

Diplomarbeit

**Einfluss von Umweltfaktoren auf synaptische
Veränderungen im Mausgehirn in Abhängigkeit
von Neuropeptid Y**

eingereicht von

Vanessa Wegerer

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor(in) der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut für Zellbiologie, Histologie und Embryologie

unter der Anleitung von

Ass. Prof. Priv.-Doz. Mag. Dr.rer.nat. Leitinger Gerd

Dr.med.univ. Reichmann Florian PhD

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 21. Jänner 2016

Vanessa Wegerer eh

Danksagungen

Ich möchte mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Gerd Leitinger und Dr. Florian Reichmann für ihre ausgezeichnete Betreuung bedanken. Sie nahmen sich bei Problemen sofort Zeit für mich und haben mich bestens beim Erstellen der Diplomarbeit begleitet.

Außerdem möchte ich mich bei Elisabeth Bock für die Aufbereitung der Proben und bei Daniel Kummer für seine Hilfe bei technischen Problemen bedanken.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer unterstützt und mir das Studium ermöglicht haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Großeltern und meinem Onkel Peter für ihre finanzielle Unterstützung während meines Studiums.

Speziell bedanken möchte ich mich bei meinem Freund, der auch in stressigen Zeiten für mich da war, nie die Geduld mit mir verloren hat und sich um meine kulinarische Verpflegung gekümmert hat.

Danke, an Prinzessin Nala, meine Lieblingshündin, die mir Ruhe und Zuneigung entgegengebracht hat. Und danke, an meinen Bruder Gernot, der mich gelehrt hat, auch mit schwierigen Menschen Geduld zu haben. Ich wünsche ihm für seine Eishockeykarriere viel Erfolg!

Zusammenfassung

Hintergrund: Environmental Enrichment (EE) und Neuropeptid Y (NPY) haben ähnliche Effekte auf das Gehirn und Verhalten von Nagetieren. Beides führt zu einer Stimulation der Neurogenese, wirkt angstmindernd und verbessert die Lern – und Merkfähigkeit.

Fragestellungen: Basierend auf diesen Erkenntnissen stellte sich nun die Frage ob die Effekte von EE durch NPY ausgelöst werden und wie sich diese Effekte auf die hippocampale Ultrastruktur des Gyrus Dentatus bei Mäusen auswirken. Außerdem wurden die Auswirkungen von EE und der genetische Deletion von NPY auf Anzahl und Struktur der Synapsen und Dense Core Vesikel untersucht.

Methoden: Die Wildtype und NPY KO Mäuse wurden 10 Wochen lang unter EE oder Standard Environment gehalten. In der 9. und 10. Woche wurde ein Verhaltenstest im Barnes Maze durchgeführt und 30 Minuten nach dem letzten Test wurden die Mäuse euthanasiert, ihre Gehirne entnommen und für die Elektronenmikroskopie vorbereitet. Mit dem Elektronenmikroskop wurden pro Maus 40 Bilder des Gyrus Dentatus gemacht, und diese dann in Bezug auf Anzahl von Synapsen und Dense Core Vesikel ausgewertet. Außerdem wurden 20 Synapsen pro Tier genauer vermessen und ausgewertet.

Ergebnisse: Wie erwartet führte EE zu vielen verschiedenen Effekten. EE erhöhte die Zelldichte ($P < 0,05$), während die Anzahl der Dense Core Vesikel durch EE stark reduziert wurde ($P < 0,05$). Im Gegensatz dazu wurde die Anzahl der Synapsen pro Neuron durch EE nicht beeinflusst, aber die Breite des synaptischen Spaltes wurde bei WT Mäusen durch EE verbreitert und bei NPY KO verringert ($P < 0,01$). Die Anzahl der gedockten Vesikel wurde weder durch EE noch durch NPY beeinflusst, wohingegen die Anzahl der ungedockten Vesikel bei NPY KO Mäusen vergrößert war ($P < 0,01$). Die Länge der präsynaptischen Membran und der postsynaptischen Dichte blieben unverändert.

Schlussfolgerung: EE führt zu deutlichen ultrastrukturellen Veränderungen im Hippocampus wobei manche davon unabhängig von NPY stattfinden, andere aber wie zum Beispiel die Breite des synaptischen Spaltes von NPY abhängig sind. Diese Erkenntnisse verbessern unser Verständnis der Neuroplastizität, welche durch EE ausgelöst wird.

Abstract

Background: Environmental enrichment (EE) and neuropeptide Y (NPY) have similar effects on the brain and behavior of mammals. For example, both lead to a stimulation of neurogenesis, ultrastructural modifications of synapses, anxiolytic effects and improved learning and memory capabilities.

Aims: Based on these findings, this thesis dealt with the question whether the effects of EE are mediated by NPY. Specifically I investigated if EE leads to any NPY dependent effects on the hippocampal ultrastructure in mice. Furthermore, the impact of EE and the genetic deletion of NPY on the number and structure of synapses and dense-core vesicles was investigated.

Methods: Wildtype and NPY KO mice were housed in standard housing conditions or EE for 10 weeks. During week 9 and 10, mice were tested in the Barnes Maze and sacrificed 30 minutes after the last test. Their brains were removed and prepared for electron microscopy. With the electron microscope images of the Dentate Gyrus were taken and analyzed regarding the number of synapses and dense core vesicles. Additionally 20 synapses per animal were measured more precisely and analyzed as well.

Results: As expected, EE resulted in a number of different effects. EE increased the numerical density of neurons ($P < 0,05$), while the number of dense-core vesicles per neuron was significantly reduced by EE. In contrast, EE didn't have an influence on the number of synapses per neuron, but EE increased the synaptic cleft width in WT animals and decreased it in NPY KO animals ($P < 0,01$). The number of docked vesicles was neither influenced by EE nor NPY, but the number of undocked vesicles was increased in NPY KO animals ($P < 0,01$). The length of presynaptic membrane and postsynaptic density was not altered by EE or NPY.

Conclusion: EE leads to significant ultrastructural changes in the hippocampus. Some of these changes are independent of NPY, while others like the width of the synaptic cleft are dependent on this peptide. The findings from this thesis improve our knowledge regarding the neuroplasticity induced by EE.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	ii
Zusammenfassung	iii
Abstract	iv
Inhaltsverzeichnis	v
Glossar und Abkürzungen	vii
Tabellenverzeichnis	ix
1 Einleitung	1
1.1 <i>Thema und Ziel dieser Diplomarbeit</i>	1
1.2 <i>Environmental Enrichment</i>	2
1.2.1 Auswirkungen von EE	3
1.3 <i>NPY</i>	4
1.3.1 NPY und seine Rezeptoren	4
1.3.2 Auswirkung von NPY	4
1.3.3 NPY und neurodegenerative Erkrankungen	5
1.3.4 NPY als ein potentiell es Medikament für psychiatrische Erkrankungen	6
1.4 <i>Gyrus Dentatus</i>	6
1.5 <i>Ultrastruktur von Synapsen</i>	8
1.5.1 Synaptische Vesikel	9
1.5.2 Dense Core Vesikel	10
1.5.3 Synaptische Vesikeln und Dense Core Vesikel: Unterschiede und Gemeinsamkeiten in Aufbau und Funktion	10
1.6 <i>Verhaltensversuche</i>	11
2 Material und Methoden	13
2.1 <i>Versuchstiere</i>	13
2.2 <i>Versuchsprotokoll</i>	13
2.3 <i>Standard und Enriched Environment</i>	14
2.4 <i>Probenvorbereitung</i>	15
2.5 <i>Lichtmikroskopie</i>	16
2.6 <i>Transelektronenmikroskop</i>	17
2.7 <i>Auszählen und Vermessen der Synapsen und Dense Core Vesikel</i>	20
2.8 <i>Statistik</i>	22
3 Ergebnisse – Resultate	23

3.1	<i>Zelldichte</i>	23
3.2	<i>Anzahl der Synapsen pro Zelle</i>	24
3.3	<i>Anzahl der Dense Core Vesikel pro Zelle</i>	25
3.4	<i>Breite des synaptischen Spaltes</i>	26
3.5	<i>Anzahl der gedockten Vesikel</i>	27
3.6	<i>Anzahl der ungedockten Vesikel</i>	28
3.7	<i>Länge der präsynaptischen Membran</i>	29
3.8	<i>Länge der postsynaptischen Density</i>	30
4	Diskussion	31
4.1	<i>Anxiolytische Effekte von EE werden durch NPY beeinflusst</i>	32
4.2	<i>Effekte von EE unabhängig von Genotyp, Auswirkungen auf Neurogenese</i>	33
4.3	<i>Negative Effekte von EE für NPY KO Mäuse</i>	34
4.4	<i>Effekte von NPY KO welche unabhängig von Haltungsbedingungen sind</i>	35
4.5	<i>Schlussfolgerung</i>	36
5	Literaturverzeichnis	38

Glossar und Abkürzungen

BDNF	Brain derived neurotrophic factor
CRH	Corticotropin- releasing hormone
CRHR1	Corticotropin- releasing hormone receptor type 1
CORT	Corticosteron
DCV	Dense Core Vesikel
DG	Dentate Gyrus, Gyrus Dentatus
DGpl	Dentate Gyrus polymorph cell layer, Hilus des Gyrus Dentatus
EE	Environmental Enrichment
HICAP Zellen	Hilar commissural- associational pathway related cells
HIPP Zellen	Hilar perforant path-associated cells
NPY	Neuropeptid Y
NPY KO	Neuropeptid Y Knock Out
ROI	Region of Interest
RP	Recycling Pool
RRP	Readily Releasable Pool
RtP	Resting Pool
SE	Standard Environment
TRP	Total Recycling Pool
WT	Wildtype

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ablaufdiagramm	14
Abbildung 2: Lichtmikroskopiebild	17
Abbildung 3: Elektronenmikroskopiebild mit Raster	19
Abbildung 4: Elektronenmikroskopiebild mit 2 Synapsen	19
Abbildung 5: Elektronenmikroskopiebild mit DCV	19
Abbildung 6: Vermessen einer Synapse	21
Abbildung 7: Vermessen eines synaptischen Spaltes	21
Abbildung 8: Zelldichte (1)	23
Abbildung 9: Anzahl der Synapsen pro Zelle (1)	24
Abbildung 10: Anzahl der Dense Core Vesikel pro Zelle (1)	25
Abbildung 11: Breite des synaptische Spaltes (1)	26
Abbildung 12: Anzahl der gedockten Vesikel (1)	27
Abbildung 13: Anzahl der ungedockten Vesikel (1)	28
Abbildung 14: Länge der präsynaptischen Membran (1)	29
Abbildung 15: Länge der postsynaptischen Density (1)	30

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Enrichment Protokoll

15

1 Einleitung

1.1 Thema und Ziel dieser Diplomarbeit

Lange Zeit nahm man an, dass der Verlust von Neuronen im humanen adulten Gehirn irreversibel sei, da im erwachsenen Gehirn keine Neurogenese mehr stattfinden kann. Auf die meisten Gehirnregionen trifft das auch zu. Eine Ausnahme bildet der Gyrus Dentatus (DG), wo auch im Erwachsenenalter noch Neuronen gebildet werden können. Nicht nur beim Menschen, sondern auch bei Nagern, Affen und anderen Tieren konnte lebenslange Neurogenese nachgewiesen werden (2). An der Grenze zwischen Hilus und Körnerzellschicht im DG wurden lebenslang neuronale Vorläuferzellen nachgewiesen, welche sich zu funktionierenden Körnerzellen weiterentwickeln (3,4).

Aufgrund von Neurogenese kann sich das Gehirn an Veränderungen in der Umwelt anpassen (5). Hält man Tiere unter Environmental Enrichment (EE), führt das aufgrund von Neurogenese zu verbesserter Lern- und Erinnerungsleistung der Tiere (6). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass EE auch bei bereits erwachsenen Tieren zu vermehrter Neurogenese im Hippocampus führt (6,7). Lu et al. (8) zeigten in einem Experiment mit 22 Tage alten Ratten, welche 4 Wochen lang entweder einzeln oder in Gruppen gehalten wurden, dass Einzelhaltung einen negativen Effekt auf die Tiere hat, welche allerdings durch soziales EE (also Gruppenhaltung) wieder rückgängig gemacht werden konnte. Isolierte Ratten zeigten nämlich eine schlechtere Lernfähigkeit und verminderte Zellproliferation im DG im Vergleich zu den Tieren in Gruppenhaltung. Nach 4 –wöchiger Gruppenhaltung der vorher isolierten Ratten kam es allerdings zu einer Verbesserung der Lernfähigkeit und erhöhter Neurogenese bei diesen Tieren (8).

Nicht nur exogene Faktoren wie EE beeinflussen die Neurogenese im DG, auch endogene Faktoren, wie zum Beispiel Neuropeptid Y (NPY), regulieren die hippocampale Neurogenese. NPY ist ein Neuropeptid, welches im gesamten Zentralnervensystem exprimiert wird und welches neuroproliferative Effekte im adulten Gehirn hat. Durch intrazerebroventrikuläre Injektion von NPY bei adulten Mäusen kommt es zu vermehrter Zellproliferation und neuronaler Differenzierung im DG (4). Zaben et al. (9) verwendeten für ihre Versuche NPY Y1 Rezeptor Knock – Out Mäuse, bei denen es zu einer signifikant verringerten Neurogenese kam.

Wie auch EE, ist NPY wichtig für Lernen und Erinnerung. NPY führt zu verbesserter Erinnerungsfähigkeit und Verbesserung von Lernschwächen (9). Verminderte NPY Level führen außerdem zu vermehrter Ängstlichkeit bei verschiedenen Verhaltenstests, welche

durch Gabe von NPY aufgelöst werden kann (10). Auch EE kann ängstlichem Verhalten entgegenwirken (2,5,10,11).

Aufgrund der also sehr ähnlichen Auswirkungen von EE und NPY auf das Gehirn und das Verhalten entstand nun die Hypothese, dass Effekte von EE durch NPY vermittelt werden könnten. Diese Diplomarbeit befasste sich daher mit der Fragestellung ob EE induzierte Veränderungen in der hippocampalen Ultrastruktur von NPY abhängig sind. Weiters wurde untersucht, ob EE und die genetische Deletion von NPY auch voneinander unabhängige Auswirkungen auf die Anzahl und/oder Struktur der Synapsen im Hippocampus haben.

Dazu wurden Neuropeptid Y Knock – Out Mäuse (NPY KO) und Wildtype (WT) Mäuse für 10 Wochen jeweils in Standard Maushaltung oder EE gegeben und ihre Gehirne auf NPY - abhängige ultrastrukturelle Veränderungen untersucht. In einer zuvor durchgeführten Studie konnte gezeigt werden, dass EE zu ultrastrukturellen Veränderungen im DG führt (11). Deswegen wurde bei dieser Diplomarbeit dieselbe Region untersucht mit der Fragestellung ob EE bei NPY KO Mäusen zu anderen Veränderungen als bei WT Mäusen führt.

