

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie

(Direktor Prof. Dr. Karlhans Endlich)

der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Thema: Morphologische Untersuchung vom Leda-1/Pianp defizienten Mäusegehirn

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des akademischen
Grades
Doktor der Zahnmedizin
(Dr. med. dent.)
der
Universitätsmedizin
der
Universität Greifswald
2020

vorgelegt von:

Johann Laurens Preisendörfer

geb. am: 05.02.1994

in: Frankfurt am Main

Prodekan: Prof. Dr. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Prof. Dr. Oliver von Bohlen und Halbach (Greifswald)

2. Gutachter: Prof. Dr. Süleyman Ergün (Würzburg)

(3. Gutachter): -

Ort, Raum: Greifswald, Mikroskopierraum des Instituts für Anatomie und Zellbiologie

Tag der Disputation: 21.10.2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	6
1 Abstract	7
2 Einleitung.....	8
2.1 Neuroanatomische Grundlagen	9
2.1.1 Aufbau und Funktion von Leda-1 – Stand der Forschung	9
2.1.2 Hippocampus	12
2.1.2.1 Hippocampusformation	12
2.1.2.2 Bestandteile	12
2.1.2.3 Faserverbindungen	13
2.1.2.4 Erregungsausbreitung	15
2.1.2.5 Schichtaufbau	16
2.1.2.6 Funktionen	17
2.1.3 Astrozyten.....	20
3 Forschungsfragen.....	23
4 Methoden	25
4.1 Versuchstiere	25
4.2 Gewichts- und Volumenmessung.....	25
4.3 Immunhistochemie	27
4.3.1 Hirnschnitte	27
4.3.2 Doppelfärbung: GFAP/CNPase.....	28
4.4 Auswertung Schichtdicke	31
4.5 Auswertung Astrozyten	32
4.6 Auswertung adulte Neurogenese	34
4.7 In-situ-Hybridisierung	35
4.8 Statistische Auswertung	36
5 Ergebnisse.....	37
5.1 Einfluss der Deletion von Leda-1 auf Gewicht und Volumen	37
5.2 Einfluss der Deletion von Leda-1 auf die Dicke ausgewählter Schichten	38
5.3 Einfluss der Deletion von Leda-1 auf die Astrozytendichte der CA1-Region	40
5.4 Einfluss der Deletion von Leda-1 auf die adulte Neurogenese	41
5.5 Ergebnis der In-situ-Hybridisierung.....	41

6	Diskussion	43
6.1	Gewicht und Volumen	43
6.2	Schichtdicke	44
6.3	Astrozytendichte	47
6.4	Adulte Neurogenese	50
6.5	In-situ-Hybridisierung	53
7	Fazit	60
8	Literaturverzeichnis	62
9	Anhang: Materialien	72
9.1	Antikörper und Chemikalien	72
9.2	In-situ-Hybridisierung	74
9.3	Laborgeräte	75
9.4	Mikroskop.....	76
9.5	Software.....	76
10	Eidesstattliche Erklärung	77
11	Danksagung	78

Abkürzungsverzeichnis

ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i>
Ajap-1	<i>Adherens junctions associated protein 1</i>
APP	<i>β-amyloid precursor protein</i>
CA	<i>Cornu Ammonis</i>
CD-99	<i>Cluster-of-differentiation-99</i>
CNPase	<i>2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase</i>
DAPI	<i>4',6-Diamidin-2-phenylindol</i>
DCX	<i>Doublecortin</i>
DG	<i>Gyrus dentatus</i>
EC	<i>Entorhinaler Cortex</i>
EZR	<i>Extrazellulärraum</i>
GABA	<i>Gamma-Aminobuttersäure</i>
GBR	<i>GABA_B-Rezeptor</i>
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
HIER	<i>Heat-induced Antigen Retrieval</i>
kDa	<i>Kilodalton</i>
KO	<i>Knock-Out</i>
Leda-1	<i>Liver endothelial-differentiation-associated protein-1</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharid</i>
PBS	<i>Phosphatgepufferte Salzlösung</i>
PFA	<i>Paraformaldehyd</i>
Pianp/Panp	<i>PILR-associating neural protein-1</i>
PILR α	<i>Paired immunoglobulin-like type 2 receptor</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
WT	<i>Wildtyp</i>
ZNS	<i>Zentrales Nervensystem</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematischer Schichtaufbau	14
Abbildung 2 Intrahippocampale Verbindungen	15
Abbildung 3 Frontalschnitt Mäusegehirn Bregma -1,94 mm	17
Abbildung 4 Astrozyt mit Interaktionspartnern	21
Abbildung 5 Versuchsaufbau für Volumenbestimmung	26
Abbildung 6 Schichtausmessung im Hippocampus und Gyrus dentatus	32
Abbildung 7 Astrozyt Doppelbelichtung GFAP/DAPI	33
Abbildung 8 Bestimmung der Astrozytdichte, Doppelbelichtung GFAP/DAPI	34
Abbildung 9 Gewicht und Volumen	37
Abbildung 10 Stratum moleculare im Gyrus dentatus	38
Abbildung 11 Stratum granulare im Gyrus dentatus	39
Abbildung 12 Dichte der Astrozyten	40
Abbildung 13 GFAP-positive Progenitorzellen	41
Abbildung 14 Schemata zur verringerten Schichtdicke	45
Abbildung 15 Immuntheorie Leda-1	49
Abbildung 16 In-situ-Hybridisierung Kleinhirn	55
Abbildung 17 Antikörperfärbung Cerebellum Purkinjezelle	56
Abbildung 18 In-situ-Hybridisierung Cerebellum Marklager	57
Abbildung 19 Antikörperfärbung Cerebellum Marklager	57
Abbildung 20 Lamina molecularis (I) des Isocortex'	59

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1 Verteilung der Versuchstiere nach Geschlecht</i>	25
---	----

1 Abstract

Leda-1 ist ein 2010 entdecktes Transmembranprotein, das im neuronalen Gewebe exprimiert wird. Bis zum jetzigen Zeitpunkt identifizierte Interaktionspartner sind PILR α und GABA_B-Rezeptor-Komplexe. 2016 wurde bei einem Kleinkind eine homozygote Defizienz des entsprechenden Gens festgestellt. Der Junge wies Dysmorphien und eine allgemeine Entwicklungsstörung auf. Ziel dieser Arbeit ist es, Auswirkungen der Defizienz von Leda-1 im Mäusegehirn unter neuroanatomischen Gesichtspunkten zu erfassen und zu bewerten.

Die Mäusegehirne wurden makroskopisch auf Gewicht und Volumen und mikroskopisch anhand immunhistochemisch gefärbter Hirnschnitte untersucht. Die Färbung erfolgte mit CNPase- und GFAP-Antikörpern sowie DAPI als Gegenfärbung. Die Schichtdicken ausgewählter Bereiche des Neocortex', des Hippocampus und verschiedener Fasertrakte wurden vermessen und die Astrozytendichte der CA1-Region des Hippocampus wurde bestimmt. Zur Untersuchung der adulten Neurogenese wurden als Marker Progenitorzellen in der subgranulären Zone des Gyrus dentatus gezählt. Anhand von In-situ-Hybridisierungsbildern wurde das Vorkommen von Leda-1 im Mäusegehirn beschrieben.

Das Gewicht der KO-Gehirne wies keinen Unterschied zur Kontrollgruppe auf. Das Volumen war leicht erhöht. Im Stratum moleculare und im Stratum granulare des Gyrus dentatus wurden signifikant geringere Schichtdicken bei den KO-Tieren gemessen. Die Astrozytendichte war im untersuchten Bereich bei KO-Tieren vermindert. Die adulte Neurogenese wies keinen messbaren Unterschied auf. Die Auswertung der In-situ-Hybridisierungsbilder zeigte eine weit verbreitete Expression von Leda-1 in Neuronen des gesamten Gehirns. Besonders stark stellte sich die Expression in den Purkinjezellen des Kleinhirns dar.

Die Defizienz von Leda-1 bewirkt verschiedene neuroanatomische Veränderungen. Die verringerten Schichtdicken könnten auf eine alterierte Zellzusammensetzung zurückzuführen sein. Der Einfluss von Leda-1 auf die Astrozyten kann als Wirkung auf das Immunsystem interpretiert werden. Wahrscheinlich beeinflusst Leda-1 auch die adulte Neurogenese. Die makro- und mikrostrukturellen Veränderungen des Mäusegehirns, die Wirkung auf das Immunsystem und die adulte Neurogenese sowie eine mögliche Verbindung zur Autismus-Spektrum-Störung bleiben Thema zukünftiger Forschung.

2 Einleitung

Das Transmembranprotein „Liver endothelial-differentiation-associated protein-1“ (Leda-1) wurde 2010 erstmals beschrieben (Geraud et al. 2010). Die daraufhin durchgeführten Studien stellten den molekularen Aufbau, die Prozessierung und strukturelle Funktionen des Proteins innerhalb der Zelle dar (Evdokimov et al. 2013; Biswas et al. 2015; Evdokimov et al. 2016; Biswas et al. 2016). Die Analyse des Expressionsmusters zeigte ein überwiegendes Vorkommen von Leda-1 im zentralen Nervensystem (ZNS) (Kogure et al. 2011). 2016 wurde erstmals eine klinische Fallbeschreibung eines Kindes mit homologer Defizienz des für Leda-1 kodierenden Gens veröffentlicht (Anazi et al. 2017).

Ziel dieser Arbeit ist es, Auswirkungen der Deletion von Leda-1 im Mäusegehirn unter grundlegend neuroanatomischen Gesichtspunkten zu erfassen und zu bewerten. Bis heute sind nur wenige funktionelle Aspekte von Leda-1 bekannt. Mögliche Interaktionen mit anderen Komponenten des ZNS wurden bis dato noch nicht ausreichend untersucht. Daher zielt diese Studie darauf ab, neue Interaktionspartner zu identifizieren, die von einer Defizienz des Proteins direkt oder indirekt betroffen sind, um dadurch Hinweise auf Funktionen von Leda-1 zu erhalten. Darüber hinaus erfolgt anhand von In-situ-Hybridisierungsbildern eine allgemeine Beschreibung des Vorkommens von Leda-1 im Mäusegehirn.

Die Ergebnisse sollen die Grundlage für fortführende Untersuchungen bilden, um Themengebiete und Fragestellungen aufzuzeigen, mit der sich die zukünftige Forschung befassen könnte.

2.1 Neuroanatomische Grundlagen

2.1.1 Aufbau und Funktion von Leda-1 – Stand der Forschung

Leda-1 ist ein Typ-I-Transmembranprotein und wurde 2010 bei der Untersuchung von Lebersinusendothelzellen der Ratte entdeckt (Geraud et al. 2010). Es besteht aus 272 Aminosäuren und seine Masse wird auf ~29 kDa geschätzt. Strukturell besitzt Leda-1 eine hohe Homologie zum „Adherens junctions associated protein 1“ (Ajap-1) (Geraud et al. 2010), einem mutmaßlichen Strukturprotein, das in polarisierten Epithelzellen mit „Adherens Junctions“ assoziiert ist (Bharti et al. 2004).

Leda-1 durchläuft im Rahmen der posttranslationalen Prozessierung mehrere proteolytische Spaltungen. Vor der Integration in die Plasmamembran wird es von „Furin-like Proprotein-Konvertasen“ gespalten (Evdokimov et al. 2013) und später beim „Ectodomain-Shedding“ mittels Matrix-Metalloproteasen und „a disintegrin and metalloproteinase“ (ADAM) weiter prozessiert (Biswas et al. 2016). Aufgrund der komplexen Prozessierung ist es möglich, dass Leda-1 zahlreiche unterschiedliche Funktionen besitzt. Möglicherweise werden durch die Prozessierung abgespaltene Fragmente als Signalmoleküle wirksam oder sie bilden intrazelluläre Domänen aus, die Signalkaskaden im Zytoplasma beeinflussen (Biswas et al. 2016).

Ähnlich wie sein Strukturhomologon Ajap-1, das einen Bestandteil von „Adherens Junctions“ in polarisierten Zellen bildet und modulierend auf die Ausprägung von E-Cadherinen wirkt (Bharti et al. 2004; Gross et al. 2009), beeinflusst Leda-1 die Prozessierung von E-Cadherinen (Evdokimov et al. 2016). Es scheint somit eine Rolle für die Integrität von Endothelzellen im nicht-neuronalen Gewebe zu spielen, indem es unter anderem den transepithelialen elektrischen Widerstand bei polarisierten Endothelzellen erhöht und Einfluss auf die Ausbildung von Zellkontakten zu haben scheint (Evdokimov et al. 2016).

Abgesehen von den Lebersinusendothelzellen der Ratte konnte Leda-1 in polarisierten Nierenepithelzellen des Hundes nachgewiesen werden (Geraud et al. 2010). Neben dem Vorkommen in Leberendothelzellen findet die Transkription bei Mensch und Maus hauptsächlich in neuronalem Gewebe statt (Kogure et al. 2011).

Wie sich herausstellte, ist Leda-1 identisch zum Protein „PILR-associating neural protein“ (Pianp/Panp), das vom gleichnamigen Gen kodiert wird (offizieller Genname: *pianp* (Clark et al. 2003)) und als neu entdeckter Ligand vom „Paired immunoglobulin-like type 2 receptor α “ (PILR α) fungiert (Kogure et al. 2011). Die Bezeichnung Leda-1 und Pianp werden synonym verwendet.

Leda-1 bindet und aktiviert PILR α , einen inhibitorischen Rezeptor, der hauptsächlich auf Makrophagen, dendritischen Zellen und Granulozyten vorkommt und durch das Binden des CD-99-Antigens die Immunantwort dieser Zellen mitreguliert. Entscheidend für die Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand ist die O-Glykosylierung von Leda-1 mit einer Sialinsäure (Kogure et al. 2011).

Bei der Exposition von Makrophagen der Maus mit Lipopolysacchariden (LPS) konnte ein Mechanismus zur Gegenregulation von Leda-1 und PILR α beobachtet werden. So stimuliert LPS die Genexpression von PILR α , während Leda-1 vermehrt durch LPS-vermittelte proteolytische Spaltung mittels Matrix-Metalloproteasen abgebaut wird (Biswas et al. 2015). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen deuten darauf hin, dass Leda-1 neben zellstrukturellen Funktionen eine Bedeutung für die Feinregulation der angeborenen Immunantwort besitzt.

Neben der neuronalen Expression wird Leda-1 von der Mäuse-Melanom-Zelllinie B16 exprimiert (Kogure et al. 2011). Dies spricht für den Einfluss von Leda-1 auf die Genese oder die Immunantwort von Tumoren (Evdokimov et al. 2013). Unterstützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass die Genexpression von Leda-1 im Hypothalamus von Mäusen mit hepatozellulärem Karzinom hochreguliert ist (Yan et al. 2010).

Abgesehen von PILR α als Interaktionspartner wurde entdeckt, dass Leda-1, Ajap-1 und das „ β -amyloid precursor protein“ (APP) Komplexe mit der N-terminalen „sushi domain“ von präsynaptischen GABA_B-Rezeptoren (GBR) bilden (Schwenk et al. 2015; Dinamarca et al. 2019). GABA-Rezeptoren werden durch Gamma-Aminobuttersäure (GABA) aktiviert und sie inhibieren mittels verschiedener Mechanismen die Signalweiterleitung. Durch ihr weitverbreitetes Vorkommen spielen sie eine entscheidende Rolle in der Modulation der neuronalen Aktivität im gesamten ZNS (Bettler et al. 2004). Die Beeinträchtigung des GABA-Systems ist mit einer Reihe von psychischen Erkrankungen wie Schizophrenie, bipolarer Störung oder Depression assoziiert (Benes 2001). Vor Kurzem konnte gezeigt werden, dass der Verlust von Leda-1 die präsynaptische GBR-vermittelte

Glutamatfreisetzung in Neuronen beeinträchtigt (Winkler et al. 2019) und folglich eine modulierende Wirkung auf die Signalweiterleitung zu haben scheint.

Klinisch liegt eine Fallbeschreibung eines ein Jahr und acht Monate alten Jungen vor, der eine homozygote Defizienz für *pianp* aufweist. Neben einer bilateralen Hodendystopie und einem niedrigen Testosteronspiegel lag eine allgemeine Entwicklungsverzögerung vor. Sprache und Motorik waren nicht altersentsprechend. An Dysmorphien wurden mandelförmige Augen, sich verjüngende Finger und eine leicht prominente Stirn beschrieben. Daneben lag eine zentrale Hypotonie vor (Anazi et al. 2017).

In Verhaltenstests zeigten Knock-out-Mäuse (KO-Mäuse) – Tiere, deren Gen für die Transkription von *Leda-1* abgeschaltet wurde – ein gesteigertes Angstverhalten, eine gesteigerte Reaktion auf Stress und ein gestörtes Sozialverhalten. Zudem wurde bei den KO-Tieren ein erniedrigtes Level an Dopamin in der Amygdala gemessen, was im Zusammenhang mit dem gestörten Angstverhalten stehen könnte (Winkler et al. 2019).

2.1.2 Hippocampus

2.1.2.1 Hippocampusformation

Der Hippocampus ist bei Säugetieren ein wichtiger Bestandteil des ZNS und bildet einen Teil des limbischen Systems, einer funktionellen Einheit verschiedener Hirnareale, die unter anderem für die Regulation von Triebverhalten, die Verarbeitung von Emotionen und die Steuerung von Affektverhalten zuständig ist (Kipp und Radlanski 2017, S. 299–300). Sein Aussehen ähnelt dem eines Seepferdchens, das als Namensgeber fungierte. Beim Menschen liegt der Hippocampus beiderseits im medialen Temporallappen. Bei Nagern befindet er sich medial unterhalb der Großhirnrinde (Andersen 2007, S. 39–42).

2.1.2.2 Bestandteile

Wird vom Hippocampus gesprochen, ist meist die Hippocampusformation gemeint. Nach Andersen beschränkt sich der Name Hippocampus auf die Felder des Cornu Ammonis (CA), die einen Teil der Hippocampusformation bilden, eines funktionellen Systems des Gehirns (Andersen 2007, S. 42). Weitere Bestandteile der Hippocampusformation sind der Gyrus dentatus (DG) und das Subiculum, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Feldern des Cornu Ammonis (CA3, CA2, CA1) befinden. Allen diesen Strukturen ist ein dreischichtiger zytoarchitektonischer Aufbau gemein. Des Weiteren werden der Hippocampusformation je nach Autor der entorhinale Cortex (EC), der perirhinale und der postrhinale Cortex sowie das Presubiculum und das Parasubiculum zugeschrieben (Andersen 2007, S. 37) oder als Parahippocampusformation zusammengefasst (Watson et al. 2012, S. 113). Trotz verschiedener Beschreibungen der Felder des Hippocampus hat sich die Einteilung nach Lorente de Nó etabliert (Lorente de Nó 1934). Demnach wird der Hippocampus in die Felder CA3, CA2 und CA1 unterteilt, die sich sowohl durch intrinsische und extrinsische Verbindungen und die Morphologie der vorhandenen Zellen als auch die Genexpression klar voneinander unterscheiden lassen (Lein et al. 2005; Watson et al. 2012, S. 119–120). In älterer Literatur wurde zusätzlich ein CA4-Feld unterschieden, das heute jedoch zu tiefen Bereichen der polymorphen Schicht des Gyrus dentatus gezählt wird (Amaral 1978).

2.1.2.3 Faserverbindungen

Eine besondere Bedeutung für die Verbindungen der Hippocampusformation hat der entorhinale Cortex. In diese Region münden zahlreiche neuronale Afferenzen aus verschiedenen neokortikalen Arealen. Da im EC Informationen gefiltert und an den Hippocampus weitergeleitet werden, wird er auch als *Tor zum Hippocampus* bezeichnet (Bähr und Frotscher 2014, S. 343; Suh et al. 2011).

Kommissurale Fasertrakte, welche die Hippocampi der beiden Gehirnhälften miteinander verbinden, gehen hauptsächlich von Pyramidenzellen der CA3-Region und Mooszellen des Gyrus dentatus aus. Sie projizieren jeweils in die Pyramiden- und Körnerzellen des kontralateralen Hippocampus (Abbildung 1: 8, 10, 15, 16) (Watson et al. 2012, S. 125–128). Weitere Projektionen stammen aus dem medialen Septumkern und dem diagonalen Band von Broca über cholinerge und GABAerge Neuronen (Amaral und Witter 1989; Bähr und Frotscher 2014, S. 343).

Die Erregungsfortleitung zum und im Hippocampus wird durch eine heterogene Gruppe von inhibitorischen GABAergen Interneuronen reguliert. Die Interneuronen wirken modulierend auf den Zellkörper (z. B. Korbzellen, Abbildung 1: 3), die Axone oder Dendriten der Neurone und spielen auf diese Weise eine wichtige Rolle in der Regulation neuronaler Aktivität, der Modulation hippocampaler Kreisläufe (Zeldenrust und Wadman 2009) und der Harmonisierung der Hippocampusformation als funktionelles System (Chamberland und Topolnik 2012).

