

*Debora Ledergerber und Jean-Marc Fritschy,
Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität
Zürich*

Zusammenfassung

Die meisten Neuronen im Gehirn werden während der embryonalen Entwicklung gebildet. Es gibt jedoch zwei Regionen des erwachsenen Gehirns, in denen Neurogenese (das heisst die Entstehung und Differenzierung von Nervenzellen) erhalten bleibt. Bei Temporallappenepilepsie mit hippocampaler Sklerose (TLE-HS) ist eine dieser Regionen, die subgranuläre Zone (SGZ) des Gyrus dentatus im Hippokampus, stark betroffen. Es liegen jedoch widersprüchliche Daten darüber vor, ob Neurogenese zur Entwicklung des epileptischen Fokus beiträgt oder ob sie im Gegenteil infolge der TLE-HS beeinträchtigt ist. Im Folgenden fassen wir unsere Arbeiten zu diesem Thema zusammen und stellen sie in den Kontext aktueller Forschungsergebnisse. Im Unterschied zu akuten epileptischen Anfällen, welche die Zellproliferation im Hippokampus stimulieren, ist Neurogenese in Tiermodellen von chronischer TLE reduziert. Die Beeinträchtigung von Neurogenese infolge der Dispersion der Körnerzellen im Gyrus dentatus zeigt, wie entscheidend die strukturelle Integrität der SGZ ist, um Neurogenese zu erhalten. Die aktuellen Ergebnisse legen nahe, dass in Patienten mit TLE-HS, bei denen eine Dispersion der Körnerzellschicht auftritt, Neurogenese weitgehend unterdrückt ist.

Epileptologie 2006; 23: 178 – 186

Schlüsselwörter: Zellproliferation, BrdU, subgranuläre Zone, Hippokampus, synaptische Plastizität

Significance of Neurogenesis in Temporal Lobe Epilepsy (TLE)

Although most neurons in the brain are born during development, neurogenesis (i.e. the birth and differentiation of new neurons) persists in two sites of the adult brain, including the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus. This region belongs to the hippocampus and is strongly affected in temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis (TLE-HS). The question whether neurogenesis contributes to or is influenced by chronic epilepsy remains unsettled, due to controversial results. Here, we review recent data from experimental models of TLE, including our own work, that address this issue. While acute epileptic seizures or status epilepticus stimulate cell proliferation and neurogenesis in the hippocampus, different results are obtained in models of

chronic epilepsy. In particular, dentate gyrus granule cell dispersion in a mouse model of TLE interferes with neurogenesis, suggesting that the structural integrity of the SGZ is essential for maintaining its neurogenic potential. Since granule cell dispersion also occurs in many patients with TLE-HS, a confirmation of these results in human brain tissue would imply that neurogenesis is largely suppressed in this disease.

Key words: Cell proliferation, BrdU, subgranular zone, hippocampus, synaptic plasticity

L'importance de la neurogenèse en cas d'épilepsie du lobe temporal

La plupart des neurones du cerveau sont formés durant le développement embryonnaire. Il existe toutefois deux régions du cerveau où la neurogenèse, (autrement dit, la genèse et la différenciation de cellules nerveuses) est préservée à l'âge adulte. En cas d'épilepsie du lobe temporal avec sclérose de l'hippocampe (ELT-SH), une de ces régions, la zone sous-granulaire (ZSG) du gyrus dentelé dans l'hippocampe est fortement atteinte. Les données disponibles sont cependant contradictoires quant à savoir si la neurogenèse contribue au développement du foyer épileptique ou si au contraire, elle est entravée par la ELT-SH. Ci-après, nous résumons nos travaux à ce sujet et les plaçons dans le contexte des résultats actuels de la recherche. A la différence des crises épileptiques aiguës qui stimulent la prolifération de cellules dans l'hippocampe, la neurogenèse est réduite dans les modélisations animales d'ELT chronique. L'inhibition de la neurogenèse suite à la dispersion des cellules granulaires dans le gyrus dentelé montre à quel point l'intégrité structurelle de la ZSG est déterminante pour la préservation de la neurogenèse. Les résultats actuels suggèrent que chez les patients atteints d'ELT-SH où il se produit une dispersion de la couche de cellules granuleuses, la neurogenèse est en grande partie opprimée.

Mots clés : Prolifération de cellules, zone subgranulaire, hippocampe, plasticité synaptique

*Danksagung

Wir danken A. Zeller und H. Johannssen für die eingehende Überarbeitung des Artikels. Ein Grossteil der in diesem Artikel beschriebenen Experimente wurde durch den Schweizerischen Nationalfonds (NCCR-Neuro) finanziert.

Einführung

Die Temporallappenepilepsie mit hippocampaler Sklerose (TLE-HS) gehört zu den häufigsten therapieresistenten partiellen Epilepsien. Die hauptsächlich betroffene Hirnregion ist ein Teil des medialen Temporallobens, der Hippokampus. Kennzeichen von TLE-HS sind eine ausgeprägte neuronale Degeneration (Zellverlust) im CA1-Bereich des Hippokampus, begleitet von einer starken Astroglieose (Vermehrung der Astrozyten). In ungefähr 50% der Fälle kommt es zu einer Dispersion der Körnerzellen im Gyrus dentatus [1] (siehe Loup, 2006, in dieser Ausgabe).

Die TLE-HS kann verschiedene Ursachen haben. Wie die oben beschriebenen histopathologischen Veränderungen entstehen, und ob sie zur Epileptogenese und zu chronischen epileptischen Anfällen beitragen, ist aber weitgehend unbekannt. Ebenfalls unklar ist, ob diese Veränderungen der Therapie-Resistenz zugrunde liegen. Zur Beantwortung dieser Fragen wurden experimentelle Modelle bei Nagern entwickelt, in denen Läsionen des Hippokampus ebenfalls zu chronischen epileptischen Anfällen führen.

Eine der interessantesten Entdeckungen in der Hirnforschung in den letzten Jahren war, dass Nervenzellen nicht nur während der Entwicklung, sondern auch im erwachsenen Gehirn neu gebildet werden. Dieses Phänomen, die so genannte Neurogenese, findet unter anderem im Hippokampus statt (**Abbildung 1**; siehe **Box 1**). Es ist jedoch unklar, ob die Neurogenese im Hippokampus einen negativen oder positiven Einfluss auf den Verlauf von TLE-HS hat [2-5]. Es gibt einerseits Indizien dafür, dass eine fehlerhafte Neurogenese zur Entwicklung des epileptischen Fokus beiträgt. Andererseits könnte Neurogenese aber auch Zellen ersetzen, die infolge der Epilepsie abgestorben sind. In diesem Fall könnte Neurogenese vielleicht sogar therapeutisch genutzt werden. Dieser Artikel geht auf die neuesten For-

schungsergebnisse ein und diskutiert experimentelle Ansätze zur Untersuchung der Neurogenese bei TLE.