Um die Grundlagen dieser Diplomarbeit zu erklären, werde ich nachfolgend kurz EE, NPY und ihre Auswirkungen auf Tiere und Menschen erläutern. Anschließend erkläre ich die für diese Diplomarbeit wichtigsten Gehirnregionen und - strukturen. Da diese Diplomarbeit Teil einer größeren Studie ist (1), bei der auch Verhaltensversuche an Mäusen durchgeführt wurden, werde ich kurz die, für diese Diplomarbeit, wichtigsten Ergebnisse der Verhaltensversuche erklären.

Der größte Teil der Arbeit bestand aus dem praktischen Teil, bei welchem ich die Gehirne der Mäuse unter dem Elektronenmikroskop fotografierte und mit einem speziellen Verfahren (11) die für mich wichtigen Strukturen, Synapsen und Dense Core Vesikel, zählte, vermaß und auswertete.

Zum Schluss werde ich die Ergebnisse meiner Diplomarbeit in Zusammenhang mit den Ergebnissen der erwähnten Studie (1) bringen und mit Ergebnissen anderer Studien vergleichen und diskutieren.

1.2 Environmental Enrichment

EE bedeutet, dass Labortiere einer physischen und/oder sozialen Stimulation ausgesetzt werden, welche größer ist als unter normalen Standard-Maushaltungsbedingungen. EE kann man in zwei Arten einteilen: physisches und soziales Enrichment. Zu physischem Enrichment gehören Veränderungen der Umgebung, wie zum Beispiel ein größerer Käfig,

Gegenstände zur vermehrten Bewegung, zum Spielen und zum Erkunden, aber auch Dinge wie Nistmaterial, mit dem die Labortiere ihre Umgebung selbst verändern können. Soziales Enrichment bedeutet, dass man Tiere in Gruppen hält. Idealerweise kombiniert man soziales und physisches Enrichment (5).

Im Jahr 1940 entdeckte Daniel Hebb, dass Laborratten, welche er frei in seinem Haus herumlaufen lies und wie Haustiere behandelte, Problemstellungen schneller lösen konnten und eine bessere Lernfähigkeit bewiesen als Ratten welche unter Standardbedingungen gehalten wurden. Seit den 1960er Jahren gewinnt EE immer mehr an Bedeutung, da man entdeckte, dass EE auch zu strukturellen Veränderungen im Gehirn führt, wie zum Beispiel eine erhöhte Neurogenese und vergrößerte Zellgröße (5). Diese Veränderungen haben wiederum Auswirkungen auf neurodegenerative Erkrankungen, auf die Erholung nach Gehirnverletzungen und auf psychiatrische Erkrankungen (5).

1.2.1 Auswirkungen von EE

Es wurde gezeigt, dass Ratten welche unter EE gehalten wurden, sich besser an neue Umgebungen anpassen und diese freier als Ratten aus Standardhaltung erkunden. EE führt außerdem zu einer Reduktion des Angstverhaltens und hat einen positiven Effekt auf das Lernen und Erinnerungsvermögen (5).

Auf molekularer Ebene kann EE die Konzentrationen verschiedener Neurotransmitter beeinflussen. EE erhöht unter anderem die Konzentration von 5HT (Serotonin) und Noradrenalin, und vermindert die stressinduzierte Acetylcholin- Ausschüttung. Diese Neurotransmitter werden mit Lernen, neuronaler Plastizität, Emotionalität und Neurogenese im Gehirn in Verbindung gebracht (5).

EE führt bei Tieren zu einem verbesserten Erinnerungsvermögen und besserer Lernfähigkeit, vor allem durch Verbesserung der neuronalen Plastizität. Neuronale Plastizität bezieht sich auf die Fähigkeiten des Gehirns und Nervensystems sich an neue Gegebenheiten in der Umwelt anzupassen, und somit neue Informationen zu erlangen und diese zu speichern. Ein wichtiger Mechanismus dafür ist die Neurogenese, also die Entstehung von neuen Zellen. Studien konnten belegen, dass EE zu vermehrter Neurogenese im Hippocampus von erwachsenen Ratten führt. Weitere Veränderungen die durch EE und neuronale Plastizität hervorgerufen werden, sind erhöhtes Gewicht und Größe des Gehirns, vermehrtes dendritisches Wachstum und vermehrte Neubildung von Synapsen (5).

1.3 NPY

1.3.1 NPY und seine Rezeptoren

Neuropeptid Y (NPY), ein aus 36 Aminosäuren bestehendes Neuropeptid, ist eines der am meisten vorhandenen Neuropeptide im Gehirn. Es gehört zur Gruppe der sogenannten NPY – Familie von biologisch aktiven Peptiden. Dazu gehören, neben NPY, auch noch 2 weitere Peptide, und zwar Peptide YY und das Pankreatische Polypeptid. NPY spielt bei vielen physiologischen Funktionen eine wichtige Rolle, unter anderem bei der Nahrungsaufnahme, beim Energiegleichgewicht, beim Herzrhythmus und bei der Wahrnehmung. Außerdem hat es angstlösende Eigenschaften, und spielt somit eine zentrale Rolle bei der Stressverarbeitung (12).

In Nagergehirnen konnten 4 Gehirnregionen, in welchen NPY Synthese stattfindet, identifiziert werden, dazu gehört der Hypothalamic arcuate nucleus, der Locus coeruleus, der Nucleus tractus solitarii und der Septohippocampale nucleus. Außerdem kommt NPY in vielen kortikalen Interneuronen, der Amygdala (wichtige Gehirnregion für die Verarbeitung von Angst und Furcht), dem Hippocampus, den Basalganglien und dem Hypothalamus vor (12).

Bis jetzt wurden bei Säugetieren 5 verschiedene Y Rezeptoren entdeckt (Y1, Y2, Y4, Y5, Y6), wobei der Y6 bei Menschen nicht funktionsfähig ist und bei Ratten komplett fehlt. NPY zeigt vor allem für die Y1, Y2 und Y5 Rezeptoren eine hohe Affinität (12).

1.3.2 Auswirkung von NPY

Man vermutet dass NPY über die Interaktion mit der Hypothalamus- Hypophysen- Nebennieren- Achse ein wichtiges Peptid für die zentrale Verarbeitung von Stress ist, da es der biologischen Wirkung von CRH (Corticotropin- Releasing – Hormon) entgegen wirkt (12). NPY wirkt außerdem angstlösend. Bei Versuchen mit Mäusen, welche intrazerebroventrikulär NPY injiziert bekamen, wurden diese weniger ängstlich. Dieser Effekt konnte auch bei einer NPY-Injektion direkt in die Amygdala und den Hippocampus beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass diese Regionen eine Schlüsselrolle für den angstlösenden Effekt von NPY spielen. Auch die Tatsache, dass NPY KO Mäuse ängstlicher und hippocampale und amygdalare NPY Überexpression Tiere weniger ängstlich macht, bestätigt den angstlösenden Effekt von NPY (12).

NPY dürfte auch eine Rolle bei depressivem Verhalten spielen, da die Behandlung von Labortieren mit Antidepressiva zu einer Erhöhung von NPY Konzentrationen in verschiedenen Hirnregionen führt. Im Hippocampus von depressiven Tieren kam es

außerdem zu einer erhöhten NPY-mRNA-Expression, im Gegensatz dazu war bei nicht depressivem Tieren die NPY-mRNA-Expression erniedrigt (10).

NPY wurde auch eine Rolle in der Regulation der Nahrungsaufnahme nachgesagt. Intrazerebroventrikuläre Administration von NPY führte zu einer vermehrten Nahrungsaufnahme bei Ratten, Nahrungsentzug wiederum zu einer vermehrten Expression von NPY im Arcuate Nucleus und im Hypothalamus. Allerdings konnten diese Auswirkungen auf die Nahrungsaufnahme bei Versuchen mit NPY KO Mäusen nicht bestätigt werden (13).

1.3.3 NPY und neurodegenerative Erkrankungen

Auch bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie zum Beispiel Alzheimer, Chorea Huntington, und Parkinson, spielt NPY eine Rolle, sowohl als Biomarker, als neuroprotektiver Faktor, als auch als potentiell Medikament (12).

Bei Alzheimer kommt es zu einer Verminderung der NPY Konzentrationen im Plasma, im Liquor und im Gehirn. Außerdem fand man heraus, dass kortikale NPY Neuronen während der Erkrankung beschädigt werden. Bei Versuchen mit transgenen Alzheimer-Mäusen waren vor allem die kortikalen und hippocampalen Neuronen, welche NPY produzieren, betroffen. Da hippocampale NPY Neuronen schon im frühen Stadium der Erkrankung betroffen sind, könnten sie als ein Biomarker für die Therapieeffizienz während der Medikamentenentwicklung dienen (12).

NPY könnte auch therapeutisch wirksam sein. In Versuchen mit transgenen Amyloid - Precursor Protein - Mäusen führte eine NPY Infusion ins Gehirn zu einer Verbesserung der neurodegenerativen Pathologie. Außerdem verhinderte die Behandlung von kultivierten menschlichen Neuronen mit NPY Fragmenten den zytotoxischen Effekt von beta-Amyloid (beta- Amyloid bezeichnet Peptide, welche durch Zerschneiden des Amyloid - Precursor Protein entstehen. Bei Alzheimer und Down- Syndrom kommt es zur Ablagerung dieser Peptide im Gehirn, sie wirken dann neurotoxisch). (12).

Bei Chorea Huntington kommt es zu einer Vermehrung von NPY-produzierenden Zellen in den Basalganglien und dem Cortex. Die Zellneubildungsrate in diesen Gehirnbereichen korreliert mit dem Krankheitsverlauf, was klinisch wichtig sein könnte. Diese Neurogenese könnte einen Gegenmechanismus darstellen, um dem neuronalen Zellverlust im Verlauf dieser Krankheit entgegen zu wirken. Da NPY zu vermehrter Neurogenese führt, könnte eine pharmakologische Erhöhung der zentralen NPY Konzentration ein vielversprechender Therapieansatz bei Chorea Huntington sein (12).

1.3.4 NPY als ein potientes Medikament für psychiatrische Erkrankungen

Die Behandlung von psychiatrischen Erkrankungen beim Menschen mit Neuropeptiden wie zum Beispiel NPY stellt uns vor verschiedene technische Herausforderungen, wie zum Beispiel die geeignetste Applikationsform, die kurze in vivo Stabilität, die schlechte Penetration der Blut- Hirn- Schranke und die Kosten und Schwierigkeit der Herstellung. Eine vielversprechende Lösung, um die systemische Applikation von Neuropeptiden zu umgehen, ist die intranasale Applikation des Medikaments. Bei Versuchen mit Ratten, welche an Symptomen ähnlich wie bei posttraumatischer Belastungsstörung litten und denen NPY intranasal gegeben wurde, konnte eine Verminderung von Angstverhalten und depressionsartigen Verhalten gezeigt werden (14). Beim Menschen gibt es erst wenige Studien zu diesem Thema. In einer klein angelegten Studie konnte allerdings bei intranasaler NPY Anwendung gezeigt werden, dass sowohl Herzrhythmus als auch arterieller Druck gleich blieben und es nur lokal zu einer Vasokonstriktion kam (15). Außerdem gab es nur eine sehr geringe systemische Absorption. Das alles spricht für ein gutes Sicherheitsprofil dieser Anwendungsmethode. Zur Zeit befindet sich eine intranasale NPY-Administration als Behandlungsoption für posttraumatische Belastungsstörung in einer klinischen Phase 1 Studie (12).

1.4 Gyrus Dentatus

Der bananenförmige Gyrus Dentatus (DG) ist ein Teil des Hippocampus. Eine wichtige Eigenschaft des DG ist, dass viele seiner Verbindungen nur unidirektional verlaufen. Der Entorhinale Kortex stellt den wichtigsten Input des DG dar. Diese Fasern, die vom Entorhinalen Kortex in den DG laufen, werden Tractus perforans genannt. Allerdings verlaufen diese Fasern nicht wieder vom DG zurück in den Entorhinalen Kortex. Im DG findet der erste Schritt jener Informationsverarbeitung statt, welche letztendlich zur Erinnerung führt (16).

Der DG besteht aus 3 Schichten. Die äußere Schicht ist die Molekularschicht (engl. Molecular Layer), welche relativ zellfrei ist und hauptsächlich Dendriten der Körnerzellen und Fasern des Tractus perforans enthält. Die zweite Schicht ist die Körnerzellschicht, welche hauptsächlich aus dicht gepackten Körnerzellen besteht. Die innerste Schicht, welche von der Körnerzellschicht umgeben wird, ist die Polymorph Cell Layer (DGpl, alternativ: Hilus des DG). Hier befinden sich unter anderem die sog. Mooszellen, HIPP Zellen (hilar perforant path-associated cell) und HICAP Zellen (hilar commissural-associational pathway related cells) (16).

Der Hauptzelltyp des DG sind die Körnerzellen, welche dicht gepackt in der Körnerzellschicht liegen. Die Dendriten dieser Zellen wachsen durch die gesamte Molekularschicht. Die Axone der Körnerzellen sind nicht myelinisiert und werden Moosfasern genannt. Die Enden dieser Moosfasern bilden Synapsen mit den CA3 Pyramidenzellen im Hippocampus. Die Axone geben außerdem im Hilus je 7 Kollateralen ab, welche meistens an GABAergen Interneuronen oder Mooszellen im Hilus enden (16).

Im Hilus befinden sich einige verschiedene Zellen. Die häufigsten sind die Mooszellen. Sie besitzen große Zellkörper und 3 oder mehr Dendriten, welche vom Zellkörper aus weit in den Hilus hineinreichen. Meistens bleiben diese Dendriten im Hilus, manche wachsen allerdings bis in die Körnerzellschicht und weiter in die Molekularschicht. Allerdings wachsen diese Dendriten niemals in die angrenzende CA3 Region. Alle Dendriten der Mooszellen sind mit großen Stacheln bedeckt, die sogenannten thorny excrescences (dornigen Auswüchse), an welchen die Axone der Moosfasern enden. Die Mooszellsynapsen wirken über Glutamat exzitatorisch, und innervieren sowohl Körnerzellen als auch GABAerge Interneurone. Die HIPP Zelle ist eine multipolare Zelle mit langen, verzweigten Stacheln auf ihrem Zellkörper und den Dendriten. Ihre Axone setzen sich bis in die Molekularschicht, die Zone des Tractus perforans, fort und enden dort mit inhibitorischen Synapsen an den Dendriten der Körnerzellen. Einiger der HIPP Zellen gehören zu den GABAergen Interneuronen. Auch die HICAP Zellen befinden sich im Hilus. Diese sind multipolar oder dreieckig, und besitzen dünne, nichtstachelige Dendriten, welche sich bis in den Hilus und die Molekularschicht fortsetzen (16).