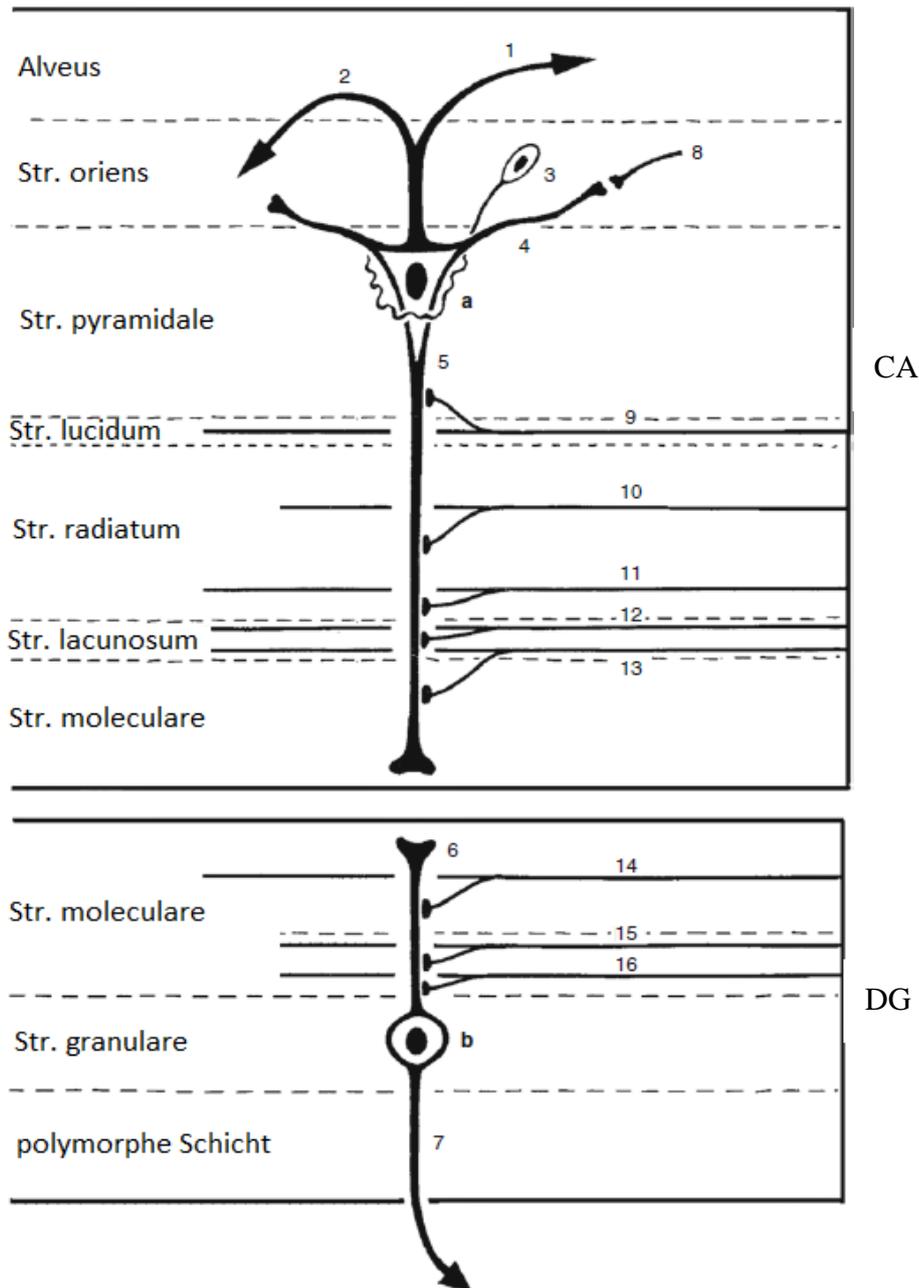


Abbildung 1 Schematischer Schichtaufbau

(a) Pyramidenzellen im Cornu ammonis (CA) und (b) Granularzellen im Gyrus dentatus (DG), (1) Axone der Pyramidenzellen, (2) Schaffer-Kollaterale, (3) Korbzelle, (4) basale Dendriten, (5) apikaler Dendrit der Pyramidenzelle, (6) apikaler Dendrit der Körnerzellen, (7) Moosfasern der Körnerzellen, (8) Verbindungen benachbarter Pyramidenzellen sowie Septum- und Kommissurenfasern, (9) Moosfasern des Stratum lucidum nach CA3, (10) Septum- und Kommissurenfasern, (11)(12) Schaffer-Kollaterale, (13)(14) Tractus Perforans, (15)(16) Septum- und Kommissurenfasern

Modifiziert nach (Duvernoy et al. 2013, S. 24)

2.1.2.4 Erregungsausbreitung

Eine Besonderheit der Hippocampusformation ist, dass ihre Bestandteile über starke, weitestgehend unidirektionale Signalwege verbunden sind. Wie in Abbildung 2 dargestellt projizieren Neuronen des EC über den Tractus perforans sowohl in den Gyrus dentatus und in die CA-Felder als auch in das Subiculum. Die Körnerzellen des Gyrus dentatus projizieren überwiegend unidirektional über die Moosfasern in die CA3-Region. Von den Pyramidenzellen der CA3-Region führen die sogenannten Schaffer-Kollaterale ebenfalls unidirektional in die CA1-Region. Die Pyramidenzellen in CA1 projizieren zum einen zurück in den EC, zum anderen in das Subiculum, das ebenfalls den EC ansteuert (Andersen 2007, S. 39–40; Watson et al. 2012, S. 126–132; Kipp und Radlanski 2017, S. 292–298).

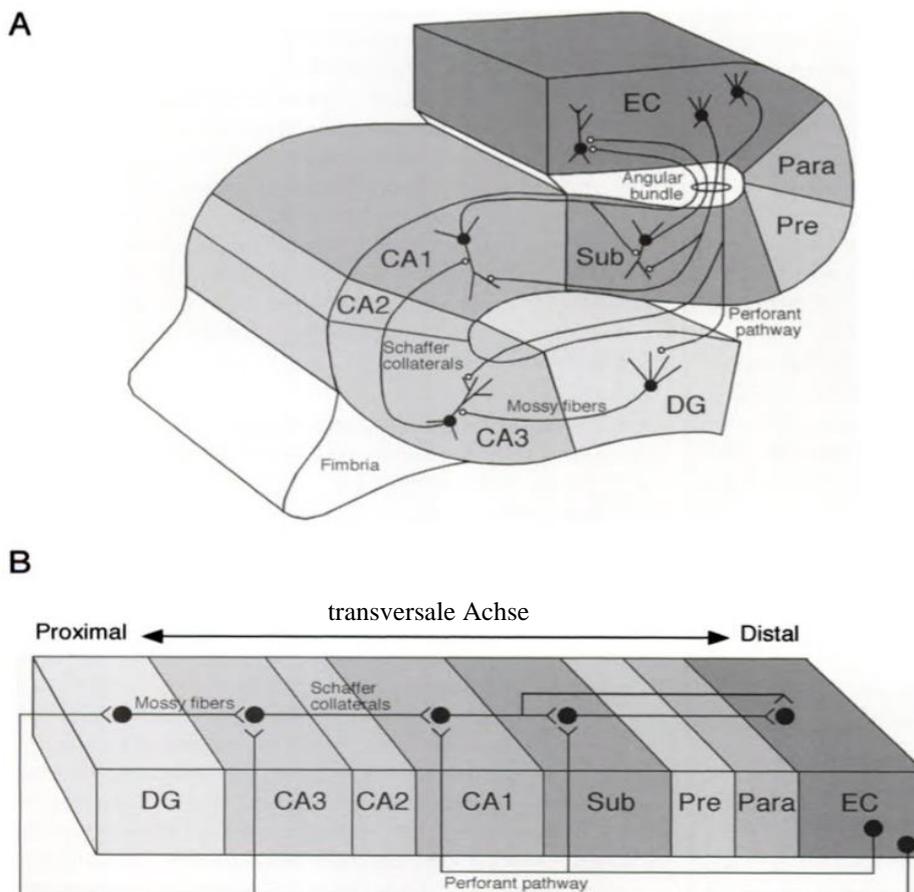


Abbildung 2 **Intrahippocampale Verbindungen**

A: Darstellung der intrahippocampalen Verbindungen. Schaltungspunkt ist der entorhinale Cortex (EC). Von hier aus gehen Verbindungen über den Tractus perforans (engl.: perforant pathway) zum Gyrus dentatus (DG), den Feldern des Cornu Ammonis (CA) und zum Subiculum (Sub). Moosfasern (engl.: mossy fibers) und die Schaffer-Kollaterale (engl.: Schaffer collaterals) vollenden den Kreislauf

B: Schematische Darstellung der genannten Verbindungen entlang der transversalen Achse

Modifiziert nach (Andersen 2007, S. 38)

Eine Komponente der intrahippocampalen Projektionen ist der sogenannte trisynaptische Kreislauf (Andersen et al. 1971). Die drei Synapsen bestehen aus:

EC → DG (Synapse 1), DG → CA3 (Synapse 2), CA3 → CA1 (Synapse 3)

Modifiziert nach (Andersen 2007, S. 42)

Da Neuronen des CA1-Feldes wiederum in den EC projizieren, erlaubt der trisynaptische Kreislauf als vereinfachter Schaltkreis die Vorstellung einer intrinsischen Signalschleife. Im Allgemeinen wird angenommen, dass diese intrahippocampalen Verbindungen für die Formierung von deklarativem Gedächtnis wichtig sind (Whitlock et al. 2006; van Strien et al. 2009).

2.1.2.5 Schichtaufbau

Der trilaminäre Aufbau des Hippocampus ist in allen Feldern weitestgehend gleich (Abbildung 3). Im Cornu Ammonis der Maus liegt nach außen das zellfreie Stratum oriens. Daran schließt sich das Stratum pyramidale an, das aus dicht beieinanderliegenden Pyramidenzellen besteht (Abbildung 1: a). Die dritte Schicht wird aus Stratum radiatum und Stratum lacunosum-moleculare gebildet. Das Stratum radiatum enthält Dendriten der Pyramidenzellen des Stratum pyramidale sowie Faserverbindungen wie die Schaffer-kollateralen. Im CA3-Feld liegt zwischen Stratum pyramidale und Stratum radiatum zusätzlich das Stratum lucidum. Hier befinden sich die Moosfasern des Gyrus dentatus (Abbildung 1: 9). Am weitesten innen liegt das Stratum lacunosum-moleculare, das unter anderem die Fasern des Tractus perforans enthält. Mit dieser Schicht grenzt das Cornu Ammonis unmittelbar an den Gyrus dentatus. Das Stratum moleculare bildet die äußerste Schicht des Gyrus dentatus. Hier liegen hauptsächlich die Dendriten der Körnerzellen, deren dicht gepackte Zellsomata das darunter liegende Stratum granulare bilden. Bei der dritten Schicht des Gyrus dentatus handelt es sich um die polymorphe Schicht, die Interneuronen und Mooszellen enthält (Watson et al. 2012, S. 116–121).

Nach außen wird der Hippocampus der Maus vom Alveus und den Fasern des Corpus Callosum bedeckt. Das Corpus Callosum geht nach lateral in die externe Kapsel über, der Alveus in die Fimbria hippocampi, die sich nach dorsal mit dem Fornix verbinden. Oberhalb des Alveus befindet sich bei der Maus der Neocortex (Andersen 2007, S. 47–48).

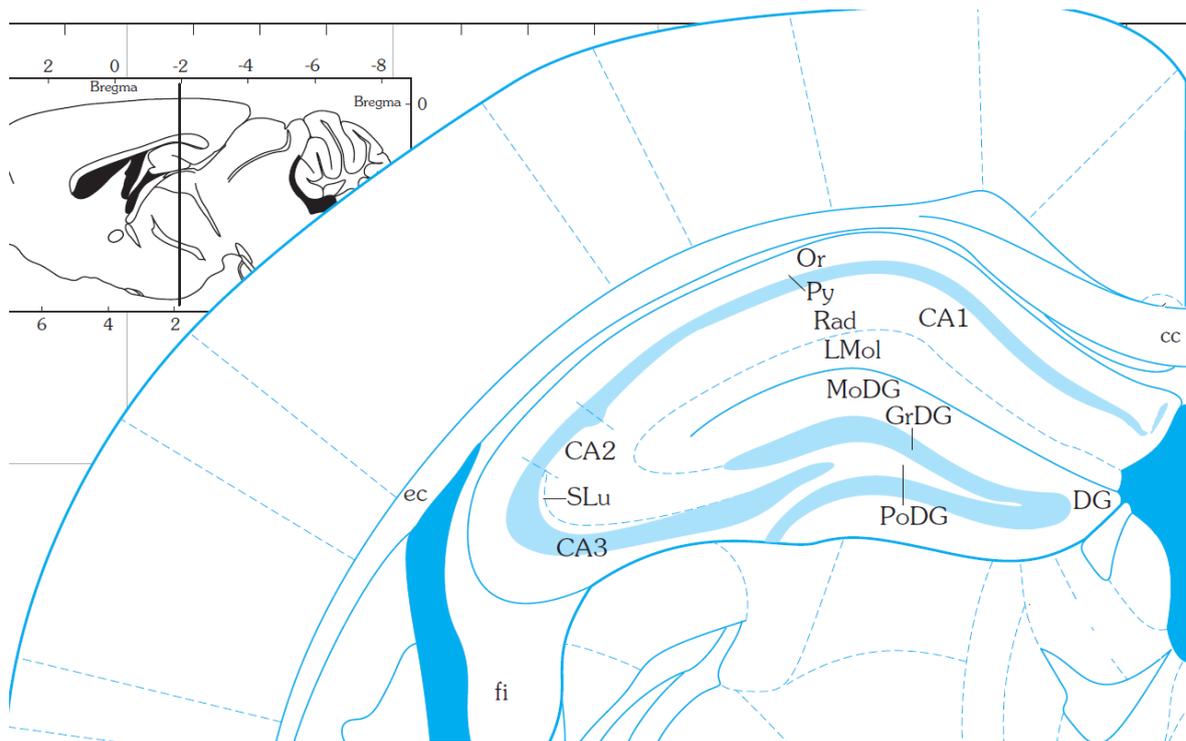


Abbildung 3 Frontalschnitt Mäusegehirn Bregma -1,94 mm

CA-Felder bestehend aus: Stratum oriens (Or), Stratum pyramidale (Py), Stratum radiatum (Rad), Stratum lacunosum-moleculare (LMol) und Stratum lucidum (SLu) sowie die Schichten des Gyrus dentatus (DG): Stratum moleculare (MoDG), Stratum granulare (GrDG), polymorphe Schicht (PoDG), Fasertrakte: Corpus Callosum (cc), externe Kapsel (ec), Fimbria Hippocampi (fi)

Modifiziert nach (Paxinos und Franklin 2013, S. 47)

2.1.2.6 Funktionen

Dem Hippocampus werden verschiedene Funktionen zugeschrieben. Einigkeit herrscht darüber, dass die Hippocampusformation an der Entstehung von episodischem Gedächtnis beteiligt ist. Den entscheidenden Hinweis hierfür lieferte der Patient H. M., dessen Hippocampusformation aufgrund von wiederauftretenden epileptischen Anfällen bilateral reseziert wurde. Infolgedessen verlor er die Fähigkeit, neue Erinnerungen zu bilden, und er hatte nur begrenzt Zugriff auf bereits vor der Operation bestehende Erinnerungen (Scoville und Milner 1957). Daraus wurde geschlossen, dass der Hippocampus eine entscheidende Rolle hinsichtlich der Entstehung des Gedächtnisses spielt (Squire 2009). Eine weitere Funktion ist die Gedächtniskonsolidierung, also der Erwerb und die Instandhaltung des Langzeitgedächtnisses (Nestor et al. 2002), wodurch Informationen vom Kurz- ins Langzeitgedächtnis übertragen werden (Squire 1986).

Bedeutung hat die Hippocampusformation zudem bei den neuronalen Vorgängen des Lernens (Blakemore und Frith 2005, S. 123–127; Wenger und Lövdén 2016). Des Weiteren beeinflusst der Hippocampus als Teil des limbischen Systems über den Hypothalamus vegetative Funktionen (Cui et al. 2013; Kipp und Radlanski 2017, S. 299–301).

Auch im Zusammenhang mit dem räumlichen Gedächtnis, der räumlichen Vorstellung und der Navigation spielt der Hippocampus eine wichtige Rolle. Entscheidend für dieses Wissen war die Entdeckung der „place cells“ (O'Keefe und Dostrovsky 1971). Die Aktivität dieser Pyramidenzellen kodiert die Lokalisation des jeweiligen Versuchstiers im Raum. Später ordnete O'Keefe denjenigen Bereichen, in denen die „place cells“ feuern, ihre entsprechenden „place fields“ zu (O'Keefe 1976). Dies begründete die Theorie einer neuronalen Karte der räumlichen Umgebung im Hippocampus (Jeffery et al. 2004; Lever et al. 2002).

Eine der vermutlich wichtigsten Entdeckungen und eine Besonderheit hinsichtlich der Hippocampusformation ist das Vorkommen von adulter Neurogenese im Gyrus dentatus. In den 1960er Jahren entdeckt (Altman und Das 1965, 1967), konnten die proliferierenden Zellen in den 1990er Jahren mittels Bromdesoxyuridin nachgewiesen und weiter untersucht werden (Kuhn et al. 1996; Kempermann et al. 1997). Andere Marker für die adulte Neurogenese sind die Antikörper gegen das saure Gliafaserprotein (GFAP), Doublecortin (DCX) oder Phospho-Histon H3, die genutzt werden können, um bestimmte Zelltypen oder einzelne zeitliche Abschnitte der adulten Neurogenese zu markieren (von Bohlen und Halbach 2007).

Aktuell ist das lebenslange Vorkommen von adulter Neurogenese im Menschen Gegenstand intensiver Diskussion. Über einen langen Zeitraum wurde die Ansicht vertreten, dass adulte Neurogenese im Gyrus dentatus von Säugetieren ein Leben lang vorkommt (Altman und Das 1967; Kornack und Rakic 1999; van Praag et al. 2002; Seri et al. 2001) und dies neben Nagern auch bei Menschen der Fall sei (Eriksson et al. 1998; Knoth et al. 2010). Erst vor Kurzem wurden in Gehirnen von kürzlich verstorbenen gesunden Menschen Hinweise für anhaltende adulte Neurogenese gefunden (Boldrini et al. 2018).

Fast zur selben Zeit erschien eine weitere Studie an menschlichen Gehirnen, die gegenteilige Ergebnisse lieferte. Demnach nimmt die Zahl neuer Neuronen ab dem Zeitpunkt der Geburt stark ab, bei einem 13-Jährigen ließen sie sich noch vereinzelt nachweisen und fehlten bei den Gehirnen der erwachsenen Probanden völlig (Sorrells et al. 2018). Diese Resultate

werden durch die Beobachtung gestützt, dass beim Menschen nach einer hohen neuronalen Proliferationsrate im Kindesalter ab dem vierten Lebensjahr nur noch Proliferation von nicht neuronalen Zellen (Microglia) nachgewiesen werden konnte, was das Vorkommen von adulter Neurogenese infrage stellt (Dennis et al. 2016).

Die Ergebnisse von Sorrells et al. wurden kontrovers diskutiert und auf einen möglichen methodischen Fehler hinsichtlich des verwendeten Antikörpers zurückgeführt (Kempermann et al. 2018). Die widersprüchliche Studienlage (Andreae 2018; Petrik und Encinas 2019) zeigt, dass trotz des massiven Forschungsaufwandes zahlreiche Aspekte der adulten Neurogenese nach wie vor ungewiss sind und nicht ohne Weiteres vom Mausmodell auf den Menschen übertragen werden können (Jessberger und Gage 2014). Daneben nimmt das Wissen über den Hippocampus stetig zu und die Fortschritte und diesbezüglichen Entdeckungen der letzten Jahren legen nahe, dass sich das grundlegende Verständnis von adulter Neurogenese, der Entwicklung von Stammzellen und dem Hippocampus als dynamische funktionelle Formation weiterhin stark erweitern wird (Ming und Song 2011).

2.1.3 Astrozyten

Astrozyten bilden einen Hauptbestandteil der Gliazellen des ZNS. Neben ihrer strukturgebenden Stützfunktion haben sie eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung des neuronalen Milieus. Sie sorgen für die Ernährung des neuronalen Gewebes und die Flüssigkeitsregulation, wobei sie den pH-Wert des Gewebes mitregulieren. Sie sind ein wesentlicher Bestandteil des glymphatischen Systems zur Beseitigung von Abfallprodukten und bilden mit ihren Ausläufern einen Teil der Blut-Hirn-Schranke (Oberheim et al. 2012; Kettenmann und Verkhratsky 2008; Trepel 2015, S. 7–8).

Infolge der hohen Diversität ihrer Funktionen sowie der sich stetig verbessernden Untersuchungsmethodik haben sich verschiedene Einteilungen der Astrozyten ergeben. Morphologisch wurden bereits Anfang des letzten Jahrhunderts die protoplasmatischen von den fibrillären Astrozyten unterschieden (Ramón y Cajal 1909, 1995). Die protoplasmatischen Astrozyten (auch Kurzstrahler genannt) kommen hauptsächlich in der grauen Substanz des Gehirns vor und entstammen der subventrikulären Zone (Levison und Goldman 1993). Sie sind stark verzweigt und ihre Ausläufer bilden Synapsen aus. Fibrilläre Astrozyten (oder auch Langstrahler) finden sich in der weißen Substanz und besitzen zahlreiche unverzweigte Fortsätze, die an Ranvier-Schnürringen enden (Sofroniew und Vinters 2010; Kipp und Radlanski 2017, S. 13–17). Andere Einteilungen unterscheiden die Astrozyten nach Antigen-Phänotyp (Raff et al. 1983) oder Expressionsmustern von Glutamatrezeptoren (Oberheim et al. 2012).

Aufgrund ihrer komplexen Interaktionsmuster im ZNS (Abbildung 4) rücken Astrozyten verstärkt in den Fokus der Forschung. Als eine Folge davon wurden in den letzten Jahren zahlreiche weitere Funktionen entdeckt, die auf die Komplexität dieses Zelltyps hinweisen. So zeigte sich, dass Astrozyten auf Neurotransmitter reagieren (Porter und McCarthy 1995) und sie modulierend auf Neuronen zurückwirken können (Parri et al. 2001). Damit kann eine nichtsynaptische Kommunikation zwischen Neuronen und Astrozyten stattfinden (Navarrete und Araque 2008). Neben der Signalübertragung zu anderen Astrozyten über Nexus (Nagy und Rash 2000) stehen sie mit weiteren Gliazellen wie Microglia oder Oligodendrozyten in vielfältigem Kontakt (Domingues et al. 2016; Reemst et al. 2016). Insbesondere bei Microglia, als wichtiger Vertreter des Immunsystems im ZNS, scheint die Interaktion mit Astrozyten modulierend auf die Immunantwort zu wirken (Barbierato et al. 2013; Brambilla et al. 2014). Ebenso konnte eine sensible Reaktion auf pathologische Veränderung beobachtet werden, z. B. verkürzte Zellfortsätze bei neuroAIDS (Lee et al. 2014) oder das

Anschwellen der Zellen bei traumatischen Gehirnverletzungen (Jayakumar et al. 2014). Nach traumatischen Schäden des ZNS kommt es zur Proliferation der Astrozyten und der Bildung von Narbengewebe, die eine Neubildung von neuronalen Axonen verhindern (z. B. bei Querschnittslähmung). Da Astrozyten eine wichtige Rolle in all diesen pathologischen Veränderungen spielen, besteht ein großes Interesse daran, diese lange vernachlässigte Zellpopulation weiter zu untersuchen, um sie später auf klinische Relevanz hin zu prüfen (Jacobson und Marcus 2011, S. 28–31).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine große Vielfalt an Astrozyten besteht, deren Einteilung und Funktionen noch nicht restlos geklärt sind (Oberheim et al. 2012).

