

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR NEUROLOGIE  
PROF. DR. MED. ULRICH BOGDAHN

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

*Der Einfluss humanen Wildtyp  $\alpha$ -Synucleins auf die Adulte Neurogenese  
am Beispiel der transgenen mThy1  $\alpha$ -Synuclein Maus*

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
*Sebastian Robert Schreglmann*

2010



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR NEUROLOGIE  
PROF. DR. MED. ULRICH BOGDAHN

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

*Der Einfluss humanen Wildtyp  $\alpha$ -Synucleins auf die Adulte Neurogenese  
am Beispiel der transgenen mThy1  $\alpha$ -Synuclein Maus*

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
*Sebastian Robert Schreglmann*

2010

Dekan:	Prof. Dr. med. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	PD Dr. med. Beate Winner
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Olaf Strauß
Tag der mündlichen Prüfung:	20. Dezember 2010

*In Dankbarkeit,  
meinen lieben Eltern*

EINLEITUNG .....	8
I. Adulte Neurogenese in Hippocampus und im System Subventrikularzone / Bulbus olfactorius.....	8
Neurale Stammzellen .....	8
Gyrus dentatus des Hippocampus .....	9
Subventrikularzone / Bulbus olfactorius.....	13
II. Idiopathisches Parkinson Syndrom und $\alpha$ -Synuclein.....	17
III. Hypothese und Fragestellung .....	24
MATERIALIEN UND METHODEN.....	25
I. Adulte Neurogenese der transgenen mThy1 human Wildtyp $\alpha$ -Synuclein Maus.....	25
mThy1 Tiere und Genkonstrukt .....	25
Versuchsdesign.....	25
BrdU Injektionen, Perfusion, Fixierung, Gewebepräparation & Histologie .....	26
Stereologische Auswertung .....	30
Konfokalmikroskopie und digitale Bildbearbeitung.....	33
II. Temporales Expressionsmuster von $\alpha$ -Synuclein im Gyrus Dentatus adulter transgener mThy1 und hPDGF $\beta$ human Wildtyp $\alpha$ -Synuclein Mäuse .....	35
hPDGF $\beta$ Tiere & Genkonstrukt.....	35
Versuchsdesign.....	35
Immunfluoreszenz und Mikroskopie .....	36
III. Ultrastrukturelle Analyse der Dendriten neu gebildeter Neurone adulter, transgener $\alpha$ -Synuclein Mäuse.....	38
Versuchsdesign.....	38
Retrovirus und stereotaktisch-intrazerebrale Injektionen .....	38
Gewebepräparation & Mikroskopie.....	41
Digitale Bildbearbeitung und Auswertung .....	42
IV. Statistische Auswertung .....	43

ERGEBNISSE .....	44
I. Adulte Hippocampale Neurogenese: mThy1 $\alpha$ -Synuclein beeinflusst die Neuroblastenreifung.....	44
mThy1 $\alpha$ -Synuclein vermindert Zahl reifer Neuroblasten.....	44
mThy1 $\alpha$ -Synuclein hat keinen Einfluss auf Zellüberleben, –Reifung, -Proliferation, Apoptose und Volumen des DG .....	45
II. Adulte Neurogenese im System SVZ/OB: mThy1 $\alpha$ -Synuclein beeinflusst die dopaminerge Differenzierung neu gebildeter Neurone in der Glomerulärzellschicht des Bulbus olfactorius .....	50
mThy1 $\alpha$ -Synuclein verringert die dopaminerge Differenzierung von NPCs in der Glomerulärzellschicht .....	50
mThy1 $\alpha$ -Synuclein hat keinen Einfluss auf Zellproliferation, -überleben, sowie das Volumen von SVZ und OB .....	51
III. Temporale Expression von $\alpha$ -Synuclein: Vergleich der Promotoren hPDGF $\beta$ und mThy1 .....	55
IV. Ultrastrukturelle Analyse der Dendriten neugebildeter Neurone adulter, transgener $\alpha$ -Synuclein Mäuse.....	58
Dendritenmorphologie in transgenen $\alpha$ -Synuclein Mausmodellen .....	58
mThy1 $\alpha$ -Synuclein beeinflusst Dendritenlänge, jedoch nicht Dichte dendritischer Verzweigungen .....	59
Dichte und Morphologie dendritischer spines .....	61
DISKUSSION .....	63
ZUSAMMENFASSUNG.....	80
DANKSAGUNG, ERKLÄRUNG & LEBENS LAUF .....	82
LITERATURVERZEICHNIS .....	85
ANHANG.....	97
Abbildungsverzeichnis.....	97
Abkürzungsverzeichnis .....	101

## Einleitung

### I. Adulte Neurogenese in Hippocampus und im System Subventrikularzone / Bulbus olfactorius

*“Once development was ended, the fonts of growth and regeneration of the axons and dendrites dried up irrevocably. In the adult centers, the nerve paths are something fixed, and immutable: everything may die, nothing may be regenerated.”*

Santiago Ramon y Cajal (Cajal, 1928)

Bis spät in die zweite Hälfte des 20. Jahrhunderts hielt das von Santiago Ramon y Cajal aufgestellte Dogma der Neurobiologie Stand, daß es im erwachsenen Zentralnervensystem keine weitere Proliferation und Neubildung von Nervenzellen gäbe (Cajal, 1928). Erst 1967 gelang es nachzuweisen, daß im Gehirn postnataler Ratten kontinuierlich neue Neurone gebildet werden (Altman and Das, 1965a). Schon in diesem Artikel wurden die beiden Gehirnregionen, in denen eine Neubildung von Nervenzellen zu beobachten ist, beschrieben: die Subgranulärzellschicht (SGZ) des im Hippocampus gelegenen Gyrus Dentatus (*dentate gyrus*, DG) und die Subventrikularzone (SVZ), von der aus neu gebildete Neurone in den Bulbus olfactorius (*olfactory bulb*, OB) migrieren.

Seither wurde das Phänomen der adulten Neurogenese u.a. bei Fischen (Meyer, 1978), Reptilien und Amphibien (Chapouton et al., 2007), Singvögeln (Goldman and Nottebohm, 1983), Affen (Gould et al., 1998) sowie beim Menschen (Eriksson et al., 1998) beschrieben. Das detaillierteste Wissen hierzu wurde jedoch vor allem an Ratten und Mäusen erarbeitet (Altman and Das, 1965a, b; Kempermann et al., 1997).

#### *Neurale Stammzellen*

Folgende Eigenschaften definieren eine neurale Stammzelle: *a*, die Fähigkeit neuronal zu differenzieren; *b*, die Kapazität zur Selbsterneuerung; *c*, die Fähigkeit sich durch asymmetrische Zellteilung in andere Zelltypen zu differenzieren (Gage, 2000). Die primären neuronalen Stammzellen des embryonalen Gehirns stellen die in der Ventrikularzone gelegenen sog. Radialen Gliazellen dar, die durch elongierte Morphologie und die Ausbildung eines apikalen und basalen Kontaktes mit dem Ventrikel, bzw. der pialen Oberfläche charakterisiert

sind (Anthony et al., 2004; Mirzadeh et al., 2008). Aus diesen bilden sich peri- und postnatal sog. Intermediäre Vorläuferzellen, die in der SVZ liegen (Noctor et al., 2007).

Für den adulten Organismus wird in der Literatur der Terminus Neurale Vorläuferzelle (*neural precursor cell*, NPC) verwendet. Bislang konnten sämtliche Stammzelleigenschaften adulter NPCs *in vivo* nur unvollständig gezeigt werden (Zhao et al., 2008). Sowohl im DG des Hippocampus als auch in der SVZ handelt es sich bei den NPCs um *glial fibrillary acidic protein* (GFAP)-exprimierende, SOX2-positive Astrozyten (Doetsch et al., 1999; Seri et al., 2001; Alvarez-Buylla and Lim, 2004; Garcia et al., 2004).

Während der Entwicklung von NPC bis zur Integration eines neu gebildeten Neuron lassen sich Veränderungen in Wanderungsverhalten, Zellmorphologie, immunhistochemischen Phänotyp, elektrophysiologischen Eigenschaften, wie auch dem Wachstum von Dendriten und Synapsen beobachten. Um der diesbezüglichen Unterschiede in DG und SVZ Rechnung zu tragen, werden sie im Folgenden nacheinander dargestellt.

### *Gyrus dentatus des Hippocampus*

In der SGZ des im Hippocampus gelegenen DG konnten zwei Typen von NPCs identifiziert werden: Typ 1 NPCs zeichnen sich durch die Coexpression von GFAP, dem Intermediärfilament Nestin und dem Transkriptionsfaktor Sox2 aus. Morphologisch zeigen sie kurze tangential zur Granulärzellschicht verlaufende Dendriten, sowie einen prominenten, radial die Granulärzellschicht durchziehenden Dendriten, der sich in der inneren Molekularzellschicht reich verzweigt. Typ 2 NPCs hingegen zeigen nur einen kurzen Dendriten, eine positive Immunreaktivität gegen Nestin und Sox2, jedoch fehlende gegen GFAP. Für diese Zellen konnte erstmals gezeigt werden, daß sie die Eigenschaft zur Selbsterneuerung besitzen und sich in Neurone und Astrozyten differenzieren können – was auf die Stammzelleigenschaften von NPCs hinweist (Fukuda et al., 2003; Suh et al., 2007).

In der direkten Umgebung der NPCs, der sog. *neurogenen Nische*, wirken verschiedene physiologische Faktoren auf Proliferation, Differenzierung und Reifung dieser Zellpopulation (Wurmser et al., 2004). Darunter befinden sich lösliche Signalproteine, wie z.B. *sonic hedgehog* (shh) (Breunig et al., 2008; Han et al., 2008), *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) (Duman and Monteggia, 2006) oder von endothelialen Zellen sezernierte Botenstoffe (Shen et al., 2004). Auch zelluläre Bestandteile wirken auf NPCs, wie z.B. hippocampale Astrozyten (Song et al., 2002) über den *Wnt* Signaltransduktionsweg (Lie et al.,

2005), bzw. eine Antagonisierung des *bone morphogenetic protein* (BMP) Signalproteins, welches ungehemmt eine gliale Differenzierung der NPCs bewirken würde (Lim et al., 2000; Ueki et al., 2003).

Anhand des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) wurde nachgewiesen, daß sich die Regulation von Angiogenese und Neurogenese *in vivo* nicht nur überschneidet, sondern teilweise auch über die selben Botenstoffe reguliert wird (Cao et al., 2004).

Abschließend sei auf die Rolle von Neurotransmittern hingewiesen: der von Neuronen der lokalen Schaltkreise sezernierte Transmitter Gamma-Amino-Buttersäure (GABA) begünstigt eine neuronale Differenzierung der Progenitorzellen (Tozuka et al., 2005). Daneben ist bei fehlender dopaminergem Innervierung der SGZ im DG die dortige Zellproliferation vermindert (Höglinger et al., 2004). Auch der Transmitter Glutamat, dessen Wirkung über den N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor vermittelt wird, beeinflusst Proliferation und Neurogenese (Nácher et al., 2007).

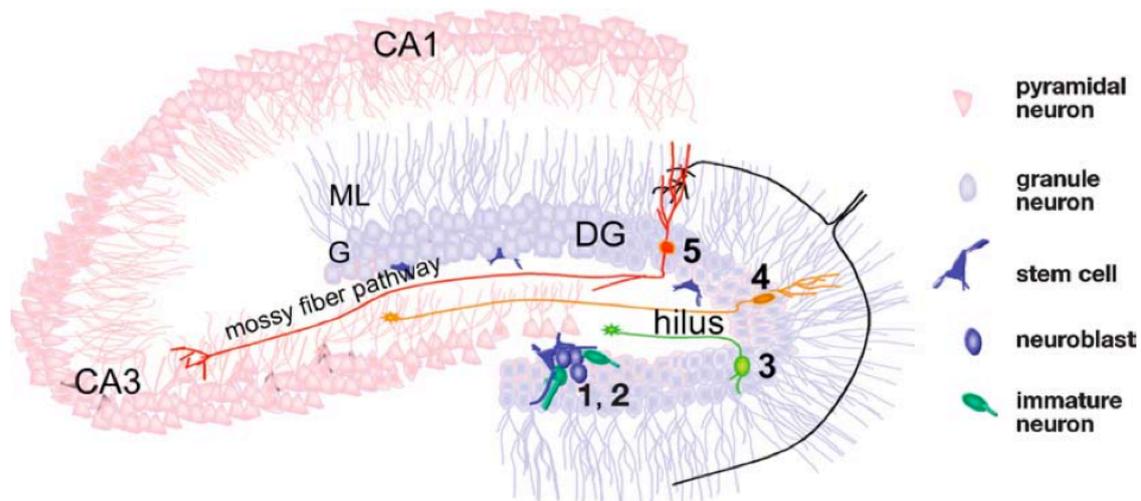


Abb. 1; Entstehung neu gebildeter Granulärzellneurone aus neuronalen Stammzellen der Subgranulärzellschicht im Gyrus dentatus des Hippocampus; (1) Typ I & II NPCs der Subgranulärzellschicht wandern (2) in das hiläre Drittel des Gyrus dentatus, wo sie über einen Zeitraum von etwa vier Wochen die Stadien (3-5) der Reifung von Axon, Dendriten, dendritischen spines und Synapsen durchlaufen, Afferenzen aus dem entorhinalen Cortex erhalten und Efferenzen zur CA3 Region aussenden; (Ming and Song, 2005)

Die von den NPCs der SGZ gebildeten Neuroblasten wandern während ihrer Reifung nur ein kurzes Stück bis in das dem Hilus zugewandte Drittel der Granulärzellschicht (*granule cell layer*, GCL) des DG und reifen dabei zu exzitatorischen Granulärzellneuronen

und Parvalbumin-positiven, inhibitorischen Interneuronen (Liu et al., 2003). Dieser Vorgang kann in vier Stadien eingeteilt werden (Zhao et al., 2006): Im *Stadium A* beginnen die initialen morphogenetischen Vorgänge der Polarisierung, Migration und das Wachstum von Axon und Dendriten. Das *Stadium B* beschreibt den Zeitraum des weiteren Neuritenwachstums, in dem zuerst das Axon die CA3-Region des Hippocampus [~Tag 10-11 nach Geburt (n.G.)] und dann die Dendriten den äußeren Rand der Molekularschicht (*molecular cell layer*, MOL) erreichen (~ Tag 21 n.G.) (Hastings and Gould, 1999). Schon während der letzten Phase des Neuritenwachstums, ab Tag 16 n.G. der Zelle, beginnt *Stadium C*, das Knospen von Filopodien, die sich zu dendritischen Dornfortsätzen (*spines*) entwickeln. Diese *spines* stellen im zentralen Nervensystem die Struktur dar, an denen über 90% aller exzitatorischen Synapsen lokalisiert sind (Bourne and Harris, 2008). Im *Stadium D* werden vorhandene synaptische Verknüpfungen weiter modifiziert, was sich durch die Ausbildung voluminöser, sog. *mushroom spines* auszeichnet. Dieses finale Stadium hält Monate an.

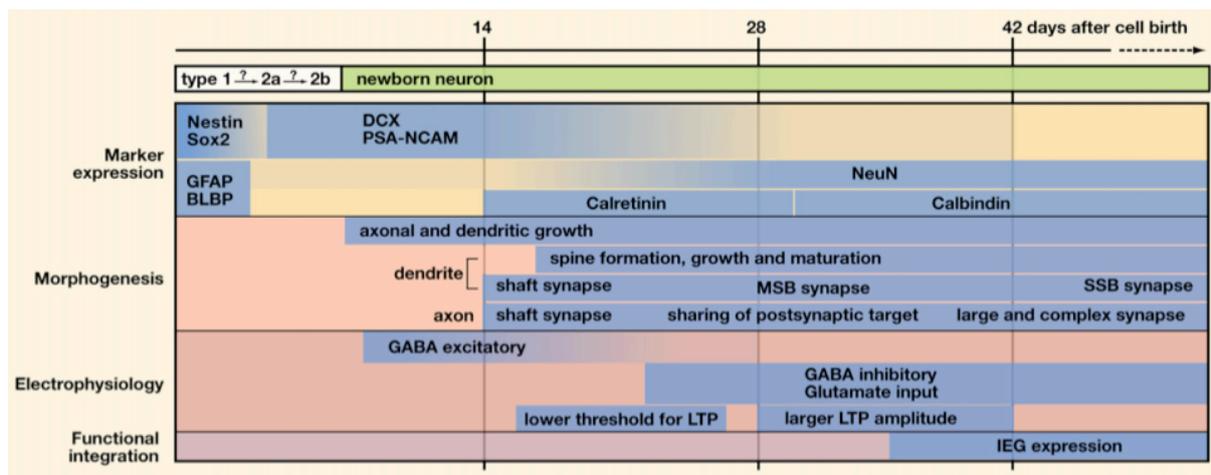


Abb. 2; Schematische Darstellung der adulten hippocampalen Neurogenese; zeitliche Abfolge wichtiger Entwicklungsschritte eines neu geborenen Neurons: Expression stadienspezifischer Marker, Wachstum der Neuriten und *spines*, elektrophysiologische Eigenschaften und funktionale Integration; (Zhao et al., 2008)

Während dieser Migration und Reifung verändert sich das Expressions- und immunhistochemische Färbemuster zytosolischer und nukleärer Markerproteine auf und in diesen Zellen: Die initiale Stammzellpopulation der Typ 1 NPCs ist durch die Kombination aus SOX2, Nestin und GFAP gekennzeichnet, Typ 2 NPCs fehlt im Vergleich dazu die GFAP-Immunreaktivität. Die migrierenden Neuroblasten exprimieren das Mikrotubuli-

assoziierte Protein *Doublecortin* (DCX) (Gleeson et al., 1999) und das *polysialic neural cell adhesion molecule* (PSA-NCAM) (Ben-Hur et al., 1998). Nach Beginn des Neuritenwachstums exprimiert die Zelle Calretinin (Domínguez et al., 2003) und in langsam zunehmenden Maße *neuronal nuclear antigen* (NeuN). Das vollständig entwickelte Granulärzellneuron zeichnet sich durch Immunreaktivität gegen Calbindin und NeuN aus – Überblick in (Zhao et al., 2008).

Die elektrophysiologische Reifung neuer Granulärzellneurone beginnt bei Typ 2 NPCs mit spontaner und evozierter GABAerger Aktivität (Wang et al., 2005). Nach zwei Wochen können an den daraus entstandenen Neuroblasten langsam depolarisierende, GABAerg-exzitatorische Potentiale, aufgenommen werden, die Einfluss auf Reifung und Neuritenwachstum haben, sich aber fundamental von den schnell-hyperpolarisierenden, GABAerg-inhibitorischen Potentialen maturer Neurone des DG unterscheiden (Ge et al., 2006; Lledo et al., 2006).

Im Zeitfenster zwischen 3 und 4 Wochen n.G. weisen verschiedene Beobachtungen an den neu gebildeten Neuronen auf eine kritische Periode erhöhter synaptischer Plastizität hin: die Dichte neu gebildeter *spines* steigt am schnellsten, die Anzahl der transienten *spines* ist am höchsten (Toni et al., 2007). Etwa zur selben Zeit vollzieht sich mit der Ausbildung funktionaler glutamaterger und GABAerger Afferenzen der Wechsel von depolarisierender zu hyperpolarisierender Wirkung GABAerger Afferenzen (Espósito et al., 2005). In elektrophysiologischer Hinsicht zeigen sich daran anschließend signifikant erhöhte Amplituden der Langzeitpotenzierung (*long term potentiation*, LTP) bei gleichzeitig deutlich erniedrigt Induktionsschwelle. Vor allem in Zusammenschau mit der kurz davor ablaufenden Bildung dendritischer *spines* könnte dies für eine schnellere Integration neuer Neurone in die vorhandenen, komplexen Netzwerke verantwortlich sein (Schmidt-Hieber et al., 2004; Ge et al., 2007).