Der Hauptinput des DG stammt aus dem Entorhinalen Kortex, ein weiterer Input stammt aus den Septumkernen, welche Zellen aus dem Hilus cholinerg oder GABAerg innervieren. Aus dem Hypothalamus stammt die wichtigste Innervation aus der Supramammillary Area, welche in der Körnerzellschicht und manchmal im Hilus endet. Diese Projektion ist anregend und verwendet Glutamat (16).

NPY wird im DG normalerweise aus den HIPP Zellen freigesetzt, welche neben NPY auch Somatostatin freisetzen. Diese HIPP Zellen inhibieren über NPY und Somatostatin die Körnerzellen. Außerdem wirkt NPY über Autorezeptoren inhibierend auf die HIPP Zellen (17).

Die Synapsen welche in dieser Diplomarbeit untersucht werden, sind jene, welche sich im Hilus zwischen den Dendriten der Mooszellen, HIPP und HICAP Zellen und den Axonen der Körnerzellen oder Axonen aus jenen extrahippocampalen Regionen, welche zuvor beschrieben worden sind, befinden. Es kann sich sowohl um inhibitorische wie auch

exzitatorische Synapsen handeln. Die Synapsen der Mooszellen wirken über Glutamat anregend, ebenso wie die Synapsen jener Zellen, welche aus der Supramammillary Area kommen und in der Körnerzellschicht enden. Die Synapsen der HIPP Zellen wirken inhibitorisch (16).

1.5 Ultrastruktur von Synapsen

Man kann Synapsen grob in 2 Kategorien einteilen. In Typ 1 oder asymmetrische Synapsen, welche exzitatorisch wirken, und in Typ 2 oder symmetrische Synapsen welche inhibitorisch wirken. Exzitatorische Synapsen besitzen eine sehr markante elektronendichte Zone unter der postsynaptischen Membran (postsynaptische Verdichtung), und befinden sich meist an den Dendriten. Inhibitorische Synapsen weisen eine weniger markante präsynaptische Membran und postsynaptische Verdichtung auf und befinden sich meist an den Zellkörpern (18).

Präsynaptische Endigungen: Axone bilden präsynaptische Endigungen, welche mit Vesikeln gefüllt sind. $\frac{3}{4}$ der Axone bilden nur einen synaptischen Kontakt, manche bilden mehrere, aber einige wenige Synapsen besitzen keinen postsynaptischen Partner. Manche Zellen bilden für den jeweiligen Zelltyp typische Endigungen: die Axone der Körnerzellen, sogenannte Moosfasern, zum Beispiel, welche in der CA3 Region an Pyramidenzellen enden bilden sehr große präsynaptische Endigungen aus, welche mit mehreren verschiedenen Dendriten Synapsen bilden. In den präsynaptischen Endigungen werden unter anderem synaptische Vesikel und Dense Core Vesikel (DCV) gespeichert (18).

Aktive Zone: Jene Region der präsynaptischen Membran, in der Vesikel gedockt und für die Freisetzung vorbereitet werden, bezeichnet man als Aktive Zone. Im Elektronenmikroskop ist dieser Bereich an einer erhöhten Elektronendichte erkennbar. Nach einem biochemischen Vorbereitungs- (Priming-) Prozess ist ein Teil der gedockten Vesikel bereit, bei Stimulation Neurotransmitter in den synaptischen Spalt frei zu setzen. Danach wird die Hülle der Vesikel durch Endozytose recycelt (18).

Der synaptische Spalt: Die 20 nm breite Ausweitung zwischen dem präsynaptischen Axon und dem postsynaptischen Partner dieses Axons bezeichnet man als synaptischen Spalt. Dieser Spalt ist kein freier Raum. Er ist einerseits gefüllt mit normalen Proteinen der extrazellulären Matrix, andererseits mit spezialisierten synaptischen Proteinen (18).

Postsynaptische Dendriten: Die postsynaptischen Dendriten unterscheiden sich durch ihre unterschiedliche Größe und Form, wobei selbst benachbarte Dendriten in derselben Gehirnregion unterschiedlich aussehen können. Allerdings korreliert die Größe der postsynaptischen Dendriten immer mit der Anzahl der präsynaptischen Vesikel. Der

markanteste Teil der postsynaptischen Dendriten bei exzitatorischen Synapsen ist die postsynaptische Dichte. Sie stellt sich als unscharfe elektronendichte Struktur dar, welche ca. 35-50 nm weit ins Zytoplasma reicht. Die Oberfläche der postsynaptischen Dichte korreliert mit dem Volumen des postsynaptischen Dendriten, der Gesamtanzahl an präsynaptischen Vesikeln und der Anzahl an Vesikel welche in der Aktiven Zone gedockt sind. Die postsynaptische Dichte besteht aus einer Vielzahl an Rezeptoren, Gerüstproteinen, und Signalstrukturen, welche für die synaptische Übertragungen eine Rolle spielen (18).

1.5.1 Synaptische Vesikel

Synaptische Vesikel speichern Neurotransmitter, setzen diese frei und leiten damit Informationen im neuronalen Netzwerk fort (19). Exzitatorische Synapsen enthalten runde, klare Vesikel welche in der Regel mit den Neurotransmittern Acetylcholin oder Neurotransmitter Glutamat gefüllt sind und einen Durchmesser von ca. 35 nm besitzen. Inhibitorische Synapsen enthalten etwas kleinere, polymorphe Vesikel welche gewöhnlich mit dem Neurotransmitter GABA oder Glycin gefüllt sind (18).

Als gedockte Vesikel werden all jene Vesikel bezeichnet, welche morphologisch mit der aktiven Zone der Synapse assoziiert sind. Dazu zählen nur ca. 10 Vesikel pro hippocampaler Synapse (19). Die Anzahl ist abhängig von strukturellen Parametern wie der Größe der aktiven Zone und der postsynaptischen Verdichtung. Man kann auch eine positive Korrelation zwischen gedockten Vesikeln und Anzahl der Vesikel im Readily Releasable Pool (RRP) feststellen. Zum RRP gehören ca. 5-15 Vesikel in hippocampalen Neuronen. Laut Fowler et al. (19) sind gedockte Vesikel nicht mit Vesikeln aus dem RRP gleichzusetzen (19). Die Vesikel aus dem RRP sind die ersten Vesikel die bei Stimulation freigesetzt werden, und haben die höchste Fusionswahrscheinlichkeit. Nachdem alle Vesikel aus dem RRP freigesetzt worden sind, werden bei weiterer Stimulation Vesikel aus dem sogenannten Recycling Pool (RP) freigesetzt. All jene Vesikel, die dazu fähig sind, ausgeschüttet zu werden, also jene des RRP und RP, befinden sich im Total Recycling Pool (TRP) (20).

Zu den ungedockten Vesikel zählen Vesikel aus dem Recycling Pool und dem Reserve Pool, welche sich vermischt und diffus verteilt in der Synapse befinden. Vesikel aus dem Reserve Pool werden nur bei intensiven, oft unphysiologischen Reizen freigesetzt (21).

1.5.2 Dense Core Vesikel

DCV haben einen Durchmesser von ca. 80 -100 nm (18). Sie besitzen einen elektronendichten Kern und speichern Neuropeptide. Aminerge Neurotransmitter können ebenfalls in DCV gespeichert werden. DCV setzen ihre Neuropeptide oft an jenen Teilen der präsynaptischen Enden frei, welche nicht zur Synapse gehören. Von DCV welche in sekretorischen Neuronen vorkommen, wird vermutet, dass sie äquivalent mit sekretorischen Körnchen in endokrinen Zellen sind, da sie eine gemeinsame Biogenese und Morphologie aufweisen (22).

1.5.3 Synaptische Vesikeln und Dense Core Vesikel: Unterschiede und Gemeinsamkeiten in Aufbau und Funktion

Ebenso wie synaptische Vesikel können DCV über Ca^{+2} abhängige Membranfusion freigesetzt werden. Synaptische Vesikel und DCV besitzen deswegen viele gleiche Proteine welche für die Membranfusion benötigt werden, wie zum Beispiel die SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) – Komplexproteine und Synaptotagmin I, welches ein wichtiger Ca^{+2} Sensor für synaptische Vesikel und DCV ist (22).

Allerdings gibt es auch Proteine welche spezifisch für DCV sind. Dazu zählen zum Beispiel das CAPS (calcium-dependent activated protein for secretion) und Chromogranin A. CAPS kommt nur in Plasmamembranen und den Membranen der DCV vor und wird für die Exozytose der DCV benötigt. Chromogranin A spielt eine wichtige Rolle in der Biogenese von DCV. Im Gegensatz dazu gibt es natürlich auch Proteine welche spezifisch für synaptische Vesikel sind wie zum Beispiel Synaptophysin, welches somit einen Marker für synaptische Vesikel darstellt (22).

In den präsynaptischen Endigungen nehmen synaptische Vesikel einen Großteil der Fläche ein, und befinden sich verteilt in diesen Endigungen. Einige wenige dieser Synapsen befinden sich gedockt in der Aktiven Zone. DCV befinden sich weiter weg vom synaptischen Spalt da sie Großteils extrasynaptisch freigesetzt werden. Die unterschiedliche Verteilung der Vesikel und der Zonen in denen sie freigesetzt werden, erklärt man sich durch die unterschiedliche Sensitivität auf die für die Exozytose nötige Ca^{+2} Konzentration (22). Exozytose von synaptischen Vesikeln passiert sehr rasch nach Auslösung durch das Aktionspotenzial, wohingegen der Inhalt aus DCV langsam und erst nach längerer anhaltender Stimulation freigesetzt wird (23). Neurotransmitter, welche aus synaptischen Vesikeln freigesetzt werden, stimulieren hauptsächlich Ionen-Kanäle um elektrische Signale fortzuleiten und weitere synaptische Aktivität zu generieren.

Neurotransmitter aus DCV reagieren als Agonisten an G protein-coupled receptors, welche synaptische Aktivität modifizieren (23).

1.6 Verhaltensversuche

Durch die Analyse des Verhaltens von Nagetieren oder auch anderen Labortieren, versucht man im Allgemeinen Aufschlüsse über die Funktion bestimmter Gehirnareale, die Funktion von Genen oder auch die Wirkung unterschiedlicher pharmakologischer Substanzen zu erhalten. Wie bereits eingangs erwähnt beeinflussen EE und NPY das Verhalten von Nagern und daher werde ich in diesem Absatz die Verhaltensversuche beschreiben, welche für diese Diplomarbeit relevant sind.

Barnes Maze: Das Barnes Maze wird verwendet um bei Mäusen das räumliche Erinnerungsvermögen, Lernen und das Langzeitgedächtnis zu überprüfen. Dafür werden die Tiere in die Mitte einer weißen runden Platte gesetzt, welche am Rand mit Löchern versehen ist. Die Mäuse sollen dabei ein bestimmtes Loch, unter dem sich ein Flucht-Käfig befindet, finden. In Trainingsdurchgängen lernen die Mäuse, unter welchem Loch sich der Fluchtkäfig befindet. In Versuchsdurchgängen wird der Fluchtkäfig entfernt und man misst die Zeit welche die Tiere in der Nähe des Loches verbringen, wo der Fluchtkäfig ursprünglich war. Die Trainingsdurchgänge dienen also der Erfassung des Lernvermögens während die Versuchsdurchgänge zur Erfassung des Erinnerungsvermögens durchgeführt werden (24).

Open Field Test: Im Open Field Test kann man den Effekt von EE auf die Bewegungsfreude und die Ängstlichkeit der Mäuse oder Ratten untersuchen. Dazu werden die Mäuse in die Mitte einer freien Fläche gesetzt, welche von einer hohen Wand umgeben ist. Es wird die Zeit gemessen, welche die Tiere in der Mitte oder am Rand dieser Fläche verbringen und die Distanz welche die Tiere zurücklegen. Nager bevorzugen in solchen Situationen spontan die Peripherie und bleiben dicht an der Wand. Vermehrte Zeit welche sie im zentralen Teil verbringen und das Verhältnis von zentraler zu totaler Bewegung sind Indikatoren von Anxiolyse (25).

Elevated Plus Maze: Mit dem Elevated Plus Maze misst man die Ängstlichkeit der Tiere. Der Versuchsaufbau besteht aus 4 Armen, welche im rechten Winkel zueinander in ca. 50 cm Höhe angeordnet sind. 2 dieser Arme sind offen, 2 sind von einer Wand umgeben. Die Ängstlichkeit wird daran gemessen, ob die Tiere sich eher in den geschlossenen Armen oder in den offenen Armen aufhalten (5).

Forced Swim Test: Dieser Test wird verwendet um depressionsartiges Verhalten zu messen. Die Tiere werden in einen mit Wasser gefüllten Glaszylinder gesetzt, in welchem

die Tiere schwimmen müssen. Nicht-depressionsartiges Verhalten zeichnet sich dadurch aus, dass die Mäuse versuchen, aus dem Zylinder zu entkommen. Dieses Verhalten zeigt sich durch Schwimmen oder Klettern. Depressive Tiere verhalten sich immobil, was mit Verzweiflung und Hoffnungslosigkeit gleichgesetzt wird (5).

Morris Water Maze: Dieser Test evaluiert ebenfalls Lernen und Erinnerungsvermögen und stellt eine Alternative zum Barnes Maze Test dar. Die Mäuse werden hierzu in eine mit Wasser gefüllte Wanne gesetzt, und die Zeit welche sie benötigen, um eine versteckte Fluchtplattform zu finden, wird gemessen (5). Verschiedene Objekte oder geometrische Bilder werden im Testraum angebracht, damit sich die Versuchstiere daran orientieren können. Die Tiere lernen wo sich die versteckte Fluchtplattform befindet, und können dem Wasser von Versuch zu Versuch schneller entkommen. Je besser sie lernen und umso besser sie sich an den Standort der Plattform erinnern können, umso kürzer ist die Zeit, die sie benötigen um diese zu erreichen (26).

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden mit insgesamt zwanzig 6-10 Wochen alten männlichen C57BL/6:129/SvJ (1:1) Mäusen durchgeführt. Die Hälfte der Versuchstiere waren homozygote NPY knockout Mäuse (NPY KO) auf dem genannten genetischen Background, während die andere Hälfte passende Kontrollmäuse waren (WT - Wildtype). Beide Genotypen wurden am Garvan Institute of Medical Research (Sidney/Australien) kreiert (27), im hauseigenen Tierstall gezüchtet und in weiterer Folge für die Versuche verwendet.