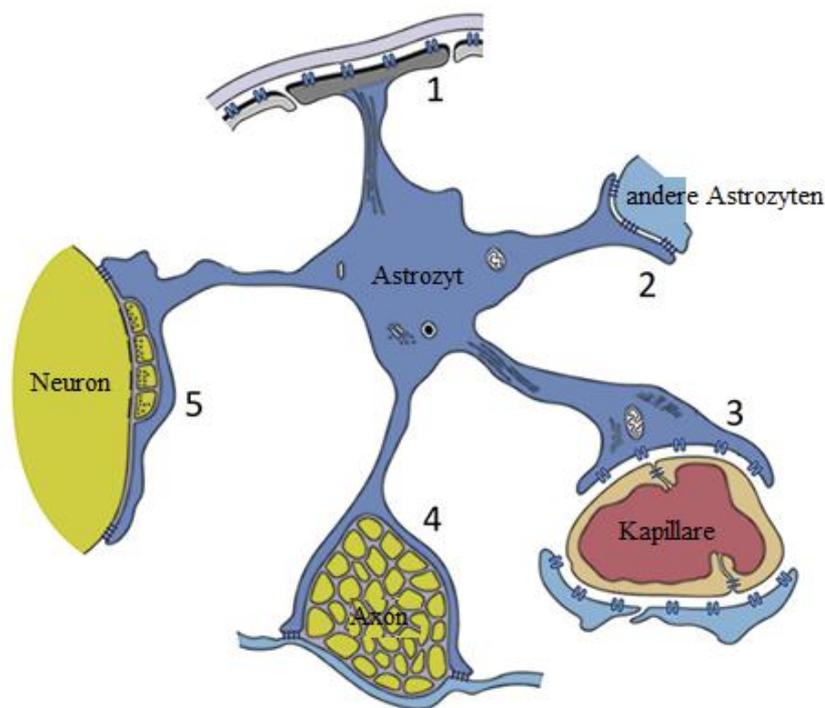


Abbildung 4 Astrozyt mit Interaktionspartnern

(1) Bildung der Membrana limitans gliae superficialis, (2) Kommunikation zu anderen Astrozyten über Nexus, (3) Bildung der Membrana limitans gliae perivascularis, (4) Kontakt zu Axonen, (5) Kontakt zu Somata und Synapsen von Neuronen

Modifiziert nach (Suzuki et al. 2017)

Im Zusammenhang mit Leda-1 bietet die Immunantwort einen möglichen Ansatz, um die beiden Forschungsthemen zu vereinen. Da sowohl Astrozyten als auch Leda-1 modulierend auf die Immunantwort wirken können (Brambilla et al. 2014; Kogure et al. 2011), stellt sich die Frage, ob die Deletion von Leda-1 eine Auswirkung auf die Astrozytenpopulationen hat.

Als Marker für Astrozyten werden GFAP-Antikörper genutzt, die sich für die routinemäßige Identifizierung als Standard etabliert haben (Eng et al. 2000). Bei GFAP handelt es sich um ein Intermediärfilament vom Typ III, das im Großteil der Astrozyten im ZNS vorhanden ist (Yang und Wang 2015). Besonders verlässlich kann der Marker im adulten Hippocampus genutzt werden (Khakh und Sofroniew 2015), da sich dort alle bisher bekannten Astrozyten mit dem Marker nachweisen lassen.

Im restlichen Gehirn ist dies nicht der Fall. So exprimieren nicht alle Astrozytenpopulationen GFAP in nachweisbaren Mengen und nicht bei allen Zellen, die GFAP exprimieren, handelt es sich um Astrozyten (Kimmelberg 2004). Im adulten Hippocampus der Maus finden sich zeitlebens GFAP-exprimierende Progenitorzellen, die als Marker für frühe Neurogenese und Gliogenese genutzt werden können (von Bohlen und Halbach 2011). Bei diesen Zellen handelt es sich um die Hauptquelle der fortlaufenden Neurogenese im adulten Mäusevorderhirn (Garcia et al. 2004). Die Progenitorzellen kommen in der subgranulären Zone des Gyrus dentatus vor (Seri et al. 2001) und weisen einen dendritenarmen, verhältnismäßig kleinen Zellkörper auf (von Bohlen und Halbach 2007). Diese Zellen wandern in die Granularzellschicht des Gyrus dentatus und proliferieren zu Körnerzellen. In späteren Entwicklungsstadien bilden sie dendritische Fortsätze in die darüber gelegene Molekularschicht des Gyrus dentatus aus (Filippov et al. 2003).

Durch ihre spezifische Lokalisation und ihre differenzierbare Morphologie können die Progenitorzellen von den ebenfalls in der subgranulären Zone vorkommenden Astrozyten unterschieden werden. Daher bietet es sich an, GFAP als Marker zu nutzen, da hiermit sowohl die Astrozyten als auch die frühen Stadien der adulten Neurogenese beurteilt werden können.

3 Forschungsfragen

Beeinflusst die Defizienz von Leda-1 das Gewicht oder Volumen des gesamten Gehirns?

Bisher wurden hauptsächlich molekularstrukturelle Untersuchungen von Leda-1 durchgeführt. Infolgedessen besteht das Risiko, dass grundlegende Strukturveränderungen des Gehirns übersehen werden. Daher ist es sinnvoll, die Gehirne vor der mikroskopischen Auswertung makroskopisch zu vermessen.

Verändert die Defizienz von Leda-1 die Schichtdicke von ausgewählten Bereichen des Cortex', des Hippocampus und von Fasertrakten?

Strukturelle Veränderungen können sowohl global als auch in einzelnen Bereichen des Gehirns auftreten. Durch die Untersuchung einzelner Schichten können subtile Größenunterschiede aufgezeigt werden. Die Lokalisation einer Veränderung kann wiederum Rückschlüsse auf die Funktion von Leda-1 liefern.

Hat die Defizienz von Leda-1 Einfluss auf Astrozytenpopulationen im Hippocampus?

Eine der wenigen Informationen, die bis jetzt über Leda-1 bekannt sind, bezieht sich auf sein Zusammenspiel mit dem Immunsystem (Kogure et al. 2011). Davon ausgehend soll die Auswirkung der Deletion auf Astrozyten überprüft werden, die ebenfalls in die Immunantwort eingreifen können (Brambilla et al. 2014), um sie als mögliche Interaktionspartner erfassen oder verwerfen zu können.

Beeinflusst die Defizienz von Leda-1 das Vorkommen von Progenitorzellen der subgranulären Zone des Gyrus dentatus?

Da Leda-1-defiziente Mäuse Auffälligkeiten in Verhaltensversuchen zeigten (Winkler et al. 2019), soll überprüft werden, ob ein Anhaltspunkt für die Vermutung vorliegt, dass Leda-1 die adulte Neurogenese im Hippocampus beeinflusst.

Welche Schlussfolgerungen lassen sich durch die Auswertung der In-situ-Hybridisierungsbilder über das Vorkommen von Leda-1 im Gehirn ziehen?

Ziel der Auswertung ist eine rein deskriptive Beschreibung des Vorkommens von Leda-1 im neuronalen Gewebe. Hierbei sollen zudem die unterschiedlichen Gensonden und Hybridisierungsverfahren berücksichtigt werden, um Rückschlüsse auf die intrazellulären Vorgänge der Prozessierung und Funktion von Leda-1 zu ziehen.

4 Methoden

4.1 Versuchstiere

Die Mäusestämme wurden von der Mannheimer Arbeitsgemeinschaft um Géraud gezüchtet. $Pianp^{tm1a(KOMP)Wtsi-C57BL/6N-A^{tm1Brd}}$ -embryonale Mäusestammzellen wurden vom KOMP repository (No. CSD70665) bestellt. Nach Rekonstitution wurden diese Mäuse mit B6N.Cg-Tg(ACTFLPe)9205Dym/CjDswJ-Mäusen (Jax No. 019100) gekreuzt, um Pianp-floxed-Mäuse zu erzeugen. Diese Mäuse wurden wiederum mit B6.C-Tg(CMV-cre)1Cgn/J-Mäusen (Jax No. 006054) gekreuzt, um Pianp-KO-Mäuse zu erzeugen. Die Präparation der Gehirne wurde ebenfalls in Mannheim durchgeführt und die Gehirne in 4 % Paraformaldehyd (PFA) versendet. Insgesamt standen für die Untersuchung die Gehirne von 17 Wildtyp- und 15 KO-Tieren zu Verfügung.

4.2 Gewichts- und Volumenmessung

Für die Gewichts- und Volumenvermessung wurden aus den vorliegenden Proben 17 Gehirne ausgewählt. Dabei wurden neun KO- und acht Wildtyp-Mäuse (WT, genetisch unveränderte Tiere) genutzt. Die Anzahl von männlichen und weiblichen Tieren war gleichmäßig verteilt (Tabelle 1). Für die einheitliche Vermessung der in 4 % PFA eingelegten Gehirne wurden ausschließlich intakte Gehirne ohne Präparationsartefakte und mit vollständig erhaltenem Bulbus olfactorius verwendet. Der über das Cerebellum herausragende Teil der Medulla oblongata wurde mit einer Rasierklinge per Hand entfernt.

	männlich	weiblich
Wildtyp	3	5
KO	5	4

Tabelle 1 Verteilung der Versuchstiere nach Geschlecht

Für die Gewichtsmessung wurde jedes Gehirn mit Filterpapier getrocknet und auf einer Waage dreimal hintereinander gemessen, um den Mittelwert zu bilden.

Um die Volumina der Gehirne von KO- und WT-Tieren zu vergleichen, wurde ein vereinfachter Versuchsaufbau nach Douglass und Wcislo genutzt, der nach dem archimedischen Prinzip funktioniert (Douglass und Wcislo 2010). Ein Zylinder mit einer angeschlossenen Spritze wird mit einer definierten Menge an 4 % PFA gefüllt und das Gehirn nach sorgfältigem Abtupfen auf dem Filterpapier in den Kolben gegeben. Die Differenz wird nun mit Hilfe der 1-mL-Spritze über einen verbundenen Schlauch abgesaugt, um wieder das Ausgangsvolumen zu erhalten (Abbildung 5). Das so erhaltene Volumen entspricht der verdrängten Flüssigkeit und kann an der Spritze abgelesen werden. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und der Mittelwert gebildet.

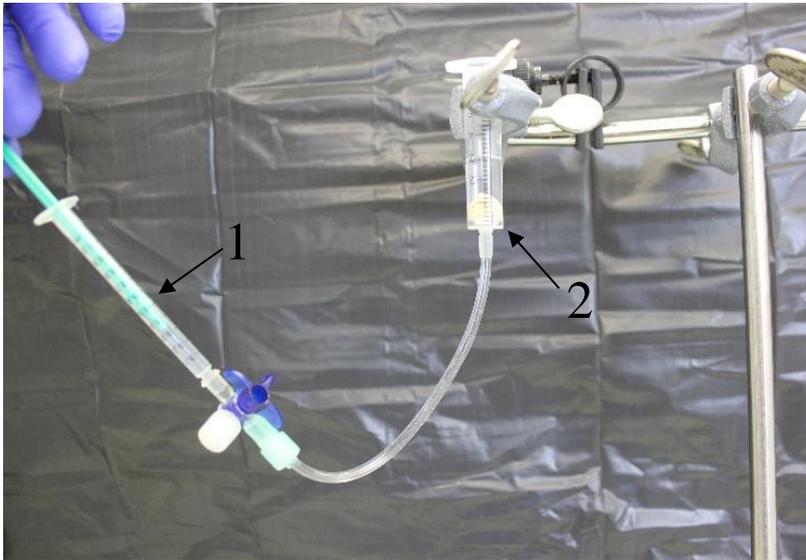


Abbildung 5 Versuchsaufbau für Volumenbestimmung

(1) Spritze, (2) Messzylinder enthält das Mäusegehirn und 4 % PFA für die Volumenbestimmung

Eigene Darstellung

4.3 Immunhistochemie

4.3.1 Hirnschnitte

Gehirne

Für die Anfertigung der immunhistochemischen Färbungen wurden jeweils drei Gehirne von KO- und Wildtyp-Tieren ausgewählt, die frei von Präparationsartefakten waren. Alle dafür verwendeten Gehirne stammten von Weibchen.

Schneiden

Für das Schneiden am Vibratom wurden den Gehirnen mit einer Rasierklinge das Cerebellum, die Medulla oblongata und die Bulbi olfactoria entfernt. Für die Stabilisierung beim Schneiden wurde das Gehirn in 4 % Agar-Lösung eingebettet. Hierfür wurde die Agar-Lösung zunächst in der Mikrowelle erhitzt. Mittels Thermometer wurde der Temperaturverlauf gemessen. Sobald sich die Temperatur beim Abkühlen auf 41 °C abgesenkt hatte, wurde das Gehirn mit der Lösung in einem Plastischälchen eingebettet und für eine Stunde im Kühlschrank belassen. Nach der Aushärtung wurde es mit der rostralen Schnittfläche mittels Cyanacrylat-Kleber auf der Trägerplatte fixiert, die in der mit phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) gefüllten Wanne befestigt wurde. Mit einer Vorschubgeschwindigkeit von 6,5 cm/min wurden 30 µm dicke Frontalschnitte hergestellt, die mit Pinsel in Mikrotiterplatten überführt wurden. Diese enthielten 20%iges Ethanol und wurden bei 4 °C gelagert.

Aufziehen

Für eine Serie wurde jeweils der dritte Hirnschnitt aus den 24 Mikrotiterplatten genutzt. Jeweils vier Hirnschnitte wurden mit einem Pinsel auf einen SuperFrost®-Objektträger aufgezogen und verweilten über Nacht bei 37 °C im Hybridisierungsöfen.

4.3.2 Doppelfärbung: GFAP/CNPase

Prinzip der Immunhistologie

Das Prinzip der immunhistologischen Färbung beruht auf der spezifischen Bindung von Antikörpern an ihren entsprechenden Antigenen. Bei der indirekten Methode bindet ein Primärantikörper die zu untersuchende Zielstruktur. Der Sekundärantikörper, der das Fc-Fragment des Primärantikörpers bindet, besitzt einen fluoreszierenden Marker, mit dem die gesuchte Struktur unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann. Bei Mehrfachfärbungen werden hierbei fluoreszierende Marker mit sich unterscheidenden Wellenlängen verwendet, um die verschiedenen Zielstrukturen sichtbar zu machen (Lang 2013, S. 270–275).

Antigendemaskierung/Heat-induced Antigen Retrieval

Der heutige Einsatz von Formaldehyd als Fixierlösung erlaubt zwar eine lange Lagerdauer von Gewebeproben, bringt aber auch Hindernisse mit sich. Formaldehyd bewirkt eine Quervernetzung der Proteine, was zu einer Maskierung vieler Epitope führt. Diese modifizierten Zielstrukturen können durch viele primäre Antikörper schlechter erkannt werden (Leong et al. 2010). Für das Rückführen der Antigene in ihre ursprüngliche Struktur bei formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe hat sich das Erhitzen in der Mikrowelle im feuchten Milieu auf ca. 100 °C bewährt (Shi et al. 1991; Shi et al. 1997). Bei diesem „Heat-induced Antigen Retrieval“ (HIER) kann als Retrieval-Lösung unter anderem Citratpuffer pH 6 eingesetzt werden (Lang 2013, S. 280–281).

Blockierung

Die Blockierung dient dazu, die Hintergrundfärbung zu minimieren, wodurch die Spezifität der Färbung erhöht wird. Hierbei ist es notwendig, vorhandene Enzymaktivität zu mindern und unspezifische Bindungsstellen für die eingesetzten Antikörper zu blockieren. HIER inhibiert unter anderem die alkalische Phosphatase. Als Blockierungslösung wird, direkt vor Zugabe des primären Antikörpers, Normalserum verwendet (Lang 2013, S. 295–297).

Antikörper

Für die immunhistochemische Färbung wurden die Antikörper gegen GFAP und 2',3'-Cyclic-nucleotide-3'-phosphodiesterase (CNPase) als Doppelfärbung sowie 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) als Kerngegenfärbung gewählt. Wie im Kapitel 2.1.3 dargelegt, lässt sich GFAP ideal im adulten Hippocampus anwenden, da sich mit ihm sowohl ausgereifte Astrozyten als auch frühe neuronale Progenitorzellen darstellen lassen. Als sekundärer Antikörper zu Anti-GFAP wird ein biotinylierter Antikörper eingesetzt. An Biotin kann wiederum mit sehr hoher Affinität Streptavidin binden, das an den Fluoreszenzmarker CyTM3 gekoppelt ist. Dieser Biotin-Avidin-Komplex sorgt für eine hohe Signalintensität und eine geringe Hintergrundfärbung (Hsu et al. 1981).

CNPase ist ein membranständiges Enzym und kommt mit hoher Expressionsrate im ZNS vor. Abgesehen von anderen noch nicht endgültig verstandenen Funktionen spielt es eine wichtige Rolle bei der Myelinisierung von Nervenfasern (Raasakka und Kursula 2014). Daher bietet es sich an, CNPase-Antikörper für die Untersuchung von Fasertrakten im ZNS zu verwenden. Als Fluoreszenzmarker wird Alexa FluorTM 488 genutzt, der an den sekundären Antikörper gekoppelt ist. Für die Kerngegenfärbung wird DAPI, ein fluoreszierender Farbstoff, der sich rasch in die Doppelhelix von DNA einlagert und auf diese Weise Zellkerne sichtbar macht, eingesetzt (Lang 2013, S. 276).

Für die Färbung wurde folgendes Doppelprotokoll verwendet. Die Auswertung fand frühestens 24 Stunden nach dem Eindecken mit Mowiol® statt.

Schritt	Dauer	Temperatur
• 30 µm dicke Schnitte mit Vibratom erstellen		
• Schnitte in 20 % Ethanol sammeln		
• Aufziehen auf SuperFrost® Objektträger		
• Antrocknen lassen, Hybridisierungssofen	über Nacht	37 °C
• Waschen mit Aqua bidest → Küvette	1x5 min.	RT
• Antigen Demaskierung → Küvette	20 min.	800 W
◦ Mikrowellenpuffer pH 6.0	(10/5/5min. nachfüllen)	
• Waschen mit Aqua bidest → Küvette	1 x 5 min.	RT
• Waschen mit PBS → Küvette	2 x 5 min.	RT
• Überführen in feuchte Kammer		
• Blockierung	2 Std.	RT
◦ 3 % Pferdeserum + 0,1 % TritonX100 in PBS		
• Waschen mit PBS	1 x 5 min.	RT
• Anti-GFAP inkubieren	2 Tage	4°C
◦ 1:100 in 3 % Pferdeserum/0,1 % TritonX100 in PBS		
• Waschen mit PBS	3 x 5 min.	RT
• biotinyliertes Pferde-anti-Ziegen IgG	2 Std.	RT
◦ 1:200 in 3 % Pferdeserum/0,1 % TritonX100		
• Waschen mit PBS	3 x 5 min.	RT
• Cy™-3-konjugiertes Streptavidin	2 Std.	RT
◦ 1:2000 in PBS		
• Waschen mit PBS	3 x 5 min.	RT
• CNPase inkubieren	über Nacht	4°C
◦ 1:300 in 3 % NGS/0,1 % TritonX-100 in PBS		
• Waschen mit PBS	3 x 5 min.	RT
• Alexa Fluor™ 488 Ziegen-anti-Hasen IgG	2 Std.	RT
◦ 1:400 in 3 % NGS/0,1 % TritonX-100 in PBS		
• Waschen mit PBS	3 x 5 min.	RT
• DAPI – Färbung	5 min.	RT
◦ 1:10000 in Aqua bidest		
• Waschen mit Aqua bidest	5 min.	RT
• Eindecken mit Mowiol®		
• Lagerung bei 4 °C im Kühlschrank		

4.4 Auswertung Schichtdicke

Die Untersuchungen fanden am Fluoreszenzmikroskop Olympus BX63 mit Hilfe des Programms cellSense® (Olympus, Japan) statt.

Durch die Kombination von CNPase mit DAPI können die einzelnen Schichten des Hippocampus gut differenziert werden. Als Ausgangspunkt der Vermessung wurde der Bereich Bregma -1,94 mm gewählt, da sich dieser Abschnitt der Längsachse des Gehirns gut an der Lage des Hippocampus abschätzen lässt. Von diesem Punkt aus wurden sechs Gehirnschnitte nach rostral vermessen. Der Untersuchungsbereich erstreckte sich demnach auf 480 µm in sagittaler Ausrichtung.

Pro Hemisphäre wurden an einem Gehirn vier Bilder mittels automatischer Doppelbelichtung von CNPase und DAPI aufgenommen. Für die Auswertung der einzelnen Schichten wurden jeweils drei durch das Programm längenkalibrierte Linien senkrecht zur Oberfläche ausgemessen.

Im ersten Bild wurden der Neocortex im Bereich des primären somatosensorischen Cortex' und das darunterliegende Corpus Callosum zusammen mit dem Alveus ausgemessen.

Im zweiten Bild wurde der Hippocampus im lateralen Bereich der CA1-Region ausgemessen, der sich direkt unterhalb des somatosensorischen Cortex' befindet. Von außen nach innen wurden jeweils das Stratum oriens, das Stratum pyramidale, das Stratum radiatum gemeinsam mit dem Stratum lacunosum-moleculare sowie das Stratum moleculare und das Stratum granulare des Gyrus dentatus vermessen (Abbildung 6).

Im dritten Bild wurde als zusätzlicher Fasertrakt die externe Kapsel der Amygdala im dorsolateralen Bereich des lateralen Amygdalakerns vermessen.

Im vierten Bild wurde erneut das Stratum granulare im Gyrus dentatus vermessen, jedoch weiter medial, da dort die Breite der Schicht konstanter ist als im lateralen Bereich.

Für jede Schicht wurden die drei Vermessungslinien gemittelt und der Mittelwerte für die jeweilige Seite wurde gebildet. Die Ergebnisse der linken und der rechten Seite wurden wiederum gemittelt, um so die Durchschnittsbreite der entsprechenden Schicht für den gesamten Bereich des jeweiligen Gehirns zu erhalten.

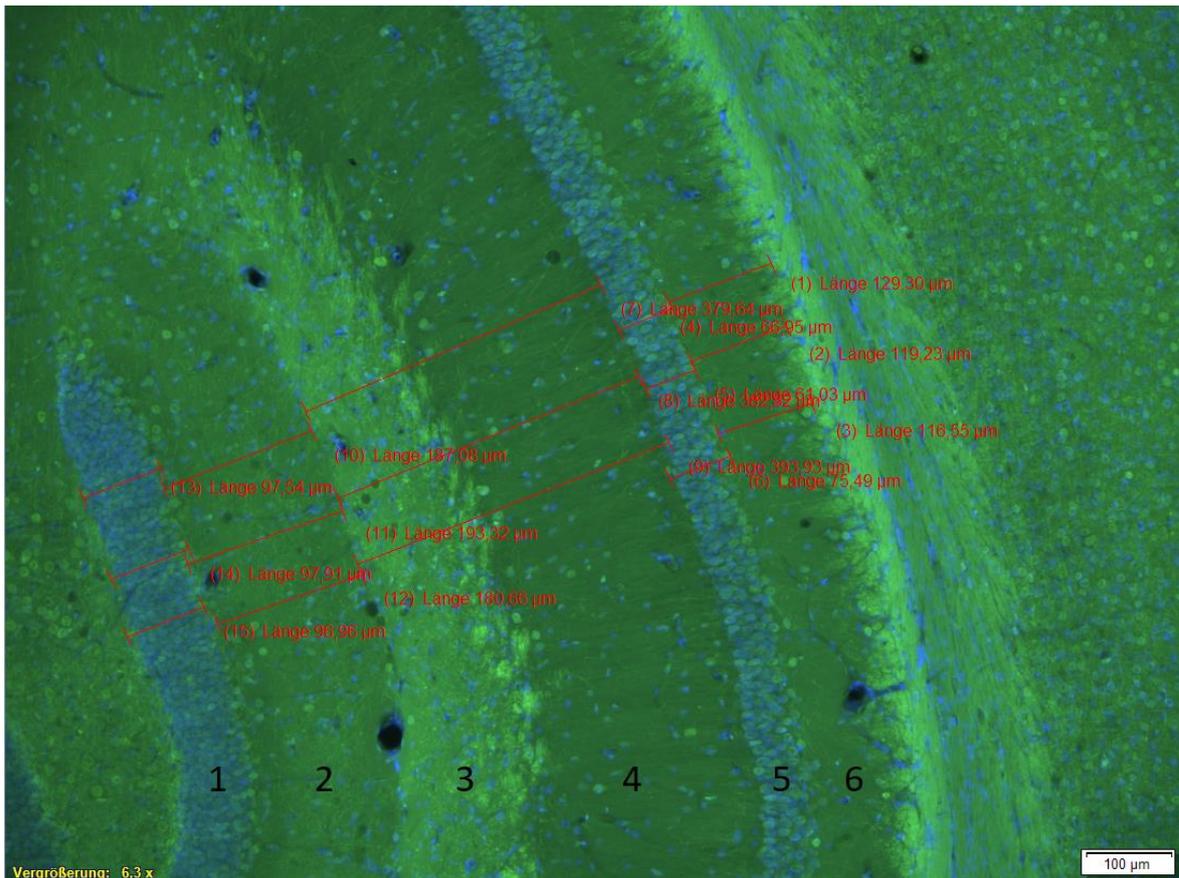


Abbildung 6 Schichtausmessung im Hippocampus und Gyrus dentatus

Jede Schicht wurden mit je drei längenkalibrierten Linien senkrecht zu Oberfläche vermessen und die Messwerte für eine Schicht gemittelt. (1) Stratum granulare DG, (2) Stratum moleculare DG, (3) Stratum radiatum zusammen mit (4) Stratum lacunosum-moleculare, (5) Stratum pyramidale, (6) Stratum oriens

Eigene Darstellung bearbeitet mit cellSense®

4.5 Auswertung Astrozyten

Um zu ermitteln, ob die Deletion von Leda-1 einen direkten oder indirekten Einfluss auf Astrozyten aufweist, wurde geprüft, ob sich die durchschnittliche Dichte von Astrozyten im adulten Hippocampus von KO-Maus zum Wildtyp unterscheidet.