Neurogenese und Epilepsie

Unser Gehirn enthält ungefähr 50 Milliarden Nervenzellen (Neurone), die während der fötalen Entwicklung durch wiederholte Teilung von Stammzellen gebildet werden. Nach der letzten Teilung wandern die neugeborenen Zellen zu ihrer endgültigen Position im Gehirn, reifen aus, kontaktieren andere Neurone durch synaptische Verbindungen, und bilden somit funktionelle Netzwerke. Bis Mitte der Neuziger Jahren herrschte die Meinung vor, dass im adulten Hirn keine neuen Neurone mehr produziert werden, obwohl Altmann und Das 1965 [6] berichtet hatten, dass sich Zellen im postnatalen Hippokampus teilen. Ihre Beobachtung geriet jedoch in Vergessenheit. Wahrscheinlich weil man sich schwer vorstellen konnte, auf welche Art undifferenzierte Zellen in bestehende komplexe neuronale Netzwerke integriert werden sollten. Vor allem aber konnten Altman und Das nicht nachweisen, ob die proliferierenden Zellen wirklich Neurone sind; es hätten auch Gliazellen, also Astrozyten oder Mikroglia, sein können. Erst kürzlich konnte durch die Entdeckung von spezifischen Markern nachgewiesen werden, dass neugeborene Zellen zu Neuronen differenzieren, das heißt dass Neurone im adulten Hirn gebildet werden (siehe auch **Box 1**). Zahlreiche Untersuchungen in verschiedensten Arten von Säugetieren haben in der Folge gezeigt, dass in zwei Regionen des adulten Gehirns neue Neurone gebildet werden: In der Subventrikulärzone entstehen so genannte Körnerzellen des Riechkolbens [7, 8] und in der Subgranulärzone (SGZ) im Hippokampus (**Abbildung 1**) Körnerzellen des Gyrus dentatus [9].

Die Veränderung neuronaler Netzwerke, so genannte neuronale Plastizität, ist wichtig für die ständige An-

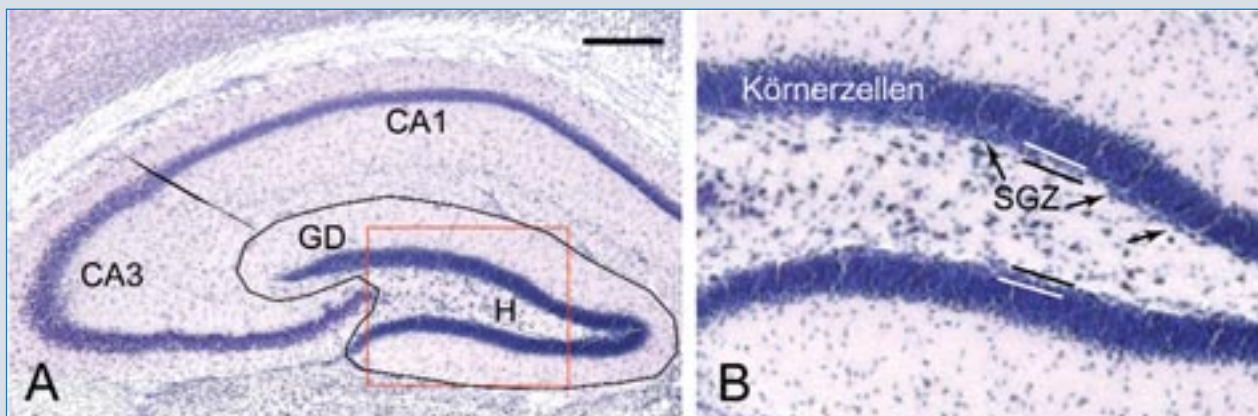


Abbildung 1: A) Fotografie eines Gewebeschnittes durch den Hippokampus der Maus. Die Zellen wurden mit Cresyl-Violett angefärbt (Nissl-Färbung). Der Hippokampus besteht aus drei Regionen: Gyrus dentatus (GD; umrahmt, CA3, und CA1. In jeder Region bilden die Neurone eine dichte, dunkle Zell-

schicht. Das rote Viereck ist im Bild B vergrößert. Die Subgranulärzone (SGZ) befindet sich direkt unter der Körnerzellschicht und enthält Stamm- und Vorläuferzellen (Pfeile), die sich während des ganzen Lebens des Tieres weiterteilen. H, Hilus des Gyrus dentatus. Balken: 0,1 mm.

passung des Gehirns an eine sich ändernde Umwelt, zum Beispiel bei Lernprozessen. Neurogenese erweitert die Möglichkeiten neuronaler Plastizität. Der Mechanismus der Integration junger Neuronen gibt Hinweise auf deren zukünftige Funktion innerhalb des hippocampalen Netzwerks. Sowohl erhöhte physische Aktivität (Rennen) als auch eine komplexe, abwechslungsreiche Umgebung stimulieren die Neurogenese in Nagern. Man geht davon aus, dass auch im menschlichen Organismus Lernen, soziale Kontakte und Bewegung die Neubildung von Nervenzellen im Hippokampus fördern. Da der Hippokampus an vielen Leistungen des Kurzzeitgedächtnisses beteiligt ist, beeinflussen alle oben genannten Prozesse seine elektrische Aktivität. Stimuliert man den Hippokampus nun direkt mit elektrischen Pulsen, werden Wachstum und Integrationsfähigkeit junger Nervenzellen ebenfalls verändert.