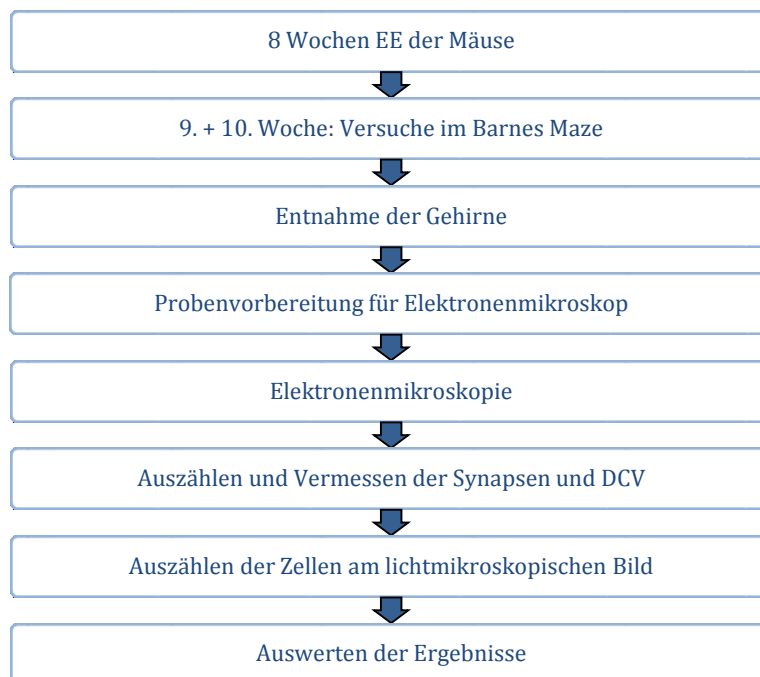
Alle verwendeten Mäuse wurden bei einer kontrollierten Temperatur (21 °C), Luftfeuchtigkeit (50 %) und einem 12 h Tag/Nacht Rhythmus (Lichter an um 6:00 Uhr, Lichter aus um 18:00 Uhr) gehalten (28). Generell wurde versucht das Tierleid auf ein Minimum zu reduzieren indem nur die Mindestanzahl an Mäusen verwendet wurde welche notwendig ist um statistisch aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.

2.2 Versuchsprotokoll

Die 20 Mäuse wurden zufällig in 4 Gruppen zu je 5 Mäusen eingeteilt (WT/Standard Environment (SE), NPY KO/SE, WT/EE, NPY KO/EE) und dementsprechend 10 Wochen lang entweder in EE oder SE gehalten. In der 9. und 10. Woche wurde mit Hilfe des Barnes Maze bestimmt, ob Genotyp (WT vs. KO) und/oder Haltungsbedingungen (EE vs. SE) Auswirkungen auf Lern -und/oder Erinnerungsvermögen (Kurz – und Langzeitgedächtnis) haben. Dazu wurden die Mäuse in der 9. Woche an Tag 1 zuerst an das Barnes Maze gewöhnt, an Tag 2 + 3 trainiert, und in der 9. Woche an Tag 5 und der 10. Woche an Tag 5 getestet (1). Dreißig Minuten nach dem letzten Test wurden die Mäuse eingeschläfert (mit Pentobarbital 150 mg/kg intraperitoneal) und ihre Gehirne entnommen (1). Wie unten beschrieben, wurden unterschiedliche Gehirnbereiche mikroseziert, fixiert und für die elektronenmikroskopische Analyse vorbereitet. Abbildung 1 zeigt ein Ablaufdiagramm, um einen besseren Überblick über den Versuchsablauf zu gewähren.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit führte ich eine verblindete elektronenmikroskopische Analyse dieser Gehirne bezüglich Ultrastruktur des DG durch.

Abbildung 1: Ablaufdiagramm



2.3 Standard und Enriched Environment

Mäuse in SE wurden in Gruppen zu je 5 Mäusen in Polycarbonatkäfigen der Größe IIL mit den Maßen 36,5 x 20,7 x 14 cm (Länge x Weite x Höhe, Bodenfläche: 530 cm²) gehalten. In der EE Haltung wurden die Mäuse ebenfalls in Gruppen zu je 5 Mäusen aber in Käfigen der Größe IV mit den Maßen 59 x 38 x 20 cm (Länge x Breite x Höhe, Bodenfläche 1815 cm²) gehalten. Im EE Käfig stand somit jeder Maus rechnerisch 363 cm² Bodenfläche zur Verfügung, während den Mäusen aus dem SE Käfig nur 106cm²(28) zur Verfügung standen. Außerdem enthielt der EE Käfig folgende Gegenstände: Nistmaterial (Papierhandtücher), ein Laufrad (Durchmesser: 14 cm, Dehner, Graz, Österreich), einen Heutunnel (Länge: 20 cm, innerer Durchmesser: 5-8 cm; Dehner, Graz), einen Holztunnel mit 6 seitlichen Löchern (Länge: 25 cm, innerer Durchmesser: 4 cm; Dehner, Graz, Österreich), einen Tunnel aus Pappe (Länge: 13 cm, innerer Durchmesser: 9 cm; Scanbur, Karlslunde, Denmark), Maushäuser mit 2 Öffnungen aus rotem transparentem Polycarbonat (10 x 9 x 5,5 cm; Ehret, Tulln, Austria), Maushäuser mit 8 Öffnungen aus Pappe (17 x 17 x 17 cm; Scanbur) und einen Tunnel aus rotem transparentem Polycarbonat (Länge: 10 cm, innerer Durchmesser: 5,5 cm; Scanbur) (28).

Am Beginn jeder Woche wurden die Mäuse in einen frisch geputzten Käfig gesetzt und die EE Gegenstände wurden wöchentlich gründlich gereinigt. Während der 10- wöchigen

Enrichmentperiode waren Nistmaterial, das Laufrad und der Heutunnel immer für die Mäuse verfügbar, während die restlichen Gegenstände immer wieder ausgetauscht wurden (siehe dazu Tabelle 1; modifiziert übernommen aus (28)).

2.4 Probenvorbereitung

Woche	Versuchsphase	Basisgegenstände	Zusätzliche Häuser	Zusätzliche Tunnel
1	Basic Enrichment	Nistmaterial, Heutunnel, Laufrad	2P	1T
2	Basic Enrichment	Nistmaterial, Heutunnel, Laufrad	2P	1T
3	Basic Enrichment	Nistmaterial, Heutunnel, Laufrad	2P	1T
4	Basic Enrichment	Nistmaterial, Heutunnel, Laufrad	2P	1T
5	Verstärktes Enrichment	Nistmaterial, Heutunnel, Laufrad	1P + 1H	1H
6	Verstärktes Enrichment	Nistmaterial, Heutunnel, Laufrad	2H	1T+1H
7	Verstärktes Enrichment	Nistmaterial, Heutunnel, Laufrad	2P	1T + 1P*
8	Verstärktes Enrichment	Nistmaterial, Heutunnel, Laufrad	2H	1T+ 1P
9	Verstärktes Enrichment	Nistmaterial, Heutunnel, Laufrad	1P + 1H	1P+ 1P*
10	Verstärktes Enrichment	Nistmaterial, Heutunnel, Laufrad	1P + 1H	1P+ 1P*

Tabelle 1: Enrichment Protokoll. H =hard paper, Karton; T= Timber, Holz; * Tunnel am Käfig aufgehängt; entnommen aus (28)

Um Bilder mit dem Elektronenmikroskop machen zu können, muss das Gewebe welches untersucht werden soll, vorbereitet werden.

Die linken Gehirnhälften der entnommenen Gehirne wurden in 2% Paraformaldehyd/ 2,5% Glutaraldehyd in 0,1M Cacodylatpuffer mit einem pH von 7,4 für 3 Tage bei 4 °C fixiert. Danach wurden die Proben für mindestens 24 h in 0,1M Cacodylatpuffer bei 4 °C aufbewahrt. Dann wurden 150 µm dicke Vibratonschnitte der folgenden Gehirnregionen hergestellt: 1.: Präfrontaler Cortex, 2.: Gyrus dentatus, 3.: Amygdala. Für meine Diplomarbeit verwendete ich die Gyrus dentatus - Region.

Die Vibratonschnitte wurden mit 2% Osmiumtetroxid für 1 h weiterbehandelt und danach über das Wochenende in 0,1M Cacodylatpuffer bei 4 °C gespült. Der nächste Schritt war die Entwässerung der Schnitte mit einer aufsteigenden Ethanol - Reihe. Dazu wurden die Schnitte je 20 Minuten in 50%, 70%, 80% und 96% Ethanol gelegt, danach 2 x 10 Minuten in 100% Ethanol. Nach der Entwässerung wurden die Schnitte bei Raumtemperatur 40 Minuten in Propylenoxyd als Intermedium, gelegt. Danach wurden die Schnitte in einer 1:2 Mischung von Propylenoxyd und TAAB Einbettungsharz (TAAB Embedding Resin, TAAB, Berkshire, UK) für mind. 2 h eingelegt und danach über Nacht bei 4 °C in eine 1:3 Mischung Propylenoxyd und Harz. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 2x in Harz bei je 45 °C für 60 Minuten und danach für 90 Minuten eingebettet.

Zuletzt wurden die Schnitte in einer Einbettungsform mit frischem Harz ausgegossen und bei 60 °C für 3 Tage im Wärmeschrank ausgehärtet.

Für die Analyse der Synapsen unter dem Elektronenmikroskop wurden nun 55 nm dicke ultradünne Schnittserien mit einem Lycra Ultracut UCT Ultramicrotome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) hergestellt, auf ein Slot Grid (Gitter, welches man ins ELMI einlegen kann) aufgebracht, und danach mit 2% Uranylacetat und 3% Bleicitrat kontrastiert.

Außerdem wurde ein 0,5 µm dicker Semidünnschnitt derselben Region hergestellt und mit 0,5% Toluidinblau gefärbt. Dieser Schnitt wurde unter dem Lichtmikroskop (Zeiss Axiophot) 10 x vergrößert fotografiert, und mit den elektronenmikroskopischen Aufnahmen verglichen um sicherzustellen, dass man das richtige Areal untersucht (11).

2.5 Lichtmikroskopie

Die numerische Dichte der Neuronen im DGpl wurde stereologisch abgeschätzt. Dabei handelt es sich um die Zahl an Neuronen, die sich in einem bestimmten Volumen befindet. Die 0,5 µm dicken Semidünnschnitte, welche mit Toluidinblau eingefärbt wurden, waren als 2 parallele Schnitte mit einem Abstand von 1,0 µm vorhanden. Diese Bilder wurden im Programm ImageJ gleich ausgerichtet. Der DG, welcher auf eine Seite hin nicht begrenzt ist, wurde manuell so begrenzt, wie zuvor im Elektronenmikroskop das Polygon festgelegt worden war. Danach wurde ein Raster über das gesamte Bild gelegt und alle Kreuzungspunkte welche sich im DG befanden, wurden gezählt. Damit wurde die vom Schnitt getroffene Fläche des DG angenähert. Außerdem zählte ich im selben Areal die Zellkerne der Nervenzellen. Nur jene Zellkerne, die auf dem ersten Schnitt, nicht aber auf dem zweiten Schnitt zu sehen waren, wurden gezählt. Damit wurden jene Zellen gezählt, die sich im Volumen zwischen diesen beiden Schnitten befanden. Danach wurden erster und zweiter Schnitt vertauscht und in umgekehrter Richtung gezählt.

Zum Berechnen der numerischen Zelldichte wurde das Volumen (=Fläche des polymorph Layer im Lichtmikroskop x Abstand zwischen den beiden Schnitten (1,0 µm)) bestimmt. Die Zellzahlen wurden durch das jeweilige Volumen dividiert.

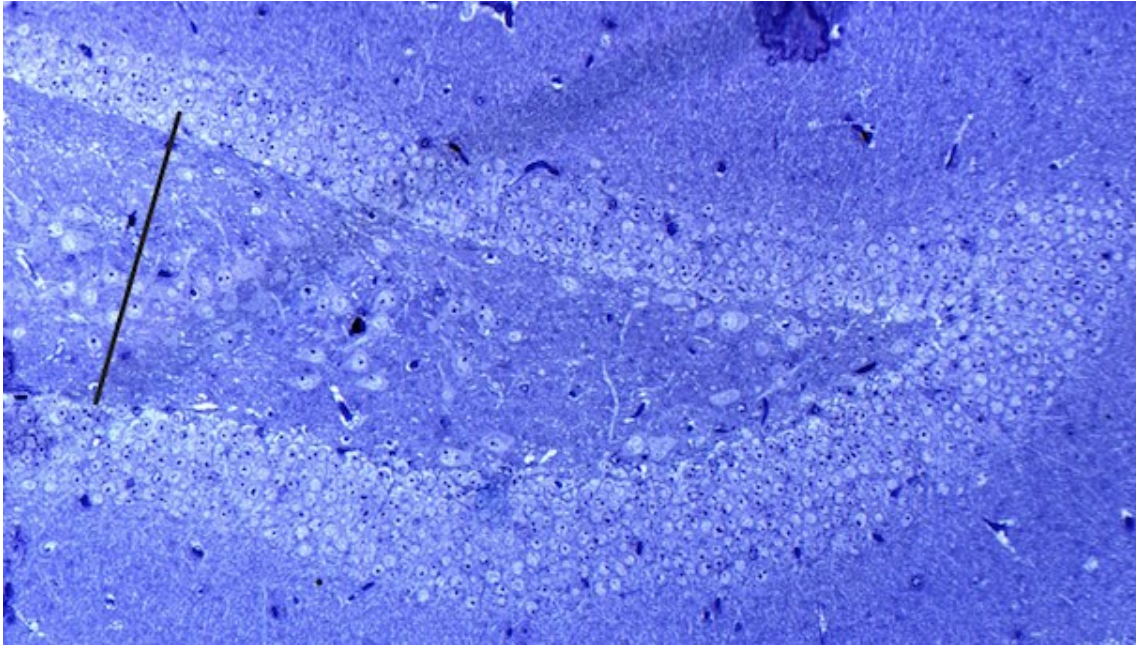


Abbildung 2: Lichtmikroskopiebild. Die schwarze Linie ist die Begrenzung des Polygons im Elektronenmikroskop

2.6 Transelektronenmikroskop

Für die Elektronenmikroskopie wurde ein Tecnai G2 20 Elektronenmikroskop (FEI, Eindhoven, Netherlands) verwendet, welches mit einer Megaview Wide Angle Camera (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany) und einer Gatan US 1000 Digital Camera (Gatan, Pleasanton, USA) ausgestattet ist (11).

Nun wurden mit dem Elektronenmikroskop pro Tier 20 Bildpaare von 2 aufeinander folgenden parallelen Schnitten mit der Gatan -Kamera aufgenommen. Dazu wurde zuerst der zu untersuchende Bereich (Region of Interest, ROI) manuell, mit einer eigens dafür programmierten Software (11), auf einem Abschnitt markiert. Die ROI war in diesem Fall der Hilus des DG, welcher bei einer niedrigen Vergrößerung (170 x) unter dem Elektronenmikroskop sichtbar war. Mit der Software konnte man die Grenzen des Hilus als Polygon speichern. Um sicherzugehen, dass man den richtigen Bereich markiert, wurde die elektronenmikroskopische Aufnahme mit dem mit Toluidinblau gefärbten Semidünnschnitt verglichen (11).