Hierfür wurden dieselben Schnitte genutzt, die bereits bei der Schichtdicke ausgewertet worden waren, also sechs Schnitte von Bregma -1,94 mm nach rostral über einen Bereich von 480 µm.

Aufgrund der differenzierten räumlichen Struktur von adulten Astrozyten mit ihren verzweigten Ausläufern können bei einer zweidimensionalen Auswertung in den 30 µm dicken Schnitten nicht alle Zellen mitgezählt werden.

Um eine einheitliche Auswertung zu garantieren, wurden ausschließlich jene Astrozyten gezählt, deren Zellsomata im Schnitt lagen. Dies gelang durch die automatische Doppelbelichtung mit DAPI und GFAP. Hierbei war es möglich, Doppelbilder anzufertigen, auf denen sowohl die GFAP-exprimierende Zellen als auch deren Zellkerne zu sehen waren (Abbildung 7).

In diesen Bildern wurde anschließend im Programm cellSense® ein längenkalibriertes Quadrat von 200 x 200 µm erstellt, um einen gleichbleibenden Bereich auszuwählen, in dem die Astrozyten jeweils ausgezählt wurden (Abbildung 8).

Der anatomische Bereich der Auswertung waren das Stratum radiatum und das Stratum lacunosum-moleculare der CA1-Region des Hippocampus. Dort wurde die durchschnittliche Anzahl der Astrozyten der beiden Hemisphären pro 200 x 200 µm ermittelt und miteinander verglichen.

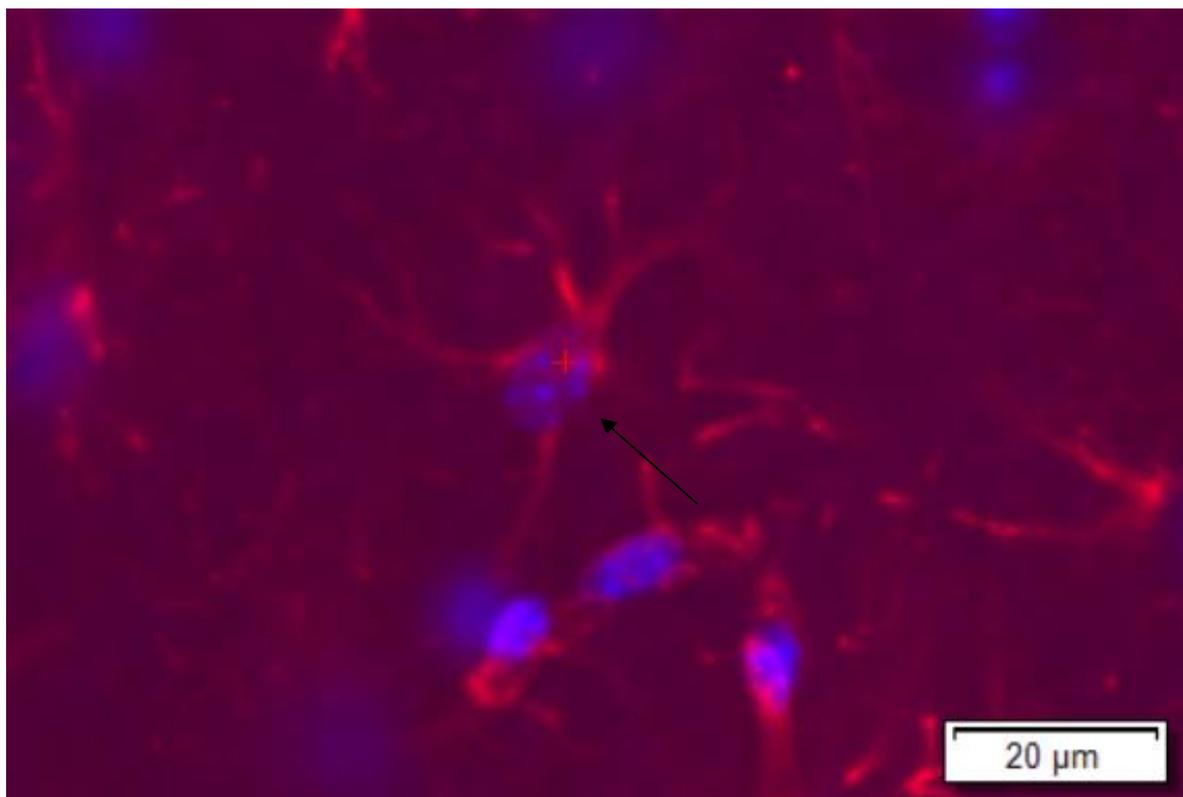


Abbildung 7 Astrozyt Doppelbelichtung GFAP/DAPI

Astrozyt liegt in Schnittebene, zu erkennen an dem rotgefärbten GFAP und dem mit DAPI markierten blauen Zellkern (rotes Kreuz).

Eigene Darstellung bearbeitet mit cellSense®

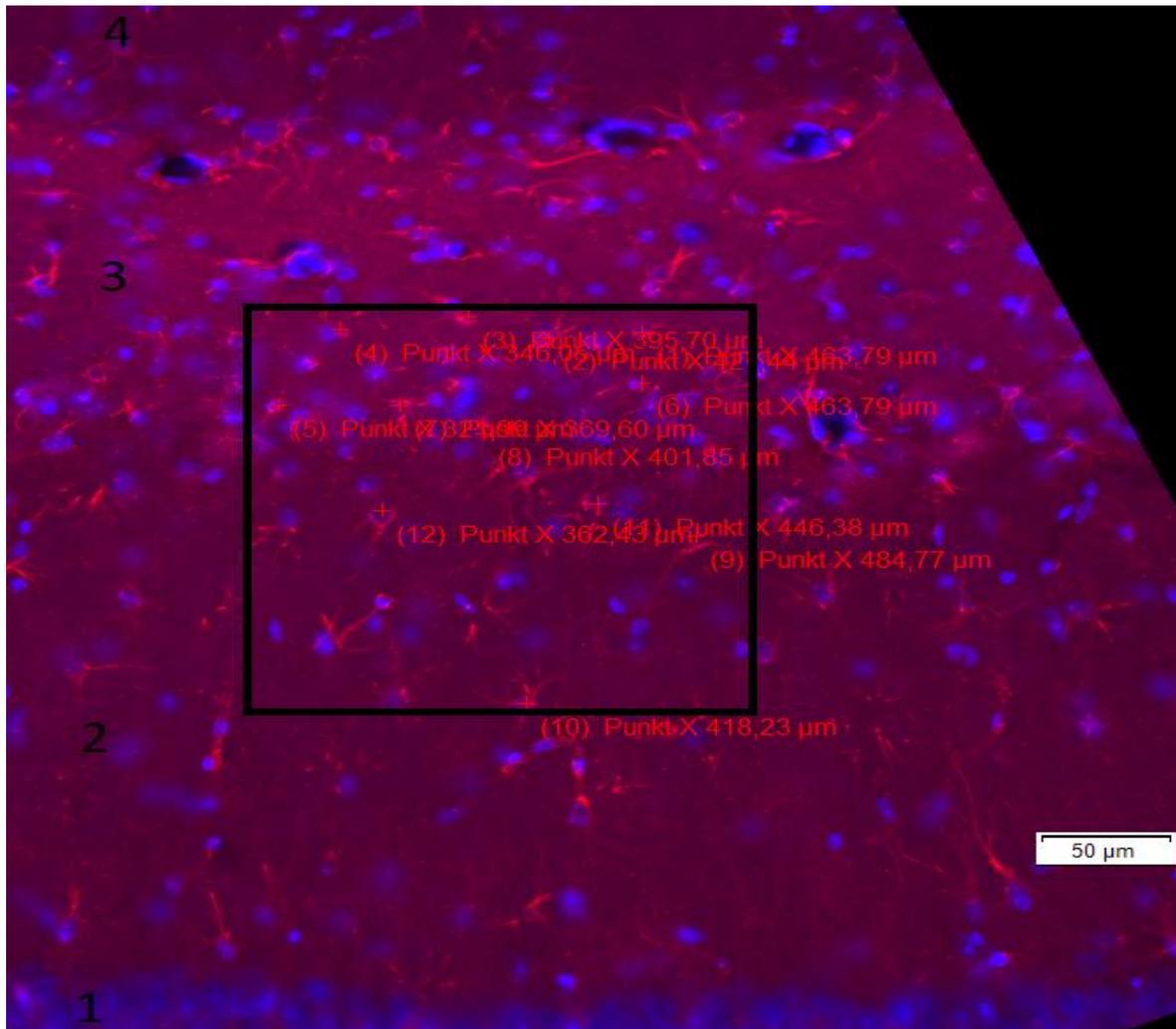


Abbildung 8 Bestimmung der Astrozytendichte, Doppelbelichtung GFAP/DAPI

(1) Stratum pyramidale, (2) Stratum radiatum zusammen mit (3) Stratum lacunosum-moleculare, (4) Stratum moleculare DG. Im 200 x 200 µm großen Fenster werden nur diejenigen Astrozyten gezählt, deren Zellkern in der Schnittebene liegt.

Eigene Darstellung bearbeitet mit cellSense®

4.6 Auswertung adulte Neurogenese

Für die Auswertung der Neurogenese wurden erneut die sechs Schnitte ab Bregma -1,94 mm untersucht. Hierfür wurde die Gesamtzahl der vorhandenen Progenitorzellen ausgewertet, die in den Schnitten vorhanden war.

Die zu untersuchenden Zellen kommen ausschließlich in der subgranulären Zone des Gyrus dentatus vor. Der Bereich liegt direkt unterhalb des Stratum granulare (Seri et al. 2001). Um die Zellen von den ebenfalls angefärbten Astrozyten differenzieren zu können, muss die

Zellmorphologie berücksichtigt werden. Die Progenitorzellen haben im Gegensatz zu den adulten Astrozyten keine stark verzweigten dendritischen Zellfortsätze sowie verhältnismäßig kleine Zellsomata (von Bohlen und Halbach 2007).

Für die Untersuchung wurde die gesamte subgranuläre Zone des Gyrus dentatus im Livebild unter dem Mikroskop abgesucht und jede Progenitorzelle gezählt. Eine Zelle wurde nur dann als Progenitorzelle erfasst, wenn sie in der entsprechenden Zone lag, die notwendige Zellmorphologie aufwies und in der Gegenfärbung mit DAPI ein Zellkern zu erkennen war. Die Zellen wurden auf beiden Seiten gezählt, im Anschluss wurde jeweils die Gesamtzahl ermittelt und verglichen.

4.7 In-situ-Hybridisierung

Die In-situ-Hybridisierung wurde von der Mannheimer Arbeitsgemeinschaft um Géraud durchgeführt und die Bilder wurden an das Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universitätsmedizin Greifswald zur Auswertung gemeinsam mit den KO- und WT-Gehirnen gesandt. Zur Hybridisierung wurde das RNAscope®/BaseScope™-System der Firma ACDBio verwendet (RNAscope® 2.5 HD Assay RED, BaseScope™ Reagent Kit-RED).

Vier WT- und vier KO-Schnitte wurden mit RNAscope® mittels der Gensonde NM_175696.4, 464-1485 hybridisiert. Weitere vier WT- und vier KO-Schnitte wurden mit BaseScope™ und der Gensonde NM_175696.4, 775-881 hybridisiert, in der auch die Gensonde NM_175696.4,787-868 enthalten ist. Zusätzlich wurden zwei WT-Schnitte mit BaseScope™ hybridisiert. Für den ersten wurde die bereits genannte Pianp-Sonde (NM_175696.4, 775-881), für den zweiten eine weitere Gensonde, NM_175696.4, 860-1100, genutzt. Als Gegenfärbung wurde Hämatoxylin verwendet.

Somit wurden drei verschiedene Pianp-Sonden eingesetzt, die in unterschiedlichen Bereichen des Gens binden (Kap. 9.2). Auf diese Weise ließen sich die beiden Hybridisierungsverfahren sowie die verschiedenen Gensonden im BaseScope™-System miteinander vergleichen.

Beim RNAscope® kann mRNA sowie lncRNA mit weniger als 300 Basenpaaren gebunden werden. Hierbei wird ein einzelnes mRNA-Molekül als singuläres Signal visualisiert (Wang

et al. 2012). BaseScope™ beruht auf der Weiterentwicklung von RNAscope®. Mit BaseScope™ lassen sich neben RNA mit 50–300 Basenpaaren Exon-Übergangsstellen, Punktmutationen und Splice-Varianten darstellen (<https://acdbio.com/rnascope%20AE-and-basescope%E2%84%A2-assays> 12.02.18), was eine differenzierte Untersuchung von kurzen RNA-Sequenzen ermöglicht (Erben et al. 2017). Laut Hersteller erlaubt BaseScope™ durch eine verbesserte Signalamplifizierung zudem eine höhere Signalqualität (<https://acdbio.com/basescope%E2%84%A2-manual-assays> 14.02.18).

Ziel der Auswertung war eine rein deskriptive Beurteilung des Vorkommens von Leda-1 im neuronalen Gewebe. Hierbei sollten zudem die unterschiedlich genutzten Gensonden und Hybridisierungsverfahren berücksichtigt werden, um Rückschlüsse auf die intrazellulären Vorgänge der Prozessierung und Funktion von Leda-1 zu ziehen. Eine statistische Auswertung der Proben war aufgrund der sich nicht überschneidenden Bereiche zwischen KO- und WT-Hirnschnitten nicht möglich.

4.8 Statistische Auswertung

Zur Auswertung und Darstellung der Ergebnisse wurden die Programme Microsoft Excel und GraphPad Prism 4 verwendet. Die statistische Analyse erfolgte mittels zweiseitigem t-Test und F-Test. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Von einem signifikanten Ergebnis wird dann gesprochen, wenn sich der Signifikanzwert p kleiner als das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ darstellt.

5 Ergebnisse

5.1 Einfluss der Deletion von Leda-1 auf Gewicht und Volumen

Anhand der makroskopischen Vermessung der Gehirne konnten keine Differenzen festgestellt werden (Abbildung 9). Weder Gewicht noch Volumen unterschieden sich bei KO- und WT-Tieren signifikant voneinander.

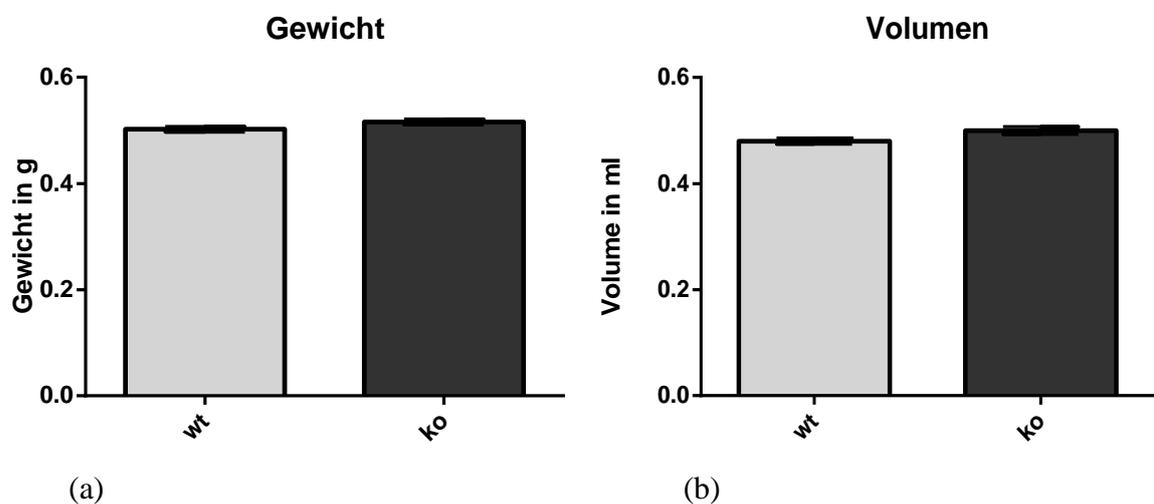


Abbildung 9 *Gewicht und Volumen*

Weder Gewicht (a) noch Volumen (b) zeigen einen signifikanten Unterschied.

Beim Gewicht ($p = 0,0908$) zeigte sich, dass kein Unterschied zwischen Wildtyp- ($0,5021 \text{ g} \pm 0,0151$) und KO-Tiere ($0,5159 \text{ g} \pm 0,01631$) bestand.

Im Gegensatz dazu überschritt der p-Wert ($0,0501$) der Volumenvermessung von Wildtyp- ($0,48 \text{ mL} \pm 0,01681$) und KO-Tieren ($0,5 \text{ mL} \pm 0,02128$) nur knapp das Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$.

5.2 Einfluss der Deletion von Leda-1 auf die Dicke ausgewählter Schichten

Weder im primären somatosensorischen Cortex ($p = 0,6492$) noch im darunterliegenden Corpus Callosum zusammen mit dem Alveus ($p = 0,9835$) konnte ein signifikanter Unterschied in der Schichtdicke festgestellt werden.

Im Hippocampus im lateralen Bereich der CA1-Region konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied im Stratum oriens ($p = 0,6814$), im Stratum pyramidale ($p = 0,5887$) und im Stratum radiatum zusammen mit dem Stratum lacunosum-moleculare ($p = 0,9420$) ermittelt werden. Die Dicke der Schichten stimmte bei KO- und Wildtyp-Tieren annähernd überein.

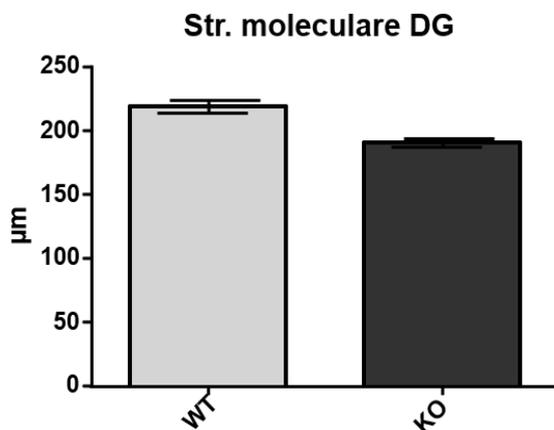
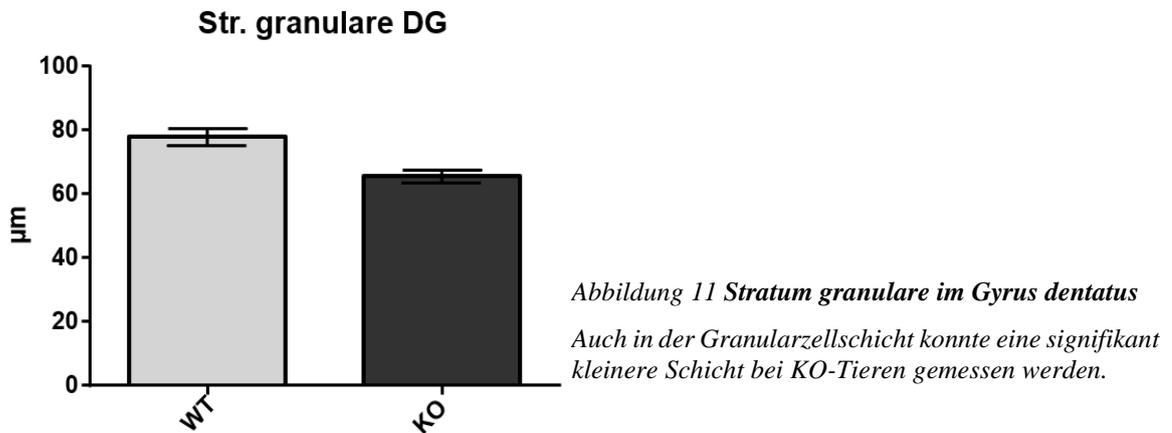


Abbildung 10 Stratum moleculare im Gyrus dentatus
Bei KO-Tieren war das Stratum moleculare signifikant kleiner ($p = 0,0079$) als bei den Wildtyp-Tieren.

Dahingegen unterschied sich die Dicke des Stratums moleculare des Gyrus dentatus der KO-Mäuse signifikant ($p = 0,0079$) von derjenigen der WT-Mäuse (Abbildung 10).

So wies das Stratum moleculare der KO-Tiere einen Mittelwert von $190,5 \mu\text{m} \pm 5,295$ auf, jenes der WT-Tiere besaß hingegen durchschnittlich eine Breite von $219,0 \mu\text{m} \pm 8,531$. Die Schicht war bei KO-Tieren also im Durchschnitt 13,01 % kleiner als beim Wildtyp.

Im medial vermessenen Stratum granulare des Gyrus dentatus konnte ebenfalls eine signifikant ($p = 0,0249$) kleinere Schicht bei den KO-Gehirnen gemessen werden.



Die Vermessungen des Stratum granulare ergaben einen Mittelwert von $65,43 \mu\text{m} \pm 3,773$ bei KO-Tieren, während die Wildtyp-Tiere eine durchschnittliche Breite von $77,84 \mu\text{m} \pm 4,847$ aufwiesen. Damit war die Schicht bei KO-Tieren im Durchschnitt 15,94 % kleiner.