In Tiermodellen wurde beobachtet, dass die Neurogenese im Gyrus dentatus auch nach epileptogener Aktivität des Hirns stimuliert wird. Diese Beobachtung stiess in der Epilepsieforschung auf grosses Interesse, bedarf aber eingehender Untersuchungen, da unklar ist, ob Neurogenese ein relevantes Phänomen für den Prozess der Epileptogenese darstellt. Dabei ist es (1) wichtig herauszufinden, ob Neurogenese in einem epileptischen Fokus positive oder negative Effekte hat; konkret, ob adulte Stammzellen gegen Epilepsie schützen können, oder ob sie epileptische Anfälle begünstigen (siehe oben). Weiter möchte man (2) wissen, ob Neurogenese Ursache oder Konsequenz der morphologischen Änderungen im epileptischen Hippokampus ist. Schliesslich ist (3) wichtig auszumachen, ob das Neuronenwachstum eine klinische Relevanz hat und auch bei Epilepsie-Patienten verändert ist.

Im Tiermodell können Neurogenese direkt beobachtet und die Zahl der neugebildeten Zellen quantifiziert werden. Neurogenese wird in zwei Schritten nachgewiesen: Erst werden sich teilende Zellen mit einer Substanz markiert, dem BrdU (siehe **Box 2**), welches sich während der Zellteilung in den Zellkern integriert und mehrere Wochen später immer noch nachweisbar ist. Damit werden alle Zellen, die sich zu einem bestimmten Zeitpunkt geteilt haben, markiert. Als zweiter Schritt wird mittels Doppel- oder Dreifachfärbungen bestimmt, ob BrdU-positive Zellkerne zu Neuronen oder Astrozyten gehören (siehe **Box 1 und 2**). Beim Menschen sind solche Untersuchungen im Allgemeinen nicht möglich, weil BrdU kanzerogene Wirkungen haben könnte. Um Zellteilungen im Tumorgewebe zu untersuchen, wurde BrdU Krebspatienten im Endstadium verabreicht. Nach ihrem Tod wurde im Hirngewebe nachgewiesen, dass auch beim Menschen bis ins hohe Alter neue Neuronen im Hippokampus generiert werden [2].

Bei Epilepsie-Patienten gibt es hingegen nur indirekte Hinweise zur Neurogenese. Untersuchungen in resektiertem Gewebe zeigten eine deutliche Erhöhung der Zellproliferation [4, 10]. Da nicht alle neuen Zellen

Box 1:

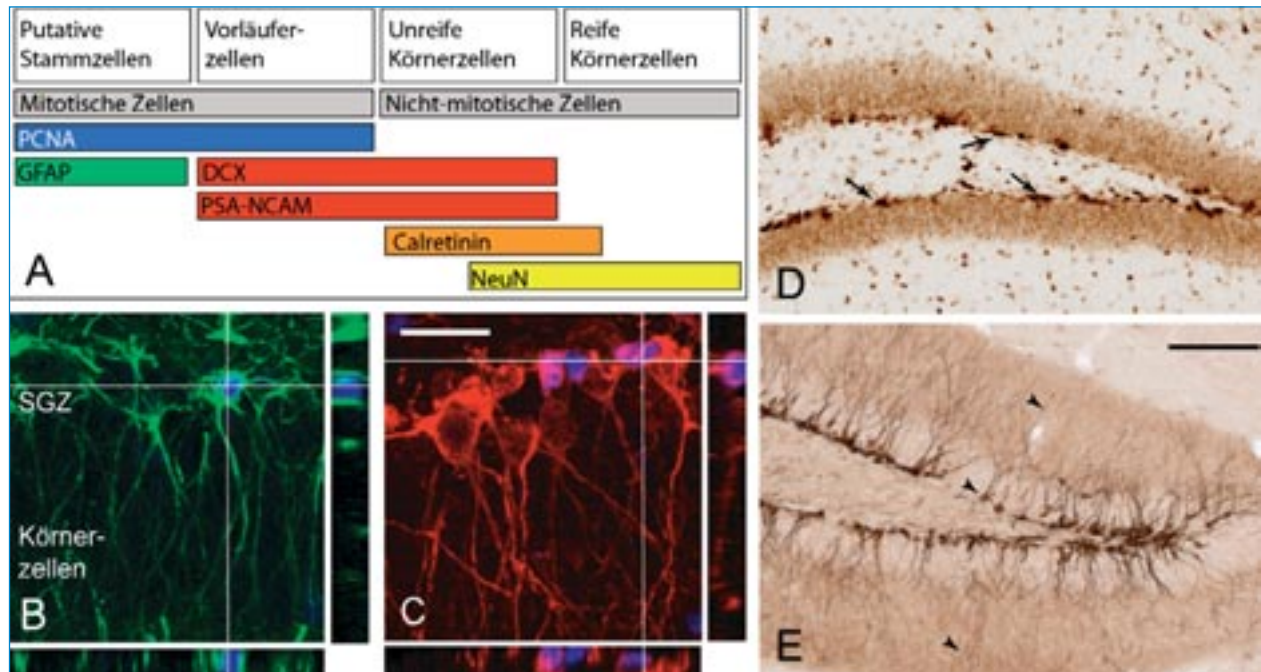
Was ist Neurogenese und wo findet sie statt?

In zwei Regionen des erwachsenen Gehirns, im Riechkolben und im Gyrus dentatus des Hippokampus, werden kontinuierlich neue Neuronen generiert. Das Neuronenwachstum ist kein statischer Prozess, sondern eine adaptive Antwort auf Stimuli aus der Umgebung. Neben der morphologischen, molekularen und synaptischen Veränderung einzelner Neurone stellt Neurogenese somit einen zusätzlichen Mechanismus dar, wie Netzwerke des Gehirns verändert und angepasst werden können. Im Gyrus dentatus teilen sich Stammzellen und neuronale Vorläuferzellen in der subgranulären Zone (SGZ). Stammzellen sind spezielle Astrozyten (Radialglia) die sich asymmetrisch teilen. In dieser Teilung entstehen eine neue Stammzelle und eine neuronale Vorläuferzelle, welche dann vorübergehend in eine Phase hoher Proliferationsrate tritt. In dieser Phase teilen sich die Vorläuferzellen symmetrisch, das heisst sie produzieren viele identische Tochterzellen. Hochrechnungen über die Anzahl der dabei entstehenden Neuronen reichen von etwa 1000 Neuronen pro Tag beim Affen [23] bis zu etwa 9000 Neuronen pro Tag bei der Ratte [24]. Ein Grossteil dieser Neuronen wird jedoch nicht ins Netzwerk integriert und stirbt nach kurzer Zeit wieder ab [25]. Die überlebenden Zellen werden innerhalb von einigen Wochen vollständig funktionell. Während dieser Reifezeit exprimieren die jungen Neuronen spezifische Proteine (**Abbildung A**), welche immunhistochemisch detektierbar sind. Durch das Anfärben dieser Proteine kann man junge Neuronen von Astrozyten unterscheiden, die ebenfalls kontinuierlich im Nervensystem entstehen. Während der Zellteilung produzieren alle Zellen des Nervensystems PCNA und Ki-67. Reifen sie zu Astrozyten, beginnen sie etwa 14 Tage nach ihrer Teilung „glial fibrillary acidic protein“ (GFAP) zu produzieren (**Abbildung B**). Entwickeln sich die Zellen aber zu Neuronen, so beginnen sie noch während sie PCNA-positiv sind, – zu einem frühen Zeitpunkt nach der Teilung also – DCX (Doublecortin) und PSA-NCAM („polycyalic acid“-NCAM) zu exprimieren (**Abbildung C, E**). Etwas später produzieren sie vorübergehend ein Calcium-bindendes Protein, Calretinin und schliesslich NeuN, einen