Für den nächsten Schritt wurde die Software Fei Serial Section verwendet. Damit ist es möglich, einander entsprechende Orte (zum Beispiel die Schnittträger), welche man manuell auf den 2 aufeinander folgenden Schnitten festlegt, zu speichern. Das Programm macht es später möglich, Punkte welche auf dem ersten Abschnitt markiert werden, auf dem zweiten Abschnitt problemlos anzusteuern (11).

Mit derselben Software, mit welcher die ROI markiert wurde, wurden nun, innerhalb der zuvor festgelegten Grenzen (also innerhalb des Hilus des DG) 20 Punkte mittels Zufallsgenerator definiert. Von jedem dieser 20 Positionen wurde ein Foto aufgenommen. Mit Hilfe der Fei Serial Section Software konnte man nun von der ersten Position auf dem ersten Abschnitt die gleiche Position auf dem zweiten Abschnitt ansteuern und auch davon ein Foto aufnehmen. Das wurde 20 x wiederholt, sodass am Ende pro Tier 40 Fotos vorlagen. Die Fotos wurden mit einer 5000-fachen Vergrößerung aufgenommen (11). Um einen für die weiteren Analysen ausreichenden Bildausschnitt zu erzielen, wurde Serial EM Software (Version 3.3.1.) dazu heran gezogen, um Photomontagen aus jeweils vier aneinander grenzenden Aufnahmen zu erzeugen, sodass die endgültige Bildgröße ca. 3850 x 3850 Pixel bei einer Pixelgröße von 1,9915 nm betrug. Die Bildgröße wich geringfügig von dieser Größe ab, deshalb wird später ein Raster, welches immer die selbe Größe hat, über jedes Bild gelegt, damit gleichgroße Ausschnitte ausgezählt werden.

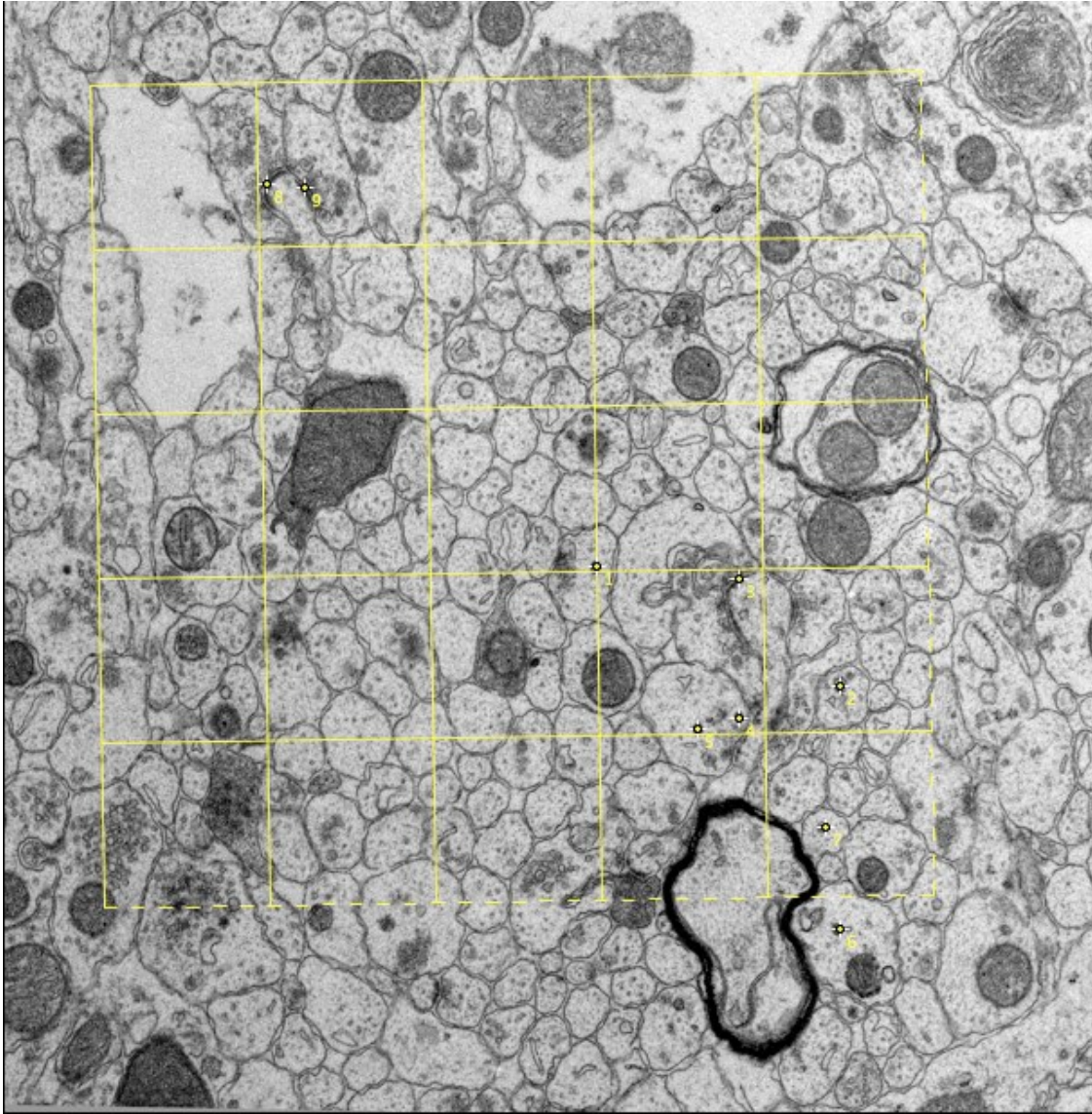


Abbildung 3: Elektronenmikroskopiebild mit Raster. Erstes Bild eines Bildpaares, mit Raster zum Auszählen der Synapsen (Kreuze Nr. 3, 8, 9) und Dense Core Vesikel (Kreuze Nr. 1, 2, 4, 5, 7)

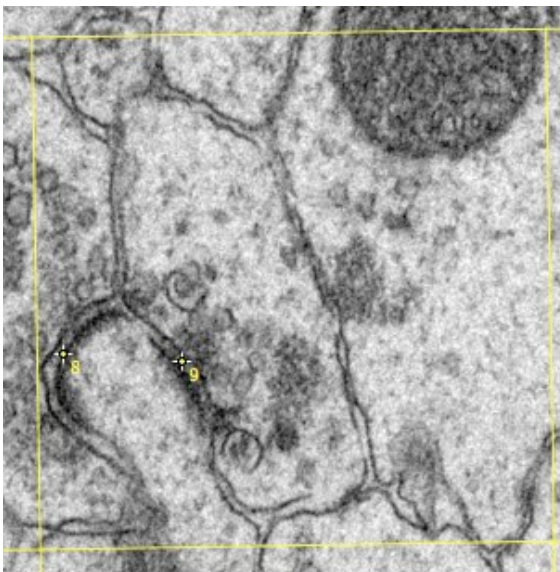


Abbildung 4: Elektronenmikroskopiebild mit 2 Synapsen. Ausschnitt mit 2 Synapsen (8+9)

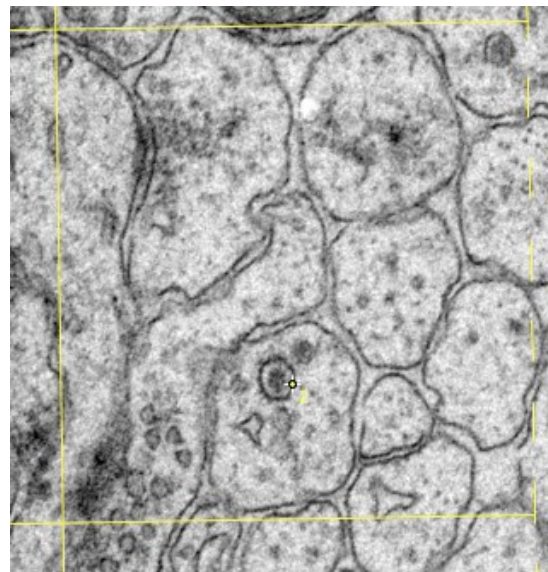


Abbildung 5: Elektronenmikroskopiebild mit DCV. Ausschnitt mit einem DCV (7)

2.7 Auszählen und Vermessen der Synapsen und Dense Core Vesikel

Die Zahl der Synapsen pro Nervenzelle und die Zahl der Dense Core Vesikel pro Nervenzelle wurden stereologisch abgeschätzt. Dazu wurde das Programm ImageJ verwendet. Zuerst wurden die Bildpaare gleich ausgerichtet und danach wurde über diese Bilder ein $5,5 \times 5,5 \mu\text{m}$ großer Raster ((29), begrenzt durch zwei durchgehende und zwei gestrichelte Linien) gelegt. Der Raster wurde auf eine zufällige Position in einem zufälligen Winkel über das Bild gelegt. Nur Synapsen welche sich in diesem Raster befanden oder sich noch zum Teil auf einer der zwei durchgängigen Linien befanden und nur auf dem ersten Bild, nicht aber auf dem zweiten Bild zu sehen waren, wurden gezählt. Dense Core Vesikel wurden gezählt wie Synapsen. Dieses Zählen der Synapsen und Dense Core Vesikel wurde bei allen 20 Bildpaaren pro Tier durchgeführt (11).

Pro Tier wurden außerdem 10 Synapsen an Einzelbildern genauer vermessen. Diese wurden zufällig ausgewählt, wobei darauf geachtet wurde, dass die prä- und postsynaptische Membran quer zum Bild verliefen. Dabei wurde die Länge der präsynaptischen Membran, die Länge der postsynaptischen Dichte, und die Breite des synaptischen Spaltes vermessen und die Anzahl der gedockten Vesikel (Vesikel die sich innerhalb der Distanz eines durchschnittlichen Vesikeldurchmessers am synaptischen Spalt befanden) und ungedockten Vesikel gezählt. Um die Breite des synaptischen Spaltes im Mittel zu bestimmen, wurde die Fläche des Spaltes durch die Länge des Spaltes dividiert (11).

Es ist wichtig, die Messergebnisse auf die Neuronenzahl zu beziehen. Bezieht man die Anzahl der Synapsen (N) auf das Volumen (V) bekommt man eine relative Anzahl: N/V . Das kann allerdings leicht zu Fehlinterpretationen führen, da diese Zahl nicht die tatsächliche Anzahl der Synapsen wiedergibt, und Volumenveränderungen das Ergebnis beeinflussen. Deshalb ist es zielführender, das Verhältnis von Synapsen zur Neuronenzahl anzugeben, da bekannt ist, dass sich die Neuronenzahl im DG Alter nicht ändert (30). Dazu musste zunächst das Volumen, innerhalb dessen gezählt worden war, bestimmt werden. Das geschah durch Multiplizieren der Dissektorfläche ($5,5 \times 5,5 \mu\text{m} = 30,25 \mu\text{m}^2$) mit der Schnittdicke ($55 \text{ nm} = 0,055 \mu\text{m}$). Weiters schätzt man die Zahl der Synapsen pro Zelle durch Dividieren der Zahl der Synapsen pro Volumen durch die Zahl der Zellen pro Volumen. Dadurch hebt sich der Bezug zum Volumen auf. Die Zahl der Vesikel pro Zelle wurde durch Multiplizieren der Zahl der Vesikel pro Synapse mit der Zahl der Synapsen pro Zelle hochgerechnet.

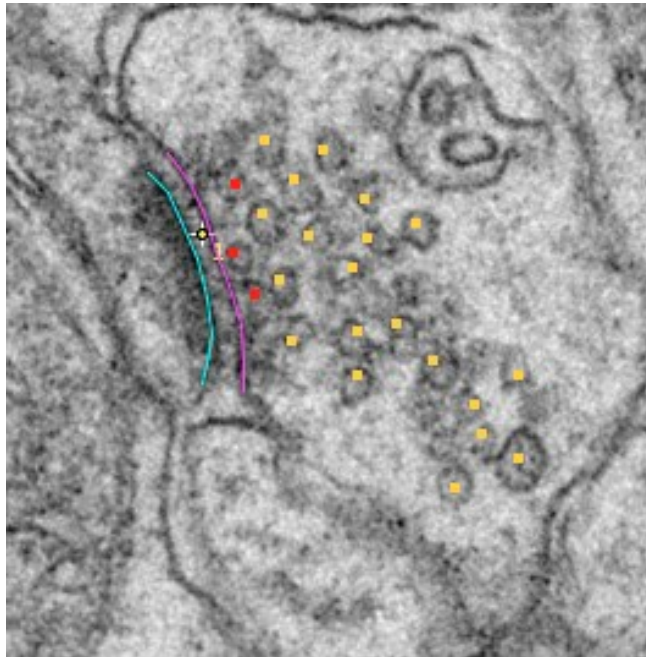


Abbildung 6: Vermessen einer Synapse. Türkis: präsynaptische Membran, Lila: postsynaptische Membran, Rot: gedockte Vesikel, Gelb: ungedockte Vesikel

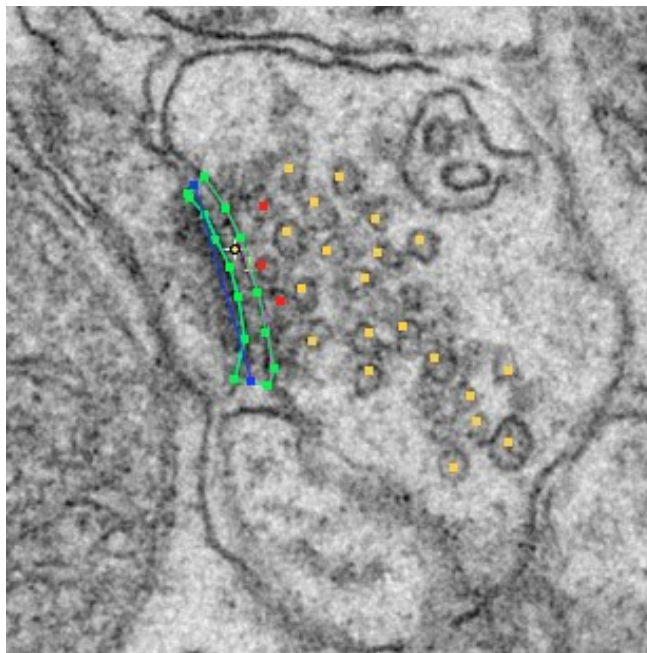


Abbildung 7: Vermessen eines synaptischen Spaltes. Grün: Fläche des synaptischen Spaltes, Blau: Länge des synaptischen Spaltes, Rot: gedockte Vesikel, Gelb: ungedockte Vesikel

2.8 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS 22. Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit two – way ANOVA bestimmt. „Two – way“ weil 2 verschiedene Parameter berücksichtigt wurden: Haltungsbedingungen und Genotyp. Im Falle einer signifikanten Interaktion wurde zusätzlich ein post- hoc Test (Tukey- Test) durchgeführt ansonsten wurden die Haupteffekte (Haltungsbedingung oder Genotyp) analysiert. Die Ergebnisse gelten als statistisch signifikant bei $p < 0,05$ und als statistischer Trend bei $p < 0,1$. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt.