In der externen Kapsel der Amygdala im dorsolateralen Bereich des lateralen Amygdalakerns konnte wiederum kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,5361$).

5.3 Einfluss der Deletion von Leda-1 auf die Astrozytendichte der CA1-Region

Durch das Auszählen der Astrozyten ergab sich bei KO-Mäusen eine signifikant ($p = 0,0432$) geringere Dichte an Astrozyten im Stratum lacunosum-moleculare sowie im Stratum radiatum der CA1-Region des Hippocampus. Durchschnittlich fanden sich bei den KO-Tieren 19,11 % weniger Astrozyten pro $40000 \mu\text{m}^2$.

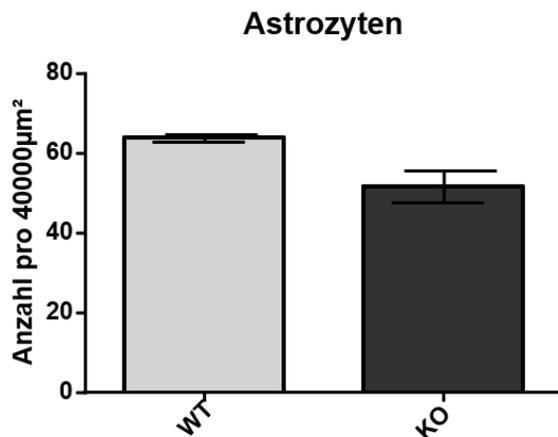


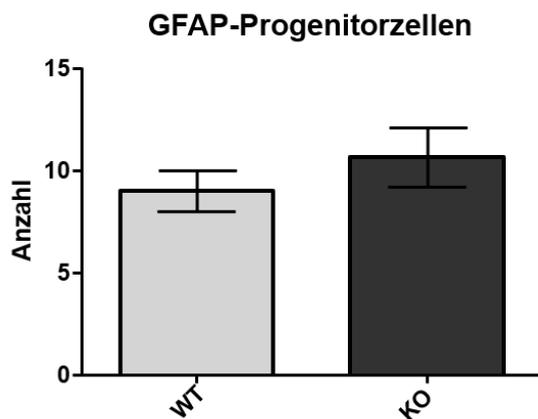
Abbildung 12 Dichte der Astrozyten

Bei der Dichtebestimmung der Astrozyten wurden bei den KO-Tieren signifikant weniger Astrozyten ($p = 0,0432$) gezählt.

Abgesehen von der geringeren Dichte ergaben die Daten zudem einen höheren Standardfehler der Mittelwerte bei den KO-Tieren. So wurden bei ihnen durchschnittlich $51,50 \pm 7$ Astrozyten pro $40000 \mu\text{m}^2$ gezählt. Bei den WT-Tieren wurden hingegen $63,67 \pm 1,756$ Astrozyten pro $40000 \mu\text{m}^2$ gemessen. So zeigten die Gehirne der KO-Tiere deutliche Schwankungen in der Anzahl der Astrozyten pro Hemisphäre (Mittelwert: 51,5, Minimum: 44, Maximum: 59), während die Wildtyp-Tiere geringere gestreute Werte lieferten (Mittelwert: 63,67, Minimum: 60, Maximum: 68). Der F-Test zum Vergleich der Varianzen zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,1184$) auf.

5.4 Einfluss der Deletion von Leda-1 auf die adulte Neurogenese

Bei der Auszählung der GFAP-exprimierenden Progenitorzellen konnte kein signifikanter Unterschied ($p = 0,3982$) ermittelt werden (Abbildung 13). Die Mittelwerte ergaben für KO-Tiere eine Anzahl von $10,67 \pm 2,517$ Progenitorzellen im untersuchten Bereich. Dies unterschied sich kaum von den Werten der WT-Tiere mit $9,000 \pm 1,732$ Progenitorzellen.



*Abbildung 13 GFAP-positive Progenitorzellen
Mit dem gewählten Marker konnte kein signifikanter
Unterschied gemessen werden.*

5.5 Ergebnis der In-situ-Hybridisierung

Die Untersuchung der In-situ-Hybridisierungsbilder ergab verschiedene Beobachtungen. Allgemein wurde ersichtlich, dass mRNA von Leda-1 in den meisten Bereichen des Mäusegehirns nachgewiesen werden konnte. In den morphologisch differenzierbaren Endothelzellen ließ sich keine mRNA nachweisen.

Sowohl RNAscope[®] als auch BaseScope[™] zeigten die gleiche Lokalisation der Signale. Im BaseScope[™]-System war die Qualität der Signale in ihrer Intensität jedoch sichtbar besser.

Zudem wurde ein Unterschied bei den verschiedenen Gensonden innerhalb des BaseScope[™]-Systems ersichtlich. So waren die Signale mit der Pianp-Sonde NM_175696.4, 775-881/NM_175696.4, 787-868 deutlicher sichtbar als mit NM_175696.4, 860-1100, wobei die Lokalisation wiederum vergleichbar war.

Hippocampus

Bei der Betrachtung des Hippocampus konnte beobachtet werden, dass Leda-1 auf den dort vorhandenen Neuronen vorkam. Die Zellen der dort verlaufenden Fasertrakte erschienen allesamt Leda-1-negativ. Da in diesen Schichten neben den Fasertrakten hauptsächlich Astrozyten und Oligodendrozyten vorkommen, erschließt sich, dass diese Zellpopulationen Leda-1-negativ sind.

Kleinhirn

Im Kleinhirn wurde Leda-1 stark von Purkinjezellen exprimiert. Vereinzelt zeigten sich auch im Stratum moleculare. Die Signale ließen sich zum Teil im Bereich der Zellwand der sich dort befindlichen Zellen lokalisieren, teilweise jedoch auch ohne direkten Bezug zu Zellsomata in der Faserschicht. Im Stratum granulosum waren ebenfalls einzelne Signale erkennbar. Im Marklager kamen nur wenige Signale vor.

Cortex

Die Neuronen des Isocortex' erschienen Leda-1-positiv. In der Lamina molecularis (I) waren deutlich weniger Signale sichtbar als in den restlichen Schichten.

6 Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass die Deletion von Leda-1 verschiedene Effekte auf die Zusammensetzung, den Aufbau und die Funktionsweise des Mäusegehirns hat. Es konnten unterschiedliche Interaktionspartner aufgezeigt werden, woraus sich verschiedene Themengebiete ergeben, die den Gegenstand zukünftiger Forschung bilden. Auf die Beantwortung der einzelnen Forschungsfragen und die Bedeutung der Ergebnisse für die weiterführenden Untersuchungen wird in den folgenden Kapiteln eingegangen.

6.1 Gewicht und Volumen

Bei der Untersuchung von Gewicht und Volumen erschienen die Untersuchungsparameter der KO-Gehirne leicht erhöht. Allerdings konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, wobei der p-Wert der Volumenuntersuchung das Signifikanzniveau nur knapp überschritt ($p = 0,0501$).

Laut den Ergebnissen liegen nach außen keine starken Veränderungen der Dimensionierung des Gehirns vor. Hierfür ist die vereinfachte Volumenbestimmung nach John K. Douglass und William T. Wcislo geeignet, da mit ihr gut grobe Abweichungen aufgezeigt werden können (Douglass und Wcislo 2010).

In der In-situ-Hybridisierung wurde deutlich, dass Leda-1 auf vielen Neuronen des gesamten Gehirns vorkommt. Zudem konnte durch die Schichtausmessung gezeigt werden, dass es bei KO-Tieren in manchen Bereichen zu deutlichen Verringerungen der Schichtdicke kommt (Kap. 5.2). Es stellt sich also die Frage, warum es bei KO-Tieren lokal zu verringerten Schichtdicken kommt, global jedoch keine Veränderung des Volumens oder des Gewichtes beobachtet werden kann.

Entweder sind die Veränderungen zu gering, als dass sie mit der verwendeten Methodik detektiert werden können, oder es kommt zu kompensatorischen Mechanismen in anderen Hirnarealen, die für ein ausgeglichenes Volumen verantwortlich sind, zum Beispiel vergrößerte Ventrikel.

Um dies zu untersuchen, wurden die Gehirne von Leda-1-defizienten Mäusen in einer weiterführenden Studie mittels MRT untersucht und die Volumina von präfrontalem Cortex, Caudoputamen und Hippocampus vermessen. Allerdings wurde lediglich im präfrontalen Cortex ein signifikant verringertes Volumen gemessen (Winkler et al. 2019). Um zu erklären, wie bei gleichbleibendem Volumen des gesamten Hippocampus eine verringerte Schichtdicke des Gyrus dentatus die Folge sein kann, sollten in weiteren Untersuchungen die Volumina der einzelnen Bestandteile dieser Formation gemessen werden, um zu ermitteln, inwieweit sich deren Verhältnis untereinander verändert.

Zudem sollten die Schichten des präfrontalen Cortex' immunhistologisch untersucht werden, um zu bestimmen, welche Schichten genau durch eine Defizienz von Leda-1 betroffen sind.

6.2 Schichtdicke

Die Untersuchungen haben ergeben, dass sowohl das Stratum granulosum als auch das Stratum moleculare des Gyrus dentatus bei den KO-Tieren eine signifikant geringere Schichtdicke aufweisen als bei den Wildtyp-Tieren.

Auffällig ist, dass sich die Deletion von Leda-1 nur auf die Schichten des Gyrus dentatus auswirkt, nicht aber auf die Schichten des Neocortex', obwohl in beiden Bereichen Leda-1 auf den Neuronen exprimiert wird (Kap. 6.5). Wie in den neuroanatomischen Grundlagen erläutert, findet im Gyrus dentatus im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Schichten fortlaufende adulte Neurogenese statt (Kap. 2.1.2.6).

Diese Ergebnisse sprechen dafür, die adulte Neurogenese in die weitere Forschung miteinzubeziehen. Zwar konnte bei der Untersuchung der Progenitorzellen in der subgranulären Zone kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Kap. 5.4), jedoch existieren noch geeignetere Untersuchungsverfahren, um die adulte Neurogenese im Hippocampus zu beurteilen (Kap. 6.4).

Damit bestimmt werden kann, wie in den künftigen Untersuchungen vorzugehen ist, müssen die Mechanismen geklärt werden, die zu einer verringerten Schichtdicke führen können (Abbildung 14). Hierbei sollen zwei Faktoren, die eine verringerte Schichtdicke verursachen können, differenziert werden.

1. Anzahl

Es können insgesamt weniger Zellen vorhanden sein, die die Schicht bilden. Dies resultiert in einer verkleinerten Schicht mit der gleichen Dichte an Zellen. Beispielhaft hierfür ist der Zelluntergang nach posttraumatischer Belastungsstörung im Hippocampus (Hayes et al. 2017; Schoenfeld et al. 2017).

2. Homöostase intrazellulär

Als weitere Ursache kann eine veränderte intrazelluläre Homöostase vorliegen. Veränderte pH- und Elektrolytwerte oder eine erniedrigte Osmolarität intrazellulär können verringerte Wassereinlagerungen in der Zelle und somit ein Anschwellen der Zellsomata nach sich ziehen. Dadurch ergibt sich die gleiche Zellzahl mit einer verminderten Größe, also einer gesteigerten Zelldichte der Schicht.

Um die Mechanismen, die zu einer verringerten Schichtdicke führen, zu bestimmen, müssten folglich die Parameter Volumen und Zelldichte der entsprechenden Schichten untersucht werden.

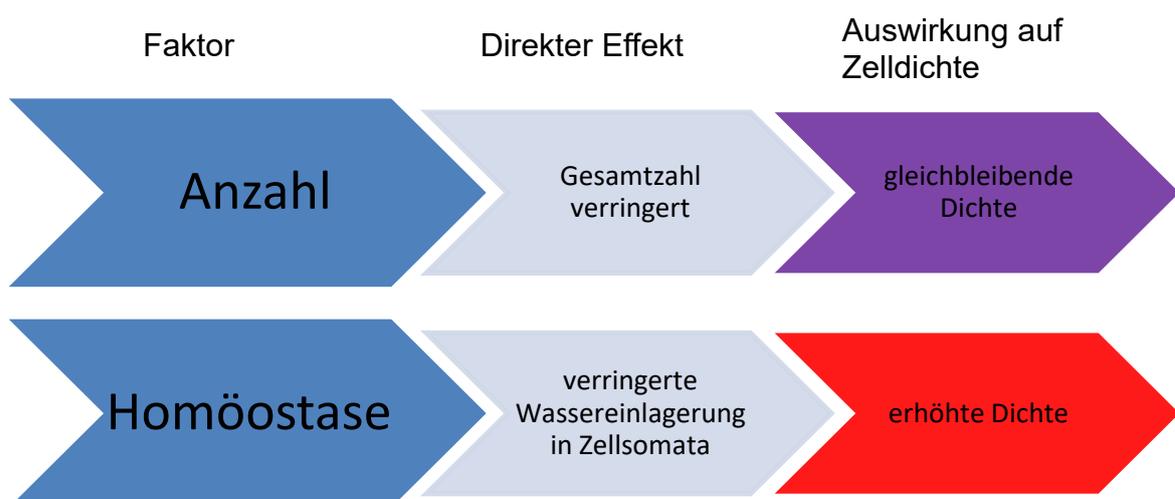


Abbildung 14 Schemata zur verringerten Schichtdicke

Eigene Darstellung

Eine dritte Möglichkeit stellt eine veränderte Homöostase des Extrazellulärraums (EZR) dar. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da sich die Schichtdicken lediglich in zwei Bereichen des Gyrus dentatus verändert haben. Alle anderen Schichten blieben trotz des gemeinsamen EZR konstant. Zudem sollte sich ein globales Abschwellen des EZR makroskopische in einem verringerten Volumen widerspiegeln. Auch hier könnte somit eine exakte volumetrische Vermessung Aufschluss geben (Kap. 6.1).

Des Weiteren kann die Ermittlung der Zelldichte Rückschlüsse über die Auswirkungen der Deletion von Leda-1 auf den Hippocampus liefern. So würde eine erhöhte Dichte in den Schichten des Gyrus dentatus für ein Abschwellen der Zellsomata oder eine andere morphologische Veränderung der Zellen sprechen. Im Gegensatz dazu könnte eine unveränderte Dichte auf eine verringerte Zellzahl in den Schichten hinweisen, wie dies bei der Störung der adulten Neurogenese der Fall ist (Kap. 6.4).

Dieser Zusammenhang zwischen adulter Neurogenese und veränderter Schichtdicke scheint sich in einer neuen Studie zu bestätigen. So wurden neugebildete Neuronen im Stratum granulare und im Stratum moleculare des Gyrus dentatus mittels Doublecortin-Antikörper untersucht. Hierbei zeigte sich bei KO-Tieren eine um 68 % erhöhte Anzahl an jungen Doublecortin-positiven Neuronen im Vergleich zu den WT-Tieren. Gleichzeitig wurde in denselben Schichten mittels des Markers Caspase-3 ein um 142 % erhöhtes Aufkommen von apoptotischen Zellen gemessen (Winkler et al. 2019). Dieses Ungleichgewicht der adulten Neurogenese zugunsten von apoptotisch untergehenden Zellen im Gyrus dentatus könnte ein Grund für die verringerte Schichtdicke sein. Der auf diese Weise alterierte Zellumsatz spricht für eine veränderte Anzahl an Zellen. Die Zellmorphologie wurde hierbei jedoch nicht berücksichtigt, sodass zusätzliche intra- und extrazelluläre Veränderungen nicht ausgeschlossen werden können und weiterer Untersuchungen bedürfen. Hierfür sollten sowohl der Durchmesser der Neuronen als auch die Ausbildung der Dendriten und Dendritischen Dornen untersucht werden, um morphologische oder funktionelle Veränderungen bei KO-Tieren nachzuweisen.

6.3 Astrozytendichte

Bei KO-Tieren sind signifikant weniger Astrozyten in der CA1-Region vorhanden als bei Wildtyp-Tieren. Auffällig ist, dass der Standardfehler der Mittelwerte bei den KO-Tieren deutlich höher ist (± 7) als bei den Wildtyp-Tieren ($\pm 1,756$). Dies spricht für eine erhöhte Streubreite der Gruppenmittelwerte bei den KO-Tieren (Koschack 2008).

Der F-Test ergab zwar, dass die Varianzen der beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied aufweisen, allerdings ist dieser Test bei einem niedrigen Umfang von jeweils $n = 3$ nur bedingt geeignet, um aussagekräftige Hinweise zu liefern (Bortz und Schuster 2010, S. 29–31). Um den Unterschied bestätigen zu können, müsste in weiteren Untersuchungen ein höherer Stichprobenumfang gewählt werden. Dennoch wäre eine erhöhte Streuung der Messwerte durchaus plausibel.

Astrozyten finden sich teilweise in homogenen Clustern (Kettenmann 2013, S. 139–140). Es könnte vermutet werden, dass in der CA1-Region Leda-1-sensible Astrozytenpopulationen in solchen Clustern vorkommen, die bei einer Deletion von Leda-1 nicht ausgebildet werden. Die Somata von Astrozyten liegen in der CA1-Region in zueinander abgegrenzten Territorien (Bushong et al. 2002). In diesem Fall würde beim Knock-out eine erhöhte Streuung der Astrozytendichte gemessen werden, da je nach Lage des Messfensters die fehlenden sensiblen Astrozyten entweder erfasst oder nicht erfasst werden.

Eine verringerte Astrozytendichte bei KO-Tieren scheint im Widerspruch zu den Ergebnissen der In-situ-Hybridisierung zu stehen, die gezeigt haben, dass Astrozyten mit hoher Wahrscheinlichkeit kein Leda-1 exprimieren (Kap. 5.5). Dies macht es wahrscheinlicher, dass Leda-1 eine Rezeptor-vermittelte Wirkung auf die Astrozyten besitzt. Aufgrund der vielfältigen Interaktionspartner der Astrozyten im ZNS können jedoch auch verschiedene indirekte Ursachen für eine Beeinflussung der Astrozytendichte vorliegen.

Wie in den neuroanatomischen Grundlagen dargelegt, erfolgen im Hippocampus über den trisynaptischen Kreislauf weitestgehend unidirektionale Signalübertragungen der intrahippocampalen Verbindungen. Die Körnerzellen des Gyrus dentatus projizieren über Moosfasern zur CA3-Region des Hippocampus, die Neuronen der CA3-Region wiederum über die Schaffer-kollaterale zu den Pyramidenzellen der CA1-Region. Diese Pyramidenzellen stehen ihrerseits in engem Kontakt zu den umliegenden Astrozyten (Honsek et al. 2012) und können auf diese Einfluss nehmen.

Dies könnte die erniedrigte Astrozytendichte erklären. So könnten Leda-1-sensible Körnerzellen des Gyrus dentatus über synaptische Verbindung die Ausbildung der Astrozyten in der CA-1 Region beeinflussen. Möglich wäre dies unter anderem durch die Abspaltung von Signalmolekülen im Rahmen der Leda-1-Prozessierung (Kap. 2.1.1) oder über die Signalaktivität der Pyramidenzellen im CA1-Feld (Kap. 2.1.2.4).

Demnach ist es für die weiterführende Forschung von Interesse zu untersuchen, ob die Deletion von Leda-1 auch Auswirkungen auf die Astrozyten anderer Bereiche, wie der CA3-Region und dem Stratum granulare des Gyrus dentatus, hat. Daneben könnte eine immunhistochemische Doppelfärbung von Leda-1 und Astrozyten Hinweise auf die Art der Interaktion zwischen dem Transmembranprotein und den Gliazellen geben.

Inwieweit die beobachtete verringerte Schichtdicke im Gyrus dentatus Auswirkung auf die veränderte Astrozytendichte hat, ist mit dem derzeitigen Wissensstand nicht abzuschätzen.

Aufgrund der bisherigen Forschungsergebnisse ließe sich die Beobachtung auch durch die Mitregulation der Immunantwort erklären. Leda-1 interagiert mit PILR α , einem inhibitorischen Rezeptor, der auf Makrophagen und anderen Zellen der myeloiden Reihe vorkommt und die Immunantwort mitreguliert (Kogure et al. 2011). Wie bereits erwähnt, wurde bei Makrophagen ein Mechanismus zur Gegenregulation von Leda-1 und PILR α entdeckt (Biswas et al. 2015). Im ZNS konnten die Rezeptoren PILR α und PILR β auch auf Microglia nachgewiesen werden (Tato et al. 2012).

Eine bedeutende Frage für weiterführende Untersuchungen ist also, ob bei Microglia ähnlich spezifische Interaktionsmuster zwischen Leda-1 und PILR α festzustellen sind wie bei Makrophagen und inwieweit sich eine Deletion von Leda-1 auf die Zellfunktion von Microglia auswirkt.

Hiermit ließe sich auch die Verbindung von Leda-1 zu den Astrozyten erklären, da Microglia und Astrozyten auf vielfältige Weise miteinander in Beziehung stehen. Beispielsweise können Microglia die modulierende Wirkung von Astrozyten auf die synaptische Übertragung auslösen (Pascual et al. 2012) oder das Anschwellen von Astrozyten bei pathologischen Noxen unterstützen (Rao et al. 2013). Darüber hinaus scheint die Kooperation der beiden Zelltypen für eine stark gesteigerte pro-inflammatorische Immunantwort verantwortlich zu sein (Barbierato et al. 2013). Aufgrund des aktuellen

Kenntnisstandes hinsichtlich Leda-1 und seiner Interaktionspartner lässt sich somit eine Immuntheorie formulieren.

Leda-1-Immuntheorie

Da PILR α bei Microglia mit hoher Wahrscheinlichkeit ähnlich wie bei Makrophagen der Maus durch Leda-1 aktiviert wird und inhibierend auf die Zelle wirkt, ist zu erwarten, dass beim Knock-out von Leda-1 durch fehlende Aktivierung des inhibitorischen Rezeptors die Enthemmung der Microgliazellen und somit eine gesteigerte Immunantwort erfolgt. Gleichzeitig wirkt sich eine Defizienz von Leda-1 negativ auf die Dichte der Astrozyten aus, was wiederum zu einer verringerten Immunantwort führen kann. So könnte die Erhöhung der Immunaktivität durch Microglia durch eine verringerte Anzahl von Astrozyten kompensiert werden, wodurch eine Regulation der Immunantwort möglich wäre.