zu Neuronen differenzieren (siehe **Box 1**), bleibt aber weiterhin unklar, ob diese Zellproliferation die Bildung neuer Neuronen oder neuer Astrozyten zur Folge hat. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass resektiertes Hippokampusgewebe Vorläuferzellen enthält, die sich in Kultur weiter teilen und Neuronen produzieren [5]. Ob diese Proliferation auch in vivo stattfindet, ist weiterhin unklar. Andererseits gibt es Hinweise dafür, dass die Dispersion der Körnerzellen im Gyrus dentatus die Struktur der SGZ und dadurch die Zahl der proliferierenden Zellen beeinträchtigen könnte [11]. Es ist also wei-

Marker adulter Neuronen (**Abbildung A**). Diese Proteine können gleichzeitig mit Antikörpern markiert werden, an die unterschiedliche Fluorochrome gebunden sind. Auf diese Art wird detektiert, ob eine Zelle, die sich in

der SGZ teilt, PCNA-positiv, DCX- oder GFAP-positiv ist, ob sie sich also zu einem Neuron (DCX) oder einem Astrozyten (GFAP) entwickelt (**Abbildung B-C**).



Abbildungen:

A) Schematische Darstellung der zelltypspezifischen Marker, die während verschiedener Phasen der Entwicklung von Zellen der SGZ exprimiert werden. Nach der letzten Teilung beginnt die neuronale Differenzierung, die bei Mausneuronen etwa zwei bis drei Wochen dauert.

B und C)

Beispiele von Doppel-Immunofluoreszenz-Färbungen für PCNA (blau) und GFAP (grün) respektive DCX (rot). PCNA markiert den Kern von Zellen, die sich teilen; GFAP markiert Stammzellen und Astrozyten, und DCX Vorläuferzellen und unreife Körnerzellen. Anhand deren Morphologie erkennt man folglich in B die PCNA/GFAP-positiven Stammzellen und in C die PCNA/DCX-positiven proliferierenden, neuronalen Vorläuferzellen. Entlang der weissen Linien sind die Zellen dreidimensional dargestellt.

D) Übersicht der Verteilung von PCNA-positiven Zellkernen (Pfeile) in der SGZ einer Kontrollmaus. Nach der Teilung wird PCNA nur wenige Tage im Zellkern exprimiert und deshalb sind nur die proliferierenden Zellen dunkel angefärbt.

E) Verteilung der DCX-positiven Zellen im Gyrus dentatus. Im Gegensatz zu PCNA zeigt die Färbung den Zellkörper und die Dendriten (Pfeilköpfe) von Körnerzellen während ihrer Reifung. Da DCX im Gegensatz zu PCNA während der drei Wochen neuronaler Reifezeit in den Zellen erhalten bleibt, ist die Anzahl der abgefärbten Zellen in E wesentlich grösser als in D. Balken: B, C, 20 µm; D-E, 0,1 mm.

terhin zweifelhaft, ob Neurogenese bei chronischer TLEHS stimuliert wird.

Was haben wir von Tiermodellen gelernt?

Bei Nagetieren können epileptische Anfälle durch zwei grundsätzlich verschiedene Stimuli ausgelöst werden. Wiederholte elektrische Stimulationen im Bereich des Hippokampus und des Mandelkerns induzieren spontane epileptische Anfälle. Chemische Substanzen,

die Nervenzellen stark erregen, lösen einen Status epilepticus aus, auf den in manchen Tiermodellen chronische Anfälle folgen. Neurogenese wird in den verschiedenen Tiermodellen für Epilepsie jedoch unterschiedlich beeinflusst. Im Allgemeinen ist die Teilungsaktivität in der SGZ nach elektrisch ausgelösten, akuten Anfällen und nach einem Status epilepticus erhöht [12-15]. Dabei differenziert ein grosser Teil der proliferierenden Zellen zu Neuronen.

Experimentell ausgelöste, akute Anfälle haben aber nur wenig gemeinsam mit chronischen Anfällen von

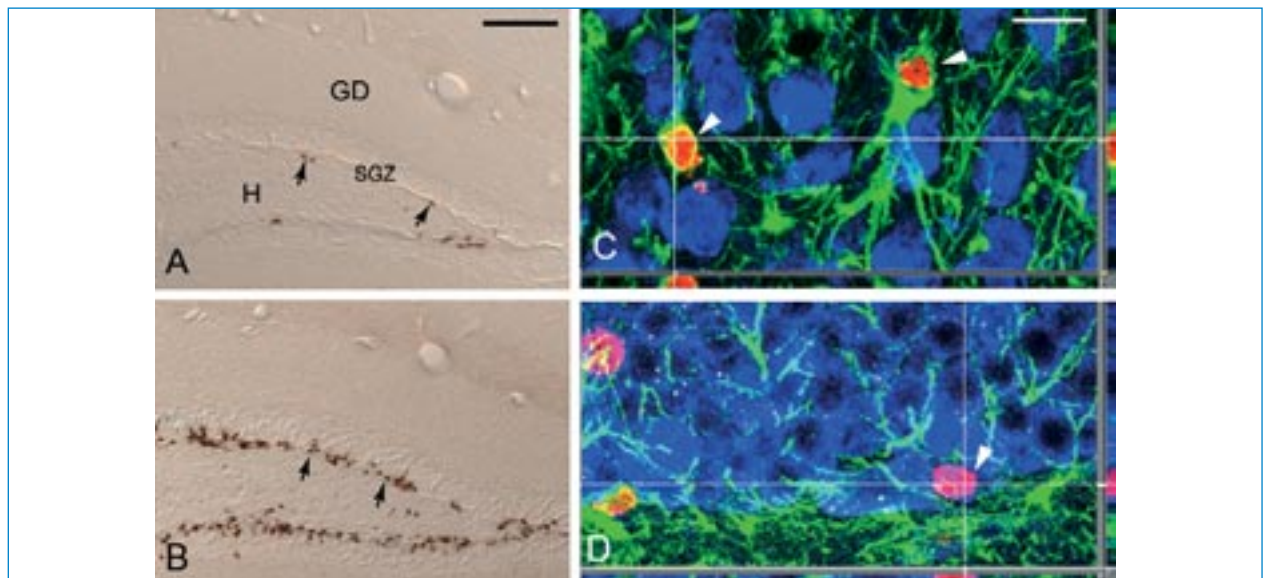
Box 2:

BrdU; die Visualisierung junger Neurone zu unterschiedlichen Zeitpunkten

Bevor sich eine Zelle teilen kann, verdoppelt sie ihr Erbgut, das heißt ihre DNS wird vor der Teilungsphase repliziert. Als erste Markierungsmethode der Zellteilung wurden daher radioaktiv markierte DNS-Bausteine (Basen) verwendet, welche bei der Replikation in die neu entstehende Doppelhelix eingebaut werden, solange sie in ausreichender Konzentration im Organismus vorhanden sind. Zu einem späteren Zeitpunkt kann die Verteilung von Zellen, die radioaktive Basen inkorporiert haben, histologisch untersucht werden. Diese Methode ist aber aufwändig und nicht besonders sensitiv. Heute wird eine prinzipiell ähnliche aber einfachere Methode angewendet: eine mit Brom versehene Base, Bromo-deoxy-Uridin (BrdU), wird dem lebenden Tier verabreicht. Alle Zellen, die sich kurz nach diesem Zeitpunkt teilen, inkorporieren BrdU, und da die DNS sehr stabil ist, bleibt BrdU in den Tochterzellen über längere Zeit nachweisbar. Wird das Gewebe zu einem späteren Zeitpunkt untersucht, können die BrdU-positiven Zellen immunhistochemisch nachgewiesen werden (Abbildung A).

Das Besondere an dieser Methode ist, dass nur eine kleine Zellpopulation durch BrdU markiert wird und

dass diese Zellen später zu einem gewählten Zeitpunkt wieder gefunden und untersucht werden können. Damit können drei Parameter bestimmt werden: 1) Die Proliferationsrate; wenn das Gewebe einige Stunden nach der BrdU-Verabreichung untersucht wird, sind die BrdU-positiven Tochterzellen noch nicht differenziert. Die Zahl dieser Zellen gibt aber einen Hinweis über die Kinetik der Zellteilung (Proliferationsrate). 2) Die Differenzierung von Tochterzellen: einige Wochen nach der BrdU-Verabreichung sind die Tochterzellen differenziert. Mit spezifischen Markern kann dann detektiert werden, welcher Zelltyp am Tag der BrdU-Verabreichung gebildet worden war (Abbildung C, D). Im Gehirn sind dies entweder Neuronen oder Gliazellen (Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikroglia). 3) Das Schicksal der neugeborenen Zellen kann unter pathologischen Umständen, zum Beispiel im epileptischen Gewebe, verändert sein. Der Vergleich von gesundem und krankem Gewebe zeigt, ob die Differenzierung oder das Überleben der Zellen, die am Tag der BrdU-Verabreichung geboren worden sind, durch die Krankheit beeinflusst wurden (Abbildung A, B). Mit dieser Methode wurde nachgewiesen, dass die Körnerzelldispersion in der experimentellen TLE die Neurogenese stark beeinträchtigt (siehe Abbildungen).



Abbildungen:

- A) BrdU-markierte Zellen (Pfeile) in der SGZ einer Kontrollmaus. BrdU wurde einen Tag zuvor verabreicht und markiert die Zellen, die sich zu diesem Zeitpunkt teilten.
B) Erhöhte Zellproliferation im intakten Hippokampus 7 Tage nach Status epilepticus, gezeigt durch die grössere Zahl von BrdU-positiven Zellen gegenüber Kontrolle.

C und D)

Dreifach-Immunfluoreszenz-Färbung von BrdU (rot), GFAP (grün; Marker für Astrozyten) und NeuN (blau;

Marker für reife Neuronen) im Gyrus dentatus einer mit Kainat injizierten Maus. BrdU wurde 4 Wochen vor der Analyse des Gewebes verabreicht, sodass nur differenzierte Zellen untersucht werden konnten. Die dreidimensionale Darstellung (entlang der weissen Linien) zeigt auf der Seite der Läsion (Bild C), dass die BrdU-Zellen zu Astrozyten geworden sind (Pfeilköpfe). Die gleiche Färbung in der kontralateralen, unbehandelten Seite zeigt, dass viele BrdU-positiv Zellen zu Neuronen differenziert haben (Pfeilkopf).
Balken: A, B, 0,1 mm; C, D, 20 µm.