Zur Rolle der adulten Neurogenese bei Vorgängen des Lernens und Gedächtnisses liegen unterschiedliche Hinweise vor. Einerseits besteht eine Korrelation zwischen dem genetisch bedingten Niveau der adulten, hippocampalen Neurogenese verschiedener Mausstämme und der Lernleistung in einem Test zur hippocampalen Funktion - der *morris water maze* (MWM) (Kempermann and Gage, 2002). Auch stimulieren freiwillige körperliche Aktivität, wie auch eine reizintensivierte Umgebung die adulte Neurogenese (Kempermann et al., 1997; van Praag et al., 1999). Auf der anderen Seite führen Alter und Stress, Faktoren, die die adulte Neurogenese dämpfen, zu beeinträchtigter Leistung in der

MWM (Mirescu and Gould, 2006; Klempin and Kempermann, 2007). Daneben ist die wichtige Rolle neu geborener Neurone des DG auch für Vorgänge der räumlichen Orientierung beschrieben (Kee et al., 2007). Andererseits konnte in Experimenten, in denen die adulte Neurogenese durch antimitotische Medikamente oder Bestrahlung reduziert wurde, kein Defizit in der MWM und damit im räumlichen Gedächtnis dieser Tiere nachgewiesen werden (Shors et al., 2002; Saxe et al., 2006). In einer aktuellen Publikation konnte bei Mäusen nach Ablation der adulte hippocampalen Neurogenese durch fokale Bestrahlung sowie genetische Modifikation ein Defizit in unterschiedlichen Tests zur Unterscheidung räumlicher Muster (*spatial pattern separation*) nachgewiesen werden (Clelland et al., 2009).

Unterschiedliche Befunde deuten somit auf eine funktionelle Integration der im adulten Organismus neu gebildeten Neurone in bereits existierende hippocampale Schaltkreise hin. Welche Rolle diese kontinuierlich gebildeten Neurone im komplexen Netzwerk der hippocampalen Verschaltungen exakt spielen, bleibt Gegenstand intensiver Forschungsarbeit.

### *Subventrikularzone / Bulbus olfactorius*

In der SVZ lassen sich drei Formen von NPCs anhand morphologischer Kriterien unterscheiden: (GFAP)-positive Astrozyten, sog. B Zellen, von denen man annimmt, daß es sich hierbei um die ursprünglichen Stammzellen der SVZ handelt, weisen einen engen Kontakt mit der Basalmembran der SVZ, eine apikal-basale Morphologie und eine charakteristische Windradanordnung auf, was auf ihre Abstammung von den Radialen Gliazellen, bzw. Intermediären Vorgängerzellen der embryonalen Ventrikularschicht hinweist (Doetsch et al., 1999; Mirzadeh et al., 2008). Aus diesen entwickeln sich aktiv proliferierende, *epidermal growth factor receptor* (EGFR)-positive, sog. *transit-amplifying* C-Zellen (Doetsch et al., 2002), die sich wiederum zu DCX- und PSA-NCAM-positiven, migrierenden Neuroblasten, sog. A Zellen differenzieren (Alvarez-Buylla and Lim, 2004).

In Analogie zur SGZ beeinflussen verschiedene lösliche und zelluläre Bestandteile der neurogenen Nische Proliferation und Reifung der Progenitorzellen: u.a. die Nähe zu Blutkapillaren (Alvarez-Buylla and Lim, 2004), die Anwesenheit von *epidermal growth factor* (EGF), *fibroblast growth factor-2* (FGF-2) oder shh (Kuhn et al., 1997; Lai et al., 2003). Wie in der SGZ wirken auch hier sezernierte BMP-Antagonisten - Noggin, sowie

*pigmented-epithelium derived factor* (PEDF) - neurogen: (Lim et al., 2000; Ramírez-Castillejo et al., 2006).

Ebenso konnte auch der Einfluss von Neurotransmittern auf die Modulation der Neurogenese im System SVZ/OB gezeigt werden: Dopamin wirkt vor allem über Rezeptoren auf den transit-amplifying C Zellen positiv auf die Zellproliferation (Borta and Höglinger, 2007). Von Neuroblasten parakrin sezerniertes GABA wirkt hemmend auf die Proliferation GFAP-positiver NPCs und reguliert diese damit über einen endogenen Rückkopplungsmechanismus (Liu et al., 2005). Darüber hinaus wird der Einfluss weiterer Neurotransmitter und direkter synaptischer Verbindungen auf die Regulation der Progenitorpopulation in der SVZ vermutet (Lledo et al., 2006; Zhao et al., 2008)

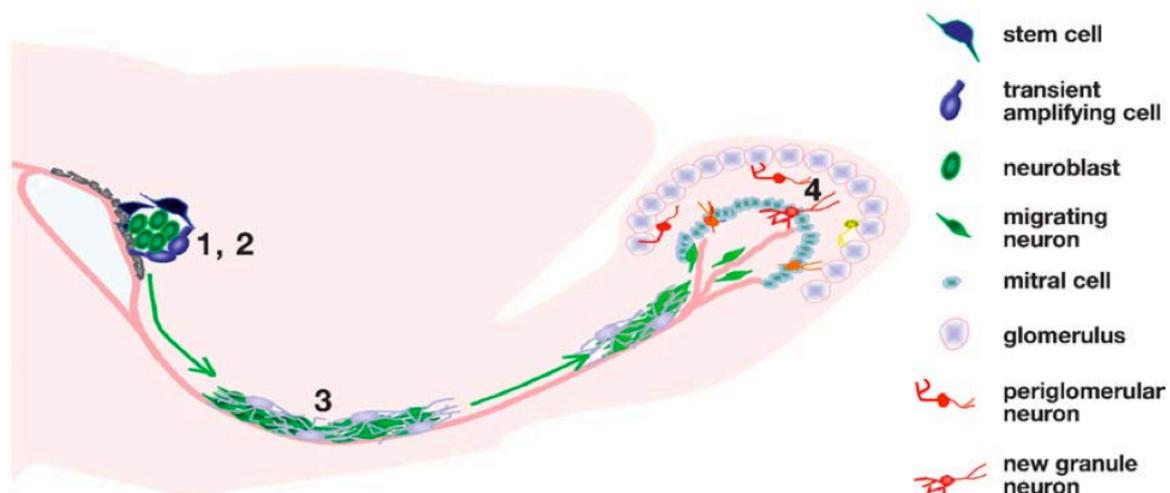


Abb. 3; Entstehung neuer Interneurone des OB aus NPCs der SVZ. Exemplarische Darstellung von (1) Generierung sog. *transit-amplifying* C Zellen aus dem ursprünglichen Stammzellpool der B Zellen; (2) Weiterentwicklung zu migrierenden Neuroblasten, den sog. A Zellen; (3) tangentielle *chain migration* entlang des rostralen Migrationsstroms; (4) radiale Migration und Integration als Granulärzellen und Periglomerulärzellen; (Ming and Song, 2005)

Im Gegensatz zu den in der SGZ gebildeten Zellen wandern die Neuroblasten der SVZ im sog. rostralen Migrationsstrom (*rostral migratory stream*, RMS) bis zu 5 mm zum OB, wobei sie charakteristische Reifungsstadien durchlaufen (Petreanu and Alvarez-Buylla,

2002): Zunächst über Fortsätze untereinander zu Ketten verbunden, in einem *chain migration* genannten Prozess, tangential entlang des RMS (Lois et al., 1996).

Nach etwa 6 Tagen erreichen sie das Zentrum des OB und trennen sich, durch das Glycoprotein Reelin und Tenascin-R reguliert, von diesen Ketten um radial in die äußeren Zellschichten des Bulbus zu migrieren (Hack et al., 2002; Saghatelian et al., 2004). Dort beginnt zwischen Tag 9-13 das Wachstum der Dendriten und die abschließende Reifung zu vollständig murenen Granulärzellen (granule cells, GCs), die spontane Aktionspotentialen, wie auch den Erhalt GABAerger und glutamaterger synaptischer Kontakte zeigen, was auf eine funktionelle Integration in die bereits bestehenden Neuronennetze deutet (Belluzzi et al., 2003; Carleton et al., 2003). Etwa 95% reifen zu GCs, etwa 5% zu periglomerulären Zellen (periglomerular cells, PGCs) in, GCL bzw. Glomerulärzellschicht (glomerular cell layer, GLOM) des OB (Lledo and Saghatelian, 2005).

Im neuronalen Netz des OB, der ersten Verschaltstation olfaktorischer Information, kommt den beiden Zelltypen jeweils inhibitorische Funktion zu: PGCs dienen über ihre Verschaltungsmuster innerhalb eines Glomerulus der Signal-, sowie zwischen zwei Glomeruli der Kontrastverstärkung – sie erfüllen damit eine wichtige Funktion für das Erkennen und Unterscheiden von Gerüchen (Scott, 2008).

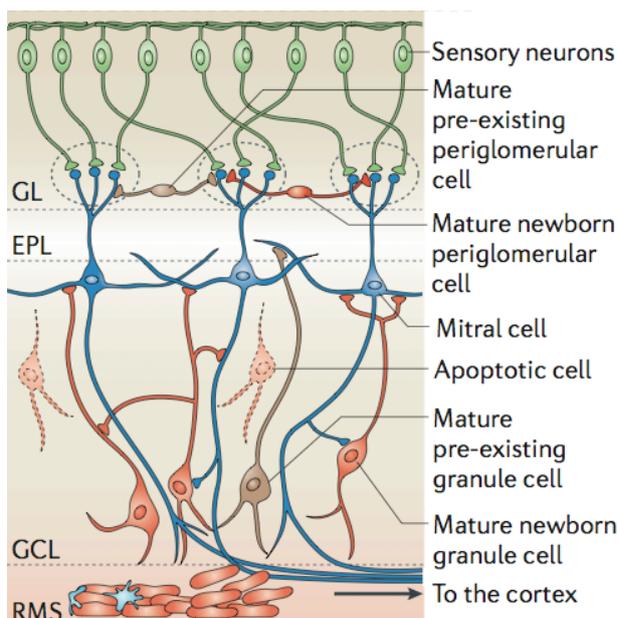


Abb. 4; Schematische Darstellung der an der im Bulbus olfactorius stattfindenden Informationsverarbeitung beteiligten Zellen; über inhibitorische dendrito-dendritische Synapsen dienen Periglomerulärzellen intraglomerulär der Signal-, interglomerulär der Kontrastverstärkung; Granulärzellen verstärken über ihre prinzipiell ähnliche Verschaltung ebenso Geruchscontraste; (Lledo et al., 2006)

Erkenntnisse aus verschiedenen Studien weisen auf eine enge Verknüpfung der adulten OB Neurogenese mit Verhalten, das mit Geruchswahrnehmung verbunden ist, hin: So konnte gezeigt werden, daß vermehrte Geruchsexposition (*odor enrichment*), Pheromonexposition und Schwangerschaft die OB Neurogenese stimulieren und das Geruchsgedächtnis, Paarungsverhalten, sowie die Brutpflege beeinflussen (Rochefort et al., 2002; Shingo et al., 2003; Mak et al., 2007). Entsprechend führt eine verminderte Geruchsexposition (*olfactory deprivation*) zu einer verminderten Zahl neu gebildeter Interneurone im OB (Corotto et al., 1994). Die repetitive Exposition unterschiedlicher Gerüche (*olfactory discrimination learning task*) steigert die adulte OB Neurogenese durch ein verlängertes Überleben der neu gebildeten Zellen (Alonso et al., 2006).

## II. Idiopathisches Parkinson Syndrom und $\alpha$ -Synuclein

### *Shaking Palsy (Paralysis Agitans)*

*Involuntary tremulous motion, with lessened muscular power, in parts not in action and even when supported; with a propensity to bend the trunk forwards, and to pass from a walking to a running pace: the senses and intellects being uninjured.*

James Parkinson (Parkinson, 1817)

Diese initial als Schüttellähmung bezeichnete Erkrankung wird heute nach seinem Erstbeschreiber Parkinson-Syndrom (*Parkinson's disease*, PD) genannt. Die klinischen Leitsymptome sind Ruhetremor, Rigor, Bradykinese und posturale Instabilität. Gemäß ihrer unterschiedlichen Ätiologie und Pathophysiologie unterscheidet man drei Gruppen von Parkinson-Syndromen. Den sog. symptomatischen (sekundären) Parkinson Syndromen, liegt eine vaskuläre, posttraumatische, entzündliche, medikamenten- oder toxininduzierte Genese der typischen klinischen Symptomkonstellation zugrunde. Die sog. atypischen Parkinson Syndrome sind durch metabolische Erkrankungen (z.B. Morbus Wilson), Tauopathien (z.B. Progressive Supranukleäre Blickparese, Kortikobasale Degeneration) oder Synucleinopathien (z.B. Multisystematrophie, Demenz vom Lewy-Körperchen-Typ) bedingt (Braak and Del Tredici, 2008).

Mit einem Anteil von 75% ist jedoch das idiopathische/sporadische Parkinson Syndrom (IPS), bei dem definitionsgemäß kein anderweitiger Erkrankungsauslöser feststellbar ist, die häufigste Ursache (Braak and Del Tredici, 2008). Das IPS stellt nach dem Morbus Alzheimer (*Alzheimer's disease*, AD) die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung dar (de Lau and Breteler, 2006). Zur endgültigen Diagnose des IPS bedarf es der neuropathologischen Befundung, da bislang kein biologisch-laborchemischer Marker zur sicheren Diagnosestellung etabliert ist. Darüber hinaus überschneiden sich die genannten Parkinson-Syndrome klinisch teilweise und sind oft nicht mit absoluter Sicherheit gegeneinander abzugrenzen. In der Praxis orientiert sich daher die Diagnose eines wahrscheinlichen IPS an klinischen Kriterien, wie von der *Movement Disorders Society* vorgeschlagen (Litvan et al., 2003).

Die pathophysiologische Ursache für das IPS ist die langsam fortschreitende Degeneration vor allem dopaminerger Neurone der Substantia nigra pars compacta, aber auch cholinergischer Neurone des Nucleus basalis Meynert, Neurone des Nucleus raphe, Locus

coeruleus, Hypothalamus, OB, sowie sympathischer und parasympathischer Ganglien (Lang and Lozano, 1998b; Cookson, 2009). Die motorischen Symptome des IPS stehen mit dem Untergang dopaminerger Zellen der Substantia nigra pars compacta in Zusammenhang. Dadurch kommt es in den Basalganglien durch Beeinträchtigung der direkten und indirekten striato-pallidalen Verschaltungen zu einer gesteigerten Aktivität inhibitorischer, GABAerger Neurone in medialem Pallidum und der Substantia nigra pars reticularis und somit zu einer Hemmung bewegungsfördernder, thalamo-cortikaler Efferenzen (Lang and Lozano, 1998a).

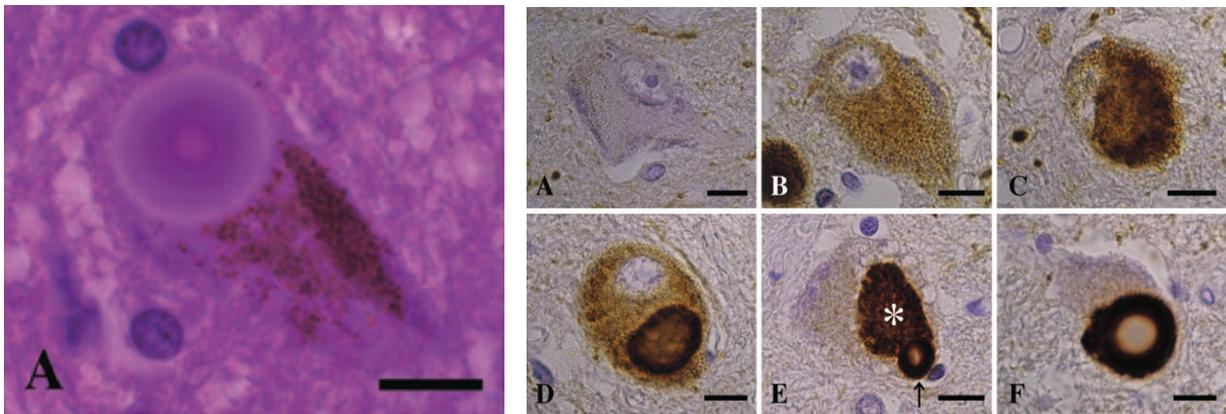


Abb. 5;

Abb. 6;

Abb. 5; Darstellung eines konzentrischen Lewykörperchens mit typischem eosinophilem Kern und blassem Halo in einem pigmentierten Neuron der Substantia nigra bei einem Patienten mit PD (A); Hämatoxylin/Eosinfärbung; Abb. 6 Unterschiedliche Reifungsstadien eines LB: ungefärbtes Cytoplasma (A), zunehmende  $\alpha$ -Synuclein-immunoreaktivität (B,C), Entstehung eines sog. *pale bodies* (D), *pale body* und LB in einer Zelle (E), bis zum klassischen Halo des LB (F), Immunhistochemische Färbung mit Antikörper gegen  $\alpha$ -Synuclein; beide aus (Wakabayashi et al., 2007)

Neben dem Zelltod kommt es zur Ausbildung sog. Lewy-Körperchen (*lewy bodies*, LB), charakteristischer, zytoplasmatischer Zelleinschlüsse, wie sie erstmalig von Friedrich Heinrich Lewy 1912 in Gehirnen von Parkinsonpatienten beobachtet und beschrieben wurden (Lewy, 1912). LB sind durch einzelne oder multiple, intrazytoplasmatische, eosinophile Formationen mit einem dichten Kern und blassem Halo gekennzeichnet, die aus fibrillären Strukturen bestehen (Wakabayashi et al., 2007).

Der Nachweis von LB, sowie der innerhalb der Nervenzellfortsätze gelegenen, filiformen Lewy-Neuriten (*lewy neurites*, LN) mittels immunhistochemischer Färbemethoden ist notwendig zur Diagnosesicherung eines IPS (Wakabayashi et al., 2007; Cookson, 2009).

Das Auftreten von LB/LN ist neben dem IPS auch für die klinisch ähnliche Demenz vom Lewykörperchen-Typ (*lewy body dementia*, DLB) charakteristisch, weshalb heute beide Erkrankungen als in ihrer klinischen Ausprägung unterschiedliche Varianten eines wahrscheinlich gemeinsamen pathophysiologischen Kontinuums gesehen werden (Richard et al., 2002; Braak and Del Tredici, 2008)

LB/LN stellen das pathologische Substrat des IPS dar. Ihre Bildung, Zusammensetzung und Funktion ist von großer Bedeutung für das Verständnis dieser Krankheit. Die LB-Fibrillen bildenden Elemente sind hierbei das Protein  $\alpha$ -Synuclein (Spillantini et al., 1998) sowie phosphoryliertes Neurofilament (Goldman et al., 1983). Insgesamt sind mittlerweile über 70 Moleküle beschrieben, die in LB oder LN vorkommen (Wakabayashi et al., 2007).  $\alpha$ -Synuclein nimmt hierunter eine Sonderstellung ein. Seine physiologische Rolle ist noch nicht abschließend geklärt. In Wirbeltieren kommt es u.a. in hoher Konzentration in Neuronen vor, in denen es mit präsynaptischen Vesikeln assoziiert ist (Cookson, 2009). Die im Kontext der Entstehung von LB beobachteten sog. *pale bodies* lassen einen kausalen Zusammenhang zwischen  $\alpha$ -Synuclein-Akkumulation und LB-Entwicklung vermuten (Wakabayashi et al., 2007).

Darüber hinaus deuten vor allem humangenetische Untersuchungen auf einen direkten Zusammenhang zwischen Mutationen des  $\alpha$ -Synucleingens (SNCA) und familiären Formen des IPS: So bewirkt eine Punktmutation von Alanin zu Threonin an Position 53 (A53T) von SNCA eine autosomal dominant vererbte Form der Parkinsonerkrankung mit LB-Pathologie und einem sehr frühen Manifestationsalter (Polymeropoulos et al., 1997). Analog dazu konnte auch in Familien mit der SNCA-Punktmutation Alanin zu Prolin an Position 30 (A30P), wie auch Glutamat zu Lysin an Position 46 (E46K) ein jeweils für IPS, bzw. DLB typischer Krankheitsverlauf nachgewiesen werden. Im Falle von A30P lag auch eine ausgedehnte LB/LN-Pathologie vor (Krüger et al., 1998; Zarranz et al., 2004).  $\alpha$ -Synuclein in seiner ursprünglichen Form wird zur Abgrenzung gegen diese mutierten Formen als sog. Wildtyp (wt), sämtliche beim Menschen nachgewiesenen Formen als human (h) bezeichnet.