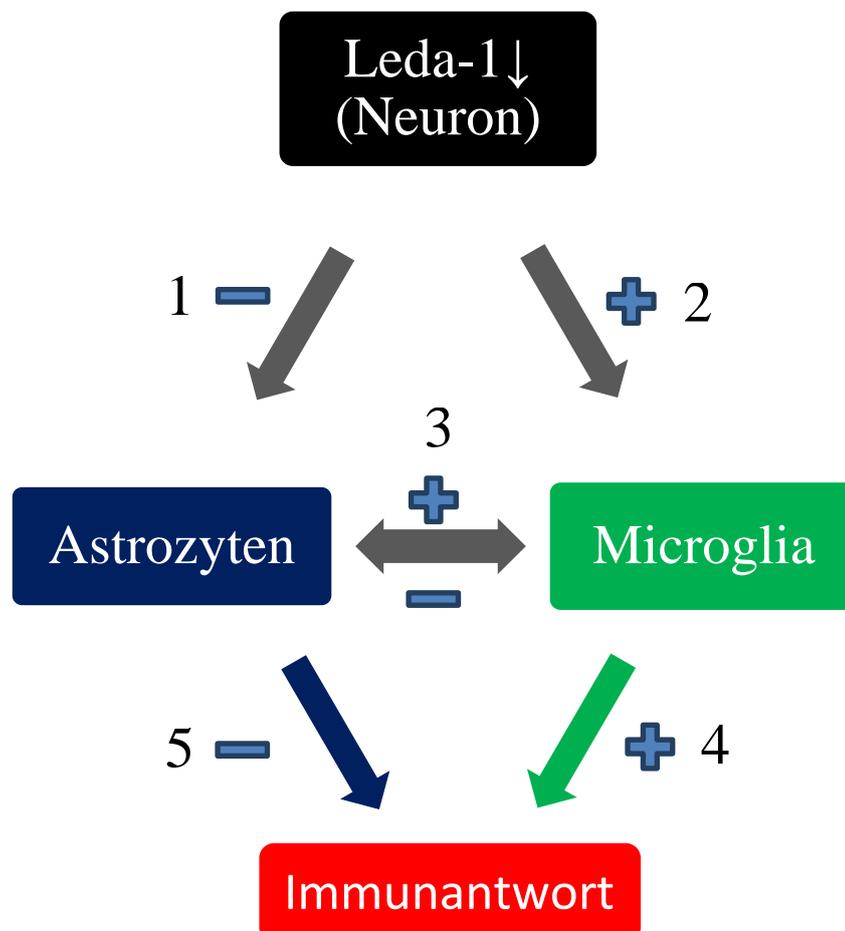


Abbildung 15 Immuntheorie Leda-1

Eine Defizienz von Leda-1 wirkt sich negativ auf die auf die Astrozyten aus (1), was zu einer verringerten Immunantwort führen kann (5). Beim Fehlen von Leda-1 kommt es vermutlich zur Enthemmung der Microgliazellen (2) und somit zu einer gesteigerten Immunantwort (4). Daher könnte die Interaktion von Astrozyten und Microglia (3) für die Regulation der Immunantwort entscheidend sein. Eigene Darstellung

Die Untersuchungsergebnisse zeigen, dass ein umfangreiches Zusammenspiel zwischen Microglia, Astrozyten und somit auch Neuronen bestehen könnte. Der derzeitige Wissensstand über Leda-1, Microglia und Astrozyten sowie die Forschungsergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Theorie, dass Leda-1 unter anderem einen Einfluss auf die Feinregulation der Immunantwort im ZNS hat. Der genaue Mechanismus der Interaktion zwischen Leda-1 und Astrozyten und die Rolle, die Microglia dabei spielen, bleiben Gegenstand zukünftiger Forschung.

6.4 Adulte Neurogenese

Durch das Auszählen der GFAP-positiven Progenitorzellen der subgranulären Zone konnte kein signifikanter Effekt der Deletion von Leda-1 auf die adulte Neurogenese im Mäusevorderhirn festgestellt werden. Die Ergebnisse der Schichtauswertung weisen jedoch darauf hin, dass deutliche Veränderungen des Stratum granulare des Gyrus dentatus erfolgen.

Einen Grund für die fehlende Aussagekraft der erhobenen Daten könnte der gewählte Marker darstellen. Da in der subgranulären Zone eine Mischpopulation aus GFAP-positiven Progenitorzellen sowie reifen Gliazellen, die ebenfalls GFAP-positiv sind, vorliegt, besteht die Möglichkeit, dass die Progenitorzellen trotz sorgfältiger morphologischer Betrachtung nicht differenziert genug erfasst wurden. Daher wäre es sinnvoll, einen präziseren und aussagekräftigeren Marker für die adulte Neurogenese zu nutzen, um bestehende Auswirkungen einer Deletion von Leda-1 entweder nachweisen oder ausschließen zu können.

Ein Marker, der hauptsächlich die frühe Phase der adulten Neurogenese darstellt, ist Phospho-Histone-H3. Durch die Kennzeichnung proliferierender und mitotischer Zellen im Hippocampus kann dieser Marker als Maß für die adulte Neurogenese eingesetzt werden (von Bohlen und Halbach 2011).

Besonders geeignet für die Untersuchung der adulten Neurogenese im Gyrus dentatus ist Doublecortin. Im Gegensatz zu GFAP markieren Doublecortin-Antikörper die Zellen der beginnenden adulten Neurogenese sehr spezifisch (Rao und Shetty 2004), da sie

charakteristisch für die neuronale Linie sind. Zudem stellen sie die sich bildenden Neuronen sowohl in ihrer mitotischen Entwicklung als auch in ihrer postmitotischen Differenzierung dar. Des Weiteren kann mit Doublecortin die Morphologie der Zelle sowie die Ausbildung der Dendriten gut beurteilt werden (von Bohlen und Halbach 2007).

Die Vorversuche haben gezeigt, dass sich die Signalqualität der Antikörper an frisch entnommenen Gehirnen deutlich besser darstellt als bei den gelagerten Gehirnen. Die Gehirne der Mannheimer AG waren bereits über ein Jahr lang in 4 % PFA fixiert und konnten daher nicht mit den genannten Antikörpern ausgewertet werden. Infolgedessen wurden diese Antikörper auch nicht für die Untersuchungen genutzt, sollten jedoch für die weitere Forschung verwendet werden. Die Lagerzeit der Gehirne sollte hierbei wenige Wochen nicht überschreiten. Darüber hinaus sind die Gehirne umgehend nach der Präparation zu fixieren (Boekhoorn et al. 2006).

Die adulte Neurogenese sollte künftig aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit weiter im Zusammenhang mit Leda-1 untersucht werden. Da Leda-1 einen Einfluss auf das Immunsystem zu haben scheint (Kap. 6.3), könnte es die Möglichkeit bieten, eine Verbindung zwischen Immunsystem und adulter Neurogenese aufzuzeigen. Eine solche Untersuchung wäre vor dem Hintergrund neuerer Studien, die darlegen, dass bei wirbellosen Tieren das Immunsystem in Verbindung zu adulter Neurogenese steht, interessant (Benton et al. 2014). Zudem wurden Hinweise für diese Verbindung bei Säugetieren beobachtet (Beltz et al. 2015; Harzsch und von Bohlen und Halbach 2016). An Mäusen konnte gezeigt werden, dass Zytokine von Zellen des hämatopoetischen Systems die Regeneration im ZNS nach Strahlenverletzung beeinflussen, stimulierend auf die Proliferation neuronaler Progenitorzellen wirken und neurokognitive Fähigkeiten verbessern können (Dietrich et al. 2018).

Des Weiteren wurde festgestellt, dass verschiedene Krankheitsbilder, die mentale Retardierung als Symptom aufweisen, Auswirkungen auf die adulte Neurogenese haben können (Velazquez et al. 2013; Allegra et al. 2017). Da in einer klinischen Fallbeschreibung nachgewiesen wurde, dass bei der homozygoten Defizienz von Leda-1 unter anderem eine allgemeine Entwicklungsstörung vorliegt (Anazi et al. 2017), bietet es sich an, die Auswirkungen der Deletion von Leda-1 auf die adulte Neurogenese weiter zu überprüfen.

Wie bereits erwähnt (Kap. 6.2), scheint sich diese Vermutung zu bestätigen. So wurde mittels der Antikörper gegen Doublecortin und Caspase-3 in KO-Tieren ein verändertes

Gleichgewicht zwischen adulter Neurogenese und apoptotischen Zellen im Gyrus dentatus zugunsten der Apoptose gemessen (Winkler et al. 2019). Ein derart alterierter Zellumsatz kann sich negativ auf die geistige Entwicklung auswirken und damit im Zusammenhang mit mentaler Retardierung stehen.

Hierin verdichten sich die Hinweise darauf, dass eine Defizienz von Leda-1 mit der Autismus-Spektrum-Störung assoziiert sein könnte. Zum einen wurde neben dem veränderten Zellumsatz eine Dysfunktion von Purkinjezellen im Cerebellum festgestellt (Winkler et al. 2019), ein Defekt, der auch bei Autismus-Störungen beobachtet wurde (Peter et al. 2016). Zum anderen wurde bei KO-Mäusen eine veränderte Genexpression im Hippocampus und in anderen Hirnbereichen gemessen (Winkler et al. 2019). Hierbei war das Gen *Erdr1*, das mit Autismus-Störungen assoziiert ist (Trent et al. 2014), herunterreguliert. Diesem möglichen Zusammenhang zur Autismus-Spektrum-Störung sollte im Rahmen zukünftiger Untersuchungen nachgegangen werden.

6.5 In-situ-Hybridisierung

Hippocampus

Wie in den Ergebnissen geschildert, erscheinen die Neuronen des Hippocampus Leda-1-positiv, während in den Zellen der Fasertrakte keine Signale für Leda-1 nachgewiesen werden konnten. Da in diesen Schichten hauptsächlich Gliazellen, wie Astrozyten und Oligodendrozyten, vorkommen, erschließt sich, dass diese Zellen Leda-1-negativ sind.

Diese Beobachtungen gleichen den Ergebnissen der Antikörperfärbung des Human Protein Atlas. Dort wurde ebenfalls eine niedrige Expression von Leda-1 in Neuronen des Hippocampus und kein Signal auf Gliazellen detektiert (Uhlén et al. 2015).

Cerebellum

Neben der starken Expression von Leda-1 in den Purkinjezellen sind einzelne Signale im Stratum moleculare und im Stratum granulosum erkennbar.

Diese Beobachtungen werden durch die Antikörperfärbung des Human Protein Atlas unterstützt. So wurde auch hier eine hohe Expression von Leda-1 in den Purkinjezellen gemessen (Uhlén et al. 2015).

Wie in den neuroanatomischen Grundlagen erwähnt, wurde in der klinischen Fallbeschreibung bei homozygoter Defizienz des Gens *pianp* unter anderem eine nicht altersentsprechend entwickelte Motorik beschrieben (Anazi et al. 2017). Die starke Expression von Leda-1 in den Purkinjezellen lässt vermuten, dass Leda-1 Auswirkungen auf die Funktionalität, die Interaktion oder die Genese dieser Zellpopulation haben könnte, was sie zu einem interessanten Forschungsthema im Zusammenhang mit Leda-1 macht. Um die Auswirkungen der Deletion von Leda-1 auf das Kleinhirn in zukünftigen Untersuchungen zu überprüfen, könnten das Volumen des Kleinhirns und dessen Schichtdicken vermessen werden. Außerdem könnten Anzahl und Morphologie der Purkinjezellen bei KO-Tieren bestimmt werden.

Unter diesen Voraussetzungen wurden Leda-1-defiziente Mäusegehirne untersucht und tatsächlich wurde im Cerebellum eine geringere Dichte an Purkinjezellen im Vergleich zu jener der WT-Tiere gemessen. Außerdem konnte festgestellt werden, dass sowohl Stratum moleculare als auch Stratum granulosum im Cerebellum signifikant verringerte

Schichtdicken aufwiesen. Im Menschen sind cerebelläre Veränderung häufig mit Bewegungsstörungen assoziiert. Die ebenfalls durchgeführten Verhaltensversuche von KO-Tieren in Hinblick auf die motorischen Fähigkeiten waren jedoch unauffällig (Winkler et al. 2019). Im Gegensatz dazu scheinen manche Dysfunktionen der Purkinjezellen neben motorischen Defiziten auch mit Autismus-Spektrum-Störungen assoziiert zu sein (Clifford et al. 2019; Peter et al. 2016), was sich durch Auffälligkeiten in Verhaltenstests widerspiegeln scheint, in denen die KO-Tiere eine veränderte Reaktion auf Stress, ein beeinträchtigtes Sozialverhalten und zwanghaft wiederholendes Verhalten zeigten (Winkler et al. 2019). Die Erforschung von Leda-1 im Zusammenhang mit der Autismus-Spektrum-Störung bildet demnach einen wichtigen Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen.

Stratum moleculare

Das faserreiche Stratum moleculare wies vereinzelte Signale auf. Neben den Dendriten der Purkinjezellen und vielen Fasertrakten kommen in dieser Schicht Gliazellen, Korbzellen und Sternzellen vor. Wie in den Ergebnissen erläutert, sind die Signale weitestgehend im Bereich der Zellwand der sich dort befindlichen Zellen lokalisiert. Die restlichen Signale sind inmitten der Faserschicht ohne direkten Bezug zum Zellsoma angesiedelt (Abbildung 16: 2 und 3).

Das verwendete Hybridisierungsverfahren (RNAscope[®]/BaseScope[™]) macht die mRNA für das entsprechende Protein als einzelnes Signal sichtbar. In Neuronen kann mRNA vom Zellkern über die Dendriten bis zu den Spines transportiert werden und an lokalen Polyribosomen translatiert werden. Vermutet wird, dass die lokale Translation unter anderem starke Auswirkungen auf die Synapsenaktivität hat und von ihr gegenreguliert wird (Steward und Schuman 2001; Bramham und Wells 2007).

Demnach könnten die Signale an den Zellwänden von den Spines der Purkinjezellen stammen, die mit den Stern- und Korbzellen in synaptischem Kontakt stehen. Die Signale ohne Zellbezug könnten in den nicht angefärbten Dendriten der Purkinjezellen lokalisiert sein.

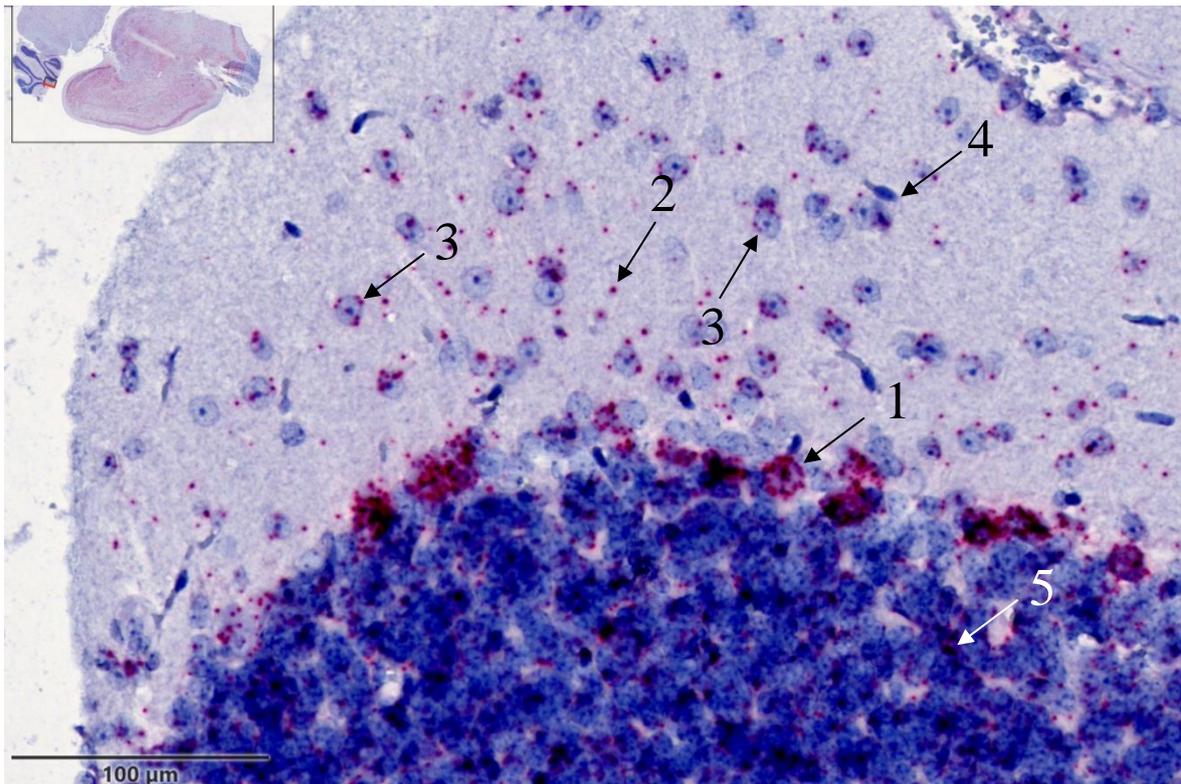


Abbildung 16 *In-situ-Hybridisierung Kleinhirn*

Signale der In-Situ-Hybridisierung werden durch rote Punkte dargestellt, die Kerngegenfärbung ist blau. (1) starke Expression in Purkinjezellen, (2) vereinzelte Signale im Stratum moleculare und (3) im Bereich der Zellwand dort ansässiger Zellen, (4) Endothelzellen ohne Signale, (5) weitere Signale im Stratum granulosum

Eigene Aufnahme

Diese Hypothese wird durch die Präparate des Human Protein Atlas unterstützt (Abbildung 17). Auf ihnen kann erkannt werden, dass die gesamten Purkinjezellen samt Dendriten mit Antikörpern markiert sind (Uhlén et al. 2015). Dies könnte anhand einer immunhistochemischen Doppelfärbung mit Purkinje Cell Protein 4 und einem Leda-1-Antikörper oder mit einer Doppel-In-situ-Hybridisierung, in der sowohl die Dendriten der Purkinjezellen als auch Leda-1 markiert sind, näher untersucht werden.

Die Vermutung, dass Leda-1 an Synapsen vorkommt, wird durch das Wissen bestärkt, dass Leda-1 Komplexe mit der präsynaptischen Untereinheit von GABA_B-Rezeptoren bildet (Schwenk et al. 2015). Zudem wurde durch elektrophysiologische Untersuchungen von Neuronen im Hippocampus gezeigt, dass die präsynaptische GBR-vermittelte Glutamatfreisetzung und somit die Signalweiterleitung bei einer Defizienz von Leda-1 beeinflusst ist. Außerdem konnte auch hier immunhistochemisch dargestellt werden, dass Leda-1 in den Axonen und somatodendritischen Bereichen der Zellen mit leichter Tendenz zum somatodendritischen Kompartiment vorhanden ist (Winkler et al. 2019).

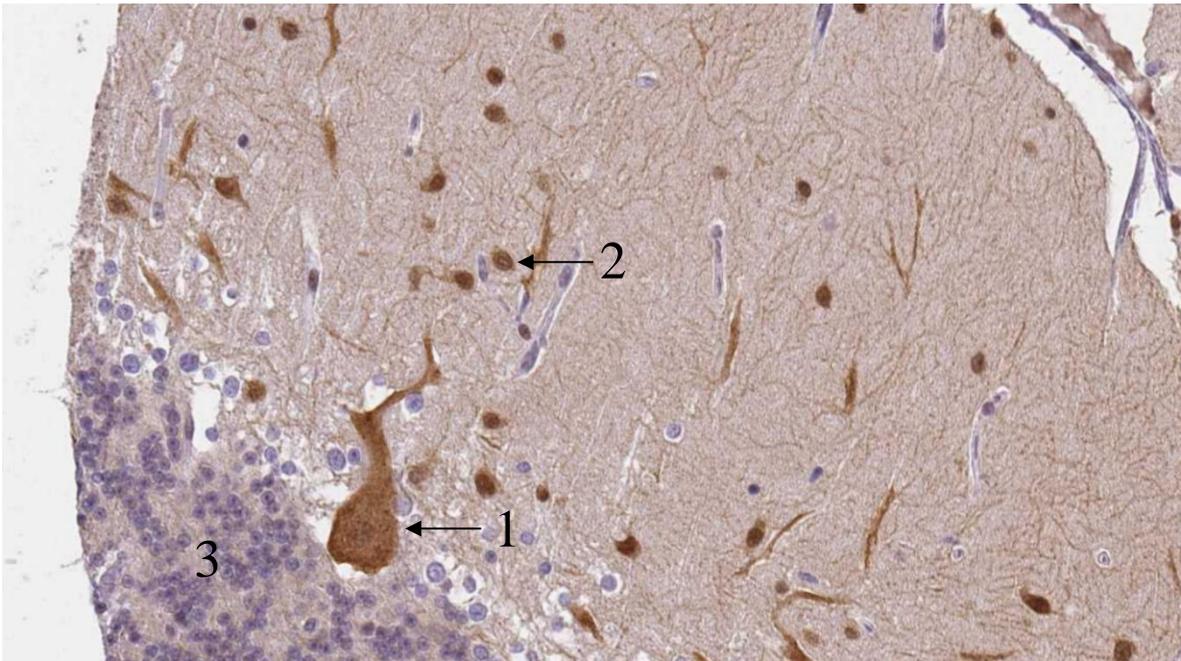


Abbildung 17 Antikörperfärbung Cerebellum Purkinjezelle

(1) deutlich angefärbte Purkinjezelle mit Dendriten, (2) möglicherweise Zellkörper von Interneuronen im Stratum moleculare, (3) Stratum granulosum

Modifiziert nach (Uhlén et al. 2015), <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000139200-PIANP/tissue/cerebellum#img>

Stratum granulosum

Im Stratum granulosum sind ebenfalls Signale erkennbar. Aufgrund der dichten Lage der Zellkerne lässt sich jedoch keine Aussage über die Herkunft dieser Signale treffen.

Marklager

In der In-situ-Hybridisierung sind nur sehr selten Signale im Marklager des Kleinhirns sichtbar (Abbildung 18), was sich mit der Beobachtung in den Fasertrakten des Hippocampus deckt. In beiden Schichten kommen hauptsächlich Gliazellpopulationen vor, die scheinbar kein Leda-1 exprimieren. Im Gegensatz dazu sind im Marklager der immunhistochemischen Präparate des Human Protein Atlas deutlich angefärbte Fasern und Zellsomata zu erkennen (Abbildung 19) (Uhlén et al. 2015).

Eine Erklärung hierfür könnte eine unterschiedliche anatomische Verteilung von Leda-1 zwischen Mensch und Maus sein, die bereits mittels „real-time quantitative polymerase chain reaction“ belegt wurde (Kogure et al. 2011). So liegt zwar die Transkriptionsrate bei beiden Spezies im Gehirn sehr hoch, jedoch könnte sie im Cerebellum des Menschen deutlich höher sein als in jenem der Maus.