3 Ergebnisse – Resultate

3.1 Zelldichte

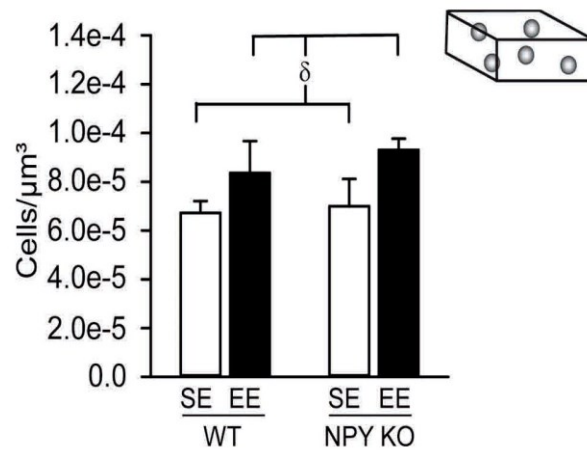


Abbildung 8: Zelldichte (1). EE erhöht die Zelldichte im Hilus des DG unabhängig vom Genotyp. SE= Standard Environment, EE = Environmental Enrichment, WT= Wildtype, NPY KO= Neuropeptid Y Knock Out, $\delta = p < 0,05$ für Haupteffekt: EE vs. SE unabhängig von Genotyp; Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt.

Die Zelldichte im Hilus des DG berechnete ich anhand der lichtmikroskopischen Bilder. Bei der Zelldichte konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Haltungsbedingungen unabhängig vom Genotyp festgestellt werden (Haupteffekt Haltung: $F_{(1,15)}=5.028$, $P=0.040$). In Zahlen ausgedrückt gab es bei den EE Tieren im Schnitt $9 \times 10^{-5} \pm 6 \times 10^{-6}$ Zellen pro μm^3 , bei den SE Tieren nur $7 \times 10^{-5} \pm 5 \times 10^{-6}$ Zellen pro μm^3 . Im Detail: Bei den WT Mäusen in Standard - Haltung gibt es $7 \times 10^{-5} \pm 5 \times 10^{-6}$ Zellen pro μm^3 , bei den WT Mäusen unter EE $8 \times 10^{-5} \pm 1 \times 10^{-5}$ Zellen pro μm^3 . Die NPY KO Mäuse kamen unter Standard Haltung auf $7 \times 10^{-5} \pm 1 \times 10^{-5}$ Zellen pro μm^3 , die NPY KO/EE Mäuse auf $9 \times 10^{-5} \pm 5 \times 10^{-6}$ Zellen pro μm^3 . EE erhöht demnach die Zelldichte, was auf einen strukturellen Umbau im DG schließen lässt.

3.2 Anzahl der Synapsen pro Zelle

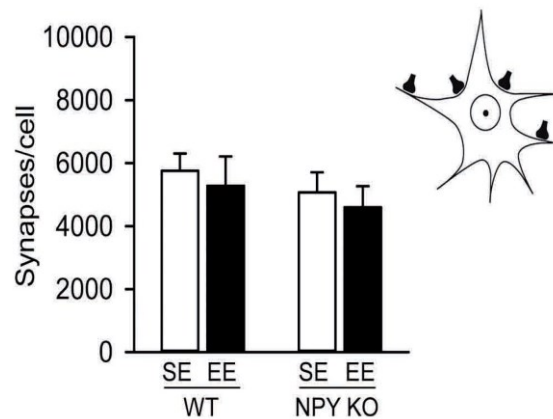


Abbildung 9: Anzahl der Synapsen pro Zelle (1). Bei der Anzahl der Synapsen pro Zelle konnte keine signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. SE= Standard Environment, EE = Environmental Enrichment, WT= Wildtype, NPY KO= Neuropeptid Y Knock Out; Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt.

Die Anzahl der Synapsen pro Neuron wurde weder durch den Genotyp noch durch die Haltungsbedingungen signifikant beeinflusst. Bei 5755 ± 550 Synapsen pro Zelle bei den WT/SE Mäusen, 5281 ± 930 bei den WT/EE Mäusen, 5071 ± 637 bei den NPY KO/SE Mäusen und 4602 ± 665 Synapsen pro Zelle bei den NPY KO/EE Mäusen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden.

3.3 Anzahl der Dense Core Vesikel pro Zelle

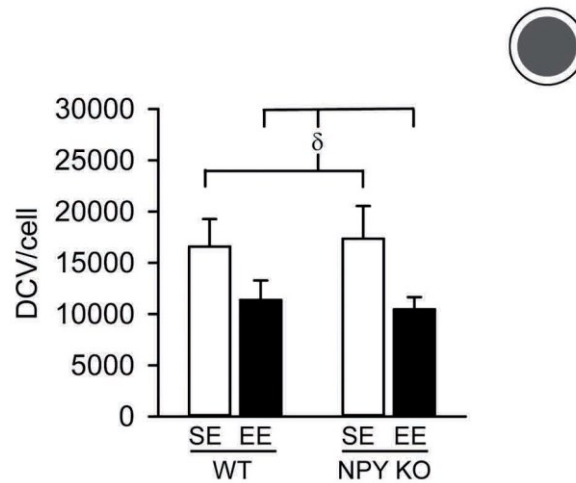


Abbildung 10: Anzahl der Dense Core Vesikel pro Zelle (1). Die Anzahl der Dense Core Vesikel pro Neuron ist unabhängig vom Genotyp bei EE Mäusen signifikant vermindert. SE= Standard Environment, EE = Environmental Enrichment, WT= Wildtype, NPY KO= Neuropeptid Y Knock Out, $\delta = p < 0,05$ für Haupteffekt: EE vs. SE unabhängig von Genotyp; Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt.

Im Gegensatz zu der Anzahl der Synapsen pro Zelle war die Anzahl der Dense Core Vesikel pro Neuron bei den EE Mäusen unabhängig vom Genotyp signifikant vermindert (Haupteffekt Haltung: $F_{(1,15)}=6.135$, $P=0.026$). Unter SE Haltung lag die Anzahl der Dense Core Vesikel bei 16966 ± 1973 , bei EE Haltung nur bei 10867 ± 1011 . Das macht einen Unterschied von durchschnittlich 6099 Dense Core Vesikel pro Zelle zwischen den beiden Haltungsbedingungen. WT/SE Mäuse kamen auf 16576 ± 2701 Dense Core Vesikel pro Neuron, WT/EE Mäuse auf nur noch 11376 ± 1897 Vesikel, NPY KO/SE auf 17355 ± 3187 und NPY KO/EE auf 10461 ± 1196 Vesikel pro Neuron. Da Dense Core Vesikel vor allem Neuropeptide enthalten, lässt diese Verminderung von Dense Core Vesikel bei EE vermuten, dass es bei EE entweder zu einer verminderten Produktion oder zu einer vermehrten Ausschüttung von Neuropeptiden kommt.

3.4 Breite des synaptischen Spaltes

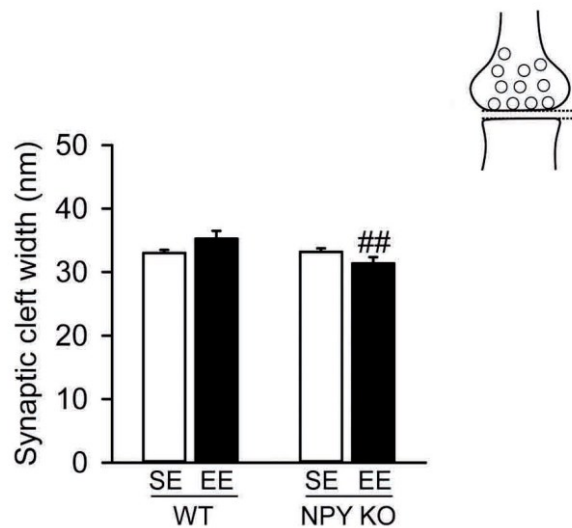


Abbildung 11: Breite des synaptische Spaltes (1). Durch EE kommt es bei WT Tieren zu einer Verbreiterung des synaptischen Spaltes und bei NPY KO Tieren zu einer Verschmälerung des synaptischen Spaltes. SE= Standard Environment, EE = Environmental Enrichment, WT= Wildtype, NPY KO= Neuropeptid Y Knock Out, ## = $p < 0,01$ vs. WT/NPY KO; Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt.

Bei den WT Mäusen führte EE zu einer Vergrößerung des synaptischen Spaltes, während bei den NPY KO Mäusen das Gegenteil durch EE bewirkt wurde, nämlich eine Verschmälerung. Dies lässt vermuten, dass NPY die morphologische Restrukturierung durch EE beeinflusst.

Die Breite des synaptischen Spaltes betrug bei WT/EE Mäusen $35 \pm 1,2$ nm, bei NPY KO/EE Tieren allerdings nur 31 ± 1 nm, ein Unterschied von 4 nm. Die statistische Analyse zeigte, dass der Effekt von EE abhängig vom Genotyp war (Interaktion: $F_{(1-15)}=5.933$, $P=0.028$; post-hoc Test, $P<0.01$ vs. WT/EE).

Die Breite des synaptischen Spaltes bei den WT/SE Mäusen betrug $33 \pm 0,49$ nm, bei NPY KO/SE Tieren $33 \pm 0,57$ nm.

3.5 Anzahl der gedockten Vesikel

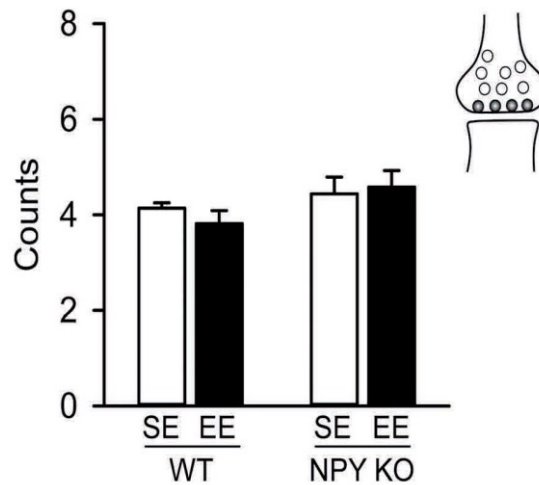


Abbildung 12: Anzahl der gedockten Vesikel (1). Bei der Anzahl der gedockten Vesikel konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. SE= Standard Environment, EE = Environmental Enrichment, WT= Wildtype, NPY KO= Neuropeptid Y Knock Out; Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt.

Bei der Anzahl der gedockten Vesikel konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. WT/SE Mäuse wiesen durchschnittlich 4.1 ± 0.1122 gedockte Vesikel auf, WT/EE Mäuse 3.9 ± 0.3291 ; NPY KO/SE kamen auf 4.5 ± 0.3216 , und NPY KO/EE auf durchschnittlich 4.6 ± 0.3513 gedockte Vesikel.

3.6 Anzahl der ungedockten Vesikel

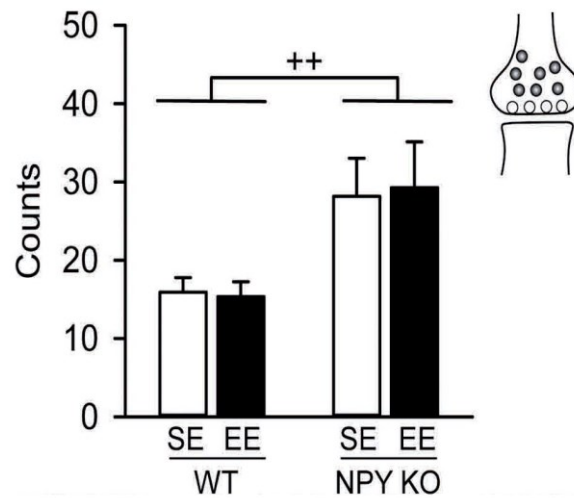


Abbildung 13: Anzahl der ungedockten Vesikel (1). Die Anzahl der ungedockten Vesikel war bei NPY KO Mäusen signifikant erhöht, unabhängig von den Haltungsverhältnissen. SE= Standard Environment, EE = Environmental Enrichment, WT= Wildtype, NPY KO= Neuropeptid Y Knock Out, ++ = $p < 0,01$ für Haupteffekt: NPY KO vs. WT unabhängig von Haltungsverhältnissen; Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt.

Bei der Anzahl der ungedockten Vesikel war ein signifikanter Anstieg bei den NPY KO Mäusen erkennbar, welcher unabhängig von den Haltungsverhältnissen war (Haupteffekt Genotyp: $F_{(1,15)}=9.003$, $P=0.009$). Bei der Gruppe der NPY KO Mäusen gab es mit $30 \pm 3,83$ ungedockten Vesikeln um 13,6 Vesikel mehr als bei den WT Mäusen ($16,4 \pm 1,6543$ ungedockte Vesikel). Die WT/SE Mäusen kamen auf durchschnittlich $15,9 \pm 1,8708$ ungedockte Vesikel, die WT/EE auf $17 \pm 3,2$. Bei den NPY KO Mäusen lag die Anzahl der ungedockten Vesikel bei der SE Gruppe bei $27,2 \pm 5,26$, bei der EE bei $32,8 \pm 5,8669$ Vesikeln.

3.7 Länge der präsynaptischen Membran

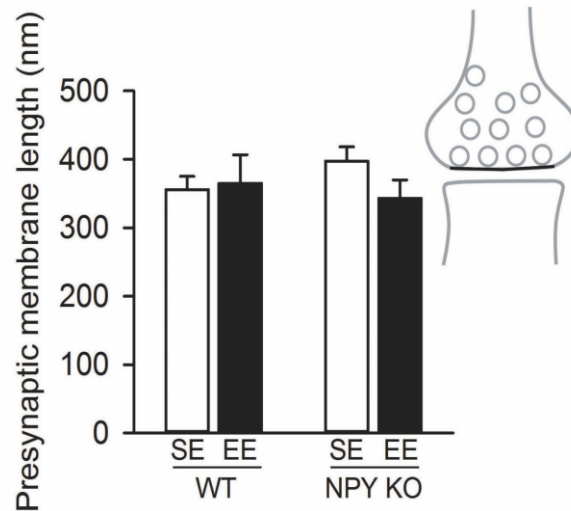


Abbildung 14: Länge der präsynaptischen Membran (1). Die Länge der präsynaptischen Membran blieb bei allen Versuchsgruppen konstant. SE= Standard Environment, EE = Environmental Enrichment, WT= Wildtype, NPY KO= Neuropeptid Y Knock Out; Die Daten werden als Mittelwert ± Standardfehler dargestellt.