Auch Fälle, in denen Multiplikationen des SNCA-Gens zu typischen histopathologischen und klinischen Formen des PD führten, sind dokumentiert: Eine Duplikation des SNCA-Gens konnte bei einer Familie mit autosomal dominant vererbter

Erkrankung und klinisch typischem IPS nachgewiesen werden (Chartier-Harlin et al., 2004). Bei einer Familie mit vererbter Triplikation des SNCA-Gens konnte eine ausgedehnte LB-Pathologie, verbunden mit einem jüngeren mittleren Erkrankungsalter und einem IPS mit prominentem, kognitiven Defizit festgestellt werden (Singleton et al., 2003). Der Zusammenhang zwischen dem durch diese Genmultiplikationen vermehrt exprimiertem  $\alpha$ -Synuclein und gleichzeitig schwererer klinischer Symptomatik mit früherem Manifestationsalter deutet auf eine Korrelation zwischen quantitativem Genprodukt und Schwere der Erkrankung beim Menschen hin (Ibáñez et al., 2004). Dies wird auch durch die Beobachtung gestützt, daß Polymorphismen in der REP1-Sequenz des SNCA-Promotors und eine dadurch womöglich gesteigerte Genexpression, mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko einhergehen (Maraganore et al., 2006).

$\alpha$ -Synuclein ist in Form von Proteinaggregaten toxisch. Nicht LB/LN, sondern vor allem im präsynaptischen Kompartiment lokalisierte  $\alpha$ -Synucleinaggregate haben einen schädigenden Effekt auf postsynaptische Strukturen und Zellfunktion (Kramer and Schulz-Schaeffer, 2007). Dabei wirken vor allem Proteinoligomere zelltoxisch, was in Zellkulturexperimenten und transgenen Tieren nachgewiesen werden konnte (Opazo et al., 2008; Outeiro et al., 2008; Zhou et al., 2008). Für LB/LN konnten Hinweise auf einen retrograden axonalen Transport präsynaptischen  $\alpha$ -Synucleins und damit Ähnlichkeiten zu Aggresomen festgestellt werden. Entgegen früherer Annahme geht man daher davon aus, daß es sich bei LB/LN nicht um eine toxische Proteinhäufung, sondern vielmehr um ein Korrelat eines Schutzmechanismus der Zelle handelt (Lee and Lee, 2002; McNaught et al., 2002; Kramer and Schulz-Schaeffer, 2007).

Die zellulären und subzellulären Mechanismen, die zwischen der Akkumulation von  $\alpha$ -Synuclein, der Bildung von Proteinaggregaten und dem für selektive Neuronenpopulationen degenerativen Effekt ablaufen, sind bislang noch nicht abschließend geklärt.  $\alpha$ -Synuclein interagiert, v.a. in oligomerer Form, mit Lipiden in Biomembranen, wodurch die Funktion von Lysosomen, synaptischen Vesikeln, Mitochondrien und der Zellmembran beeinträchtigt wird. Daneben ist auch ein hemmender Einfluss auf das Ubiquitin-Proteasom-System, und damit auf einen zentralen Mechanismus der Regulation der Proteinhomöostase, beschrieben (Golbe and Mouradian, 2004; Cookson, 2009).

Neben den bekannten motorischen Symptomen finden auch die nicht-motorischen Symptome des IPS zunehmend wissenschaftliche Beachtung. Schon seit Längerem ist bekannt, daß u.a. neben Zeichen der autonomen Dysfunktion und Depression auch eine Abnahme der höheren kognitiven Leistungsfähigkeit mit demenzieller Entwicklung, Problemen der visuell-räumlichen Kognition, sowie Anosmie häufige Symptome des IPS darstellen (Adler, 2005). Klinisch unterscheiden sich die durch die IPS-typischen pathologischen Veränderungen bedingten kognitiven Defizite von der AD: Konzentration, exekutive Funktionen und visuell-räumliche Kognition sind stärker beeinträchtigt, als das Gedächtnis (Padovani et al., 2006; Farlow and Cummings, 2008).

Bei Patienten mit IPS ist eine eindeutige Korrelation zwischen der Ausprägung der LB/LN-Pathologie und der Abnahme kognitiver Leistungsfähigkeit bis zur Maximalform der Demenz vom Parkinsontyp (*Parkinson disease dementia*, PDD) festzustellen (Mattila et al., 2000; Braak et al., 2006). Bei Untersuchungen an Patienten mit PDD konnte insbesondere ein signifikant stärkerer Befall des neokortikalen und limbischen Kortex durch die LB/LN-Pathologie als bei vergleichbaren IPS Patienten ohne Demenz festgestellt werden (Apaydin et al., 2002). Bezogen auf die anatomische Struktur des Hippocampus konnte für die CA2 Region eine Korrelation zwischen Dichte der LN und zunehmender kognitiver Beeinträchtigung gezeigt werden (Churchyard and Lees, 1997). Darüber hinaus konnte beim Menschen in einer kleinen Fallserie Hinweise für eine Korrelation zwischen kognitiver Einschränkung und verringerter Anzahl neuraler Progenitorzellen im DG (Kontrolle vs. PD vs. PDD) gewonnen werden (Höglinger et al., 2004). Mittels bildgebender Untersuchungen durch Voxel Basierte Morphometrie (VBM) konnte bei IPS und PDD Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen eine Volumenminderung des Hippocampus festgestellt werden (Riekkinen et al., 1998; Camicioli et al., 2003; Burton et al., 2004; Nagano-Saito et al., 2005; Tam et al., 2005).

Mehr als 80% der IPS Patienten klagen über olfaktorische Beschwerden, wie fehlende Geruchswahrnehmung (Anosmie) oder Schwierigkeiten bei Geruchsunterscheidung und – Identifikation (Hawkes et al., 1997). Beim Menschen konnte bei PD Patienten eine signifikant verringerte mitotische Aktivität in der SVZ, sowie eine verringerte Anzahl von NPCs im OB nachgewiesen werden (Höglinger et al., 2004).

Bei Parkinsonpatienten bestehen somit Hinweise für *a*, einen kausalen Zusammenhang zwischen der Aggregation von h-wt  $\alpha$ -Synuclein in Neuronen kortikaler und limbischer Strukturen (wie dem Hippocampus) und dem Ausmaß der kognitiven Einschränkung; *b*, eine

reduzierte Anzahl und mitotische Aktivität von NPCs in Regionen aktiver adulter Neurogenese; *c*, eine messbare Volumenabnahme des Hippocampus bei PDD Patienten; *d*, eine klinisch quantifizierbare Abnahme der Leistungen, die mit der Funktion von Hippocampus und OB assoziiert sind;

Zur Untersuchung der Auswirkungen der  $\alpha$ -Synucleinpathologie auf die adulte Neurogenese stellen transgene (tg) Mäuse, die h-wt  $\alpha$ -Synuclein unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors in neurogenen Arealen des Zentralnervensystems (ZNS) exprimieren, ein ideales Modell dar.

tg h-wt $\alpha$ -Synuclein Mausstamm	mThy1	hPDGF $\beta$
Expressionsmuster	Neocortex, Hippocampus, Olfaktorisches System, Thalamus, Colliculus, Substantia nigra, Hirnstamm, Cerebellum (Linie 61)	Hippocampus, Neocortex, Olfaktorisches System (Linie D)
Zelluläre Expression	Präsynaptische Lokalisation + diffuse neuronale Expression, v.a. in Pyramidenzellneuronen in Hippocampus u. Cortex, bzw. Nichtpyramidenzellneuronen in Thalamus, Substantia nigra und Nucleus basalis; Neocortex: Gleichmäßige Expression in allen Schichten	Präsynaptische Lokalisation + dichte neuronale Expression in Pyramidenzellneuronen;  Neocortex: hauptsächlich in tieferen Schichten;
Abbildung *		
Quellen	(Rockenstein et al., 2002)	(Masliah et al., 2000) (Rockenstein et al., 2002)

Tab.1; Tabellarischer Vergleich der beiden tg h-wt  $\alpha$ -Synuclein Mausstämme in bezug auf Expressionsmuster und zelluläre Expression; \* Abbildungen aus (Rockenstein et al., 2002)

Eine der ersten tg Mäuse dieser Art exprimiert h-wt  $\alpha$ -Synuclein unter der regulatorischen Kontrolle des *human platelet derived growth factor  $\beta$*  (hPDGF $\beta$ ) Promotors. Die Tiere zeigen eine verminderte Zahl dopaminerger Nervenendigungen im Striatum und signifikante motorischen Defizite im Rotarod-test (Masliah et al., 2000). Zeitgleich wurden weitere tg Mausstämme generiert, die h-wt  $\alpha$ -Synuclein und seine Varianten A53T bzw. A30P unter der regulatorischen Kontrolle des murinen (m) Thy-1 Promotors exprimieren (Kahle et al., 2000a; van der Putten et al., 2000; Rockenstein et al., 2002). Weitere tg h-wt  $\alpha$ -Synucleinmäuse zeigen keine  $\alpha$ -Synucleinexpression in neurogenen Arealen (Matsuoka et al., 2001; Giasson et al., 2002; Lee et al., 2002).

### III. Hypothese und Fragestellung

Es wird vermutet, dass die für das IPS charakteristische Akkumulation von h-wt  $\alpha$ -Synuclein in neurogenen Zonen des ZNS die adulte Neurogenese in transgenen Mausmodellen negativ beeinflusst. Für die exzellent histopathologisch charakterisierte tg hPDGF $\beta$  h-wt  $\alpha$ -Synuclein-Maus konnte im Vergleich zu wt-Kontrolltieren bei unveränderter Proliferation in DG und SVZ eine signifikant verminderte adulte Neurogenese in beiden neurogenen Strukturen nachgewiesen werden (Winner et al., 2004). Die tg mThy-1 Tiere der Linie 61 aus dem Labor von E. Masliah zeigen eine im Vergleich zu tg hPDGF $\beta$  Tieren 4-fach höhere  $\alpha$ -Synucleinexpression (Rockenstein et al., 2002). Aufgrund des Expressionsmusters und der im Vergleich zur regulatorischen Kontrolle des hPDGF $\beta$  Promotors stärkeren  $\alpha$ -Synucleinexpression scheint die tg mThy-1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein-Maus ideal für eine weitere Untersuchung der Interaktion zwischen h-wt  $\alpha$ -Synuclein und der adulten Neurogenese.

Die Hypothese dieser Arbeit lautet daher: *Die adulte Neurogenese der tg mThy-1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein-Maus ist durch die höhere absolute  $\alpha$ -Synucleinexpression stärker reduziert, als bei der tg hPDGF $\beta$  h-wt  $\alpha$ -Synuclein-Maus.*

Es ergibt sich folgende Fragestellung: *Wie beeinflusst die gesteigerte Akkumulation von h-wt  $\alpha$ -Synuclein unter der regulatorischen Kontrolle des mThy1 Promotors die adulte Neurogenese in Gyrus dentatus und SVZ/OB in a, Proliferation von NPCs, b, Reifung der Neuroblasten, c, Apoptose und d, Integration neu gebildeter Neurone? Führen diese quantitativen/qualitativen Veränderungen zu einer hippocampalen Volumenminderung?*

Es wurde ein Versuchsdesign mit Markierung der im adulten System neu gebildeten Zellen gewählt. So können Proliferation, Überleben und Zelltod untersucht werden. Zusätzlich soll für die tg mThy1 und hPDGF $\beta$  h-wt  $\alpha$ -Synuclein Mausstämme a, das temporale Muster der Transgenexpression mithilfe einer Koexpressionsstudie und b, ultrastrukturelle Unterschiede an einzelnen, neugeborener Neuronen mittels eines retroviralen Ansatzes charakterisiert und verglichen werden.

## Materialien und Methoden

### I. Adulte Neurogenese der transgenen mThy1 human Wildtyp $\alpha$ -Synuclein Maus

#### *mThy1 Tiere und Genkonstrukt*

Thy-1 ist ein bei Mäusen auf der Zelloberfläche von Lymphozyten, Fibroblasten sowie auch beim Menschen auf Neuronen des ZNS vorkommendes Glycoprotein, dessen Promotor sich in verschiedenen tg Mausstämmen durch stabile neuronale Expression im ZNS bewährt hat (Chen et al., 1987; Kollias et al., 1987; van der Putten et al., 2000; Freichel et al., 2007; Van Broeck et al., 2008). Die in dieser Arbeit verwendeten tg mThy1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein Tiere stammen aus dem Labor von E. Masliah und gehören zur höchsten Expressionslinie Nr. 61 (Rockenstein et al., 2002).

#### *Versuchsdesign*

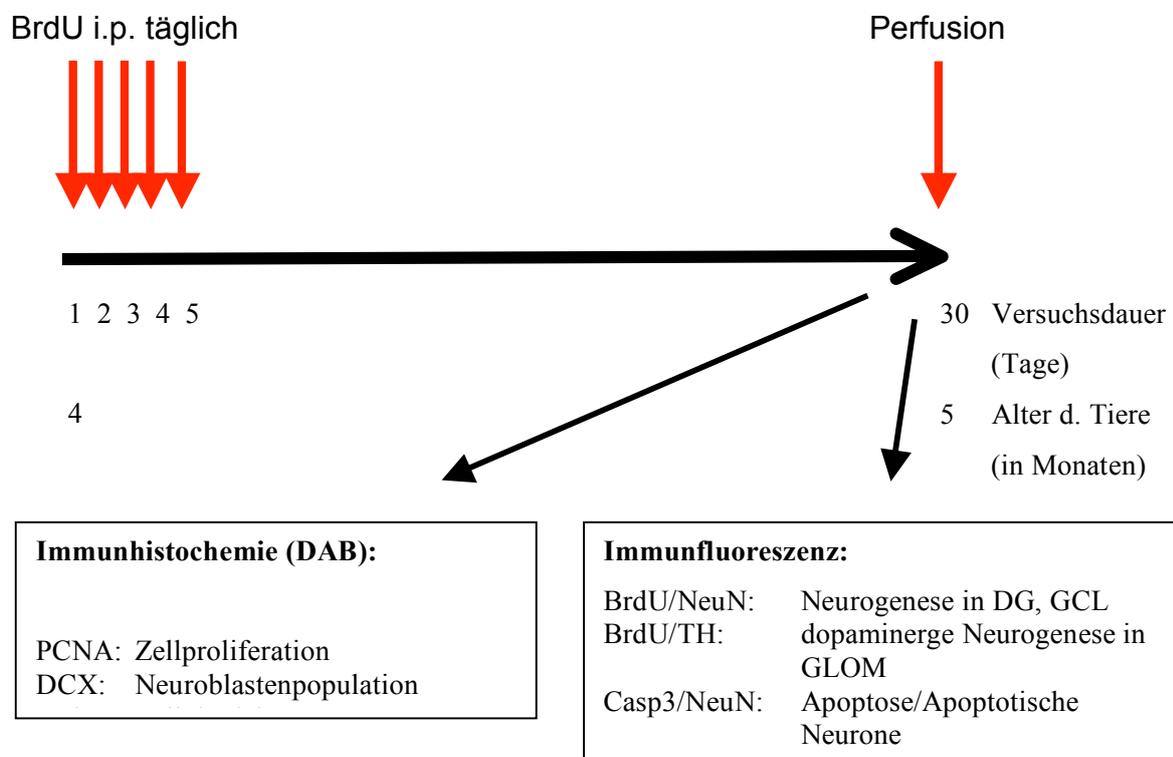


Abb. 7; Paradigma der adulten Neurogenesestudie

Ein h-wt  $\alpha$ -Synuclein cDNA Fragment wurde unter die regulatorische Kontrolle des mThy-1 Promotors (Lüthi et al., 1997) gebracht und auf dem genetischen Hintergrund einer C57BL/6 x DBA Kreuzung gezüchtet. Die Mäuse wurden nach einem Standardprotokoll im 12 Stunden hell/dunkel Rhythmus und unter freiem Zugang zu Wasser und Futter in temperaturkontrollierten Käfigen zu je maximal 6 Tieren gehalten. Das Alter betrug zu Versuchsbeginn 4 Monate, das Gewicht etwa 30 Gramm, die Anzahl n=6. Als Kontrolltiere wurden n=6 C57BL6/DBA Mäuse im gleichen Geschlechtsverhältnis verwendet, die unter exakt gleichen Versuchsbedingungen gehalten wurden. Alle Versuche wurden gemäß NIH Richtlinien zur Behandlung von Labortieren und nach Bewilligung des Versuchprotokolls durch die Ethikkommission der University of California, San Diego durchgeführt.

### *BrdU Injektionen, Perfusion, Fixierung, Gewebepräparation & Histologie*

Im Alter von vier Monaten, wurden alle Tiere an fünf aufeinander folgenden Tagen intraperitoneal mit 200 $\mu$ l 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 60103, USA) in einer Konzentration von 50mg/kg Körpergewicht injiziert. BrdU ist ein synthetisches Thymidinanalogon, welches sich während der S-Phase des Zellzyklus in die Tochter-DNA-Stränge sich teilender Zellen eingebaut, und damit Zellen markiert, die sich in einem Zeitfenster von zwei Stunden ab Injektion teilen. Mittels eines monoklonalen Antikörpers gegen BrdU lassen sich diese Zellen später immunhistochemisch darstellen und datieren (Gratzner, 1982).

Am Tag 30 nach der ersten BrdU-Injektion wurden die Tiere in tiefer Narkose (0,3ml Xylazin + Ketamin, intraperitoneal injiziert) transkardial zum Blutaustausch für 8 min mit einer 0,9% NaCl-Lösung und zur Gewebsfixierung 8 min mit einer 4% Paraformaldehyd-Lösung in 0,1M Phosphatpuffer (PFA) perfundiert. Das Gehirn inklusive OB wurde vorsichtig entnommen, zur weiteren Fixierung für 24 Stunden in 4% PFA-Lösung gelagert und im Anschluss in 30% Sukroselösung verbracht, um die Antigenstrukturen des Gewebes zu schonen. Das Gewebe wurde erst weiter bearbeitet, wenn eine maximale Durchtränkung des Gewebes durch Absinken in der Lösung sichergestellt war. Zur weiteren histologischen und stereologischen Auswertung wurden die Gehirne auf einen Gefrierschnittadapter unter Trockeneiskühlung auf TissueTec (O.C.T. Compound, Sakura Finetek, Torrance, CA 90501, USA) aufgefroren und auf einem Schlittenmikrotom (Bauart Om E, Firma Reichert, A-Wien) sagittal bzw. koronar zu 25 $\mu$ m bzw. 40 $\mu$ m geschnitten. Bis zur weiteren Bearbeitung wurde

die Schnitte in Gefrierschutzlösung (Ethylen Glykol, Glycerol, 0,1M Phosphat Puffer im Verhältnis 1:1:2 bei pH 7,4) in 96-well-Platten bei -20°C aufbewahrt.

Folgende primäre Antikörper (AK) und Chemikalien wurden für die Experimente in diesem Teil der Arbeit verwendet:

<b>Primäre Antikörper:</b>			
Antikörperbezeichnung	No.	Verdünnung	Hersteller
monoklonaler Maus- $\alpha$ -PCNA-AK	P8825	1:1000	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 60103, USA
polyklonaler Ziegen- $\alpha$ -DCX(c-18)-AK	sc-8066	1:250	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA 95060, USA
monoklonaler Ratten- $\alpha$ -BrdU-AK	OBT0030	1:100	Accurate, Westbury, NY 11590, USA
polyklonaler Hasen- $\alpha$ -TH-AK	P40101	1:500	Pel Freez, Rogers, AR 72756, USA
polyklonaler Hasen- $\alpha$ -Cleaved Caspase-3-AK	Asp175	1:400	Cell Signaling, Boston, MA 02241, USA
monoklonaler Maus- $\alpha$ -NeuN-AK	MAB377	1:250	Chemicon, Temecula, CA 92590, USA
<b>Sekundäre Antikörper:</b>			
Esel- $\alpha$ -Maus-biotinylierter-IgG AK	715-065-151	1:250	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA 19390, USA
Esel- $\alpha$ -Ratte-biotinylierter-IgG AK	712-065-153	1:250	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA 19390, USA
Esel- $\alpha$ -Ziege-biotinylierter-IgG AK	705-065-147	1:250	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA 19390, USA
Esel- $\alpha$ -Maus-IgG AlexaFluor 555 AK	A31570	1:250	Molecular Probes Inc. Eugene, OR 97402, USA
Esel- $\alpha$ -Maus-IgG AlexaFluor 488 AK	A21202	1:250	Molecular Probes Inc. Eugene, OR 97402, USA
Esel- $\alpha$ -Ratte-IgG AlexaFluor 488 AK	A21208	1:250	Molecular Probes Inc. Eugene, OR 97402, USA
Esel- $\alpha$ -Hase-IgG AlexaFluor 647 AK	A31573	1:250	Molecular Probes Inc. Eugene, OR 97402, USA
Esel- $\alpha$ -Hase-IgG AlexaFluor 555 AK	A31572	1:250	Molecular Probes Inc. Eugene, OR 97402, USA

Tab. 1; Liste der verwendeten primären und sekundären Antikörper

Folgende weitere Reagenzien wurden für die histologischen Versuche benutzt: Esel-Serum Equitech Bio SD-500, #017-000-121 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA 19390, USA), 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochlorid Hydrate (DAPI) D9542, Triton-X-100 SigmaUltra, 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) (alle von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 60103, USA), Polyvenylalkohol/1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (PVA/Dabco), 0,1M tris buffered saline (TBS), 2N HCl, 0,1M Borat Puffer, 0,1M PO<sub>4</sub>, 0,6% Wasserstoffperoxyd, Vectastain *Elite* ABC kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA 94010, USA), NeoClear Xylen-Ersatz, NeoMount Eindeckmittel (beide von Merck, KGaA, D-64293 Darmstadt), Fisherbrand Superfrost/Plus Objektträger (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA 15275, USA), VWR micro glass cover glass Deckgläser (VWR, West Chester, PA19380, USA). Sämtliche Gewebeschnitte wurden als *free-floating sections*, d.h. vor dem Aufbringen auf einen Objektträger in Netwells frei-schwimmend behandelt und gefärbt.