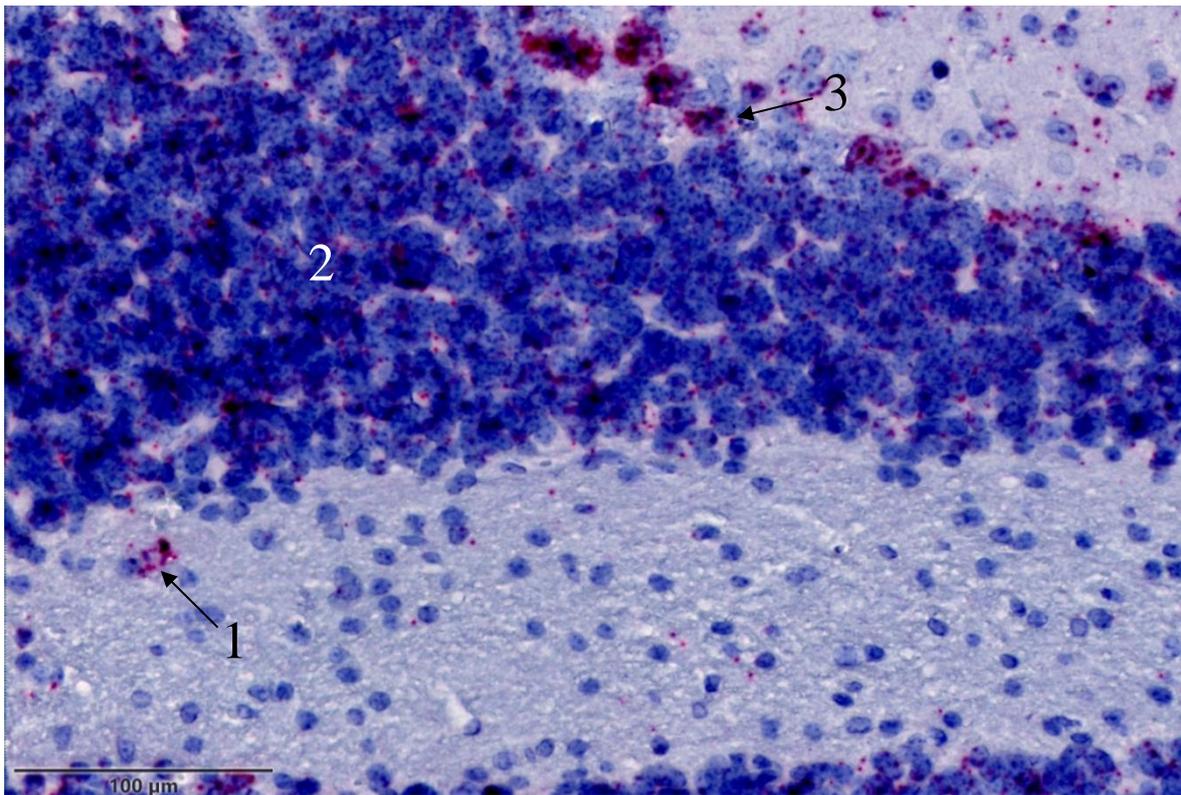


Abbildung 18 *In-situ-Hybridisierung Cerebellum Marklager*

(1) einzelnes Signal im Marklager, (2) Stratum granulosum, (3) Purkinjezelle

Eigene Aufnahme

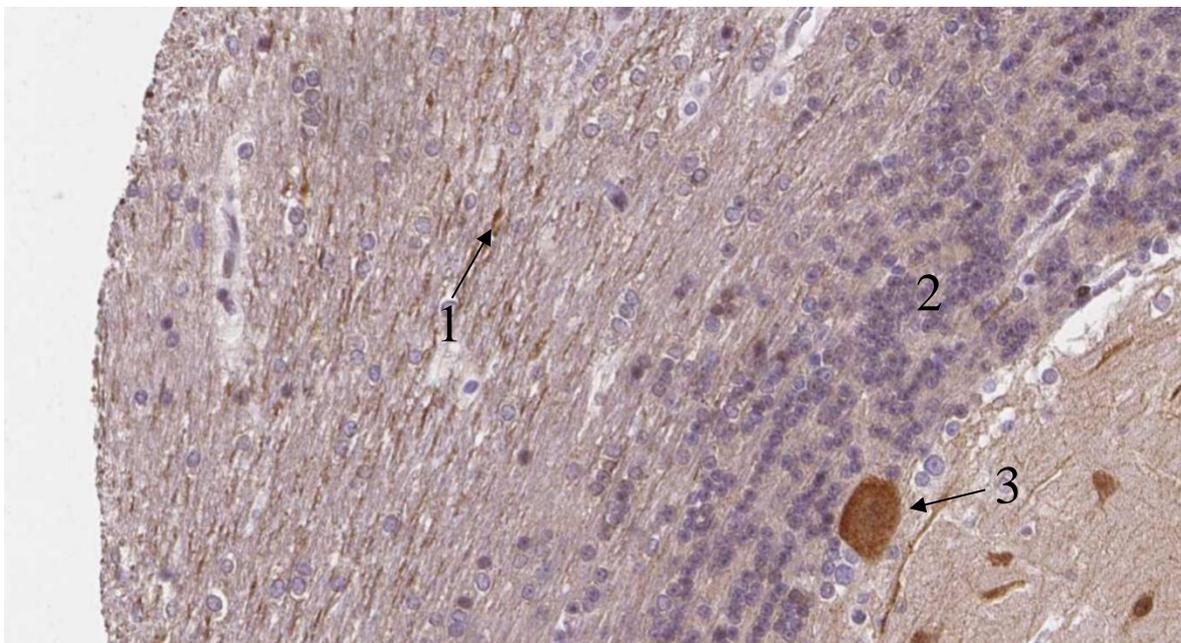


Abbildung 19 *Antikörperfärbung Cerebellum Marklager*

(1) viele Signale in den Fasertrakten des Marklagers, (2) Stratum granulosum, (3) Purkinjezelle

Modifiziert nach (Uhlén et al. 2015), <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000139200-PIANP/tissue/cerebellum#img>

Eine weitere Erklärung könnten die unterschiedlichen Arten der Färbungen darstellen, da in den In-situ-Hybridisierungen lediglich die mRNA und nicht wie bei der immunhistochemischen Färbung das prozessierte Protein markiert wird. Hieraus ergibt sich eine unterschiedliche Lokalisation der Signale, da das Protein im Axon transportiert werden kann, die mRNA jedoch nur im Zellsomata und im Bereich der Synapsen vorkommt. Dies erklärt die angefärbten Fasern in den immunhistochemischen Schnitten, die in der In-situ-Hybridisierung nicht zu erkennen sind. Die sichtbaren Signale könnten somit wiederum von den Synapsen der Purkinjezellen stammen.

Cortex

Die Neuronen des Isocortex' erscheinen Leda-1-positiv. In der Lamina molecularis (I) sind deutlich weniger Signale sichtbar als in den restlichen Schichten. Dies lässt vermuten, dass die dort vorkommenden Zellen (hauptsächlich Gliazellen, unter anderem Astrozyten) Leda-1 nicht in nachweisbarer Menge exprimieren.

Diese Vermutung wird durch die Beobachtungen in den Fasertrakten des Hippocampus und dem Marklager des Cerebellums unterstützt. Auch hier sind hauptsächlich Gliazellen vorhanden, die Leda-1 negativ erscheinen. Die vereinzelt Signale in der Lamina molecularis (I) könnten unter anderem von Interneuronen stammen (Abbildung 20: 1).

Diese Beobachtungen werden wiederum durch die Antikörperfärbung des Human Protein Atlas unterstützt. Auch hier wurden eine hohe Expression von Leda-1 in den cerebralen Neuronen und nur wenige Signale in Gliazellen nachgewiesen (Uhlén et al. 2015).

Endothelzellen

Wie in den Ergebnissen geschildert, konnte kein Signal in den morphologisch differenzierbaren Endothelzellen (Abbildung 20: 3 und Abbildung 16: 4) nachgewiesen werden. Scheinbar hat Leda-1 im ZNS eine grundsätzlich andere Funktion als in Leberendothelzellen, wo es erstmals nachgewiesen wurde. Zudem deutet zum jetzigen Zeitpunkt noch nichts darauf hin, dass Leda-1 im ZNS ähnliche zellstrukturelle Funktionen besitzt wie im Leberendothel. Dies bleibt Gegenstand zukünftiger Forschung.

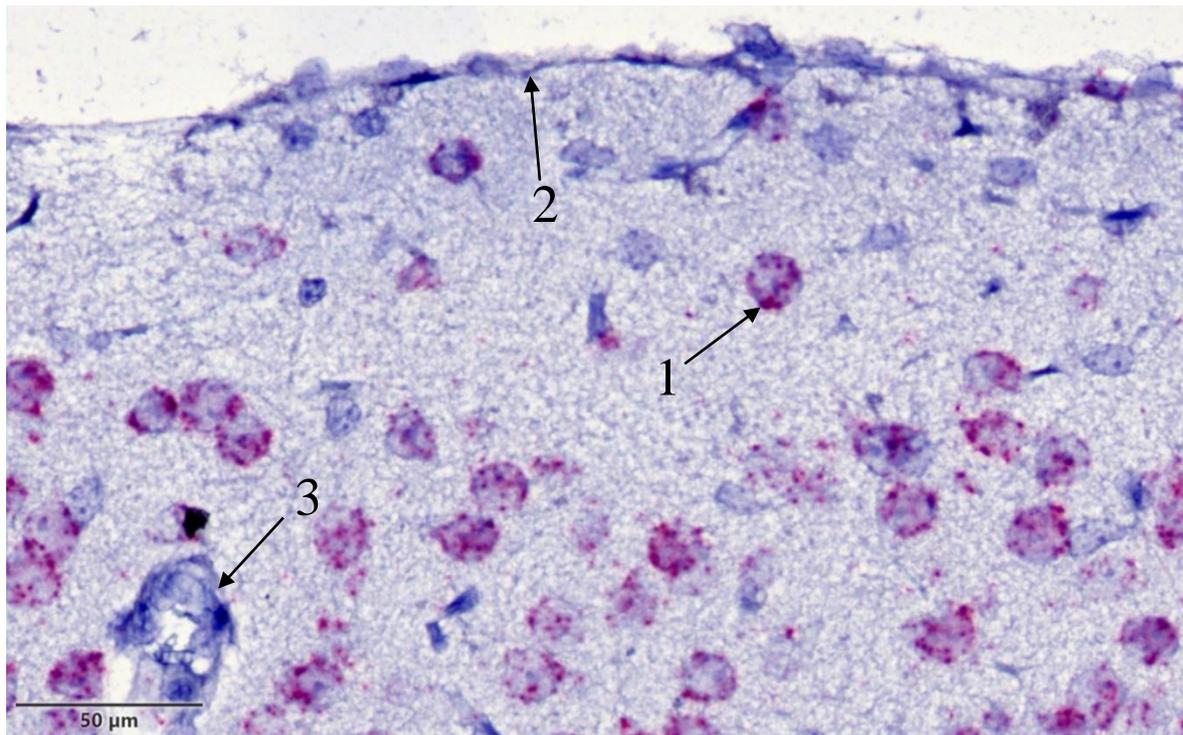


Abbildung 20 *Lamina molecularis (I) des Isocortex'*

Wenige Signale im Bereich der Lamina I des Isocortex', (1) einzelne Signale möglicherweise von Interneuronen, (2) keine Signale an der membrana limitans gliae superficialis, die von Ausläufern der Astrozyten gebildet wird, (3) Endothelzellen mit Blutgefäß ohne Signale

Eigene Aufnahme

Hybridisierung

Die starke Intensität der Signale von BaseScope™ im Vergleich zu RNAscope® lässt sich mit der verbesserten Amplifizierungsmethode erklären (<https://acdbio.com/basescope%E2%84%A2-manual-assays> 12.02.18). Jedoch lässt sich dies nicht mit Sicherheit bestätigen, da zwei verschiedene Gensonden verwendet wurden, die ebenfalls für die unterschiedliche Qualität der Signale verantwortlich sein könnten. Um in Zukunft BaseScope™ mit RNAscope® vergleichen zu können, müsste dieselbe Gensonde genutzt werden.

Die Unterschiede in den Gensonden ließen sich statistisch nicht nachweisen, da in den verschiedenen Hirnschnitten zu wenige vergleichbare Bereiche vorhanden waren. Zudem ließen sich nur die Sonden im BaseScope™-System miteinander vergleichen. Aufgrund der hervorragenden Qualität des Signales scheint für weitere Forschung jedoch das BaseScope™-System mit der Pianp-Sonde NM_175696.4, 775-881 gut geeignet zu sein.

7 Fazit

Die Ergebnisse dieser Arbeit zur Untersuchung neuroanatomischer Veränderungen bei Leda-1-defizienten Mäusen und der Auswertung von In-situ-Hybridisierungsbildern belegen verschiedene Effekte, die eine Deletion von Leda-1 im Mäusegehirn bewirkt. Neben dem Hinweis auf ein möglicherweise vergrößertes Volumen des gesamten Gehirns konnten veränderte Schichtdicken im Gyrus dentatus nachgewiesen werden. Des Weiteren scheint die Defizienz von Leda-1 einen Einfluss auf die Astrozyten zu haben, was als Hinweis auf eine Verbindung zum Immunsystem angesehen werden kann. Die Vermutung, dass die Neurogenese beeinflusst wird, konnte durch die in dieser Arbeit genutzten Antikörper nicht nachgewiesen werden, bestätigte sich jedoch in einer weiteren Studie mit einem geeigneteren Marker (Winkler et al. 2019). Anhand der In-situ-Hybridisierungsbilder erfolgte eine allgemeine Beschreibung des Vorkommens von Leda-1 im Mäusegehirn. Speziell im Kleinhirn lieferten die Signale Hinweise auf die Lokalisation von Leda-1 in Bezug auf die verschiedenen Bereiche der Zelle.

Ausgehend von den Ergebnissen dieser Studie sollten für zukünftige Untersuchungen folgende Fragen berücksichtigt werden:

1. Lassen sich beim Knock-out von Leda-1 Volumenveränderungen von anderen Hirnarealen feststellen, zum Beispiel dem Gyrus dentatus oder dem Cerebellum, zwei Bereiche, in denen eine veränderte Schichtdicke beobachtet wurde?
2. Kommt es, wenn sowohl die Schichtdicke als auch die Anzahl von Neuronen der adulten Neurogenese und Purkinjezellen verändert sind, auch zu einer alterierten Morphologie Leda-1-exprimierender Zellen, zum Beispiel eine verringerte Dichte an Spines?
3. Hat die Deletion von Leda-1 Auswirkungen auf die Astrozyten anderer Hirnbereiche wie der CA3-Region oder dem Stratum granulare des Gyrus dentatus?
4. Finden sich bei Microglia ähnliche Interaktionsmuster zwischen Leda-1 und PILR α wie bei Makrophagen und ist die Immunantwort von KO-Tieren verändert?
5. Lassen sich auch in anderen Hirnarealen, in denen adulte Neurogenese vorkommt, veränderte Schichtdicken nachweisen, und ist die adulte Neurogenese in diesen Bereichen beeinflusst?

Zudem sollte den Hinweisen auf die Verbindung von Leda-1 zur Autismus-Spektrum-Störung, wie sie von der Arbeitsgruppe um Géraud postuliert wurde (Winkler et al. 2019), weiter nachgegangen werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die vorliegende Arbeit Erkenntnisse zu Vorkommen, Funktionen und Interaktionspartnern von Leda-1 liefert. Die Ergebnisse geben weitere Hinweise, um die Rolle, die Leda-1 im ZNS spielt, besser zu verstehen. Darüber hinaus bildet sie gemeinsam mit den vorangegangenen Studien die Grundlage, von der aus das noch weitestgehend unbekannte Netzwerk an Funktionen, Interaktionen und Pathologien um Leda-1 ergründet werden kann.

8 Literaturverzeichnis

Altman, J.; Das, G. D. (1965): Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. In: *The Journal of comparative neurology* 124 (3), S. 319–335.

Altman, J.; Das, G. D. (1967): Postnatal neurogenesis in the guinea-pig. In: *Nature* 214 (5093), S. 1098–1101.

Amaral, D. G. (1978): A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. In: *The Journal of comparative neurology* 182 (4 Pt 2), S. 851–914.

Amaral, D. G.; Witter, M. P. (1989): The three-dimensional organization of the hippocampal formation. A review of anatomical data. In: *Neuroscience* 31 (3), S. 571–591. DOI: 10.1016/0306-4522(89)90424-7.

Anazi, S.; Maddirevula, S.; Fageih, E.; Alsedairy, H.; Alzahrani, F.; Shamseldin, H. E. et al. (2017): Clinical genomics expands the morbid genome of intellectual disability and offers a high diagnostic yield. In: *Molecular psychiatry* 22 (4), S. 615–624. DOI: 10.1038/mp.2016.113.

Andersen, P. (Hg.) (2007): The hippocampus book. Oxford: Oxford Univ. Press. Online verfügbar unter <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0725/2006007088-d.html>.

Andersen, P.; Bliss, T. V.; Skrede, K. K. (1971): Lamellar organization of hippocampal pathways. In: *Experimental brain research* 13 (2), S. 222–238.

Andrae, L. C. (2018): Adult neurogenesis in humans: Dogma overturned, again and again? In: *Sci. Transl. Med.* 10 (436), eaat3893. DOI: 10.1126/scitranslmed.aat3893.

Bähr, M.; Frotscher, M. (2014): Neurologisch-topische Diagnostik. Anatomie - Funktion - Klinik. 10. Aufl. Stuttgart u.a.: Thieme. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1055/b-002-99152>.

Barbierato, M.; Facci, L.; Argentini, C.; Marinelli, C.; Skaper, S. D.; Giusti, P. (2013): Astrocyte-microglia cooperation in the expression of a pro-inflammatory phenotype. In: *CNS & neurological disorders drug targets* 12 (5), S. 608–618.

Benes, F. (2001): GABAergic Interneurons Implications for Understanding Schizophrenia and Bipolar Disorder. In: *Neuropsychopharmacology* 25 (1), S. 1–27. DOI: 10.1016/S0893-133X(01)00225-1.

Bettler, B.; Kaupmann, K.; Mosbacher, J.; Gassmann, M. (2004): Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. In: *Physiological reviews* 84 (3), S. 835–867. DOI: 10.1152/physrev.00036.2003.

- Biswas, S.; Adrian, M.; Evdokimov, K.; Schledzewski, K.; Weber, J.; Winkler, M. et al. (2015): Counter-regulation of the ligand-receptor pair Leda-1/Pianp and PirA during the LPS-mediated immune response of murine macrophages. In: *Biochemical and biophysical research communications* 464 (4), S. 1078–1083. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.07.079.
- Biswas, S.; Adrian, M.; Weber, J.; Evdokimov, K.; Winkler, M.; Geraud, C. (2016): Posttranslational proteolytic processing of Leda-1/Pianp involves cleavage by MMPs, ADAM10/17 and gamma-secretase. In: *Biochemical and biophysical research communications* 477 (4), S. 661–666. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.06.116.
- Blakemore, S. J.; Frith, U. (2005): *The learning brain. Lessons for education*. 1. publ. Malden Mass. u.a.: Blackwell.
- Boekhoorn, Karin; Joels, Marian; Lucassen, Paul J. (2006): Increased proliferation reflects glial and vascular-associated changes, but not neurogenesis in the presenile Alzheimer hippocampus. In: *Neurobiology of disease* 24 (1), S. 1–14. DOI: 10.1016/j.nbd.2006.04.017.
- Boldrini, M.; Fulmore, C. A.; Tartt, A. N.; Simeon, L. R.; Pavlova, I.; Poposka, V. et al. (2018): Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. In: *Cell stem cell* 22 (4), 589-599.e5. DOI: 10.1016/j.stem.2018.03.015.
- Bortz, J.; Schuster, C. (2010): *Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler*. 7., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-12770-0>.
- Brambilla, R.; Morton, P. D.; Ashbaugh, J. J.; Karmally, S.; Lambertsen, K. L.; Bethea, J. R. (2014): Astrocytes play a key role in EAE pathophysiology by orchestrating in the CNS the inflammatory response of resident and peripheral immune cells and by suppressing remyelination. In: *Glia* 62 (3), S. 452–467. DOI: 10.1002/glia.22616.
- Bramham, C. R.; Wells, D. G. (2007): Dendritic mRNA. Transport, translation and function. In: *Nature reviews. Neuroscience* 8 (10), S. 776–789. DOI: 10.1038/nrn2150.
- Bushong, E. A.; Martone, M. E.; Jones, Y. Z.; Ellisman, M. H. (2002): Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22 (1), S. 183–192.
- Chamberland, S.; Topolnik, L. (2012): Inhibitory control of hippocampal inhibitory neurons. In: *Frontiers in neuroscience* 6, S. 165. DOI: 10.3389/fnins.2012.00165.
- Clark, H. F.; Gurney, A. L.; Abaya, E.; Baker, K.; Baldwin, D.; Brush, J. et al. (2003): The secreted protein discovery initiative (SPDI), a large-scale effort to identify novel human

- secreted and transmembrane proteins. A bioinformatics assessment. In: *Genome research* 13 (10), S. 2265–2270. DOI: 10.1101/gr.1293003.
- Clifford, H.; Dulneva, A.; Ponting, C. P.; Haerty, W.; Becker, E. B. E. (2019): A gene expression signature in developing Purkinje cells predicts autism and intellectual disability co-morbidity status. In: *Scientific Reports* 9 (1), S. 485. DOI: 10.1038/s41598-018-37284-1.
- Cui, Z.; Gerfen, C. R.; Young, W. S. (2013): Hypothalamic and other connections with dorsal CA2 area of the mouse hippocampus. In: *The Journal of comparative neurology* 521 (8), S. 1844–1866. DOI: 10.1002/cne.23263.
- Dennis, C. V.; Suh, L. S.; Rodriguez, M. L.; Kril, J. J.; Sutherland, G. T. (2016): Human adult neurogenesis across the ages. An immunohistochemical study. In: *Neuropathology and applied neurobiology* 42 (7), S. 621–638. DOI: 10.1111/nan.12337.
- Dinamarca, M. C.; Raveh, A.; Schneider, A.; Fritzius, T.; Früh, S.; Rem, P. D. et al. (2019): Complex formation of APP with GABAB receptors links axonal trafficking to amyloidogenic processing. In: *Nature Communications* 10 (1), S. 1331. DOI: 10.1038/s41467-019-09164-3.
- Domingues, H. S.; Portugal, C. C.; Socodato, R.; Relvas, J. B. (2016): Oligodendrocyte, Astrocyte, and Microglia Crosstalk in Myelin Development, Damage, and Repair. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 4, S. 71. DOI: 10.3389/fcell.2016.00071.
- Douglass, J. K.; Wcislo, W. T. (2010): An inexpensive and portable microvolumeter for rapid evaluation of biological samples. In: *BioTechniques* 49 (2), S. 566–572. DOI: 10.2144/000113464.
- Eng, L. F.; Ghirnikar, R. S.; Lee, Y. L. (2000): Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). In: *Neurochemical research* 25 (9-10), S. 1439–1451.
- Erben, L.; He, M. X.; Laeremans, A.; Park, E.; Buonanno, A. (2017): A Novel Ultrasensitive In Situ Hybridization Approach to Detect Short Sequences and Splice Variants with Cellular Resolution. In: *Molecular neurobiology*. DOI: 10.1007/s12035-017-0834-6.
- Eriksson, P. S.; Perfilieva, E.; Björk-Eriksson, T.; Alborn, A. M.; Nordborg, C.; Peterson, D. A.; Gage, F. H. (1998): Neurogenesis in the adult human hippocampus. In: *Nature medicine* 4 (11), S. 1313–1317. DOI: 10.1038/3305.
- Evdokimov, K.; Biswas, S.; Adrian, M.; Weber, J.; Schledzewski, K.; Winkler, M. et al. (2013): Proteolytic cleavage of LEDA-1/PIANP by furin-like proprotein convertases precedes its plasma membrane localization. In: *Biochemical and biophysical research communications* 434 (1), S. 22–27. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.03.073.