Die Länge der präsynaptischen Membran blieb bei allen Versuchsgruppen konstant. Bei den WT/SE Mäusen betrug die Länge der präsynaptischen Membran 356 ± 19 nm, bei den WT/EE Mäusen 365 ± 42 nm, bei den NPY KO/SE 397 ± 21 nm und bei den NPY KO/EE 343 ± 27 nm.

3.8 Länge der postsynaptischen Density

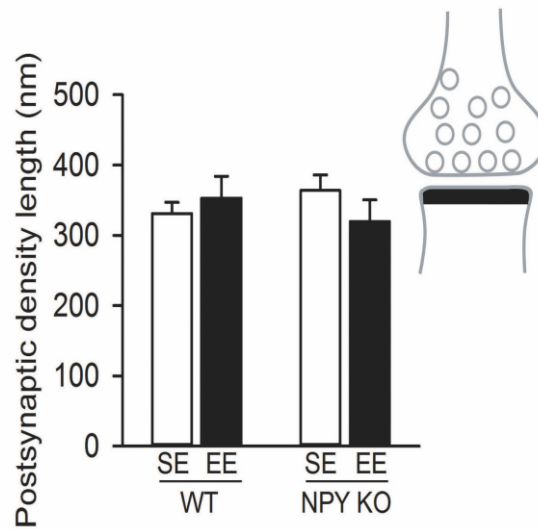


Abbildung 15: Länge der postsynaptischen Density (1). Die Länge der postsynaptischen Density blieb bei allen Versuchsgruppen konstant. SE= Standard Environment, EE = Environmental Enrichment, WT= Wildtype, NPY KO= Neuropeptid Y Knock Out; Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt.

Die Länge der postsynaptischen Density zeigte ebenfalls keinen Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Bei den WT/SE Mäusen betrug die Länge der postsynaptischen Density 331 ± 16 nm, bei den WT/EE Mäusen 353 ± 31 nm, bei den NPY KO/SE 364 ± 22 nm und bei den NPY KO/EE 320 ± 31 nm.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Diplomarbeit war, herauszufinden, ob EE und/oder NPY KO zu ultrastrukturellen Veränderungen im Hippocampus von Mäusen führt. Diese Diplomarbeit war Teil einer Studie, welche sich mit dem Effekt von EE auf die Gehirnfunktion von Mäusen, in Abhängigkeit von NPY beschäftigt (1). Wie bereits aus vorhergehenden Studien bekannt, führt EE zu zahlreichen positiven Verhaltensänderungen bei Mäusen. Sie sind zum Beispiel weniger ängstlich und weniger depressiv (31), lernen schneller und zeigen ein besseres Erinnerungsvermögen (32-34). Außerdem führt EE zu Veränderungen in der Struktur des Gehirns, zu erhöhter adulter Neurogenese und zu Veränderungen des serotonergen Neurotransmitter – Metabolismus (31).

Intrazerebrale Applikation oder erhöhte Konzentration von NPY führt zu ähnlichen Effekten wie EE. Ebenso wie EE vermindert NPY das Angstempfinden (10). Weiters führt Behandlung mit Antidepressiva zu einer Erhöhung der NPY Konzentrationen in verschiedenen Gehirnregionen (35) und transgene Ratten, welche eine Überexpression von pre-pro NPY und vermehrt Zellen mit NPY Produktion im Hippocampus aufweisen, zeigen eine deutliche Verbesserung der räumlichen Erinnerung im Morris Water Maze (36). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass NPY eine wichtige Rolle bei Neuroplastizität und Erinnerungsvermögen spielt (37). Darüber hinaus stimuliert NPY die Neurogenese in der subventrikulären Zone und in der subgranulären Zone des DG (4,9,38). Wie man an den Ergebnissen erkennen kann, führt sowohl der unterschiedliche Genotyp als auch EE zu den unterschiedlichsten Veränderungen im Hippocampus. So führte EE bei beiden Genotypen (WT und NPY KO Mäusen) im DG zu einer Erhöhung der Zelldichte und zu einer verminderten Anzahl von Dense Core Vesikeln. NPY KO Mäuse wiesen hingegen unabhängig von den Haltungsbedingungen eine erhöhte Anzahl von ungedockten synaptischen Vesikeln auf. Die Breite des synaptischen Spaltes wurde wiederum durch EE bei WT Tieren erhöht und bei NPY KO Tieren vermindert. Parameter wie die Anzahl der Synapsen pro Zelle, die Anzahl der gedockten Vesikel, die Länge der präsynaptischen Membran und der postsynaptischen Density wurden weder durch die Haltungsbedingungen noch durch den Genotyp signifikant verändert.

In den folgenden Kapiteln werde ich nun meine Ergebnisse im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Verhaltensversuche aus der Studie präsentieren. Diese Daten werde ich mit Erkenntnissen aus anderen Studien, welche sich mit der Auswirkung von NPY und EE auf Mäuse, Ratten und auch Menschen beschäftigen, in Verbindung bringen.

4.1 Anxiolytische Effekte von EE werden durch NPY beeinflusst

EE und NPY führen beide zu einem positiven Effekt auf das Verhalten von Nagern (5,10), allerdings sind die molekularen Vorgänge die zu diesen Effekten führen, noch nicht ausführlich erforscht. Eine Studie, welche zeigt, dass durch EE ausgelöste Verhaltensänderungen auch auf molekularer Ebene Veränderungen auslösen, stammt von Sztainberg et al. (39). Die Autoren zeigten, dass der anxiolytische Effekt von EE mit einer Down-Regulation von CRHR1 (Corticotropin-releasing hormone receptor type 1) mRNA Expression in der Amygdala korreliert und ein Knockdown von CRHR1 in der Amygdala denselben Effekt bewirkt. Der anxiolytische Effekt von EE wird somit unter anderem über CRHR1 vermittelt (39). Eine weitere Studie die sich mit den molekularen Vorgängen nach EE beschäftigt, ist jene von Hendriksen et al. (40). Werden Ratten einem Angstreiz (in diesem Fall Inescapable Foot Shock, Tiermodell für posttraumatische Belastungsstörung) wiederholt ausgesetzt (Re-Exposure), führt das zu einer Verminderung des Angstreizes. Im Detail zeigten diese Ratten in Verhaltenstests ähnliche Ergebnisse wie die Kontrollgruppen, welche keinem Inescapable Foot Shock ausgesetzt wurden. Ratten ohne Re-Exposure reagierten jedoch wesentlich ängstlicher, mit weniger Bewegung und mehr Freezing. Re-Exposure bewirkte außerdem eine Verminderung der, zuvor wegen Inescapable Foot Shock erhöhten, CRHR1 mRNA Expression und eine Erhöhung der NPY-Y1 mRNA Expression in der Amygdala. In derselben Studie wurde eine Gruppe von Ratten nach Inescapable Foot Shock 2 Wochen lang unter EE gehalten. Die Effekte auf das Verhalten und die CRHR1 und NPY – Y1 Expression waren ähnlich wie unter Re-Exposure (EE Ratten bewegten sich mehr und zeigten weniger Freezing als auch eine Verminderung der CRHR1 mRNA Expression und eine Erhöhung der NPY-Y1 mRNA Expression), und ein deutlicher Unterschied zu der Kontrollgruppe ohne EE war sichtbar (40).

Im Rahmen unserer Studie (1) wurden Verhaltenstests von WT und NPY-KO Mäusen erhoben. Hier zeigte sich, dass der anxiolytische Effekt von EE auch von NPY vermittelt wird. Im Elevated Plus Maze zeigten die WT Tiere nach EE ein weniger ängstliches Verhalten, was an den vermehrten Eintritten und der verlängerten Aufenthaltsdauer in die offenen Arme des Elevated Plus Maze erkennbar ist. Im Gegensatz dazu konnte bei NPY KO Mäusen kein derartiges Verhalten nach EE beobachtet werden. Zusätzlich wurde bei den WT/EE Tieren eine erhöhte NPY mRNA Expression im Hippocampus und Amygdala gemessen. Die NPY Peptidkonzentrationen blieben allerdings konstant, was auf eine erhöhte NPY Turnover Rate hindeutet. Zu dieser Vermutung passt auch die verminderte

Anzahl an Dense Core Vesikeln nach EE. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass NPY benötigt wird, um angstlösendes Verhalten nach EE zu beobachten. Diese 3 Studien (1,39,40) belegen, dass EE Veränderungen auf genetischer Ebene auslösen kann, und eben jene Veränderungen für den angstlösenden Effekt von EE verantwortlich sind.

Im Open Field Test zeigten WT Tiere nach EE kein weniger ängstliches Verhalten. Allerdings waren NPY KO Mäuse generell (unabhängig von den Haltungsbedingungen) ängstlicher als WT Mäuse in diesem Test, was bedeuten könnte, dass EE nur manche Aspekte von Angst beeinflusst (1).

4.2 Effekte von EE unabhängig von Genotyp, Auswirkungen auf Neurogenese

Im Gehirn von Säugetieren gibt es 2 Regionen, in denen Neurogenese im Erwachsenenalter stattfindet: im DG im Hippocampus und in der subventrikulären Zone, welche sich in der Nähe der lateralen Ventrikel befindet. In diesen beiden Bereichen des Gehirns befinden sich nämlich neuronale Stammzellen (41). Adulte Neurogenese wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst, wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren (42), Neurotrophine (43), Cytokine (44) und Neurotransmitter (45). Auch der Lebensstil kann Neurogenese beeinflussen, dazu zählen Faktoren wie Bewegung (46), EE (47), Soziale Interaktionen (48) und Ernährung (49). Kempermann et al. (47) zeigten dass EE zu einer Volumenzunahme in der Körnerzellschicht und zu einer erhöhten Anzahl von Neuronen im DG führt. Bei dieser Diplomarbeit führte EE, unabhängig vom Genotyp zu einer erhöhten Zelldichte, allerdings im DGpl, was auf den ersten Blick verwunderlich ist, da in diesem Bereich des DG im adulten Stadium keine Neurogenese mehr stattfindet (16). Erklären kann man sich die erhöhte Zelldichte damit, dass in der Körnerzellschicht, jene Schicht die den DGpl umgibt (16), auch im Erwachsenenalter noch Neurogenese stattfindet. Diese neugeformten Progenitorzellen, und ihre Dendriten, welche Richtung Molekularschicht (äußerste Schicht des DG) wachsen, könnten zu einer Kompression des innen liegenden DGpl führen. Somit würde die erhöhte Zelldichte auf eine erhöhte Neurogenese in der Körnerzellschicht zurückzuführen sein. Dieser Effekt war bei dieser Studie allerdings unabhängig vom NPY. Bei anderen Studien wurde Neurogenese allerdings durch NPY beeinflusst, sowohl in der subventrikulären Zone als auch im DG (4,38). Diese Ergebnisse deuten drauf hin, dass auch andere Faktoren neben NPY eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von EE-induzierter Neurogenese spielen.

Ebenfalls unabhängig vom Genotyp ist die Anzahl an DCV, welche durch EE vermindert ist. In einer vorhergehenden Studie von Reichmann et al. konnte auch eine Verminderung

der DCV nach EE festgestellt werden (11). Wahrscheinlich führt EE zu einer schnelleren Ausschüttung von Neuropeptiden aus den DCV, sowohl bei WT Mäusen als auch bei NPY KO, weswegen die Anzahl der Speichervesikel bei beiden Genotypen schrumpft. Da NPY KO Tiere kein NPY produzieren, werden wahrscheinlich andere Peptide vermehrt ausgeschüttet. Welche das sind, und welche Konsequenzen das hat, könnten vielversprechende Fragestellungen für Folgeexperimente sein..

4.3 Negative Effekte von EE für NPY KO Mäuse

Nicht immer wirkt sich EE positiv aus. Bei den NPY KO Tieren führte EE zu einer negativen Entwicklung, und zwar zu stressinduzierter Hyperthermie und einer Verschlechterung der räumlichen Erinnerung. Bei den Versuchen im Barnes Maze zeigte sich bei den NPY KO Mäusen ein hypolokomotorischer, hypoexplorativer und ängstlicher Phänotyp, aber keine Lernschwäche. Misst man allerdings jene Zeit welche die Mäuse im Zielquadranten verbringen, ein Parameter welcher nicht durch verminderte Bewegung und Ängstlichkeit beeinflusst wird, stellt sich heraus dass NPY KO Tiere nach EE weniger Zeit im Zielquadranten verbringen als NPY KO Tiere nach SE. Das deutet auf eine durch EE ausgelöste Merkfähigkeitsstörung hin (1).

Ein Grund dafür könnte eine Veränderung in der synaptischen Ultrastruktur im DGpl sein. Sowohl in einer vorhergehenden Studie von Reichmann et al. (11) als auch in dieser Studie konnte festgestellt werden, dass EE bei WT Tieren zu einer Verbreiterung des synaptischen Spaltes führt. Bei beiden Studien schnitten die WT/EE Mäuse in Verhaltenstests jedoch besser ab, als jene Mäuse, bei denen keine Verbreiterung des synaptischen Spaltes festgestellt wurde. Bei dieser Studie (1) konnte nun ein weiterer Effekt von EE festgestellt werden: bei den NPY KO Tieren führt EE zu eine Verminderung der Breite des synaptischen Spaltes. Diese Ergebnisse scheinen auf den ersten Blick seltsam, da eine Verbreiterung des synaptischen Spaltes mit einer schlechteren Neurotransmitterübertragung und herabgesetzten synaptischen Leistungsfähigkeit gleichgesetzt wird (50) und Tiere mit derartigen ultrastrukturellen Veränderungen bei anderen Studien (50,51) auch in Verhaltensversuchen schlechter abschnitten. Umgekehrt sollte eine Verminderung der Breite des synaptischen Spaltes eigentlich zu einer verbesserten synaptischen Übertragung im DGpl und somit zu einem besseren Abschneiden in den Verhaltenstests führen.

Zum Beispiel zeigten Li et al (51), dass Chronic Unpredictable Mild Stress bei Ratten zu einer Verbreiterung des synaptischen Spaltes im Gyrus cinguli Area 1 und einer erhöhten Immobilität im Forced Swim Test führt. Behandelt man die gestressten Ratten jedoch mit

Escitalopram (ein selektiver Serotonin – Wiederaufnahmehemmer, zur Behandlung u.a. von Depressionen und Panikstörungen), vermindert sich die Breite des synaptischen Spaltes und auch die Immobilität im Forced Swim Test, im Vergleich zu den Tieren ohne Escitalopram – Behandlung. Die Breite des synaptischen Spaltes ist dann sogar mit jenen Tieren, welche keinem Stress ausgesetzt waren und keine Escitalopram – Behandlung bekommen haben, vergleichbar. Auch Di et al. (52) zeigten in ihrer Studie, dass Ratten, welche 90 Tage lang mit einem lauten Eisenbahngeräusch beschallt wurden, eine Verbreiterung des synaptischen Spaltes in Synapsen im Hippocampus, Amygdala und im Temporallappen aufweisen. Mit diesen Tieren wurden keine Verhaltenstests durchgeführt, Di et al. vermuten jedoch, dass jene Tiere, mit verbreitertem synaptischem Spalt darin schlechter abschneiden würden, da Neurotransmitter länger brauchen um einen breiteren synaptischen Spalt zu überwinden, und somit die Übertragungseffizienz herabgesetzt ist (52). Bei einer Studie welche die Auswirkungen von Aluminium auf die synaptische Ultrastruktur untersuchte (50) kam es unter Aluminiumgabe zu einer Verbreiterung des synaptischen Spaltes im frontalen Cortex und der CA3 Area des Hippocampus, und einer damit einhergehenden Verschlechterung der kognitiven Fähigkeiten im Morris Water Maze.