### Immunhistochemie

Für die PCNA-DAB-, DCX- und BrdU-Färbung wurden die Gehirnschnitte nach folgendem immunhistochemischen Standardprotokoll behandelt: nach dreimaligem Spülen in 0,1 M TBS wurde die endogene Peroxidaseaktivität durch eine 30-minütige Inkubation in 0,6%iger Wasserstoffperoxyd (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-Lösung (in TBS) bei Raumtemperatur blockiert und die Schnitte wiederum drei mal in 0,1M TBS gespült. Eine 60-minütige Inkubation in 3%igem Esel-Normalserum und 0,25% Triton-X in 0,1M TBS (im weiteren TBS++) wurde zur Blockierung der Eselepitope, bzw. zur Permeabilisierung des Gewebes durchgeführt. Eine der Empfehlung des Herstellers entsprechende, bzw. durch Vorversuche etablierte Verdünnung des Primärantikörpers in TBS++ wurde vorbereitet und die Schnitte über Nacht bei 4°C auf einem Schwenker inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Schnitte durch zwei TBS- und einen TBS++-Waschschritte zu je 15 min von Resten des primären Antikörpers befreit und dann in einer 1:250 Verdünnung des biotinylierten Sekundärantikörpers in TBS++ 60 min bei Raumtemperatur auf einem Schwenker inkubiert. Nach drei weiteren TBS-Waschschritten zu je 5min, mithilfe derer Reste des Sekundärantikörpers entfernt wurden, wurden die Proben für 60min in einer zuvor nach Angaben des Herstellers vorbereiteten Avidin-Biotinylierter-Meerrettich-Peroxidase-Complex (*ABC/Elite*)-Lösung in TBS inkubiert. Mittels dreier TBS Waschschritte zu je 5 min wurden ABC-Komplex-Reste entfernt, um unspezifische Signalbildung zu unterbinden. In einem letzten Färbeschritt wurde unter einem geeigneten Abzug als Substrat für die Meerrettich-Peroxidase 10mg DAB in 40ml TBS (pH

7,4), 200µl NaCl<sub>2</sub> (85%) und 12µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) gelöst und die Schnitte darin unter wiederholter mikroskopischer Kontrolle des Färbeprodukts für etwa 15 min inkubiert. Abschließend wurde in vier TBS-Waschschritten überschüssiges DAB entfernt, die Schnitte in einem 0,1M PO<sub>4</sub> Bad mit einem Pinsel in anatomischer Reihenfolge auf statisch geladene Objektträger aufgezogen und etwa 5 min getrocknet. Nach einem 5-minütigen Bad in NeoClear zur Entwässerung und Fettentfernung wurden die Proben etwa 10 min getrocknet und mit NeoMount und klaren 24x60mm Deckgläsern eingedeckelt.

Zusätzlich wurden folgende Schritte bei der BrdU-immunhistochemischen Färbung durchgeführt: An die ersten TBS-Spülungen schloss sich ein 30-minütiger Inkubationsschritt in 2N HCL in einem auf 37°C temperierten Schwenkwasserbad zur Antigendemaskierung an, gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation in 0,1M Borat Puffer zur pH-Neutralisierung. Um das Gewebe vollständig von Säure- und Pufferresten zu reinigen, wurden die Proben bei Raumtemperatur sechsmal für je 15 min. in 0,1M TBS gespült. Des Weiteren wurde das Protokoll wie bei allen anderen immunhistochemischen Färbungen angewendet.

### Immunfluoreszenz

Für die Koexpressionsstudien und Apoptose-Färbung wurden die Gehirnschnitte nach folgendem Immunfluoreszenz-Standardprotokoll behandelt: nach dreimaligem Spülen in 0,1 M TBS wurden die Proben einer 60-minütigen Inkubation in TBS++ zur Blockierung der Eseelepitope und Permeabilisierung des Gewebes unterzogen. Eine der Empfehlung des Herstellers entsprechende, bzw. durch Vorversuche etablierte Verdünnung des Primärantikörpers in TBS++ wurde vorbereitet und die Schnitte darin über Nacht bei 4°C auf einem Schwenker inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde das Gewebe durch zwei TBS- und einen TBS++-Waschschritte zu je 15 min von Resten des primären Antikörpers befreit um anschließend in einer 1:250 Verdünnung eines mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Sekundärantikörpers in TBS++ 60 min bei Raumtemperatur auf einem Schwenker inkubiert zu werden. Nach drei weiteren TBS-Waschschritten zu je 5 min, mithilfe derer Reste des Sekundärantikörpers entfernt wurden, wurden die Proben für 5 min in einer 1:1000 Verdünnung des Zellkernmarkers DAPI in TBS inkubiert. DAPI interkaliert in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA und hat ein bei 461nm charakteristisches Emissions-Spektrum, weshalb es in der Fluoreszenzmikroskopie als Zellkern-Standardmarker eingesetzt wird. Abschließend wurde in vier TBS-Waschschritten überschüssiges DAPI entfernt, die Schnitte in einem 0,1M PO<sub>4</sub> Bad mit einem Pinsel in anatomischer Reihenfolge auf geladene

Objektträger aufgezogen, etwa 10 min getrocknet und mittels PVA/Dabco und 24x60mm Deckgläser eingedeckelt.

Zusätzliche wurden folgende Schritte bei der BrdU-Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt: nach den ersten drei 0,1M TBS Waschschritten schloss sich ein 30-minütiger Inkubationsschritt in 2N HCL in einem auf 37°C temperierten Schwenkwasserbad zur Antigendemaskierung an, gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation in 0,1M Borat Puffer zur pH-Neutralisierung und dreier weiterer Waschschrritte in TBS. Des Weiteren wurde das Protokoll wie bei allen anderen Immunfluoreszenzfärbungen angewendet.

### *Stereologische Auswertung*

Sämtliche stereologischen Auswertungen wurden an einem halbautomatischen Stereologie-Arbeitsplatz durchgeführt: Nikon Eclipse E600 Mikroskop mit Nikon CFI Plan Fluor 4x, 40x und CFI Plan Achromat 10x, 20x Objektiven (Nikon Instruments Inc. Melville, NY 11747, USA), LEP BioPrecision Mikroskopiertisch + Mac 5000 Kontrolleinheit (Ludl Electronic Product Ltd., Hawthorne, NY 10532, USA), Dage MTI CCD-300 monochrome CCD-Kameramodul + IFG 300 Kontrolleinheit (Dage MIT of MC, Inc., Michigan City, IN 46360, USA), *Stereo Investigator 7* Software (MicroBrightField, Williston, VT 05495, USA); Für alle stereologischen Auswertungen gelten dabei folgende Gemeinsamkeiten:

- Auszählung an sagittalen Schnitten;
- Einzeichnen des Referenzfeldes jedes Schnittes unter 10x Vergrößerung, im OB Unterscheidung von GLOM und GCL, im DG unter Einbeziehung der SGZ;
- Ausschließlich Zählung von Zellprofilen typischer Form & Färbung;
- Ausschluss von Schnitten, die eine ge- oder zerstörte Anatomie aufwiesen (z.B. Gewebsriss, fehlendes oder umgeschlagenes Gewebe);

Die Volumina von SVZ, DG, GCL und GLOM wurden auf folgende Weise berechnet: Die Fläche der jeweiligen Struktur (jeweils mindestens acht Schnitte in DG, vier in SVZ, sowie drei in GCL und GLOM pro Tier) wurde durch Einzeichnen der Umrisslinie des Referenzfeldes im Programm *Stereo Investigator* bestimmt und folgende Formeln darauf angewandt:

- Referenzvolumen = Fläche des Referenzfeldes x Schnittdicke /  $10^9$  (mm<sup>3</sup>)
- Volumen der Struktur = Referenzvolumen x Schnittserie (mm<sup>3</sup>)

Zur Analyse der Zell-Proliferation in den Regionen adulter Neurogenese wurden Schnitte einer 1-in-12 Schnittserie mit 40µm Schnittdicke mit einem gegen den Mitosemarker *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) reaktiven Antikörper + DAB gefärbt. PCNA ist eine *DNA clamp*, die die Aktivität der DNA Polymerase  $\delta$  selektiv während der S Phase des Zellzyklus beschleunigt. Zellen in der frühen G1 und S Phase des Zellzyklus exprimieren diesen nukleären Marker, welcher somit spezifisch mitotisch aktive Zellen kennzeichnet (Takasaki et al., 1981).

DG: Aufgrund der relativ geringen Anzahl positiver Zellprofile in dieser Struktur wurde eine extensive Zählweise bei 100x Vergrößerung gewählt. Pro Tier wurden sechs medial gelegene, sagittale Schnitte ausgewählt.

SVZ: Die Anzahl PCNA-positiver Zellen wurde angesichts ihrer Häufigkeit und dem Kontrast der Färbung extensiv bei 100x Vergrößerung auf jeweils vier repräsentativen Schnitten pro Tier gezählt.

Auf die so ermittelten Zellzahlen wurden folgende Formeln angewandt:

- Gesamtzellanzahl = Summe gezählter Zellen aller Schnitte x Schnittserie;
- Zelldichte = Gesamtzellanzahl / Gesamtvolumen (Anzahl / mm<sup>3</sup>)

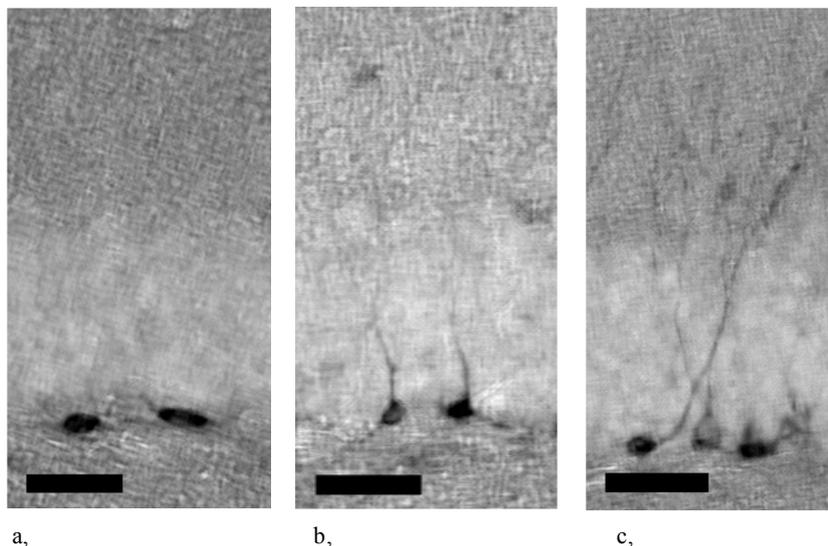


Abb. 8; DCX-positive Neuroblasten-Subpopulationen der Subgranulärzellschicht des DG nach Reifestadium: frühe (a), intermediäre (b), reife Neuroblasten (c); Maßstab 20µm

Für die Untersuchung der Neuroblastenpopulation im DG wurden die Schnitte mit einem polyklonalen Antikörper gegen den Marker DCX + DAB gefärbt. DCX ist ein für neuronale Vorläuferzellen und frühe postmitotische Neurone spezifischer, zytoplasmatischer Marker (Brown et al., 2003; Couillard-Despres et al., 2005).

Zusätzlich wurden bei der Beurteilung der Zellen folgende Subpopulationen von Neuroblasten in jeweils drei repräsentativen Schnitten pro Tier unterschieden und gezählt:

- frühe: DCX<sup>+</sup> Zellen mit flachem Perikaryon ohne/mit zur SGZ parallel verlaufenden Fortsätzen;  
intermediäre: DCX<sup>+</sup> Zellen mit bis in die GCL reichenden, vertikalen Fortsätzen;  
reife: DCX<sup>+</sup> Zellen mit bis über die GCL hinaus reichenden, weit verzweigten Fortsätzen;

Für die Analyse der Anzahl neu gebildeter Zellen wurden die Schnitte wie beschrieben immunhistochemisch gegen BrdU gefärbt.

DG: Die Anzahl BrdU-positiver Zellen wurde angesichts ihrer geringen Zahl im DG extensiv auf jeweils 8 Schnitten pro Tier unter 300x Vergrößerung gezählt. Zellprofile außerhalb des Referenzfeldes wurden bis zu einem Abstand von drei Zelldurchmessern vom Rand desselben mitgezählt.

Auf die so ermittelten Zellzahlen wurden folgende Formeln angewandt:

- Gesamtzellanzahl = Summe gezählter Zellen aller Schnitte x Schnittserie
- Zelldichte = Gesamtzellanzahl / Gesamtvolumen (Anzahl / mm<sup>3</sup>)

OB: Da die Anzahl BrdU-positiver Zellen im OB ungleich höher ist als im DG, wurde zur Analyse dieser Region ein von West et al. beschriebenes Zählverfahren angewandt, das die Vorzüge des *optical disectors* und des *systematic uniform sampling* vereint – der optische Fraktionator (West et al., 1991). Hierfür wurde die entsprechende Funktion der *Stereo Investigator 7* Software unter 300x Vergrößerung auf die GCL und GLOM des OB verwendet. Der Zählrahmen wurde 30 x 30µm (= 900µm<sup>2</sup>), das Zählraster 300 x 300µm<sup>2</sup> (= 90 000µm<sup>2</sup>) groß gewählt, woraus maximal fünf positive Zellprofile pro Zählrahmen und mindestens fünf Zählrahmen pro Referenzfeld resultierten. Pro Tier wurden jeweils zwischen drei und sechs repräsentativen Schnitten durch den OB ausgemessen und –gezählt. Aus den genannten Parametern ergeben sich eine *section sampling fraction* = 1/6, *area sampling fraction* = 1/100 und *height sampling fraction* = 0,8.

Auf die so ermittelten Zellzahlen wurden folgende Formeln angewandt:

- Zählvolumen = Anzahl gezählter Rahmen x Rahmenfläche  
x Schnittdicke /  $10^9$  (mm<sup>3</sup>)
- Zelldichte = gezählte Zellen / Zählvolumen
- Gesamtzellanzahl = Zelldichte x Gesamtvolumen der Struktur

### *Konfokalmikroskopie und digitale Bildbearbeitung*

Die meisten in dieser Arbeit erstellten konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurden an einem Nikon Eclipse TE 300 Mikroskop mit Plan Apo 10x & 60x, S Fluor 20x und Plan Fluor 40x Objektiven (Nikon Instruments Inc. Melville, NY 11747, USA), BIORAD Radiance 2700 Lasersystem und *Laserssharp Confocal Assistant* Software (beides von Bio-Rad, Hercules, CA 94547, USA) erarbeitet. Die quantitative Untersuchung der BrdU/TH-Koexpression erfolgte an einem Leica DMRXE Mikroskop mit Leica TCS NT System, PL Fluotar 25x/0,75 Objektiv, HeNe Laser und *Leica Confocal* Software (alles Leica Microsystems GmbH, D-35578 Wetzlar). *Adobe Photoshop CS2* (Adobe Systems Inc., San Jose, CA 95110, USA) wurde zur digitalen Nachbearbeitung der Originaldateien (Kontrast, Format und Formatierung) verwendet.

Um die Koexpression zweier Marker bestätigen zu können, und falsch positive Ergebnisse auszuschließen, wurde bei der Auswertung aller Koexpressionsstudien die zu beurteilenden Zellen in ihrer gesamten Ausdehnung um die z-Achse untersucht. Hierfür wurde die *pinhole*-Apertur so gewählt, daß sich eine optische Schnittdicke von 1 µm ergab. Bei unterschiedlicher Penetranz der Antikörper wurden ausschließlich Bereiche der Probe beurteilt, in denen beide Marker mit gleicher Intensität vorhanden waren.

Zur Analyse der Differenzierung neu gebildeter Zellen wurden pro Tier in jeder untersuchten Region 50 BrdU-positive Zellen per Zufall aufgesucht und auf Koexpression mit NeuN (neuronale Differenzierung in DG und GCL), bzw. Tyrosinhydroxylase (TH) (dopaminerge Differenzierung in GLOM) untersucht. Das Verhältnis von doppelt- zu einfach-positiven Zellprofilen entspricht somit dem Anteil neuronal, bzw. dopaminerg differenzierter Zellen an der Gesamtheit neu gebildeter Zellen.

Auf die so erhaltenen Verhältnisse wurde folgende Formel angewendet:

- Gesamtzellanzahl entsprechend differenzierter, neu gebildeter Zellen =

Verhältnis entsprechend differenzierter Zellen (in %) x Gesamtzellanzahl BrdU+ Zellen (Durchschnitt aller Tiere einer Gruppe in der jeweiligen anatomischen Region)

Zur Untersuchung der Apoptoseaktivität im DG wurde in einer 1-in-12-Schnittserie die Anzahl Caspase-3 (Casp-3) einfach-positiver, sowie Casp-3/NeuN doppelt-positiver Zellprofile ermittelt. Casp-3 ist ein zentrales Molekül des Apoptose-Signaltransduktionsweges und als verlässlicher Apoptosemarker in der humanen Substantia nigra bei Parkinsonpatienten bekannt (Tatton et al., 2003). Auf die so ermittelten Zellzahlen wurde folgende Formel angewendet:

- Gesamtzellanzahl apoptotischer Zellen/ apoptotischer neuronaler Zellen =  
Anzahl einfach- / doppelt-positiver Zellprofile x Schnittserie

## II. Temporales Expressionsmuster von $\alpha$ -Synuclein im Gyrus Dentatus adulter transgener mThy1 und hPDGF $\beta$ human Wildtyp $\alpha$ -Synuclein Mäuse

### *hPDGF $\beta$ Tiere & Genkonstrukt*

Die in dieser Arbeit verwendeten tg hPDGF- $\beta$  h-wt  $\alpha$ -Synuclein Tiere stammen aus dem Labor von E Masliah (Masliah et al., 2000). Ein Fusionsgen aus einem 423 Basen-Paare (bp) langen h-wt  $\alpha$ -Synuclein cDNA Fragment und zweier SV40 Sequenzen wurde unter die regulatorische Kontrolle der 1480 bp langen 5'-Region des hPDGF- $\beta$ -Ketten-Gens gebracht. Dieses Fusionsgen wurde in Ein-Zell-Embryos mikroinjiziert und auf dem genetischen Hintergrund einer C57BL/6 x DBA Kreuzung gezüchtet (Masliah et al., 2000). Die tg Tiere wurden analog zu den beschriebenen tg mThy1 Tieren gehalten und behandelt (siehe S.25).



Abb. 9; Fusionsgen mit humanem Wildtyp  $\alpha$ -Synucleinelement unter der regulatorischen Kontrolle des hPDGF- $\beta$  Promotors (Masliah et al., 2000)

### *Versuchsdesign*

Um das temporale Expressionsverhalten von  $\alpha$ -Synuclein im Gyrus dentatus der tg mThy-1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein und tg hPDGF- $\beta$   $\alpha$ -Synuclein Maus zu vergleichen, wurde die Koexpression dieses Proteins mit standardisierten Markern der hippocampalen Neurogenese mittels Immunfluoreszenz und Konfokalmikroskopie untersucht. Abbildung 2 illustriert das temporale Expressionsmuster zellulärer Marker der adulten hippocampalen Neurogenese, von denen Sox2, GFAP, DCX, Calbindin, Calretinin und NeuN gewählt wurden.