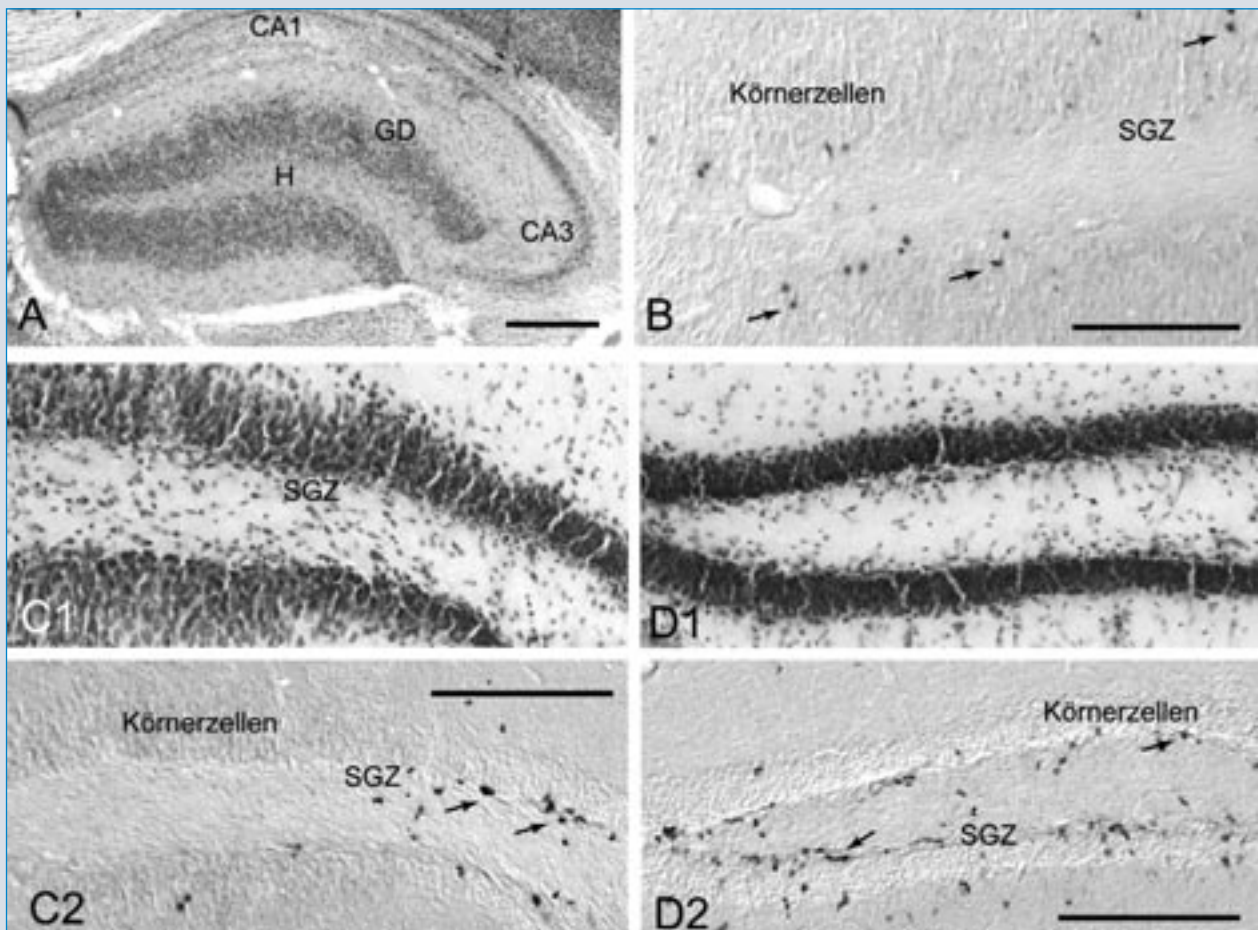


Abbildung 2: Zusammenhang zwischen Körnerzelldispersion und Zellproliferation im Maus-Kainat-Modell der TLE.

A) Fotografie des Hippokampus einer chronisch epileptischen Maus (Nissl-Färbung). Im Vergleich zum normalen Hippokampus (siehe Abbildung 1) sind die meisten Neuronen in CA1 abgestorben und die Körnerzellen im GD sind infolge ihrer Dispersion viel weniger dicht gepackt.

B) Markierung von proliferierenden Zellen mit BrdU nach dem Beginn der Körnerzelldispersion. Nur vereinzelte BrdU-positive

Zellkerne sind im Gyrus dentatus sichtbar (Pfeile) und viele von ihnen sind nicht in der SGZ lokalisiert.

C1-C2 und D1-D2) Zwei Beispiele von Schnittpaaren mit einer unvollständigen beziehungsweise fehlenden Körnerzelldispersion (C1, D1: Nissl-Färbung; C2, D2, Färbung für BrdU). Während in der intakten SGZ viele BrdU-positive Zellkerne sichtbar sind (Pfeile), fehlen sie vollkommen in Bereichen mit ausgeprägter Körnerzelldispersion. Balken: 0,1 mm.

Epilepsie. Untersuchungen von TLE-Modellen in der Ratte zeigen, dass chronische Anfälle zwar die Neurogenese im Hippokampus stimulieren, erstaunlicherweise aber ein Teil der jungen Neuronen nicht regulär in die Körnerzellschicht (**Abbildung 1**) migrieren, sondern in den Hilus des Gyrus dentatus abwandern. Diese neu gebildeten Körnerzellen werden in der Folge in falsche neuronale Netzwerke integriert [16, 17]. Diese falsch gebauten Schaltkreise erhöhen, der aktuellen Hypothese zufolge, die Erregbarkeit des Gyrus dentatus und des Hippokampus und begünstigen somit die epileptische Aktivität des Hippokampus. Die erhöhte Stimulation zur Zellteilung während der Epilepsie kann somit verheerende Auswirkungen auf die Entwicklung des epileptischen Fokus haben. Zusätzlich zeigen diese Beobachtungen, dass adulte Stammzellen nicht in jeder Krankheit fehlende Zellen ersetzen, sondern dass sie sich in gewissen Fällen an der Entwicklung einer Krank-

heit sogar beteiligen können.

In einem anderen Maus-Modell für TLE-HS wurde jedoch gezeigt, dass die Neurogenese infolge der Körnerzelldispersion stark unterdrückt wird. In diesem Modell wird durch lokale Applikation eines Nervengifts, des so genannten Kainats, eine kleine Läsion unilateral im Hippokampus erwachsener Mäuse gesetzt (siehe Fritschy, *Epileptologie* 2004; 21: 21-28). Diese Injektion löst eine Degenerationskaskade aus, und nach 2 bis 3 Wochen entwickeln die Mäuse spontane, fokale Anfälle. Die auffälligsten morphologischen Veränderungen des Kainat-Modells sind (1) der Zellverlust im CA1-Bereich des Hippokampus, (2) der Verlust inhibitorischer Interneurone im Hilus und (3) die Dispersion der Körnerzellen im Gyrus dentatus [18, 19] (**Abbildung 2**). Damit spiegelt dieses Modell drei wichtige Merkmale der TLE-HS wider und ist von besonderer Bedeutung für die Erforschung der Neurogenese.

