Zitierfähige Kongressbeiträge:

Pekcec A, Löscher W, Potschka H. Characterization and fate of newborn neurons in the adult piriform cortex. **Abstract CD** 2006; Program No A173.9
Federation of European Neuroscience Societies, Vienna, Austria

Sonstige Beiträge:

Pekcec A, Löscher W, Potschka H. Neurogenese im adulten Gehirn – Einfluss eines Status Epilepticus. **Programmheft** 2005; Program No 14
Vetpharm-Symposium, Vienna, Austria

Pekcec A, Löscher W, Potschka H. Newborn neurons in the adult rat paleocortex. **Abstract book** 2006; Program No #5,
Brainstorming II – Current approaches to the nervous system, Hannover, Germany

Weitere Beiträge

Veröffentlichungen in deutschsprachigen Zeitschriften :

Pekcec A, Nolte M. Dekade des Gehirns – Neurowissenschaftliche Forschung bietet neue berufliche Perspektiven für Tierärzte. **Deutsches Tierärzteblatt** 2005; Nov 53:252-1254, ISSN 0724-6773

Pekcec A, Nolte M. Kongressbericht - Brainstorming: Interdisciplinary Aspects of Neuroscience. **Neuroforum** 2005; Sep 3.05; Vol. 11:101, ISSN 0947-0875

Zitierfähige Kongressbeiträge:

Pekcec A, Gerady-Schahn R, Mühlenhoff M, Stummeyer K, Potschka H. Enzymatic removal of polysialic acid and its impact on seizure susceptibility and epileptogenesis. **Epilepsia** 2005; 46, 2082:119
Annual Meeting of the American Epilepsy Society, Washington DC, USA

Potschka H, **Pekcec A**, Weinhold B, Gerady-Schahn R. Enzymatic removal of polysialic acid and its impact on seizure susceptibility and epileptogenesis. **Epilepsia** 2005; 46, 2087:120
Annual Meeting of the American Epilepsy Society, Washington DC, USA

Pekcec A, Fuest C, Stummeyer K, Mühlenhoff M, Gerady-Schahn R, Potschka H. Modulation of neuronal plasticity affects status epilepticus and epileptogenesis in a rat model. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology** 2006; Mar 1; 372:83, 303
Deutsche Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, Germany

Potschka H, **Pekcec A**, Weinhold B, Gerady-Schahn R. Modulation of AMPA Receptor sensitivity by the PSA-NCAM-System. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology** 2006; Mar 1; 372:83, 304

Deutsche Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, Germany

Pekcec A, Bauer B, Hartz AM, Winter J, Töllner K, Miller DS, Potschka H. Regulation and prevention of seizure-induced up-regulation of P-glycoprotein in rat brain capillaries. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology** 2007; Mar 1; 375:54, 245

Deutsche Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, Germany

Danksagung

Mein größter Dank gilt meiner Mentorin Frau Prof. Dr. Heidrun Potschka für die Überlassung des Themas, die ideenreichen wissenschaftlichen Diskussionen, die Anleitung zur experimentellen pharmakologischen und neurowissenschaftlichen Forschung und der Abfassung dieser Arbeit sowie die jederzeit gewährte konstruktive Unterstützung meiner Ideen und Förderung meines beruflichen Werdegangs. Zudem bedanke ich mich für die uneingeschränkte Hilfestellung in allen Labor- und Lebenslagen, der Motivation, dem großen persönlichen Einsatz sowie dem mir entgegengebrachten Vertrauen.

Besonders bedanke ich mich für die freundliche und kompetente Unterstützung bei Christiane Bartling sowie Michael Weissing und Meriame Nassiri.

Ein großer Dank gilt meinen Freunden, die mich in den letzten Jahren stets begleitet haben und mir jegliche Form der Unterstützung haben zukommen lassen. Sie sind die Besten, die man sich wünschen kann.

Schließlich danke ich den wichtigsten Menschen in meinem Leben, meinen Eltern und meiner Schwester, die vorbehaltlos alle persönlichen Entscheidungen in meinem Leben akzeptiert, unterstützt und mitgetragen haben. Ohne Ihre Liebe, Ihren Rückhalt, Ihr Vertrauen und Ihren Zuspruch wäre ich heute nicht da wo ich bin. Danke.

Lebenslauf

Anton Pekcec, PhD
geb. am 15.11.1978 in Bremen, Deutschland
Staatsbürgerschaft: deutsch
Familienstand: ledig

Schul Ausbildung

1985 – 1998 Grundschule, Orientierungsstufe und Gymnasium in Bremen, Deutschland
Abitur: 29.06.1998

Studium

1998 – 2004 Veterinärmedizin an der Stiftung Tierärztliche Hochschule in Hannover, Deutschland
Approbation: 17.02.2004

Auslandspraktika in Zagreb, Kroatien sowie Sydney, Australien

PhD-Studium

2004 - 2006 Ph.D.-Student des Promotionsstudiengangs des Zentrums für Systemische Neurowissenschaften Hannover, Deutschland
Arbeitsgruppe: Prof. Dr. H. Potschka
Doctor of Philosophy (PhD): 25.10.2006

Stipendiat des Zentrums für Systemische Neurowissenschaften Hannover, Deutschland

Organisation des internationalen Kongresses „Brain-storming: Interdisciplinary Aspects of Neuroscience“ in Hannover, Deutschland

Preisträger des Studentenwerkpreises 2005 für außerordentliches Engagement im Hochschulbereich

Derzeitiges Arbeitsverhältnis

seit 01.10.2006 Wiss. Mitarbeiter des Instituts für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der LMU München, Deutschland