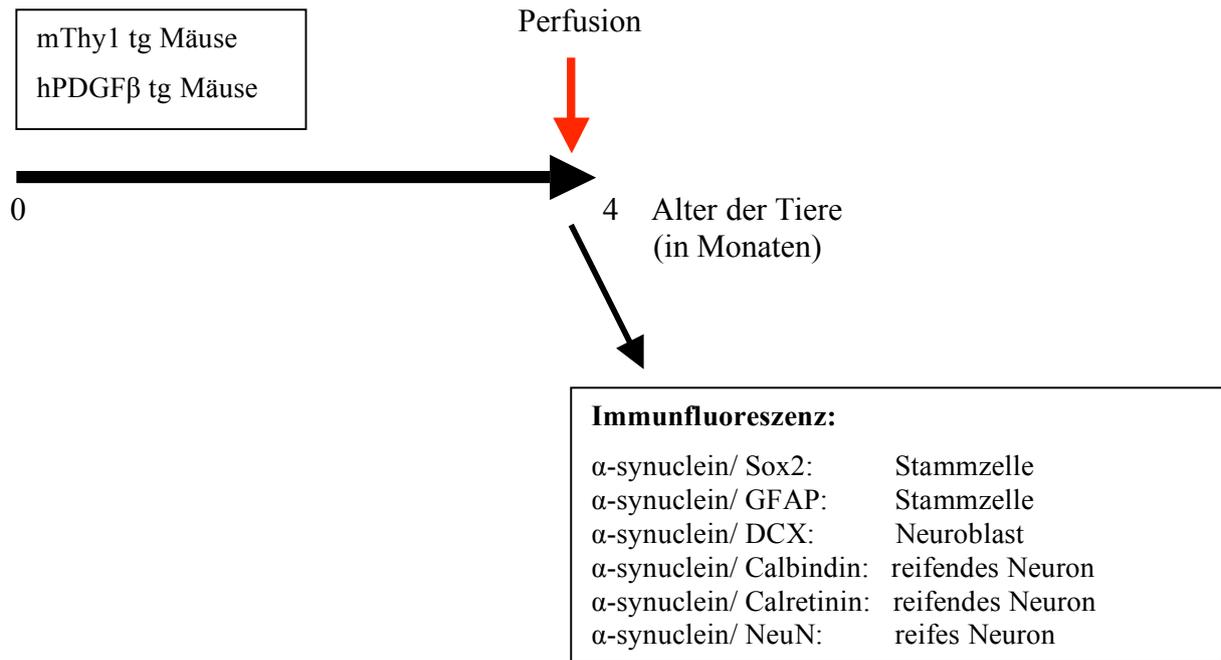


Abb. 10; Paradigma der Analyse des temporalen Expressionsmusters von  $\alpha$ -Synuclein in beiden tg Mausstämmen

### Immunfluoreszenz und Mikroskopie

Die Proben wurden, wie oben beschrieben, immunfluoreszent gefärbt und konfokalmikroskopisch analysiert. Folgende AKs wurden für die Experimente in diesem Teil verwendet:

Primäre Antikörper:			
Antikörperbezeichnung	No.	Verdünnung	Hersteller
monoklonaler Ratten- $\alpha$ -human- $\alpha$ -Syn-AK	15G7	1:10	Axxora, San Diego, CA 92121, USA
polyklonaler Hasen- $\alpha$ -SOX2-AK	AB5603	1:250	Chemicon, Temecula, CA 92590, USA
polyklonaler Hasen- $\alpha$ -DCX-AK	4603	1:100	Cell Signaling, Boston, MA 02241, USA
polyklonaler Hühnchen- $\alpha$ -GFAP-AK	AB5541	1:500	Chemicon, Temecula, CA 92590, USA
monoklonaler Maus- $\alpha$ -NeuN-AK	MAB377	1:200	Chemicon, Temecula, CA 92590, USA

polyklonaler Ziegen- $\alpha$ -Calretinin-AK	AB1550	1:500	Chemicon, Temecula, CA 92590, USA
monoklonaler Maus- $\alpha$ -Calbindin 28kD-AK	300	1:250	Swant, Bellinzona, CH-6501

<b>Sekundäre Antikörper:</b>			
Esel- $\alpha$ -Ratte-CY3-IgG AK	712-165-153	1:200	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA 19390, USA
Esel- $\alpha$ -Hühnchen-FITC-IgY AK	703-095-155	1:200	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA 19390, USA
Esel- $\alpha$ -Hase-FITC-IgG AK	711-095-152	1:200	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA 19390, USA
Esel- $\alpha$ -Maus-IgG AlexaFluor 488 AK	A21202	1:200	Molecular Probes, Inc. Eugene, OR 97402, USA
Esel- $\alpha$ -Ziege-IgG AlexaFluor 488 AK	A11055	1:200	Molecular Probes, Inc. Eugene, OR 97402, USA

Tab. 2; Liste der verwendeten primären und sekundären Antikörper

Der 15G7 IgG Antikörper ist gegen das h-wt  $\alpha$ -Synuclein Antigen 116-131 gerichtet. Er reagiert spezifisch mit der h Variante ohne eine Kreuzreaktion mit endogenem, murinen  $\alpha$ -Synuclein zu zeigen (Kahle et al., 2000b).

### III. Ultrastrukturelle Analyse der Dendriten neu gebildeter Neurone adulter, transgener $\alpha$ -Synuclein Mäuse

#### *Versuchsdesign*

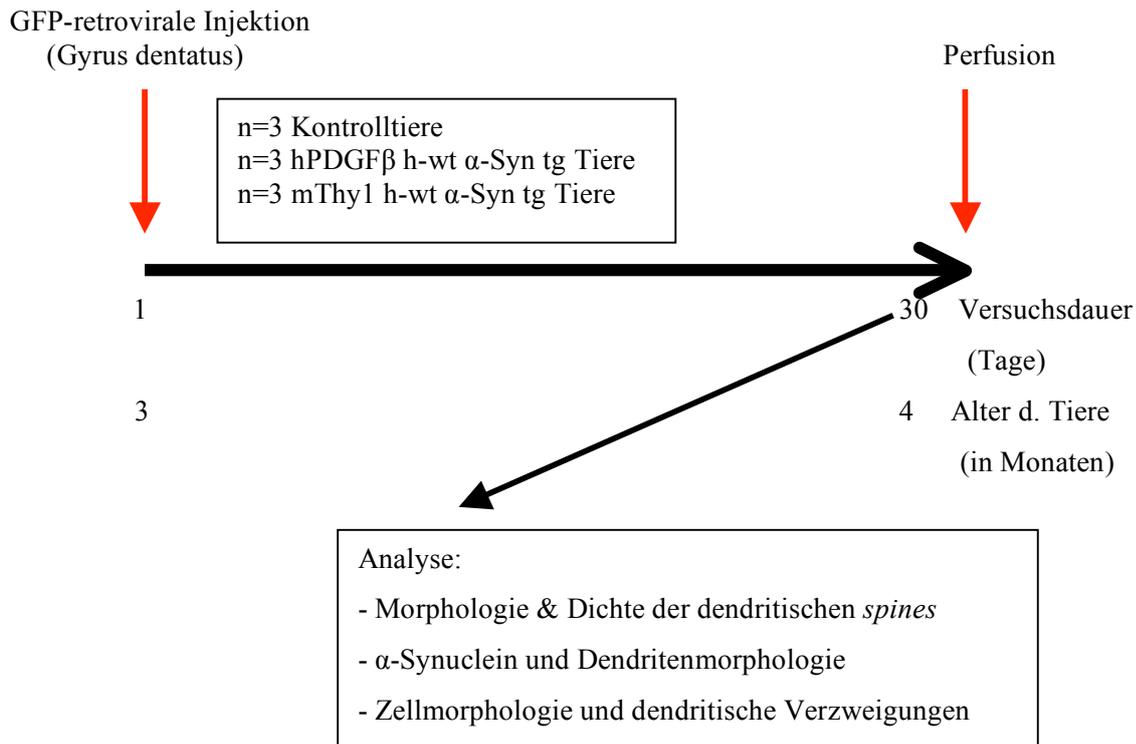


Abb. 11; Paradigma zur ultrastrukturellen Analyse der Dendriten und *spines*

#### *Retrovirus und stereotaktisch-intrazerebrale Injektionen*

Zur Herstellung der Retroviralen Injektionslösung wurden folgende Chemikalien und Geräte benutzt: Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Invitrogen, Carlsbad, CA 92008, USA), fetales Kälberserum (FBS, F-2442, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 60103, USA), Polyethylenimine linear (PEI) (Polyscience Inc., Warrington, PA 18976, USA), 0,22 $\mu$ m Express Plus Filter (Millipore, Temecula, CA 92590, USA), Ultrazentrifugenröhrchen 13x51mm & 25x89mm, Ultrazentrifuge Optima L-90K (beides von Beckman Coulter, Fullerton, CA 92834, USA);

Zur Visualisierung der seit dem Zeitpunkt der Injektion neu gebildeten Neurone in der SGZ des DG wurde eine Eigenschaft von Onkoretroviren ausgenutzt (Lewis and Emerman, 1994): diese können ausschließlich Zellen während der Mitose infizieren und ihr Genmaterial in deren DNA einbauen. Tragen diese Onkoretroviren ein Reporter-Gen, so lassen sich von ihnen infizierte Zellen leicht histologisch nachweisen (Price et al., 1987). Für diese Arbeit wurde das beschriebene CAG-GFP Viruskonstrukt verwendet (Zhao et al., 2006). Dieser auf Basis des murinen Moloney Leukämie Virus entwickelte Vektor enthält neben dem Compoundpromotor CAG (Naviaux et al., 1996) den Reporter *green fluorescent protein* (GFP). Als weitere Komponenten wurden ein CMV-Verstärker (CMV-gp), das Hüllglykoprotein des Vesikulären Stomatitis Rhabdovirus (VSV-G) zur Vergrößerung des Wirtsspektrums und wegen seiner mechanischen Festigkeit unter Ultrazentrifugation (Burns et al., 1993), sowie das posttranskriptionale Regulatorelement des Woodchuck Hepatitis Virus (WPRE) zur Stabilisierung des Virustranskripts und Steigerung der Expression (Zufferey et al., 1999) gewählt.

Für die Viruspräparation wurden humane embryonale Nierenzellen der Linie HEK293T gemäß eines leicht modifizierten Protokolls (Tashiro et al., 2006a) verwendet: Einen Tag vor geplanter Virustransfektion (Tag 1) wurden HEK293T Zellen in einer Dichte von  $8 \times 10^6$  Zellen pro 150mm Petrischale in 20ml IMDM + FBS plattiert. Am Tag der Transfektion (Tag 2) wurden die drei Plasmide CAG-GFP (13,8 $\mu$ g), CMV-gp (9,2 $\mu$ g) und VSV-G (4,6 $\mu$ g) in 1ml IMDM Medium verdünnt, mit 110,4 $\mu$ l PEI (1 $\mu$ g/ $\mu$ l) vermischt, vorsichtig gevortext und nach 5 min auf die Zellkulturschalen aufgetropft. Das in PEI enthaltene stark kationische Aethylenimin wirkt als kationisches Polymer analog zu bei der Lipofektion verwendeten kationischen Lipiden (z.B. *Lipofectamin*); der Vorgang wird Polyfektion genannt (Fischer et al., 1999) und ist nach laborinternen Vergleichsexperimenten in Bezug auf die Transfektionsrate der Lipofektion gleichwertig. Das Medium wurde nach fünf Stunden erneuert und die Zellkulturen bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C zwei weitere Tage inkubiert.

Am Tag 4 wurde der Virus auf folgende Weise gereinigt und aufkonzentriert: Das Medium aus den Zellkulturschalen wurde in 50ml Falcon-Röhrchen gesammelt, bei 2000 U/min 3min abzentrifugiert, der Überstand durch 0,22 $\mu$ m Filteraufsätze vakuumfiltriert, das Filtrat mittels Feinwaage exakt gleichmäßig auf 25x89mm Ultrazentrifugenröhrchen verteilt und in einer Ultrazentrifuge bei 4°C und 19400 U/min für zwei Stunden zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde abgesaugt, das Pellet mit 2 x 0,7 ml PBS vorsichtig mittels

Pipette resuspendiert und in ein 13x51mm Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Hierauf wurde eine 20%ige Sukroslösung als Trennkissen pipettiert und die Röhrchen wiederum mittels Feinwaage justiert. Ein zweiter Zentrifugationsschritt bei 4°C, 19400 U/min für zwei Stunden schloss sich an. Nach Verwerfen des Überstand wurde das Pellet mit dem Virus einmal in 70µl und ein zweites Mal in 20µl PBS 30sec gelöst, gevortext, mittels Pipette resuspendiert, zu je 11µl aliquotiert und auf -80°C tiefgefroren.

Neu erstellte Viruspräparationen wurden auf ihre Transfektionseigenschaften in absteigender Viruskonzentration auf HEK293T Zellen getestet. Nach vier Tagen Inkubation wurden die Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie (Nikon Eclipse TE300 Mikroskop, Nikon Instruments Inc. Melville, NY 11747, USA) auf grüne Autofluoreszenz überprüft. Sobald mindestens eine erfolgreich transfizierte Zelle in der 1:10<sup>7</sup> Viruspräparation gefunden werden konnte, wurde eine ausreichend gute Transfektionsrate angenommen.

Für die Injektionen des Retrovirus wurden die Mäuse im Alter von drei Monaten mit einem Mix von 0,3ml Ketamin und Xylazin tief anästhesiert und in einem Stereotaxieinstrument Modell 900 (David Kopf Instruments, Tujunga, CA 91042, USA) horizontal ausgerichtet und fixiert. Bei eingesetzter 5µl Mikroinjektionsspritze und stumpfer 30G Nadel (Modell RN, point style 3; beide von Hamilton Company, Reno, NV 98502, USA) wurden die Koordinaten für Bregma in drei Dimensionen bestimmt und die Koordinaten der Zielstruktur (Hippocampus: -2mm AP (anterior-posterior), -1,6mm ML (midline = lateral), -1,9mm DV (dorsoventral) ab Dura mater bzw. -2,3mm DV ab Schädelknochen) eingestellt. Schädeldecke und Dura mater wurden mit Bohrer und steriler Nadel eröffnet. Nach Reinigung des Injektionsbestecks mit Ethanol und destilliertem Wasser und Laden von 1,5µl Virus, wurde die Nadel über den Feintrieb des Stereotaxieinstruments zu den vertikalen Koordinaten vorgeschoben, wo die Hälfte des Virusvolumens über 1 min langsam instilliert wurde. Die Nadel wurde 2 Minuten lang nicht bewegt, um eine Verteilung des Virus im Stichkanal zu verhindern, die zweite Hälfte des Virusvolumens 1/10 mm weiter rostral über 1 min langsam injiziert, und die Nadel wiederum 2 min lang nicht bewegt. Nach endgültigem Entfernen der Injektionsnadel wurde abschließend die Kopfschwarte mittels Gewebekleber (3M Vetbond Tissue Adhesive, 3M, St.Paul, MN 55144, USA) verschlossen und die Tiere auf einer Wärmematte bis zum Erwachen aus der Narkose beobachtet.

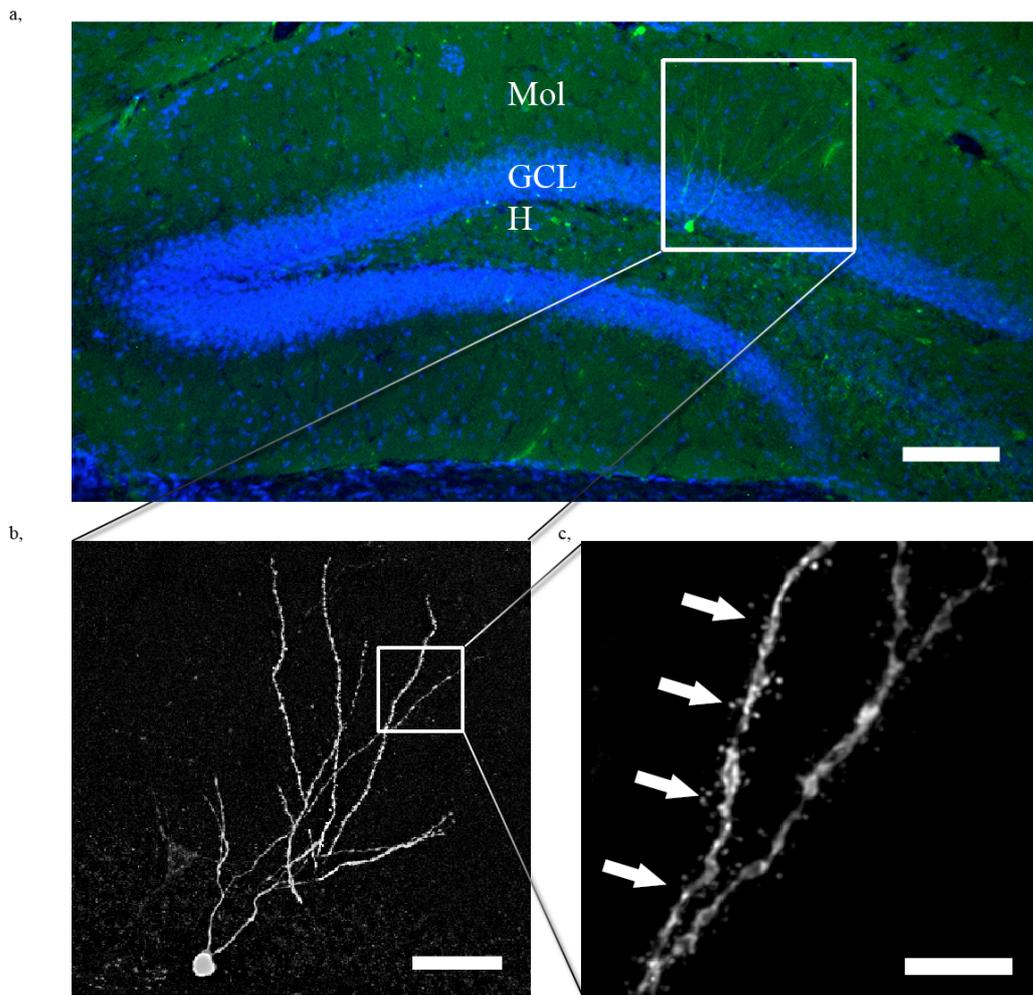


Abb. 12; Arbeitsschritte der ultrastrukturellen Analyse an Dendriten und dendritischen *spines* neugeborener, hippocampaler Neurone; Aufsuchen retroviral gefärbter Neurone (grün) an der Grenze von Hilus (H) und Granulärzellschicht (GCL) des Gyrus dentatus (a); konfokal-mikroskopische z-Stapelaufnahme der Zelle mit Dendriten in drei Dimensionen und Umwandlung des 3-D-Datensatzes in eine zweidimensionale Maximalintensitätsprojektion; quantitative Auswertung der Verzweigungspunkte (b); selektive Stapelaufnahme einzelner Dendritenabschnitte in der Molekularzellschicht (Mol) unter 400-facher Vergrößerung, 2-D-Dekonvolution und quantitative Analyse der *spine*-Dichte und -Qualität (c); GFP-positive Neurone (grün), DAPI-positive Zellkerne (blau); Maßstab 100 $\mu$ m (a), 25 $\mu$ m (b), bzw. 5 $\mu$ m (c)

### *Gewebepräparation & Mikroskopie*

Die injizierten Tiere aus der Kontroll-, mThy1- und hPDGF- $\beta$ -Gruppe wurde perfundiert, die Gehirne fixiert und nach koronarem Zuschnitt zu je 40 $\mu$ m als *free floating sections* behandelt. Nach dreimaligem Waschen in TBS folgte eine 6-minütige Inkubation in

DAPI zur Anfärbung der Zellkerne (in einer Verdünnung von 1:1000 in TBS) und nach vier weiteren TBS Waschschritten das Aufziehen und Eindeckeln auf Objektträger. GFP-exprimierende Zellen wurden dann mit einem Fluoreszenzmikroskop im DG aufgesucht und als Stapel um die z-Achse aufgenommen. Zur Analyse der Zell- wie auch Dendritenmorphologie wurden pro Zelle konfokale z-Stapel jeweils zweier unterschiedlichen Einstellungen als BIORAD-Dateien gespeichert:

- Je eine Übersichtsaufnahme der ganzen Zelle und ihres Dendritenbaums:  
Vergrößerung optisch 40x, digital 1x; Auflösung 512x512 Pixel; optische Schnittdicke 1,5 $\mu$ m; entspricht einer reellen Bildkantenlänge von 304x304 $\mu$ m;
- Je zwei Detailaufnahmen der Dendriten und ihrer *spines* aus dem mittleren Drittel der Molekularzellschicht:  
Vergrößerung optisch 60x, digital 5x; Auflösung 1024x1024 Pixel; optische Schnittdicke 0,5 $\mu$ m; entspricht einer reellen Bildkantenlänge von 40x40 $\mu$ m;

### *Digitale Bildbearbeitung und Auswertung*

Die Rohdaten aus den z-Stapeln der Übersichtsaufnahmen (Vergrößerung 40x1) wurden mithilfe der Bildanalyse-Software *Image Pro* (Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD 20814, USA) in Maximal-Intensitäts-Projektionen (MIP) umgewandelt, um aus dem dreidimensionalen Datensatz jeder Zelle ein zweidimensionales Bild zu generieren. Der Kontrast wurde angepasst, um Bilder vergleichbarer Güte zu erhalten. Die Länge der Dendriten pro Zelle wurde anhand der generierten MIP mit *IGL Trace* (©Kristen M. Harris, *Synapse Web*) erfasst: Nach Maßstabskalibrierung der x- und y-Achse und manuellem Auszählen der Verzweigungspunkte auf denselben Aufnahmen wurde die Dichte der dendritischen Verzweigungen bestimmt. Für die Analyse wurden ausschließlich Zellen mit erkennbarem Soma und durchgehend kontinuierlichen Zellfortsätzen eingeschlossen, um eine Überschätzung auszuschließen.