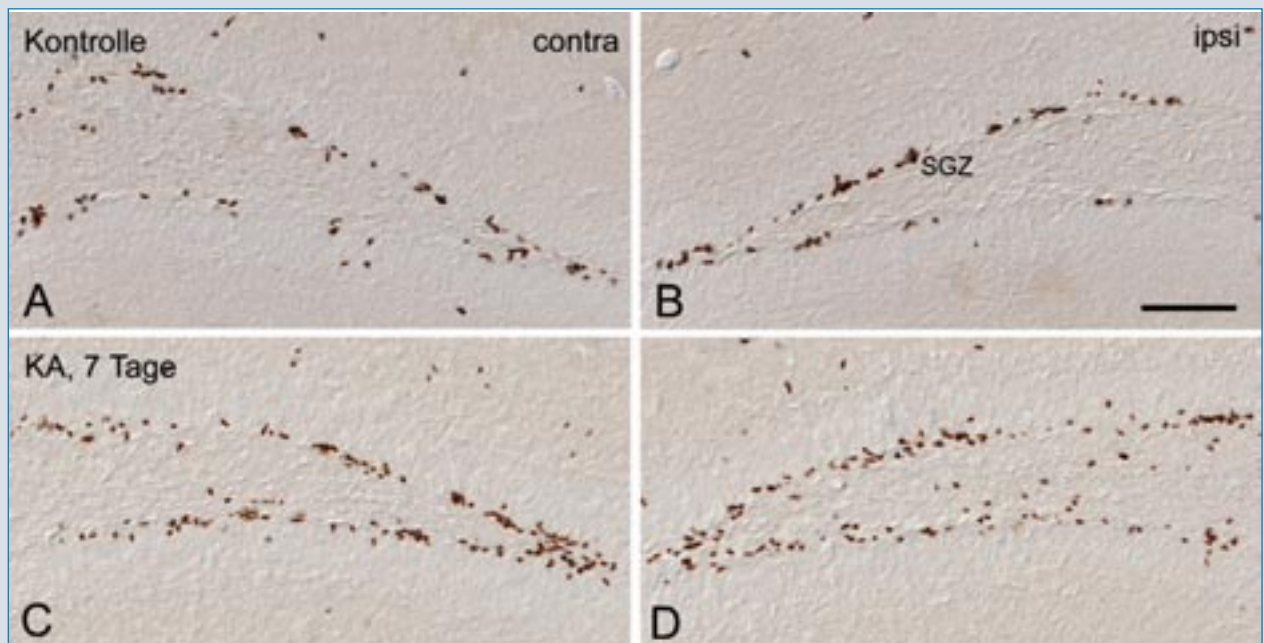


Abbildung 3: Proliferation von BrdU-markierten Zellen induziert durch Kainat-induzierten Status epilepticus. In diesem Experiment wurden Mäuse zuerst mit BrdU behandelt, um proliferierende Zellen in der SGZ zu markieren. Ein Tag danach wurden sie im rechten Hippokampus mit physiologischer Kochsalzlösung (Kontrolle) respektive mit Kainat (KA) injiziert. KA löste einen Status epilepticus aus und stimulierte damit beidseitig die Zellproliferation in der SGZ. A-B) Verteilung von BrdU-positiven Zellen in der SGZ sieben Tage nach der Injektion physiologischer Kochsalzlösung.

Die BrdU-Markierung zeigt ähnliche Zahlen von Zellkernen in beiden Seiten des Gehirns (kontralateral: unbehandelte Seite; ipsilateral: mit Kainat behandelte Seite).

C-D) Erhöhte Zahl von BrdU-markierten Zellen 7 Tage nach Kainatsäureinjektion. Die Erhöhung gegenüber der Kontrolle zeigt, dass die Kainatsäureinjektion die weitere Proliferation von BrdU-markierten Zellen stimulierte. Da der gleiche Effekt auf beiden Hirnseiten zu sehen ist, schliesst man daraus, dass Kainat nicht toxisch auf Vorläuferzellen wirkt.

Balken: 0,1 mm.

Akut löst die Kainatinjektion einen nichtkonvulsiven Status epilepticus aus. Wie in andern Epilepsiemodellen ist die Zellproliferation auf beiden Seiten des Gehirns während 3 bis 7 Tagen stark erhöht, wie die Quantifizierung von BrdU-markierten Zellen durch Kralic et al. [20] zeigte (siehe **Box 2**). Die neu gebildeten Zellen erfahren aber in jeder Hirnhälfte ein unterschiedliches Schicksal. Im gesunden Hippokampus differenzieren sie zu Neuronen, während im läsierten Hippokampus vor allem Astrozyten entstehen (Astrogliose). Ferner ist die Zellproliferation im läsierten Hippokampus nur kurzlebig, denn 7 bis 10 Tage nach Injektion von Kainat werden keine BrdU-positiven Zellen mehr gefunden. Konkret bedeutet dies, dass Neurogenese durch den Status epilepticus zwar stimuliert ist, dass sie aber auf der injizierten Seite infolge der Läsion verhindert wird. Auch in späteren Phasen, wenn die Mäuse chronisch epileptisch werden, sind Zellproliferation und Neurogenese im läsierten Hippokampus nicht mehr nachweisbar [20]. Der Rückgang von sich teilenden Zellen findet in denselben Regionen des Gyrus dentatus statt wie die Körnerzelldispersion (**Abbildung 2**). Dies lässt vermuten, dass die Fähigkeit zur Neurogenese in der SGZ als Folge der Dispersion verloren geht.

Zusammengefasst gibt es im Tiermodell viele Hinweise darauf, dass epileptische Anfälle die Neurogenese

stimulieren. Ein Teil der neugebildeten Zellen wird vermutlich in falsche Netzwerke integriert, was die Epileptogenese begünstigen könnte. Diese Neurogenese findet aber nur statt, solange die SGZ im Gyrus dentatus nicht beeinträchtigt ist.