Beim Vergleich dieser Studien muss man natürlich beachten, dass unterschiedliche Gehirnbereiche untersucht wurden. In der aktuellen Studie wurden Synapsen im DGpl untersucht. Die Synapsen befinden sich zwischen den Dendriten der Mooszellen, HIPP und HICAP Zellen und den Axonen der Körnerzellen oder Axonen aus extrahippocampalen Regionen, wie z.B. den Septumkernen oder den supramammillären Kernen. NPY, welches aus den HIPP Zellen freigesetzt wird, wirkt sowohl inhibierend auf die Körnerzellen als auch über Autorezeptoren auf die HIPP Zellen selbst (17). Es ist somit durchaus möglich, dass ein schmalere synaptischer Spalt im DGpl einen negativen Einfluss auf die Verarbeitung von Erinnerungen hat, und somit zu Auswirkungen auf die Verhaltenstests führt.

4.4 Effekte von NPY KO welche unabhängig von Haltungsbedingungen sind

NPY KO Mäuse, zeigten in der aktuellen Studie (1) unabhängig von den Haltungsbedingungen einen speziellen Phänotyp, der auch in anderen Studien schon beobachtet wurde (27). Im Open Field Test verbrachten die Mäuse weniger Zeit im zentralen Bereich und bewegten sich auch weniger oft in diesen Bereich hinein (1). Dieses Verhalten deutet auf ein erhöhtes Angstverhalten hin. Außerdem bewegten sich die NPY

KO Mäuse weniger als die WT Mäuse, was den hypolokomotorischen Phänotyp der Mäuse bestätigt. Zusätzlich zeigten die NPY KO Mäuse ein depressiveres Verhalten im Forced Swim Test, da sie mehr immobile Phasen als die WT Tiere hatten (1). Dieses Verhalten der NPY KO Mäuse war in der aktuellen Studie mit veränderten Konzentrationen von BDNF (brain derived neurotrophic factor) in der Amygdala und von CORT (Corticosteron) assoziiert. Bei der NPY KO Gruppe kam es sowohl zu einer Erhöhung der BDNF als auch der CORT Konzentration, was zum beobachteten Phänotyp der NPY KO Mäuse beitragen dürfte.

Allerdings könnten auch ultrastrukturelle Veränderungen zu diesem Phänotyp beitragen. Die elektronenmikroskopische Analyse zeigte nämlich eine erhöhte Anzahl an ungedockten synaptischen Vesikeln bei den NPY KO Mäusen. Zu den ungedockten Vesikeln einer Synapse zählen all jene, welche nicht morphologisch mit der aktiven Zone assoziiert sind. Diese Vesikel gehören meist dem TRP oder dem Resting Pool (RtP) an (19). Dieser RtP an Vesikeln dient nun einerseits als Puffer für lösliche Proteine, welche im Recycling von Vesikeln beteiligt sind (21). Andererseits dient der RtP als Vesikelspender und -empfängerpool für den TRP (19). Eine Vergrößerung der Anzahl an ungedockten Vesikeln könnte nun bedeuten, dass mehr Vesikel recycelt werden, und deshalb ein größerer Puffer für die löslichen Proteine benötigt wird. Eine andere Erklärung wäre, dass mehr Vesikel im RtP gespeichert werden. Da der Effekt abhängig vom Genotyp ist, könnte NPY einen wichtigen Einfluss auf diese Vorgänge haben.

4.5 Schlussfolgerung

Im Gyrus dentatus von Mäusen führt EE zu deutlichen Veränderungen der synaptischen Ultrastruktur, wie zum Beispiel einer erhöhten Breite des synaptischen Spaltes und einer verringerten Anzahl an dense-core-Vesikeln (11). Hier wurde erstmals untersucht, ob NPY KO einen Einfluss auf diese Effekte von EE hat. Es wurde festgestellt, dass bestimmte Auswirkungen von EE, wie zum Beispiel eine erhöhte Zelldichte im DG und eine verminderte Anzahl an DCV, unabhängig vom Genotyp auftreten. Wiederum führte NPY KO, unabhängig von den Haltungsbedingungen, zu einer erhöhten Anzahl an ungedockten synaptischen Vesikeln.

Während jedoch EE in WT Mäusen zu einer erhöhten Breite des synaptischen Spaltes führte, war die Breite bei NPY-KO Mäusen nach EE signifikant erhöht, was darauf schließen lässt, dass NPY an den Veränderungen der Breite des synaptischen Spaltes durch EE maßgeblich beteiligt ist.

Diese Arbeit in Zusammenhang mit den damit assoziierten Verhaltensergebnissen (1) gibt Hinweise darauf dass NPY dafür benutzt werden könnte, um neue Medikamente, sogenannte Enviromimetics, herzustellen. Enviromimetics sind Medikamente, welche die positiven Effekte von geistiger Stimulation und physischer Aktivität nachahmen und verstärken. Für die Entwicklung dieser Medikamente ist es wichtig, die zellulären Vorgänge zu untersuchen, welche Synaptogenese, synaptischer Plastizität und anderen zellulären Veränderungen zugrunde liegen (53). Diese Diplomarbeit ist ein kleiner Beitrag zum besseren Verständnis dieser molekularen Vorgänge.

5 Literaturverzeichnis

- (1) Reichmann F. Neuropeptide Y genotype determines the effect of environmental enrichment on brain and behavior. submitted.
- (2) Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998 Nov;4(11):1313-1317.
- (3) Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 1996 Mar 15;16(6):2027-2033.
- (4) Decressac M, Wright B, David B, Tyers P, Jaber M, Barker RA, et al. Exogenous neuropeptide Y promotes in vivo hippocampal neurogenesis. *Hippocampus* 2011 Mar;21(3):233-238.
- (5) Simpson J, Kelly JP. The impact of environmental enrichment in laboratory rats--behavioural and neurochemical aspects. *Behav Brain Res* 2011 Sep 12;222(1):246-264.
- (6) van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 2000 Dec;1(3):191-198.
- (7) Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson PS. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J Neurobiol* 1999 Jun 15;39(4):569-578.
- (8) Lu L, Bao G, Chen H, Xia P, Fan X, Zhang J, et al. Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments. *Exp Neurol* 2003 Oct;183(2):600-609.
- (9) Zaben MJ, Gray WP. Neuropeptides and hippocampal neurogenesis. *Neuropeptides* 2013 Dec;47(6):431-438.
- (10) Heilig M. The NPY system in stress, anxiety and depression. *Neuropeptides* 2004;38:213-224.
- (11) Reichmann F, Painsipp E, Holzer P, Kummer D, Bock E, Leitinger G. A novel unbiased counting method for the quantification of synapses in the mouse brain. *J Neurosci Methods* 2015 Jan 30;240:13-21.
- (12) Reichmann F, Holzer P. Neuropeptide Y: A stressful review. *Neuropeptides* 2015 Sep 30.
- (13) Bannon AW, Seda J, Carmouche M, Francis JM, Norman MH, Karbon B, et al. Behavioral characterization of neuropeptide Y knockout mice. *Brain Res* 2000 Jun 16;868(1):79-87.
- (14) Serova LI, Tillinger A, Alaluf LG, Laukova M, Keegan K, Sabban EL. Single intranasal neuropeptide Y infusion attenuates development of PTSD-like symptoms to traumatic stress in rats. *Neuroscience* 2013 Apr 16;236:298-312.
- (15) Lacroix JS, Ricchetti AP, Morel D, Mossimann B, Waeber B, Grouzmann E. Intranasal administration of neuropeptide Y in man: systemic absorption and functional effects. *Br J Pharmacol* 1996 Aug;118(8):2079-2084.
- (16) Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res* 2007;163:3-22.
- (17) Nadler JV, Tu B, Timofeeva O, Jiao Y, Herzog H. Neuropeptide Y in the recurrent mossy fiber pathway. *Peptides* 2007 Feb;28(2):357-364.
- (18) Harris KM, Weinberg RJ. Ultrastructure of synapses in the mammalian brain. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012 May 1;4(5):10.1101/cshperspect.a005587.

- (19) Fowler MW, Staras K. Synaptic vesicle pools: Principles, properties and limitations. *Exp Cell Res* 2015 Jul 15;335(2):150-156.
- (20) Alabi AA, Tsien RW. Synaptic vesicle pools and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012 Aug 1;4(8):a013680.
- (21) Denker A, Krohnert K, Buckers J, Neher E, Rizzoli SO. The reserve pool of synaptic vesicles acts as a buffer for proteins involved in synaptic vesicle recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 Oct 11;108(41):17183-17188.
- (22) Torrealba F, Carrasco MA. A review on electron microscopy and neurotransmitter systems. *Brain Res Brain Res Rev* 2004 Dec;47(1-3):5-17.
- (23) Park Y, Kim KT. Short-term plasticity of small synaptic vesicle (SSV) and large dense-core vesicle (LDCV) exocytosis. *Cell Signal* 2009 Oct;21(10):1465-1470.
- (24) Attar A, Liu T, Chan WT, Hayes J, Nejad M, Lei K, et al. A shortened Barnes maze protocol reveals memory deficits at 4-months of age in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 2013 Nov 13;8(11):e80355.
- (25) Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 2003 Feb 28;463(1-3):3-33.
- (26) Terry AV, Jr. Spatial Navigation (Water Maze) Tasks. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd ed. Boca Raton (FL): Taylor & Francis Group, LLC; 2009.
- (27) Karl T, Duffy L, Herzog H. Behavioural profile of a new mouse model for NPY deficiency. *Eur J Neurosci* 2008 Jul;28(1):173-180.
- (28) Reichmann F, Painsipp E, Holzer P. Environmental enrichment and gut inflammation modify stress-induced c-Fos expression in the mouse corticolimbic system. *PLoS One* 2013;8(1):e54811.
- (29) Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988 Oct;96(10):857-881.
- (30) Mayhew TM. How to count synapses unbiasedly and efficiently at the ultrastructural level: proposal for a standard sampling and counting protocol. *J Neurocytol* 1996 Dec;25(12):793-804.
- (31) Leger M, Paizanis E, Dzahini K, Quiedeville A, Bouet V, Cassel JC, et al. Environmental Enrichment Duration Differentially Affects Behavior and Neuroplasticity in Adult Mice. *Cereb Cortex* 2015 Nov;25(11):4048-4061.
- (32) Doulames V, Lee S, Shea TB. Environmental enrichment and social interaction improve cognitive function and decrease reactive oxidative species in normal adult mice. *Int J Neurosci* 2014 May;124(5):369-376.
- (33) Frick KM, Stearns NA, Pan JY, Berger-Sweeney J. Effects of environmental enrichment on spatial memory and neurochemistry in middle-aged mice. *Learn Mem* 2003 May-Jun;10(3):187-198.
- (34) Girbovan C, Plamondon H. Environmental enrichment in female rodents: considerations in the effects on behavior and biochemical markers. *Behav Brain Res* 2013 Sep 15;253:178-190.
- (35) Heilig M, Wahlestedt C, Ekman R, Widerlov E. Antidepressant drugs increase the concentration of neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in the rat brain. *Eur J Pharmacol* 1988 Mar 15;147(3):465-467.
- (36) Thorsell A, Michalkiewicz M, Dumont Y, Quirion R, Caberlotto L, Rimondini R, et al. Behavioral insensitivity to restraint stress, absent fear suppression of behavior and impaired spatial learning in transgenic

rats with hippocampal neuropeptide Y overexpression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Nov 7;97(23):12852-12857.

(37) Gotzsche CR, Woldbye DP. The role of NPY in learning and memory. *Neuropeptides* 2015 Oct 3.

(38) Deceasac M, Prestoz L, Veran J, Cantereau A, Jaber M, Gaillard A. Neuropeptide Y stimulates proliferation, migration and differentiation of neural precursors from the subventricular zone in adult mice. *Neurobiol Dis* 2009 Jun;34(3):441-449.

(39) Sztainberg Y, Kuperman Y, Tsoory M, Lebow M, Chen A. The anxiolytic effect of environmental enrichment is mediated via amygdalar CRF receptor type 1. *Mol Psychiatry* 2010 Sep;15(9):905-917.

(40) Hendriksen H, Bink DI, Daniels EG, Pandit R, Piriou C, Slieker R, et al. Re-exposure and environmental enrichment reveal NPY-Y1 as a possible target for post-traumatic stress disorder. *Neuropharmacology* 2012 Sep;63(4):733-742.

(41) Malva JO, Xapelli S, Baptista S, Valero J, Agasse F, Ferreira R, et al. Multifaces of neuropeptide Y in the brain--neuroprotection, neurogenesis and neuroinflammation. *Neuropeptides* 2012 Dec;46(6):299-308.

(42) Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* 1997 Aug 1;17(15):5820-5829.

(43) Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 2008 Feb 22;132(4):645-660.

(44) Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, Landa G, Talpalar AE, Pluchino S, et al. Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 2006 Jan;31(1):149-160.

(45) Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron* 2005 Sep 15;47(6):803-815.

(46) van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 1999 Mar;2(3):266-270.

(47) Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 1997 Apr 3;386(6624):493-495.

(48) Gheusi G, Ortega-Perez I, Murray K, Lledo PM. A niche for adult neurogenesis in social behavior. *Behav Brain Res* 2009 Jun 25;200(2):315-322.

(49) Park HR, Lee J. Neurogenic contributions made by dietary regulation to hippocampal neurogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2011 Jul;1229:23-28.

(50) Jing Y, Wang Z, Song Y. Quantitative study of aluminum-induced changes in synaptic ultrastructure in rats. *Synapse* 2004 Jun 15;52(4):292-298.

(51) Li XL, Yuan YG, Xu H, Wu D, Gong WG, Geng LY, et al. Changed Synaptic Plasticity in Neural Circuits of Depressive-Like and Escitalopram-Treated Rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 2015 Apr 21;18(10):pyv046.

(52) Di G, Zheng Y. Effects of high-speed railway noise on the synaptic ultrastructure and phosphorylated-CaMKII expression in the central nervous system of SD rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 2013 Jan;35(1):93-99.

(53) Pang TY, Hannan AJ. Enhancement of cognitive function in models of brain disease through environmental enrichment and physical activity. *Neuropharmacology* 2013 Jan;64:515-528.