Die Rohdaten aus den z-Stapeln der Detailaufnahmen (Vergrößerung 60x5) wurden mithilfe von *AutoDeblur Deconvolutions* (Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD 20814, USA) mit folgenden Einstellungen als Stapel 5-fach dekonvolutioniert: mittleres Rauschlevel; Optischer Koeffizient „Öl“; numerische Apertur des Objektivs 1,4; Mikroskop „*laser scanning confocal microscope*“. Diese dekonvolutionierten Stapel wurden dann im Programm

*Confocal Assistant* (©Todd Clark Brelje, Biomedical Image Processing Lab) geöffnet und in Projektionen umgewandelt, um aus dem dreidimensionalen Datensatz jedes Dendriten ein zweidimensionales Bild zu generieren. Mittels *IGL Trace* wurde die Länge der vollständig abgebildeten Dendritenabschnitte in  $\mu\text{m}$  bestimmt und die Anzahl sämtlicher darauf liegender *spines* ausgezählt. Zusätzlich wurde durch individuelles Vermessen großer *spines* nach der Formel Länge x Breite x  $\pi / 4$  die Fläche des jeweiligen Fortsatzes berechnet und nach Mittelung dreier Messungen ab  $0,4 \mu\text{m}^2$  als *mushroom spine* gezählt.

Die Statistik beruht auf folgenden Anzahlen analysierter Zellen: Dendritenlänge/-verzweigungen (Ctrl  $n=15$ , mThy1  $n=12$ , hPDGF $\beta$   $n=7$ ), Dichte dendritischer *spines* (Ctrl  $n=15$ , mThy1  $n=13$ , hPDGF $\beta$   $n=21$ ), die Anzahl der Tiere betrug jeweils (Ctrl  $n=6$ , mThy1  $n=3$ , hPDGF $\beta$   $n=2$ ). Die Ergebnisse gehen als Mittelwert pro Tier in die Statistik ein.

Detailaufnahmen von Kontroll- sowie tg Tieren beider Gruppen wurden über die 3-D-Funktion der Bildanalyse-Software *Image Pro* (Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD 20814, USA) aus konfokalen z-Stapeln zur morphologischen Beschreibung in dreidimensionale Zweikanalardarstellungen umgewandelt.

#### **IV. Statistische Auswertung**

Alle statistischen Rohdaten wurden mithilfe von *Microsoft Excel 2004 für Mac* (Microsoft Cooperation, Redmond, WA 98052, USA) und der Statistiksoftware *GraphPad Prism 4* (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA 92037, USA) ausgewertet. Die statistische Analyse erfolgte mithilfe des *unpaired, two-sided Student t-Test*, *one-way ANOVA* und *Bonferroni's post test*. Das Signifikanzniveau wurde bei  $p < 0,05$  festgelegt. Alle Ergebnisse sind als gerundete Durchschnittswerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) angegeben.

## Ergebnisse

### I. Adulte Hippocampale Neurogenese: mThy1 $\alpha$ -Synuclein beeinflusst die Neuroblastenreifung

Im Folgenden wurde die Hypothese, daß die höhere absolute  $\alpha$ -Synucleinexpression der tg mThy-1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein-Maus die Neurogenese im DG des Hippocampus quantitativ stärker negativ beeinflusst, als bei der tg hPDGF $\beta$  h-wt  $\alpha$ -Synuclein-Maus, experimentell überprüft. Neben der Reifung der Neuroblasten wurden Proliferation, Zellüberleben, Apoptose und die Differenzierung neu gebildeter Zellen quantifiziert, sowie eine Volumetrie durchgeführt.

#### *mThy1 $\alpha$ -Synuclein vermindert Zahl reifer Neuroblasten*

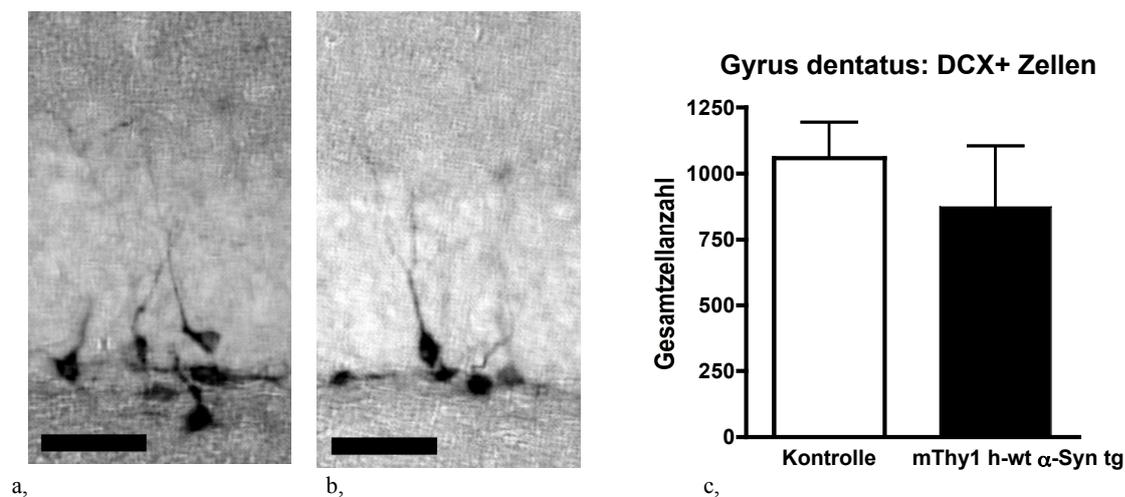


Abb. 13; DCX-positive Zellprofile in Subgranulärzellschicht und hilärem Drittel der Granulärzellschicht des Gyrus dentatus bei einem Kontroll- (a) und tg mThy1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein Tier (b); Gesamtanzahl DCX-positiver Zellprofile bei Kontroll- und Versuchsgruppe (c); Maßstab 20  $\mu$ m

Die Quantifizierung der Neuroblastenpopulation im DG ergibt in der Summe aller DCX positiven Zellprofile zwischen den Gruppen keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,19$ ). Auch in der Auszählung nach Reifegrad ergibt sich bei den frühen ( $p=0,16$ ) und intermediären Neuroblasten ( $p=0,91$ ) kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Reife Neuroblasten sind bei transgenen Tieren ( $130 \pm 58$ ) im Vergleich zu Kontrolltieren ( $210 \pm 46$ ) signifikant vermindert ( $p=0,04$ ).

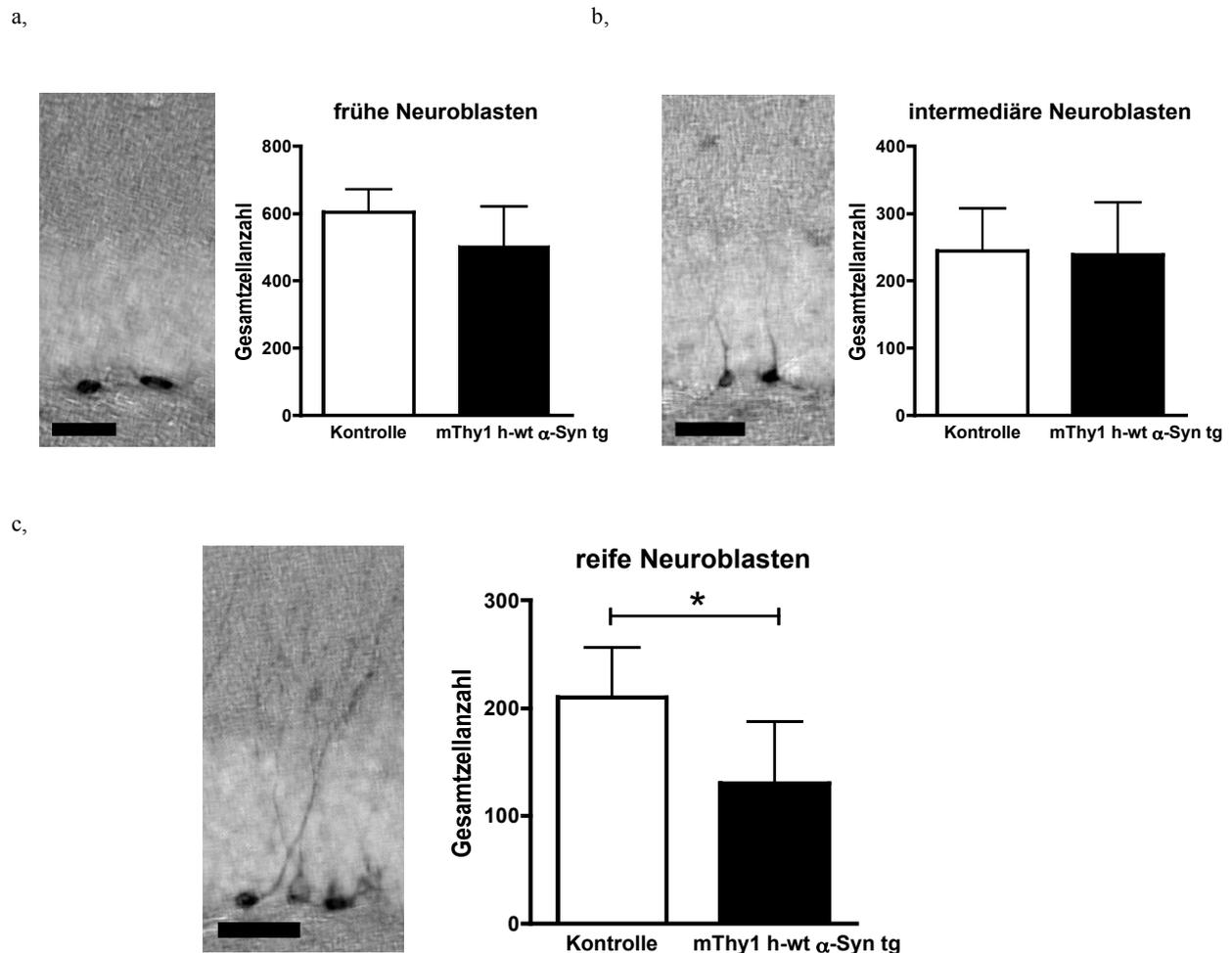


Abb. 14; Anzahl DCX-positiver Zellprofile im Gyrus dentatus nach morphologischer Unterscheidung in frühe (a), intermediäre (b) und reife Neuroblasten (c); Maßstab  $20\mu\text{m}$

*mThy1  $\alpha$ -Synuclein hat keinen Einfluss auf Zellüberleben, -Reifung, -Proliferation, Apoptose und Volumen des DG*

Mit Hilfe des BrdU-Paradigmas wurde das Überleben der Zellen, die sich zum Zeitpunkt der i.p. Injektionen in den neurogenen Regionen teilten mithilfe einer immunhistochemischen Färbung stereologisch quantifiziert. Dabei zeigt sich im DG des Hippocampus sowohl beim Vergleich der BrdU-Gesamtzellanzahl ( $p=0,77$ ), als auch der Dichte BrdU-positiver Zellen kein signifikanter Unterschied ( $p=0,82$ ).

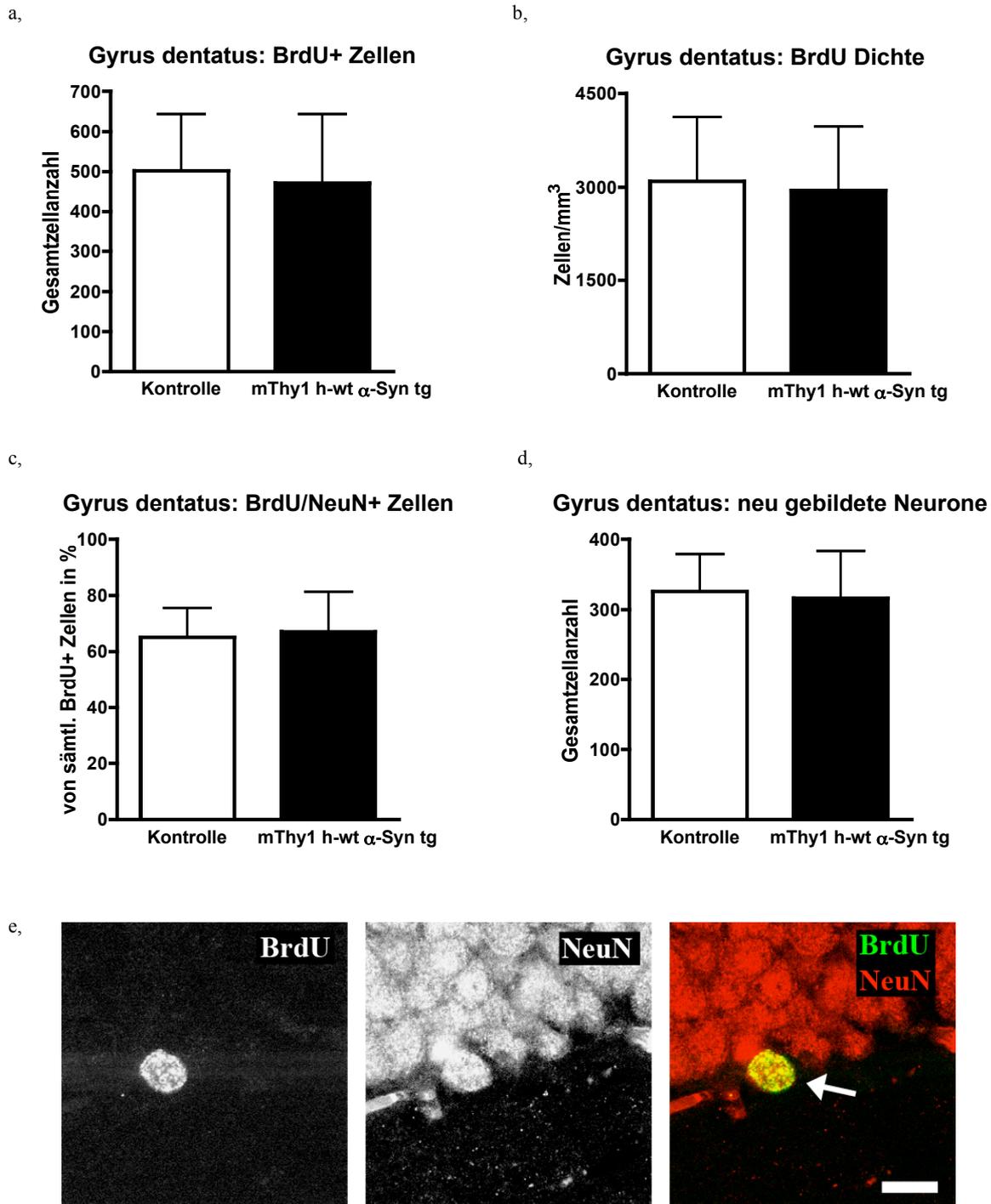


Abb. 15; Zellüberleben und zelluläre Differenzierung im Gyrus dentatus des Hippocampus: Stereologische Auszählung BrdU-positiver Zellprofile (a) und daraus berechnete Dichte BrdU-positiver Zellprofile (b); Zelluläre Differenzierung BrdU-positiver Zellen in Gyrus dentatus durch Analyse der Koexpression mit spezifischen Markern neuronaler Differenzierung (c); durchschnittliche Anzahl neu gebildeter Neurone des Gyrus dentatus (d); konfokalmikroskopische Darstellung eines BrdU/NeuN doppelt-positiven Zellprofils an der Grenze von Granulär- und Subgranulärzellschicht des Gyrus dentatus (e); Maßstab 10 $\mu$ m

In einem zweiten Schritt wurde mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung das Verhältnis von BrdU/NeuN doppelt- zu BrdU einfach-positiv gefärbten Zellprofilen ermittelt. Dieses stellt den prozentualen Anteil neuronal differenzierter Zellen an der Gesamtzahl neu gebildeter Zellen dar. Die neuronale Differenzierung neu gebildeter Zellen im DG liegt bei Versuchs- und Kontrollgruppe bei etwa 66% ( $p=0,78$ ). In der daraufhin durchgeführte Berechnung der Absolutzahlen neu gebildeter Neurone unterscheiden sich Kontroll- und Versuchsgruppe nicht signifikant bezüglich Überleben neu geborener Neurone ( $p=0,79$ ).

Um zu untersuchen, ob das Transgen einen Einfluss auf die mitotische Aktivität der NPCs hat, wurde die Zellproliferation untersucht. Hierzu wurde die Anzahl PCNA-positiver Zellprofile mittels Immunhistochemie und stereologischer Auszählung bestimmt und in Bezug auf das Volumen der untersuchten Schnittserie berechnet.

In der GCL des DG zeigt sich in der Anzahl PCNA-positiver, mitotisch-aktiver Zellen kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe ( $p=0,84$ ). Das bedeutet, daß im DG kein quantitativer Unterschied in der mitotischen Aktivität besteht.

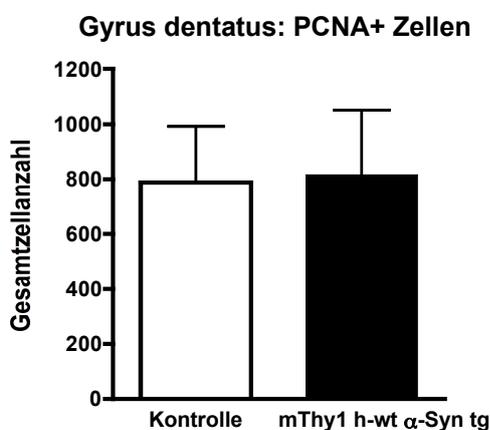


Abb. 16; Zellproliferation im Gyrus dentatus anhand stereologischer Quantifizierung PCNA-positiver Zellprofile

Die quantitativen Effekte der Adulten Neurogenese im DG werden nicht nur durch Zellproliferation und –Reifung, sondern auch durch die kontrollierte Elimination von Zellen mittels Apoptose bestimmt (Biebl et al., 2000; Winner et al., 2002). Die Untersuchung der Apoptoseaktivität durch Immunfluoreszenz ergibt weder für die Anzahl aller apoptotischer Zellen ( $p=0,27$ ), noch aller Casp-3/NeuN-doppelt positiver, apoptotischer Neurone ( $p=0,54$ ),

einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. mThy1  $\alpha$ -Synuclein hat keinen signifikanten Einfluss auf die Apoptoserate im DG.