Die Körnerzelldispersion behindert die Neurogenese

Da die Epilepsie in der Maus durch Injektion einer toxischen Substanz, des Kainats, ausgelöst wird, ist die Ursache der Krankheit ganz anders als beim Menschen. Es wäre also durchaus vorstellbar, dass die Zellproliferation und die Neurogenese in der SGZ verschwinden, weil Vorläuferzellen durch Kainat zerstört werden. Um diese Möglichkeit auszuschliessen und die vermutete Rolle der Körnerzelldispersion bei der Suppression der Neurogenese im epileptischen Hippokampus besser zu verstehen, wurde das Schicksal von Zellen untersucht, welche sich kurz vor der Kainatinjektion geteilt hatten [21]. Zu diesem Zweck wurden Mäuse zuerst drei Tage mit BrdU behandelt, welches eine Population von proliferierenden Zellen in der SGZ markierte. Einen Tag später wurden Kainat intrahippokampal injiziert und die Hippokampi der Mäuse an verschiedenen Tagen nach

der Injektion untersucht. Überraschenderweise fand man einen Tag nach der Kainatinjektion die gleiche Anzahl BrdU-positiver Zellen im injizierten wie im kontralateralen Hippokampus, der als negative Kontrolle diente. Zu späteren Zeitpunkten nahm die Anzahl BrdU-Zellen auf beiden Seiten in gleichem Masse vorübergehend zu, was zeigt, dass Kainat die Vorläuferzellen nicht abtötet, sondern zur Proliferation stimuliert (**Abbildung 3**). Eine genaue Charakterisierung der neugeborenen Zellen 7 und 14 Tage nach der Kainat-Läsion zeigte, dass die Zellen, die sich vor der Kainatinjektion geteilt hatten, mehrheitlich zu Neuronen ausdifferenzierten. Die Läsion hatte also keinen Einfluss auf das Schicksal von Zellen, die eine neuronale Differenzierung bereits begonnen hatten. Im Gegensatz dazu war es für Zellen, die sich nach der Kainatinjektion teilten, unmöglich, zu Neuronen auszuwachsen. Basierend auf dem aktuellen Stand des Wissens geht man davon aus, dass die Neurogenese aufgrund struktureller Veränderungen in der SGZ verhindert wird [21]. Diese Veränderungen beinhalten sowohl die Dispersion der Körnerzellschicht als auch den Verlust inhibitorischer Zellen im Hilus. Die korrekte Anordnung der Körnerzellen ist wichtig für die Interaktion zwischen Stamm- und Vorläuferzellen und für deren Migration, während die Interneuronen des Hilus den für die Reifung essentiellen Botenstoff GABA liefern [22]. Im Mausmodell für TLE-HS sind diese Signalwege ausgeschaltet und die Neurogenese wohl deshalb verunmöglicht.

Schlussfolgerungen

Erkenntnisse aus Tiermodellen dürfen nur mit Vorbehalt auf die menschliche Krankheit übertragen werden. Trotzdem können wir aufgrund unserer Arbeiten schliessen, dass die Hemmung der Neurogenese nicht auf die Toxizität von Kainat zurückzuführen ist, sondern vielmehr auf eine Beeinträchtigung der strukturellen Integrität der SGZ. Neurogenese kann also nur durch epileptische Anfälle stimuliert werden, solange die SGZ intakt ist. Bei Patienten mit TLE-HS ist es jedoch wahrscheinlich, dass die Neurogenese ebenfalls beeinträchtigt ist, insbesondere in Fällen mit einer ausgeprägten Körnerzelldispersion. Dies sollte in weiteren Studien an menschlichem Hirngewebe eingehend untersucht werden.

Referenzen

1. Blumcke I, Thom M, Wiestler OD. Ammon's horn sclerosis: a maldevelopmental disorder associated with temporal lobe epilepsy. *Brain Pathol* 2002; 12: 199-211
2. Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998; 4: 1313-1317
3. Thom M, Sisodiva SM, Beckett A et al. Cytoarchitectural abnormalities in hippocampal sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; 61: 510-519
4. Crespel A, Rigau V, Coubes P et al. Increased number of neural progenitors in human temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease* 2005; 19: 436-450
5. Moe MC, Varghese M, Danilov AI et al. Multipotent progenitor cells from the adult human brain: neurophysiological differentiation to mature neurons. *Brain* 2005; 128: 2189-2199
6. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 1965; 124: 319-335
7. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992; 255: 1707-1710
8. Richards LJ, Kilpatrick TJ, Bartlett PF. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 8591-8595
9. Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS et al. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 1993; 56: 337-344
10. Blumcke I, Schewe JC, Normann S et al. Increase of nestin-immunoreactive neural precursor cells in the dentate gyrus of pediatric patients with early-onset temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 2001; 11: 311-321
11. Pirttila TJ, Manninen A, Jutila L et al. Cystatin C expression is associated with granule cell dispersion in epilepsy. *Ann Neurol* 2005; 58: 211-223
12. Bengzon J, Kokaia Z, Elmer E et al. Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 10432-10437
13. Nakagawa E, Aimi Y, Yasuhara O et al. Enhancement of progenitor cell division in the dentate gyrus triggered by initial limbic seizures in rat models of epilepsy. *Epilepsia* 2000; 41: 10-18
14. Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT et al. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 1997; 17: 3727-3738
15. Radley JJ, Jacobs BL. Pilocarpine-induced status epilepticus increases cell proliferation in the dentate gyrus of adult rats via a 5-HT1A receptor-dependent mechanism. *Brain Res* 2003; 966: 1-12
16. Pierce JP, Melton J, Punsoni M et al. Mossy fibers are the primary source of afferent input to ectopic granule cells that are born after pilocarpine-induced seizures. *Exp Neurol* 2005; 196: 316-331
17. Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL. Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. *J Neurosci* 2000; 20: 6144-6158
18. Bouilleret V, Ridoux V, Depaulis A et al. Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice: EEG, histopathology and synaptic reorganization similar to mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 1999; 89: 717-729
19. Riban V, Bouilleret V, Pham-Le BT et al. Evolution of hippocampal epileptic activity during the development of hippocampal sclerosis in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 2002; 112: 101-111
20. Kralic J, Ledergerber DA, Fritschy JM. Disruption of the neurogenic potential of the dentate gyrus in a mouse model of temporal lobe epilepsy

- with focal seizures. *Eur J Neurosci* 2005; 22: 1916-1927
21. Ledergerber DA, Fritschy JM, Kralic JE. Impairment of dentate gyrus neuronal progenitor cell differentiation in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol* 2006; 199: 130-142
 22. Tsukada M, Proschka A, Ungewickell E et al. Doublecortin association with actin filaments is regulated by neurabin II. *J Biol Chem* 2005; 280: 11361-11368
 23. Kornack DR, Rakic P. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5768-5773
 24. Cameron HA, McKay RD. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 2001; 435: 406-417
 25. Dayer AG, Ford AA, Cleaver KM et al. Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 2003; 460: 563-572

Korrespondenzadresse:
Prof. Jean-Marc Fritschy
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Universität Zürich
Winterthurerstrasse 190
CH 8057 Zürich
Tel. 0041 44 41 635 5926
Fax 0041 44 41 635 6874
fritschy@pharma.unizh.ch