- Evdokimov, K.; Biswas, S.; Schledzewski, K.; Winkler, M.; Gorzelanny, C.; Schneider, S. W. et al. (2016): Leda-1/Pianp is targeted to the basolateral plasma membrane by a distinct intracellular juxtamembrane region and modulates barrier properties and E-Cadherin processing. In: *Biochemical and biophysical research communications* 475 (4), S. 342–349. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.05.092.
- Filippov, V.; Kronenberg, G.; Pivneva, T.; Reuter, K.; Steiner, B.; Wang, L. P. et al. (2003): Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. In: *Molecular and cellular neurosciences* 23 (3), S. 373–382.
- Garcia, A. Denise R.; Doan, Ngan B.; Imura, Tetsuya; Bush, Toby G.; Sofroniew, Michael V. (2004): GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. In: *Nature neuroscience* 7 (11), S. 1233–1241. DOI: 10.1038/nn1340.
- Geraud, C.; Schledzewski, K.; Demory, A.; Klein, D.; Kaus, M.; Peyre, F. et al. (2010): Liver sinusoidal endothelium: a microenvironment-dependent differentiation program in rat including the novel junctional protein liver endothelial differentiation-associated protein-1. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 52 (1), S. 313–326. DOI: 10.1002/hep.23618.
- Honsek, S. D.; Walz, C.; Kafitz, K. W.; Rose, C. R. (2012): Astrocyte calcium signals at Schaffer collateral to CA1 pyramidal cell synapses correlate with the number of activated synapses but not with synaptic strength. In: *Hippocampus* 22 (1), S. 29–42. DOI: 10.1002/hipo.20843.
- Hsu, S. M.; Raine, L.; Fanger, H. (1981): Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 29 (4), S. 577–580. DOI: 10.1177/29.4.6166661.
- Jacobson, S.; Marcus, E. M. (2011): *Neuroanatomy for the Neuroscientist*. Boston, MA: Springer US.
- Jayakumar, A. R.; Tong, X. Y.; Ruiz-Cordero, R.; Bregy, A.; Bethea, J. R.; Bramlett, H. M.; Norenberg, M. D. (2014): Activation of NF- κ B mediates astrocyte swelling and brain edema in traumatic brain injury. In: *Journal of neurotrauma* 31 (14), S. 1249–1257. DOI: 10.1089/neu.2013.3169.
- Jeffery, K. J.; Anderson, M. I.; Hayman, R.; Chakraborty, S. (2004): A proposed architecture for the neural representation of spatial context. In: *Neuroscience and biobehavioral reviews* 28 (2), S. 201–218. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2003.12.002.
- Jessberger, S.; Gage, F. H. (2014): Adult neurogenesis. Bridging the gap between mice and humans. In: *Trends in cell biology* 24 (10), S. 558–563. DOI: 10.1016/j.tcb.2014.07.003.

- Kempermann, G.; Gage, F. H.; Aigner, L.; Song, H.; Curtis, M. A.; Thuret, S. et al. (2018): Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions. In: *Cell stem cell* 23 (1), S. 25–30. DOI: 10.1016/j.stem.2018.04.004.
- Kempermann, G.; Kuhn, H. G.; Gage, F. H. (1997): More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. In: *Nature* 386 (6624), S. 493–495. DOI: 10.1038/386493a0.
- Kettenmann, H. (Hg.) (2013): Neuroglia. 3rd ed. New York: Oxford Univ. Press.
- Kettenmann, H.; Verkhratsky, A. (2008): Neuroglia: the 150 years after. In: *Trends in neurosciences* 31 (12), S. 653–659. DOI: 10.1016/j.tins.2008.09.003.
- Khakh, B. S.; Sofroniew, M. V. (2015): Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. In: *Nature neuroscience* 18 (7), S. 942–952. DOI: 10.1038/nn.4043.
- Kimelberg, H. K. (2004): The problem of astrocyte identity. In: *Neurochemistry international* 45 (2-3), S. 191–202. DOI: 10.1016/j.neuint.2003.08.015.
- Kipp, M.; Radlanski, K. (2017): Neuroanatomie. Nachschlagen, lernen, verstehen. 1. Auflage.
- Knoth, R.; Singec, I.; Ditter, M.; Pantazis, G.; Capetian, P.; Meyer, R. P. et al. (2010): Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. In: *PloS one* 5 (1), e8809. DOI: 10.1371/journal.pone.0008809.
- Kogure, A.; Shiratori, I.; Wang, J.; Lanier, L. L.; Arase, H. (2011): PANP is a novel O-glycosylated PILRalpha ligand expressed in neural tissues. In: *Biochemical and biophysical research communications* 405 (3), S. 428–433. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.01.047.
- Kornack, D. R.; Rakic, P. (1999): Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (10), S. 5768–5773.
- Koschack, J. (2008): Standardabweichung und Standardfehler. Der kleine, aber feine Unterschied. In: *Z Allg Med* 84 (6), S. 258–260. DOI: 10.1055/s-2008-1073146.
- Kuhn, H. G.; Dickinson-Anson, H.; Gage, F. H. (1996): Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat. Age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16 (6), S. 2027–2033.
- Lang, G. (2013): Histotechnik. Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik. 2., überarb. und aktualisierte Aufl. Wien u.a.: Springer.
- Lee, K. M.; Chiu, K. B.; Renner, N. A.; Sansing, H. A.; Didier, P. J.; MacLean, A. G. (2014): Form follows function: astrocyte morphology and immune dysfunction in SIV

- neuroAIDS. In: *Journal of neurovirology* 20 (5), S. 474–484. DOI: 10.1007/s13365-014-0267-1.
- Lein, E. S.; Callaway, E. M.; Albright, T. D.; Gage, F. H. (2005): Redefining the boundaries of the hippocampal CA2 subfield in the mouse using gene expression and 3-dimensional reconstruction. In: *The Journal of comparative neurology* 485 (1), S. 1–10. DOI: 10.1002/cne.20426.
- Leong, T. Y. M.; Cooper, K.; Leong, A. S. Y. (2010): Immunohistology--past, present, and future. In: *Advances in anatomic pathology* 17 (6), S. 404–418. DOI: 10.1097/PAP.0b013e3181f8957c.
- Lever, C.; Wills, T.; Cacucci, F.; Burgess, N.; O'Keefe, J. (2002): Long-term plasticity in hippocampal place-cell representation of environmental geometry. In: *Nature* 416 (6876), S. 90–94. DOI: 10.1038/416090a.
- Levison, S. W.; Goldman, J. E. (1993): Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. In: *Neuron* 10 (2), S. 201–212. DOI: 10.1016/0896-6273(93)90311-E.
- Lorente de Nó, R. (1934): Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. In: *Journal für Psychologie und Neurologie* (46), S. 113–177.
- Ming, G. L.; Song, H. (2011): Adult neurogenesis in the mammalian brain. Significant answers and significant questions. In: *Neuron* 70 (4), S. 687–702. DOI: 10.1016/j.neuron.2011.05.001.
- Nagy, J. I.; Rash, J. E. (2000): Connexins and gap junctions of astrocytes and oligodendrocytes in the CNS. In: *Brain research. Brain research reviews* 32 (1), S. 29–44.
- Navarrete, M.; Araque, A. (2008): Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. In: *Neuron* 57 (6), S. 883–893. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.01.029.
- Nestor, P. J.; Graham, K. S.; Bozeat, S.; Simons, J. S.; Hodges, J. R. (2002): Memory consolidation and the hippocampus. Further evidence from studies of autobiographical memory in semantic dementia and frontal variant frontotemporal dementia. In: *Neuropsychologia* 40 (6), S. 633–654.
- Oberheim, N. A.; Goldman, S. A.; Nedergaard, M. (2012): Heterogeneity of astrocytic form and function. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 814, S. 23–45. DOI: 10.1007/978-1-61779-452-0_3.
- O'Keefe, J. (1976): Place units in the hippocampus of the freely moving rat. In: *Experimental Neurology* 51 (1), S. 78–109. DOI: 10.1016/0014-4886(76)90055-8.

- O'Keefe, J.; Dostrovsky, J. (1971): The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. In: *Brain Research* 34 (1), S. 171–175. DOI: 10.1016/0006-8993(71)90358-1.
- Parri, H. R.; Gould, T. M.; Crunelli, V. (2001): Spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. In: *Nature neuroscience* 4 (8), S. 803–812. DOI: 10.1038/90507.
- Pascual, O.; Ben Achour, S.; Rostaing, P.; Triller, A.; Bessis, A. (2012): Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (4), E197-205. DOI: 10.1073/pnas.1111098109.
- Peter, S.; Brinke, M. M.; Stedehouder, J.; Reinelt, C. M.; Wu, B.; Zhou, H. et al. (2016): Dysfunctional cerebellar Purkinje cells contribute to autism-like behaviour in Shank2-deficient mice. In: *Nature Communications* 7, 12627 EP -. DOI: 10.1038/ncomms12627.
- Petrik, D.; Encinas, J. M. (2019): Perspective: Of Mice and Men – How Widespread Is Adult Neurogenesis? In: *Front. Neurosci.* 13, S. 589. DOI: 10.3389/fnins.2019.00923.
- Porter, J. T.; McCarthy, K. D. (1995): GFAP-positive hippocampal astrocytes in situ respond to glutamatergic neuroligands with increases in Ca²⁺i. In: *Glia* 13 (2), S. 101–112. DOI: 10.1002/glia.440130204.
- Raasakka, A.; Kursula, P. (2014): The myelin membrane-associated enzyme 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase. On a highway to structure and function. In: *Neuroscience bulletin* 30 (6), S. 956–966. DOI: 10.1007/s12264-013-1437-5.
- Raff, M. C.; Abney, E. R.; Cohen, J.; Lindsay, R.; Noble, M. (1983): Two types of astrocytes in cultures of developing rat white matter. Differences in morphology, surface gangliosides, and growth characteristics. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 3 (6), S. 1289–1300.
- Ramón y Cajal, S. (1909): *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertèbres*. Maloine, Paris.
- Ramón y Cajal, S. (1995): *Histology of the nervous system of man and vertebrates*. Translated from the French by Neely Swanson and Larry W. Swanson. New York: Oxford University Press (History of neuroscience, no. 6). Online verfügbar unter <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0603/93035437-d.html>.
- Rao, K. V. Rama; Brahmabhatt, M.; Norenberg, M. D. (2013): Microglia contribute to ammonia-induced astrocyte swelling in culture. In: *Metabolic brain disease* 28 (2), S. 139–143. DOI: 10.1007/s11011-012-9339-1.

- Reemst, K.; Noctor, S. C.; Lucassen, P. J.; Hol, E. M. (2016): The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development. In: *Frontiers in human neuroscience* 10, S. 566. DOI: 10.3389/fnhum.2016.00566.
- Schwenk, J.; Pérez-Garci, E.; Schneider, A.; Kollwe, A.; Gauthier-Kemper, A.; Fritzius, T. et al. (2015): Modular composition and dynamics of native GABAB receptors identified by high-resolution proteomics. In: *Nature neuroscience* 19, 233 EP -. DOI: 10.1038/nn.4198.
- Scoville, W. B.; Milner, B. (1957): Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. In: *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 20 (1), S. 11–21. DOI: 10.1136/jnnp.20.1.11.
- Seri, B.; García-Verdugo, J. M.; McEwen, B. S.; Alvarez-Buylla, A. (2001): Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21 (18), S. 7153–7160.
- Shi, S. R.; Cote, R. J.; Taylor, C. R. (1997): Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 45 (3), S. 327–343. DOI: 10.1177/002215549704500301.
- Shi, S. R.; Key, M. E.; Kalra, K. L. (1991): Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 39 (6), S. 741–748. DOI: 10.1177/39.6.1709656.
- Sofroniew, M. V.; Vinters, H. V. (2010): Astrocytes. Biology and pathology. In: *Acta neuropathologica* 119 (1), S. 7–35. DOI: 10.1007/s00401-009-0619-8.
- Sorrells, S. F.; Paredes, M. F.; Cebrian-Silla, A.; Sandoval, K.; Qi, D.; Kelley, K. W. et al. (2018): Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. In: *Nature*. DOI: 10.1038/nature25975.
- Squire, L. R. (1986): Mechanisms of memory. In: *Science (New York, N.Y.)* 232 (4758), S. 1612–1619.
- Squire, L. R. (2009): The legacy of patient H.M. for neuroscience. In: *Neuron* 61 (1), S. 6–9. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.12.023.
- Steward, O.; Schuman, E. M. (2001): Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. In: *Annual review of neuroscience* 24, S. 299–325. DOI: 10.1146/annurev.neuro.24.1.299.
- Suh, J.; Rivest, A. J.; Nakashiba, T.; Tominaga, T.; Tonegawa, S. (2011): Entorhinal cortex layer III input to the hippocampus is crucial for temporal association memory. In: *Science (New York, N.Y.)* 334 (6061), S. 1415–1420. DOI: 10.1126/science.1210125.

- Tato, C. M.; Joyce-Shaikh, B.; Banerjee, A.; Chen, Y.; Sathe, M.; Ewald, S. E. et al. (2012): The myeloid receptor PILR β mediates the balance of inflammatory responses through regulation of IL-27 production. In: *PloS one* 7 (3), e31680. DOI: 10.1371/journal.pone.0031680.
- Trent, S.; Fry, J. P.; Ojarikre, O. A.; Davies, W. (2014): Altered brain gene expression but not steroid biochemistry in a genetic mouse model of neurodevelopmental disorder. In: *Molecular autism* 5 (1), S. 21. DOI: 10.1186/2040-2392-5-21.
- Trepel, M. (2015): Neuroanatomie. Struktur und Funktion. 6. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer. Online verfügbar unter <http://institut.elsevierelibrary.de/product/neuroanatomie-6>.
- Uhlén, M.; Fagerberg, L.; Hallström, B. M.; Lindskog, C.; Oksvold, P.; Mardinoglu, A. et al. (2015): Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. In: *Science (New York, N.Y.)* 347 (6220), S. 1260419. DOI: 10.1126/science.1260419.
- van Praag, H.; Schinder, A. F.; Christie, B. R.; Toni, N.; Palmer, T. D.; Gage, F. H. (2002): Functional neurogenesis in the adult hippocampus. In: *Nature* 415 (6875), S. 1030–1034. DOI: 10.1038/4151030a.
- van Strien, N. M.; Cappaert, N. L. M.; Witter, M. P. (2009): The anatomy of memory. An interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. In: *Nature reviews. Neuroscience* 10 (4), S. 272–282. DOI: 10.1038/nrn2614.
- von Bohlen und Halbach, O. (2007): Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. In: *Cell and tissue research* 329 (3), S. 409–420. DOI: 10.1007/s00441-007-0432-4.
- von Bohlen und Halbach, O. (2011): Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. In: *Cell and tissue research* 345 (1), S. 1–19. DOI: 10.1007/s00441-011-1196-4.
- Wang, F.; Flanagan, J.; Su, N.; Wang, L. C.; Bui, S.; Nielson, A. et al. (2012): RNAscope. A novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. In: *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 14 (1), S. 22–29. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2011.08.002.
- Watson, C.; Paxinos, G.;uelles, L. (Hg.) (2012): The mouse nervous system. 1. ed. Amsterdam: Elsevier Acad. Press.
- Wenger, E.; Lövdén, M. (2016): The Learning Hippocampus. Education and Experience-Dependent Plasticity. In: *Mind, Brain, and Education* 10 (3), S. 171–183. DOI: 10.1111/mbe.12112.

Whitlock, J. R.; Heynen, A. J.; Shuler, M. G.; Bear, M. F. (2006): Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. In: *Science (New York, N.Y.)* 313 (5790), S. 1093–1097. DOI: 10.1126/science.1128134.

Winkler, M.; Biswas, S.; Berger, S. M.; Küchler, M.; Preisendörfer, L.; Choo, M. et al. (2019): Pjanp deficiency links GABAB receptor signaling and hippocampal and cerebellar neuronal cell composition to autism-like behavior. In: *Molecular psychiatry*. DOI: 10.1038/s41380-019-0519-9.

Yan, Y.; Fang, Z. Q.; Liu, X. M.; Pan, Z. Q.; Lu, W. L.; Liang, C. et al. (2010): Up or down-regulated Coincident Genes in Hypothalamus of H22 Tumour Mice with Different Symptoms and Signs. In: *Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine 2010年08期*.

Yang, Z.; Wang, K. K. W. (2015): Glial fibrillary acidic protein. From intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. In: *Trends in neurosciences* 38 (6), S. 364–374. DOI: 10.1016/j.tins.2015.04.003.

Zeldenrust, F.; Wadman, W. J. (2009): Two forms of feedback inhibition determine the dynamical state of a small hippocampal network. In: *Neural networks : the official journal of the International Neural Network Society* 22 (8), S. 1139–1158. DOI: 10.1016/j.neunet.2009.07.015.

9 Anhang: Materialien

9.1 Antikörper und Chemikalien

Glial fibrillary acidic protein Antikörper

- GFAP (C-19): sc6170
- Host: Ziege
- Typ: polyclonal
- Firma: Santa Cruz Biotechnology, INC.

CNPase Antikörper

- Anti-CNPase
- Host: Ziege
- Typ: polyclonal
- Firma: Thermo Fischer Scientific
- Katalog-Nr.: PA5-19551

Biotinyliertes Pferde-anti-Ziegen IgG

- biotinyliertes Anti-Ziegen IgG (H+L)
- Host: Pferd
- Typ: Ziege
- Firma: Vector Laboratories
- Katalog-Nr.: BA-9500

Cy 3-konjugiertes Streptavidin

- CyTM3-konjugiertes Streptavidin
- Firma: Jackson ImmunoResearch, INC.; Dianova
- Katalog-Nr.: 016-160-084

Alexa Fluor™ 488 Ziegen-anti-Hasen IgG

- Alexa Fluor™ 488 konjugiertes Ziegen-anti-Hasen IgG (H+L)
- Host: Ziege
- Typ: Hase
- Firma: Jackson ImmunoResearch INC.; Dianova
- Katalog-Nr.: 111-545-144

DAPI

- 4',6-Diamidin-2-phenylindol
- Firma: Sigma-Aldrich

Lösungen

- zweifach destilliertes Wasser (Aqua bidest)
- Ethanol 20 %
- phosphatgepufferte Salzlösung
- Blockierungslösung (3 % Horseserum + 0,1 % TritonX100 in PBS)
- Mowiol® 4-88 Reagent (Calbiochem®)
- Agar 4 %
- Mikrowellenpuffer: Citratpuffer (0,01M, pH 6,0)
 - 9 mL Lösung A + 41 mL Lösung B + 450 mL Aqua bidest.
 - Lösung A (0,1M)
 - 21,01 g Citrat in 1000 mL Aqua bidest.
 - Lösung B (0,1M)
 - 29,41 g Natriumcitrat in 1000 mL Aqua bidest.

9.2 In-situ-Hybridisierung

In-situ-Hybridisierungssysteme

RNAscope® 2.5 HD Assay RED, BaseScope™ Reagent Kit-RED der Firma ACDBio

Gensonden

Gennummer: NM_175696.4

- **RNAscope®**
 - Versuchstier: Mm-Pianp
 - Gensonde: NM_175696.4, 464-1485
- **BaseScope™**
 - Versuchstier: BA-Mm-Pianp-2EJ
 - Gensonde: NM_175696.4, 775-881
 - Gensonde: NM_175696.4, 787-868 (Die Target-Region dieser Sonde dehnt sich über die Region des Exon-4 hinaus.)
 - Versuchstier: BA-Mm-Pianp-2EJ-O1
 - Gensonde: NM_175696.4, 860-1100 (Die Target-Region dieser Sonde dehnt sich über die Region des Exon-5 hinaus.)

9.3 Laborgeräte

- Vibratom (VT1000S, Leica Microsystems Wetzlar)
- Mikrotiterplatten (Cellstar 24, Greiner bio-one, Frickhausen)
- Rasierklingen (Gillette Super Silver)
- Cyanoacrylat-Kleber (UHU)
- Pinsel
- SuperFrost-Plus®-Objektträger (R. Langenbrinck, Emmendingen)
- Deckgläser 24 x 50 mm (R. Langenbrinck, Emmendingen)
- Streckplatte
- Hybridisierungssofen
- Vortex
- Inkubationsbox aus Metall
- Taumelschüttler
- Küvetten
- Pipetten
- Pipettenspitzen
- Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf)

9.4 Mikroskop

Mikroskop: Olympus BX63

Objektive Marke Olympus

Vergrößerung	Objektiv	Seriennummer
2 x/0,08	PLAN APO N	FN26.5
10 x/0,40	UPLANSAPO	0.17/FN26.5
20 x/0,75	UPLANSAPO	0.17/FN26.5
40 x/0,95	UPLANSAPO	0.11-0.23/FN26.5
100 x/1,40	UPLANSAPO	FN26.5 OIL PH3

Tisch

- BX3 UCD8A mit BX3 Filtermodulrevolver
- BX3 Frontlinse
- BX3 LED
- BX3 Polarisator Steuereinheit: BX3-cbh
- Immunfluoreszenzlicht: HXP 120 CQ-HXP 120-z/10026c

9.5 Software

SOFTWARE	VERSION	HERAUSGEBER
CITAVI	5.6 / 6.3	Swiss Academic Software
MICROSOFT EXCELL 2016 MSO	16.0.11029.20045	Microsoft Corporation
MICROSOFT WORD 2016 MSO	16.0.11029.20045	Microsoft Corporation
MICROSOFT PAINT	17134.407	Microsoft Corporation
CELLSENSE	1.18	Olympus
GRAPHPAD PRISM 4	4.0.2.315	GraphPad Software
OLYMPUS OLYVIA	2.9	Olympus
ADOBE ACROBAT READER DC	2019.012.20034	Adobe

10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Allen danken, die mich beim Schreiben dieser Arbeit unterstützt haben.

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Oliver von Bohlen und Halbach. Seine unermüdliche und optimistische Art motivierte mich sowohl in der experimentellen Phase, als auch beim Verfassen dieser Arbeit, mir immer wieder die größte Mühe zu geben. Auf alle Fragen erhielt ich in kürzester Zeit gründliche Antworten mit hilfreichen Verbesserungsvorschlägen. Ich fühlte mich nie allein gelassen und konnte gleichzeitig durch die konstruktiven Gespräche selbstständig die Forschungshypothesen entwickeln. Ich hätte mir keinen besseren Doktorvater wünschen können.

Des Weiteren danke ich Frau Hanisch, die mir im Labor mit ihrem Wissen und ihrer Erfahrung mit Rat zur Seite stand. Auch der gesamten Arbeitsgemeinschaft um Prof. Dr. von Bohlen und Halbach sei gedankt für die umfangreiche Hilfe und das hervorragende Arbeitsklima im Institut.

Dank gilt auch meiner Familie, meinen Freunden und insbesondere meinen Eltern, die mich immer unterstützten und mir letztlich mein Studium erst ermöglicht haben. Zum Schluss möchte ich meiner zukünftigen Ehefrau Vanessa Maria Rosa Howland für die liebevolle Unterstützung danken.

Danke