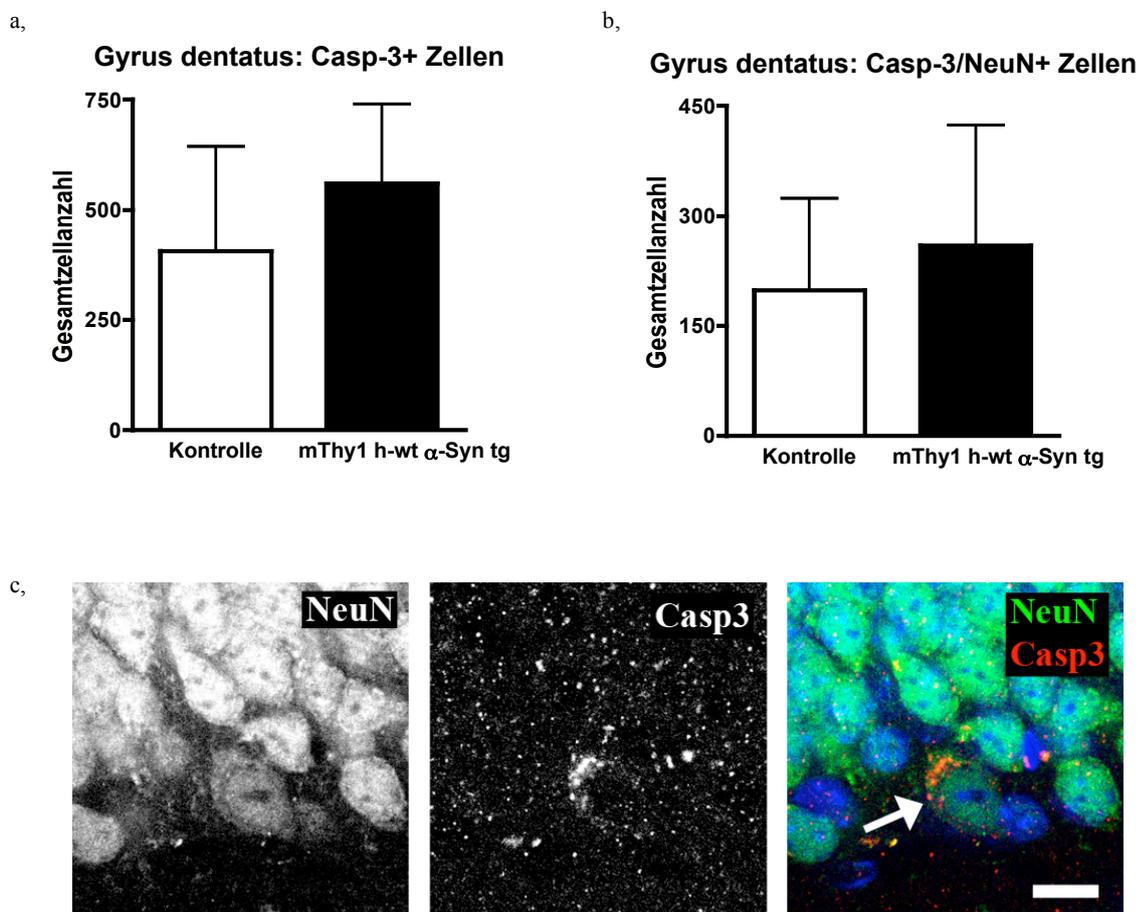
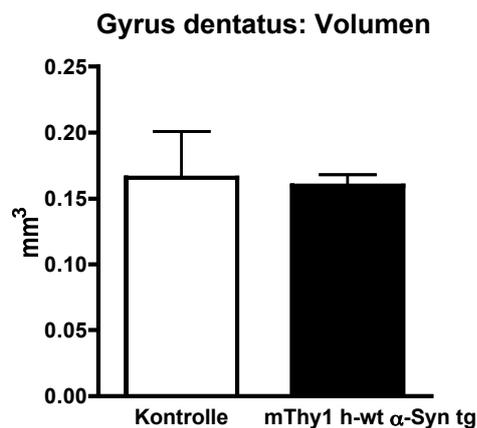


Abb. 17; Gesamtzahl apoptotischer, Casp-3 einfach-positiver Zellen (a), bzw. Casp-3/NeuN-doppelt positiver Neurone (b) im Gyrus dentatus; Konfokalmikroskopische Aufnahme eines Casp-3/NeuN doppelt-positiven Zellprofils im Gyrus dentatus (c); Maßstab 10 $\mu$ m



In der olumetrischen Untersuchung des DG zeigen sich keine signifikant unterschiedlichen Volumina zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe ( $p=0,36$ ). mThy1  $\alpha$ -Synuclein hat daher keinen Einfluss auf das Volumen des DG.

Abb. 18; Volumetrie des DG

Anatomische Struktur	Parameter	Kontrolle	tg mThy1 h-wt $\alpha$ -Syn	p =
<b>DG</b>				
	Volumen (mm <sup>3</sup> )	0,166 ± 0,035	0,160 ± 0,008	0,36
	Proliferation (PCNA+ Zellen)	788 ± 202	814 ± 236	0,84
	Zellüberleben (BrdU+ Zellen)	502 ± 142	472 ± 171	0,77
	Zelldichte (BrdU+ Zellen)	3095 ± 1025	2945 ± 1022	0,82
	Neuronale Differenzierung (BrdU/NeuN+ Zellen)	65% ± 10,5%	67% ± 14,2%	0,78
	Summe neu gebildeter Neurone	326 ± 53	316 ± 67	0,79
	Neuroblasten (DCX+ Zellen):	1059 ± 136	873 ± 231	0,19
	a, frühe Neuroblasten	605 ± 68	504 ± 116,9	0,16
	b, intermediäre Neuroblasten	245 ± 63	239 ± 78	0,91
	c, reife Neuroblasten	210 ± 46	130 ± 58	0,04 *
	Apoptose:			
	a, Gesamt	405 ± 239	560 ± 180	0,27
	b, neuronaler Zellen	198 ± 126	260 ± 164	0,54

Tab. 3; Quantitative Analyse der adulten Neurogenese der tg mThy1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein Maus im Vergleich zu Kontrollen, nach anatomischen Strukturen und Zellpopulationen; \* signifikant unterschiedlich

## **II. Adulte Neurogenese im System SVZ/OB: mThy1 $\alpha$ -Synuclein beeinflusst die dopaminerge Differenzierung neu gebildeter Neurone in der Glomerulärzellschicht des Bulbus olfactorius**

In einem zweiten Schritt wurde die Hypothese, daß die höhere absolute  $\alpha$ -Synucleinexpression bei der tg mThy-1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein-Maus die adulte Neurogenese quantitativ stärker negativ beeinflusst, als bei der tg hPDGF $\beta$  h-wt  $\alpha$ -Synuclein-Maus, im System SVZ/OB experimentell überprüft. Neben der Reifung der Neuroblasten wurden Proliferation, Zellüberleben und Differenzierung neu gebildeter Zellen quantifiziert, sowie eine Volumetrie durchgeführt.

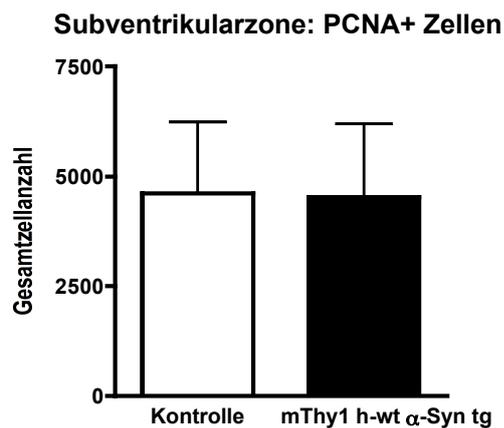
### *mThy1 $\alpha$ -Synuclein verringert die dopaminerge Differenzierung von NPCs in der Glomerulärzellschicht*

Es wurde untersucht, inwiefern h-wt  $\alpha$ -Synuclein die Differenzierung von NPCs im System SVZ/OB beeinflusst. Mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung wurde das Verhältnis von BrdU einfach- zu BrdU/TH (GLOM), bzw. BrdU/NeuN (GCL) doppelt-positiv gefärbten Zellprofilen ermittelt. Dieses stellt den prozentualen Anteil dopaminerg, bzw. neuronal differenzierter Zellen an der Gesamtzahl neu gebildeter Zellen dar. In der GLOM zeigte sich bei den tg Tieren eine um 55% verringerte Differenzierung der NPCs zu dopaminergen Neuronen. Das Ergebnis liegt knapp überhalb des Signifikanzniveaus: 2,5% (mThy1 tg) vs. 5,5% (Kontrolle);  $p=0,07$ . In der GCL des OB lag die neuronale Differenzierung bei 90% (mThy1 tg) bzw. 94% (Kontrolle);  $p=0,10$ .

Die Berechnung neu gebildeter Neurone ergab für die mThy1 tg Gruppe eine um 61% signifikant verringerte Anzahl dopaminerg Neurone in der GLOM ( $p=0,04$ ). In der GCL ist die Zahl neu gebildeter Neurone grenzwertig signifikant um 6% verringert ( $p=0,05$ ). h-wt  $\alpha$ -Synuclein führt somit zu einer signifikant verminderten dopaminergen Differenzierung von NPCs in der GLOM des OB.

*mThy1  $\alpha$ -Synuclein hat keinen Einfluss auf Zellproliferation, -überleben, sowie das Volumen von SVZ und OB*

Ebenso wurde untersucht, inwiefern die Expression von h-wt  $\alpha$ -Synuclein die Zellproliferation in der SVZ beeinflusst. Hierzu wurde die Anzahl PCNA-positiver Zellprofile mittels Immunhistochemie und stereologischer Auszählung bestimmt. Versuchs- und



Kontrollgruppe unterscheiden sich in der Anzahl mitotisch-aktiver Zellprofile nicht ( $p=0,92$ ). Tg h-wt  $\alpha$ -Synuclein hat somit keinen Einfluss auf die Zellproliferation in der SVZ.

Abb. 19; Zellproliferation der Subventrikularzone; stereologische Quantifizierung PCNA-positiver Zellprofile

Weiter wurde untersucht, inwiefern h-wt  $\alpha$ -Synuclein das Zellüberleben in SVZ/OB beeinflusst. Mit Hilfe des BrdU-Paradigmas wurde das Überleben der Zellen, die sich zum Zeitpunkt der i.p. Injektionen in den neurogenen Regionen teilten, stereologisch quantifiziert. Weder in der GCL ( $p=0,95$ ) noch GLOM ( $p=0,52$ ) des OB zeigte sich dabei ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen. Auch in der Dichte BrdU-positiver Zellen ergibt sich in diesen Strukturen kein Unterschied: GCL ( $p=0,83$ ); GLOM ( $p=0,75$ ). Tg h-wt  $\alpha$ -Synuclein hat somit keinen Einfluss auf das Zellüberleben im System SVZ/OB.

Mittels stereologischer Vermessung wurde untersucht, inwiefern die Expression von mThy1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein die Volumina in SVZ und OB beeinflusst. Weder in dem neurogenen Areal der SVZ ( $p=0,73$ ), noch im OB konnten dabei signifikant unterschiedliche Volumina zwischen den Vergleichsgruppen festgestellt werden (GCL:  $p=0,80$ ; GLOM:  $p=0,59$ ). mThy1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein hat demnach keinen Einfluss auf die Volumina in SVZ und OB.

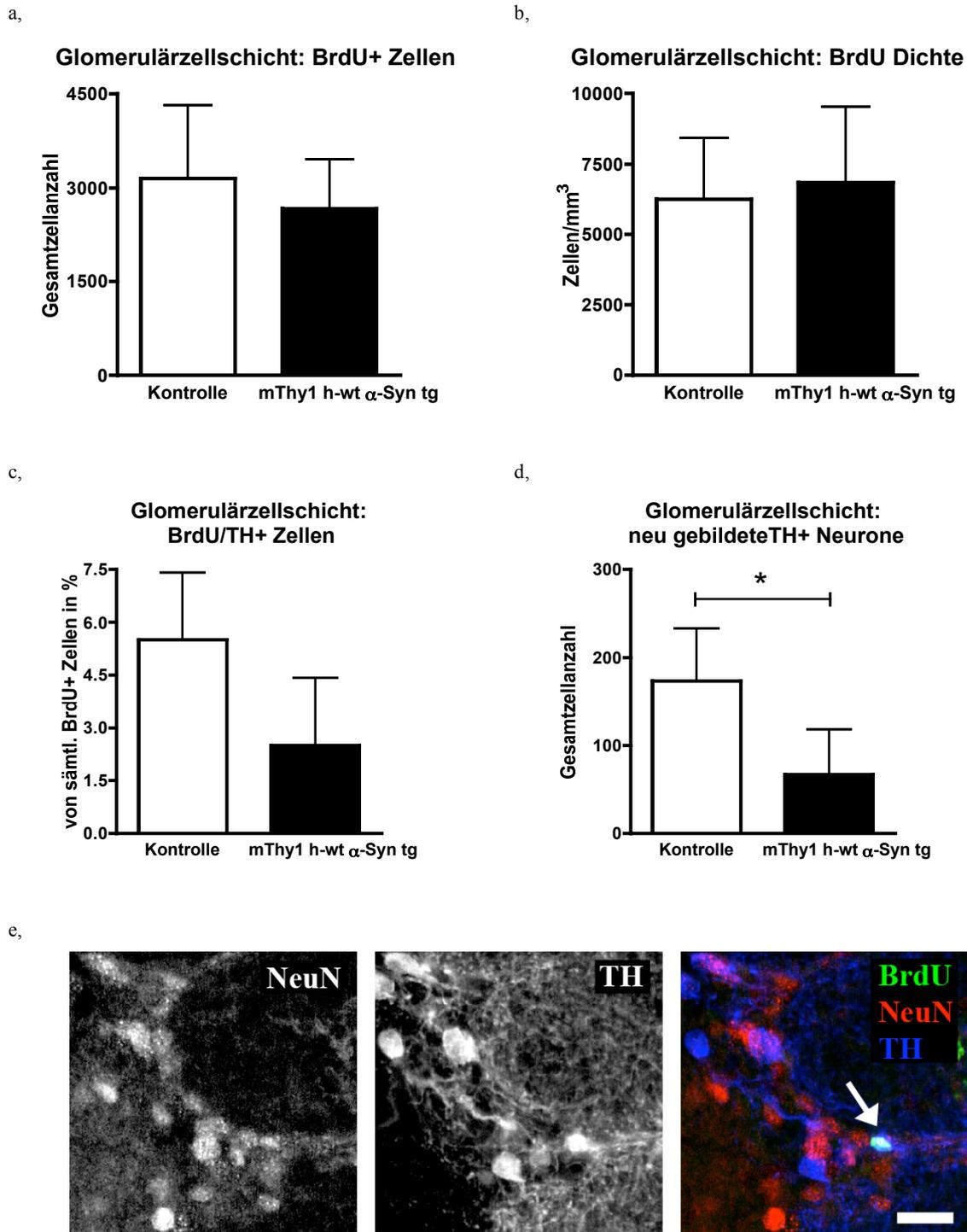
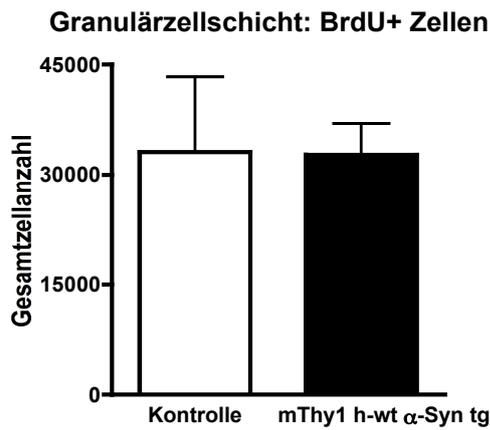
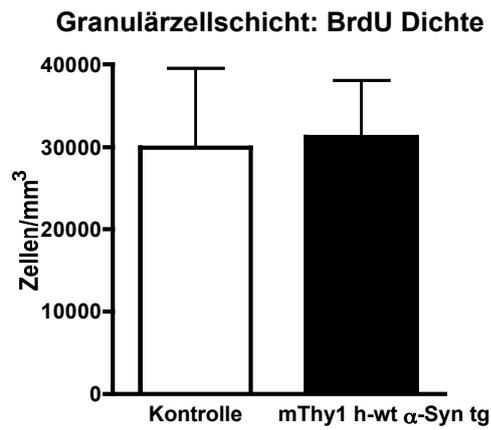


Abb. 20; Zellüberleben und zelluläre Differenzierung in der Glomerulärzellschicht des Bulbus olfactorius: Stereologische Auszählung BrdU-positiver Zellprofile (a) und daraus berechnete Dichte BrdU-positiver Zellprofile in der Glomerulärzellschicht (b); Anteil dopaminerg differenzierter NPCs durch Analyse der Koexpression von BrdU und TH (c); berechnete Anzahl neu gebildeter dopaminerg Neurone,  $p=0,04$  (d); BrdU/NeuN/TH dreifach-positives Zelle in der Glomerulärzellschicht des Bulbus olfactorius (e); Maßstab 20 $\mu$ m

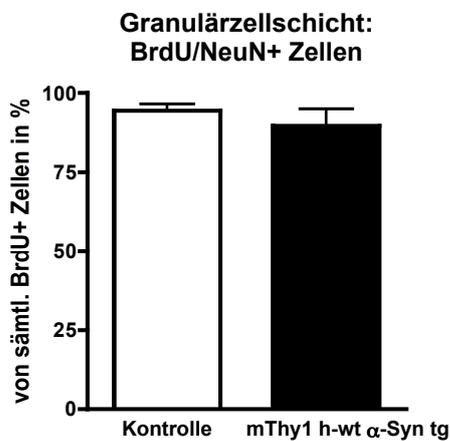
a,



b,



c,



d,

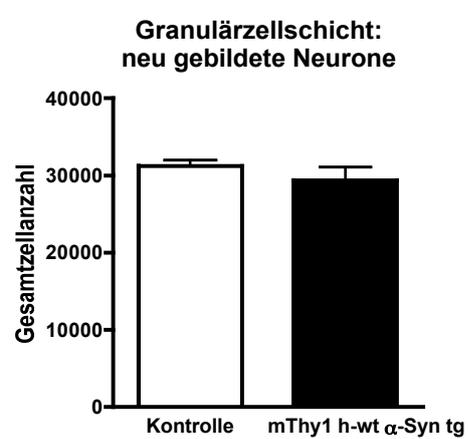
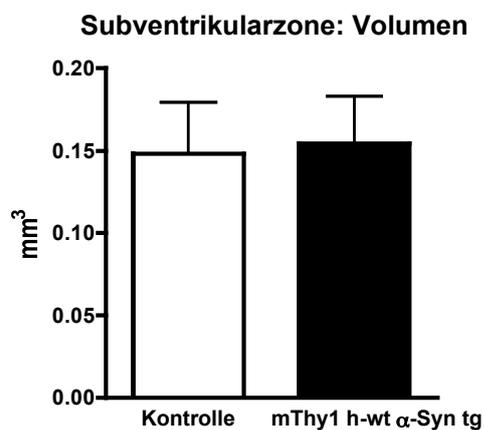
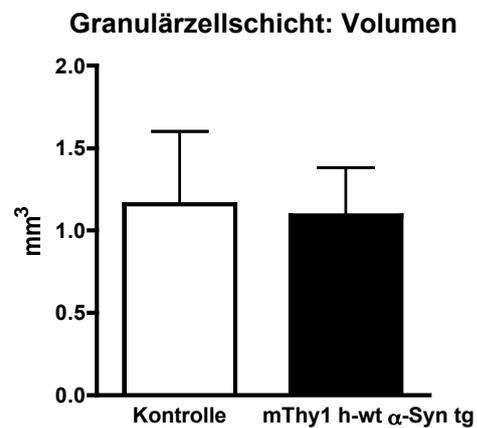


Abb. 21; Zellüberleben und zelluläre Differenzierung in der Glomerulärzellschicht des Bulbus olfactorius: Stereologische Auszählung BrdU-positiver Zellprofile (a) und daraus berechnete Dichte BrdU-positiver Zellprofile (b); Anteil neuronal differenzierter NPCs (c); berechnete Anzahl neu gebildeter Neurone der Granulärzellschicht,  $p=0,05$  (d)

a,



b,



c,

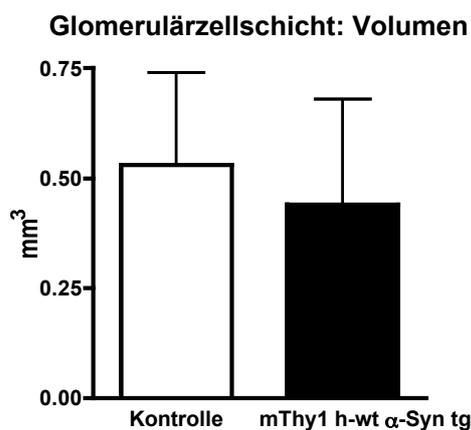


Abb. 22; Volumina der SVZ (a) und Granulärzell- (b) bzw. Glomerulärzellschicht des Bulbus olfactorius (c)

Anatomische Struktur	Parameter	Kontrolle	tg mThy1 h-wt α-Syn	p =
<b>SVZ</b>	Volumen (mm <sup>3</sup> )	0,148 ± 0,031	0,154 ± 0,028	0,73
	Proliferation (PCNA+ Zellen)	4620 ± 1613	4526 ± 1668	0,92
<b>GCL</b>	Volumen (mm <sup>3</sup> )	1,164 ± 0,442	1,090 ± 0,286	0,80
	Zellüberleben (BrdU+ Zellen)	33071 ± 10238	32726 ± 4256	0,95
	Zelldichte (BrdU+ Zellen)	29911 ± 9623	31248 ± 6802	0,83
	Neuronale Differenzierung (BrdU/NeuN+ Zellen)	94% ± 2,2%	90% ± 5,3%	0,10
	Summe neu gebildeter Neurone	31219 ± 725	29344 ± 1728	0,05
<b>GLOM</b>	Volumen (mm <sup>3</sup> )	0,529 ± 0,214	0,439 ± 0,243	0,59
	Zellüberleben (BrdU+ Zellen)	3148 ± 1172	2666 ± 788	0,52
	Zelldichte (BrdU+ Zellen)	6260 ± 2165	6843 ± 2687	0,75
	Dopaminerge Differenzierung (BrdU/TH+ Zellen)	5,5% ± 1,91%	2,5% ± 1,91%	0,07
	Summe neu gebildeter TH+ Neurone	173 ± 60	67 ± 51	0,04 *

Tab. 4; Quantitative Analyse der adulten Neurogenese transgener mThy1 h-wt α-Synuclein Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren; \* signifikant unterschiedlich (p<0,05)

### III. Temporale Expression von $\alpha$ -Synuclein: Vergleich der Promotoren hPDGF $\beta$ und mThy1

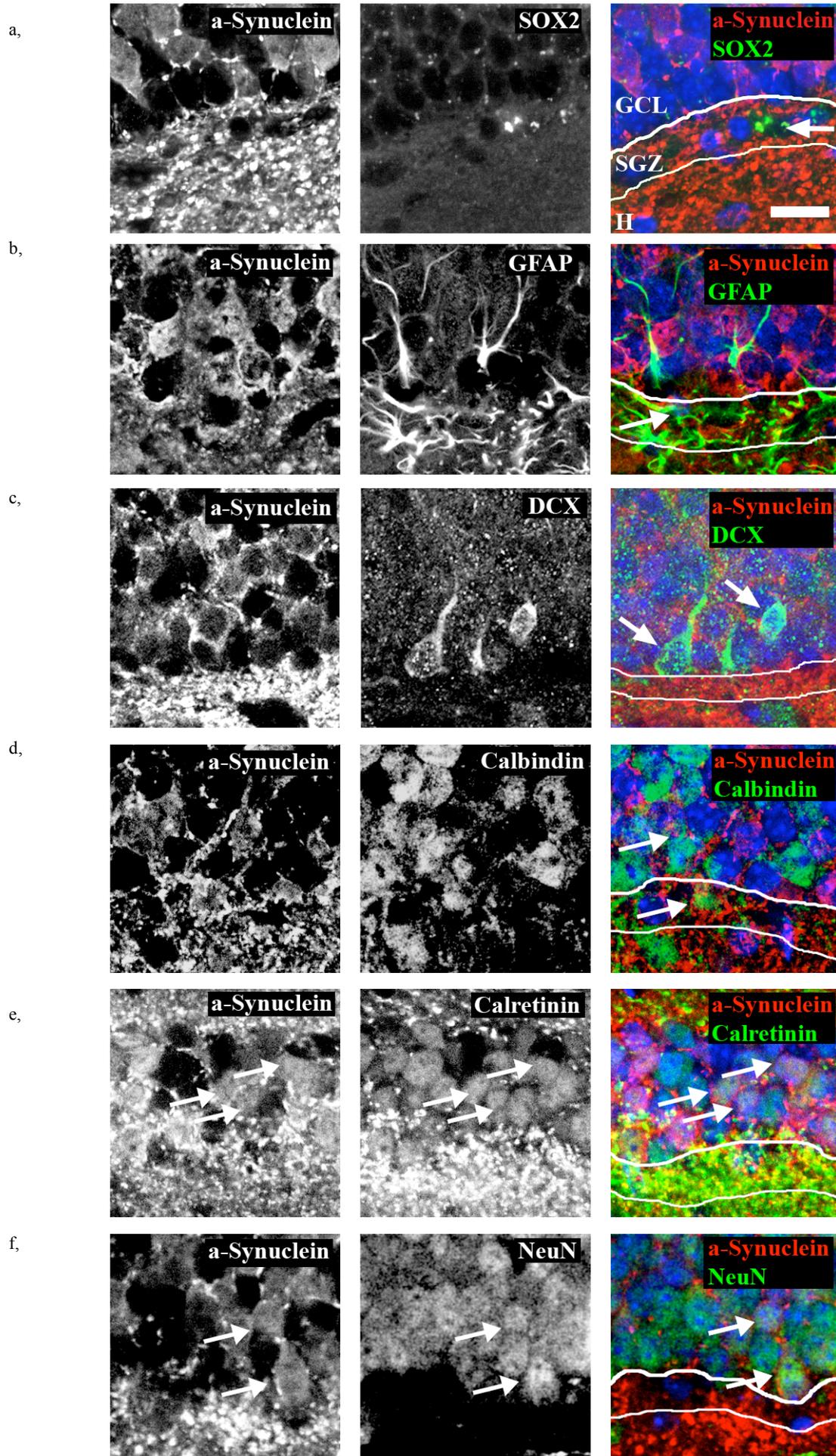
In dieser Arbeit wurde das temporale Expressionsmuster von h-wt  $\alpha$ -Synuclein unter der regulatorischen Kontrolle des mThy1-, sowie des hPDGF $\beta$ -Promotors charakterisiert, um dessen unterschiedlich starken Effekt auf die Reifung neu gebildeter Neurone zu untersuchen. Hierzu wurde Gewebe beider Mausstämme auf Koexpression von h-wt  $\alpha$ -Synuclein mit Zellmarkern untersucht, die Aufschluss über das Reifungsstadium geben.

Unter der Kontrolle des mThy1 Promotors zeigt sich hierbei eine Koexpression des tg exprimierten h-wt  $\alpha$ -Synuclein mit den Markern, die Zellen in einem relativ späten Stadium der Reifung (Calretinin, Calbindin), bzw. ausgereifte Neurone (NeuN) charakterisieren (siehe Abb. 23). Dahingegen kann keine Koexpression mit Markern für NPCs (SOX2, GFAP) oder reifende Neuroblasten (DCX) bestätigt werden: Erst als ausgereifte Neurone beginnen neu geborene Zelle mit der Transgenexpression.

Unter der regulatorischen Kontrolle des hPDGF $\beta$  Promotors kann auf dieselbe Art und Weise eine kontinuierliche Koexpression von h-wt  $\alpha$ -Synuclein mit den Stammzellmarkern SOX2 und GFAP und von da an in allen folgenden Stadien der Neuroblastenmigration (DCX) und Reifung (Calbindin) festgestellt werden (siehe Abb. 24).

folgende Seite:

Abb. 23; Gyrus dentatus transgener mThy1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein Mäuse: Koexpression von h-wt  $\alpha$ -Synuclein mit Markern der adulten Neurogenese; Exemplarisch hervorgehoben (weißer Pfeil) sind jeweils Zellen, die ein einfach-positives Färbeverhalten für SOX2 (a), GFAP (b), DCX (c), bzw. doppelt-positives Färbeverhalten für h-wt  $\alpha$ -Synuclein mit Calbindin (d), Calretinin (e) und NeuN (f) zeigen; Maßstab 10 $\mu$ m



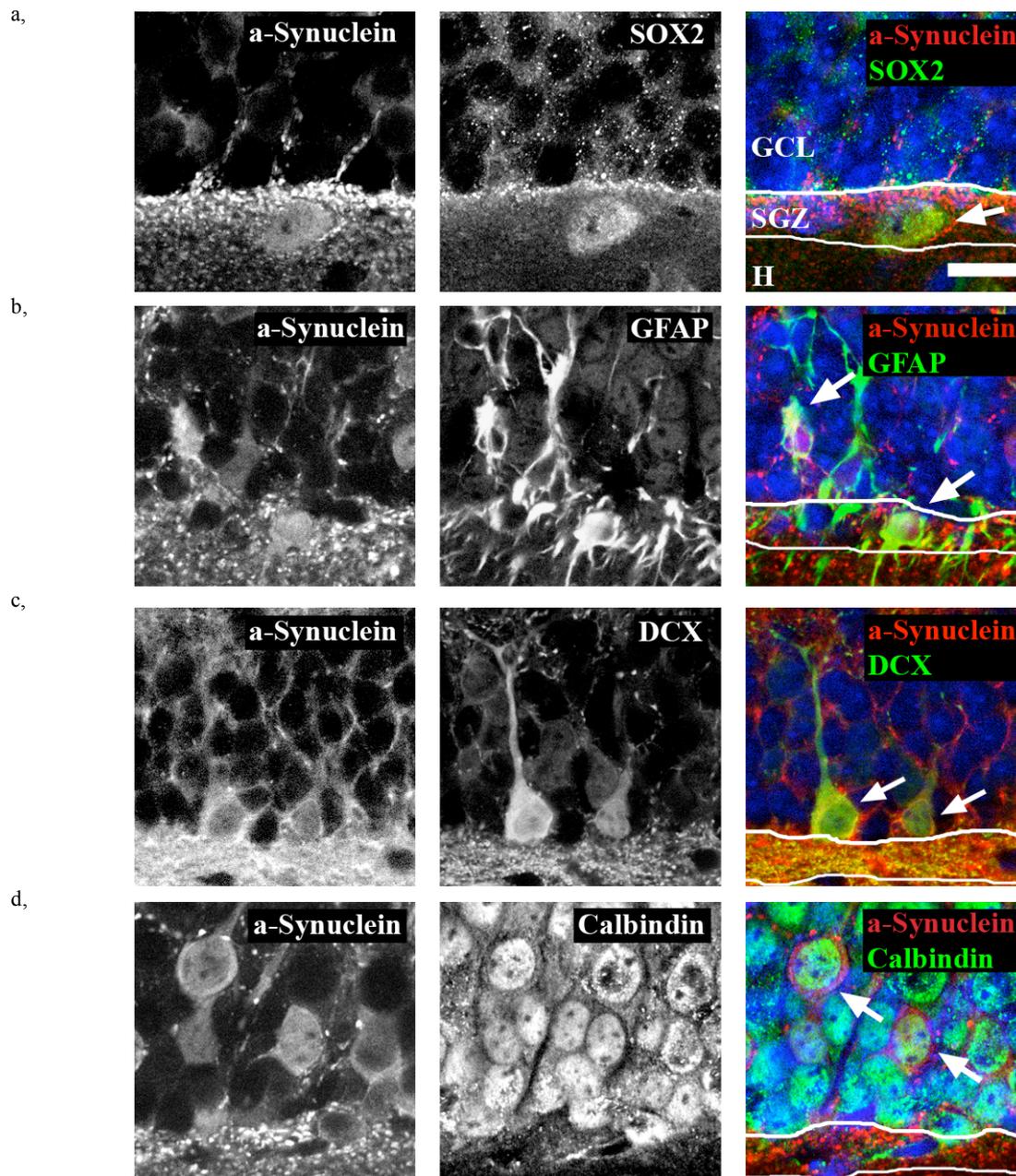


Abb. 24; Gyrus dentatus transgener hPDGF $\beta$  h-wt  $\alpha$ -Synuclein Mäuse: Koexpression von h-wt  $\alpha$ -Synuclein mit Markern der adulten Neurogenese; Exemplarisch hervorgehoben (weiße Pfeile) sind jeweils Zellen, die ein doppelt-positives Färbeverhalten für  $\alpha$ -Synuclein mit SOX2 (a), GFAP (b), DCX (c) und Calbindin (d) zeigen; Maßstab 10 $\mu$ m

#### IV. Ultrastrukturelle Analyse der Dendriten neugebildeter Neurone adulter, transgener $\alpha$ -Synuclein Mäuse

##### *Dendritenmorphologie in transgenen $\alpha$ -Synuclein Mausmodellen*

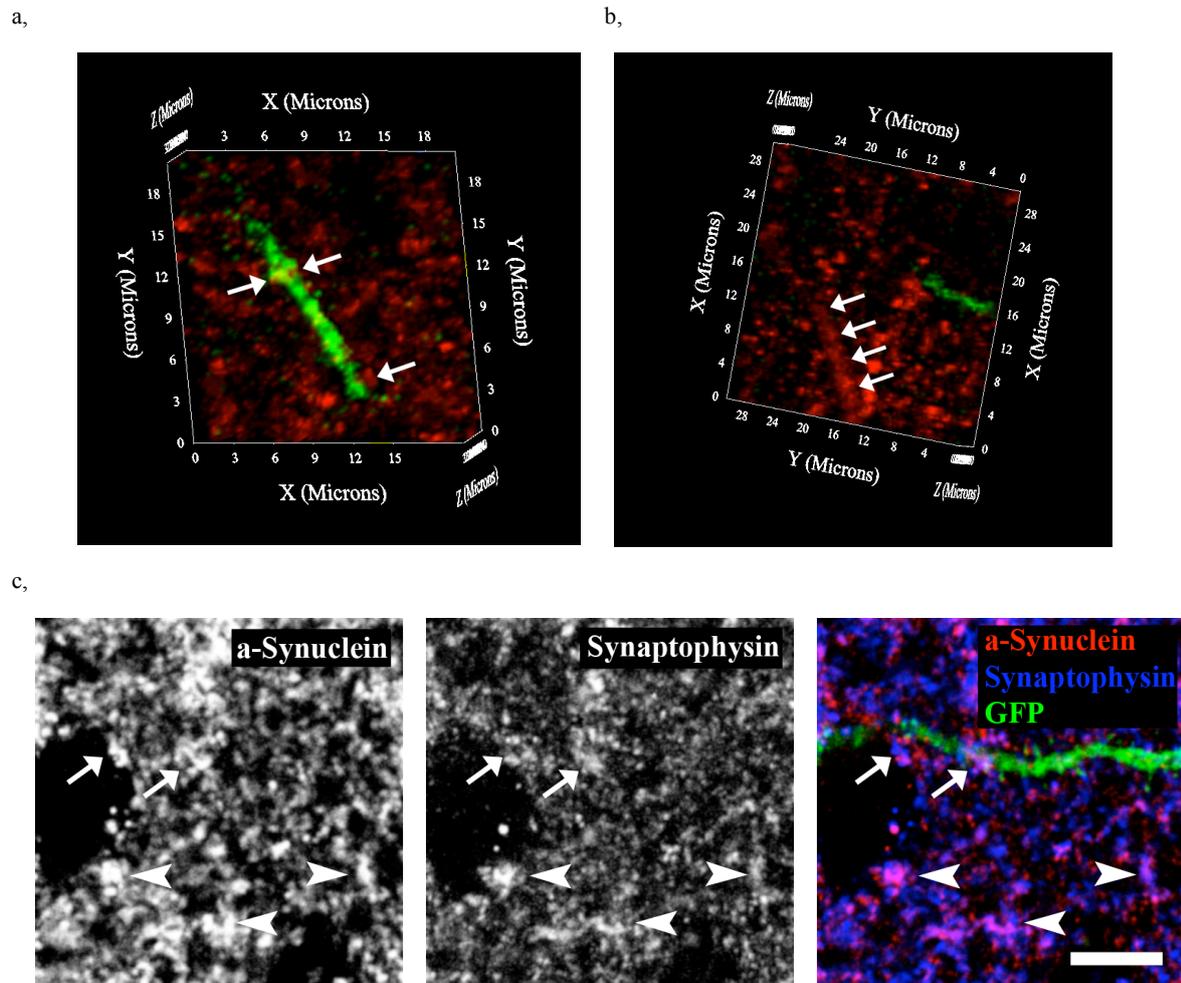


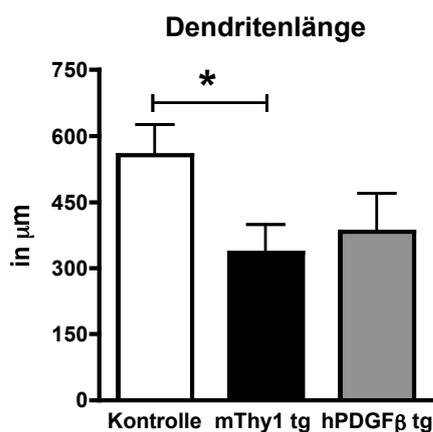
Abb. 25; Lagebeziehung zwischen transgen exprimiertem  $\alpha$ -Synuclein und GFP-gefärbten Dendriten (grün) in der Molekularzellschicht des Gyrus dentatus; fleckiges Vorkommen von  $\alpha$ -Synuclein (rot) in Neuropil und intrazellulär (b, Pfeile); In direkter Umgebung der GFP-gefärbten Dendriten Akkumulation in der Nähe zu dendritischen *spines* (a, Pfeile); Koexpression von  $\alpha$ -Synuclein mit Synnaptophysin in Nähe der *spines* (c, Pfeile), wie auch im Neuropil (c, Pfeilspitzen); 3D-Rekonstruktionen konfokalmikroskopischer Z-Stapel- (a,b), bzw. Einzelebenaufnahmen (c); Maßstab 5  $\mu$ m (c), bzw. gemäß Abbildung (a,b)

Das tg exprimierte  $\alpha$ -Synuclein liegt in der MOL des DG in fleckiger Form, gleichmäßig verteilt vor. In direkter Umgebung der GFP-gefärbten Dendriten scheint das Protein in Nähe der dendritischen *spines* zu akkumulieren. Darüber hinaus lässt sich auch in Neuriten gelegenes h-wt  $\alpha$ -Synuclein, sowie Auftreibungen an Dendritenabschnitten beobachten, wie sie bei andere tg mThy1  $\alpha$ -Synuclein Mäuse auch dokumentiert wurden (van der Putten et al., 2000). Auf konfokalmikroskopischen Bildern kann das Transgen sowohl in unmittelbarer Nähe zu GFP-gefärbten Dendriten und deren *spines*, als auch im gesamten Neuropil verteilt, teils in Koexpression mit Synaptophysin, einem Marker präsynaptischer Vesikel, beobachtet werden. Aufgrund der Grenzen des gewählten Versuchsdesigns kann jedoch keine quantitative Aussage über eine exklusive Akkumulation von  $\alpha$ -Synuclein an dendritischen *spines*, bzw. Synapsen gemacht werden.

#### *mThy1 $\alpha$ -Synuclein beeinflusst Dendritenlänge, jedoch nicht Dichte dendritischer Verzweigungen*

Durch die ultrastrukturelle Analyse an Dendriten und *spines* neu gebildeter Neurone soll die Auswirkung des h-wt  $\alpha$ -Synucleins auf die Zellmorphologie untersucht werden. Die Auswertung der mittleren Dendritenlänge pro neu gebildeter, GFP-positiver Zelle ergab statistisch hoch signifikant unterschiedliche Ergebnisse zwischen den drei Gruppen ( $p=0,0074$ ).

a,



b,

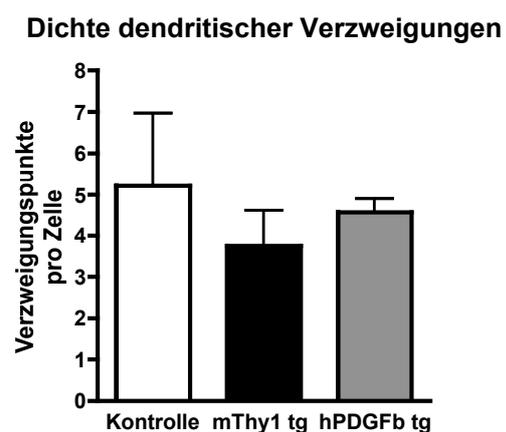


Abb. 26; Analyse der mittleren Dendritenlänge (a), bzw. Dichte der dendritischen Verzweigungen (b)

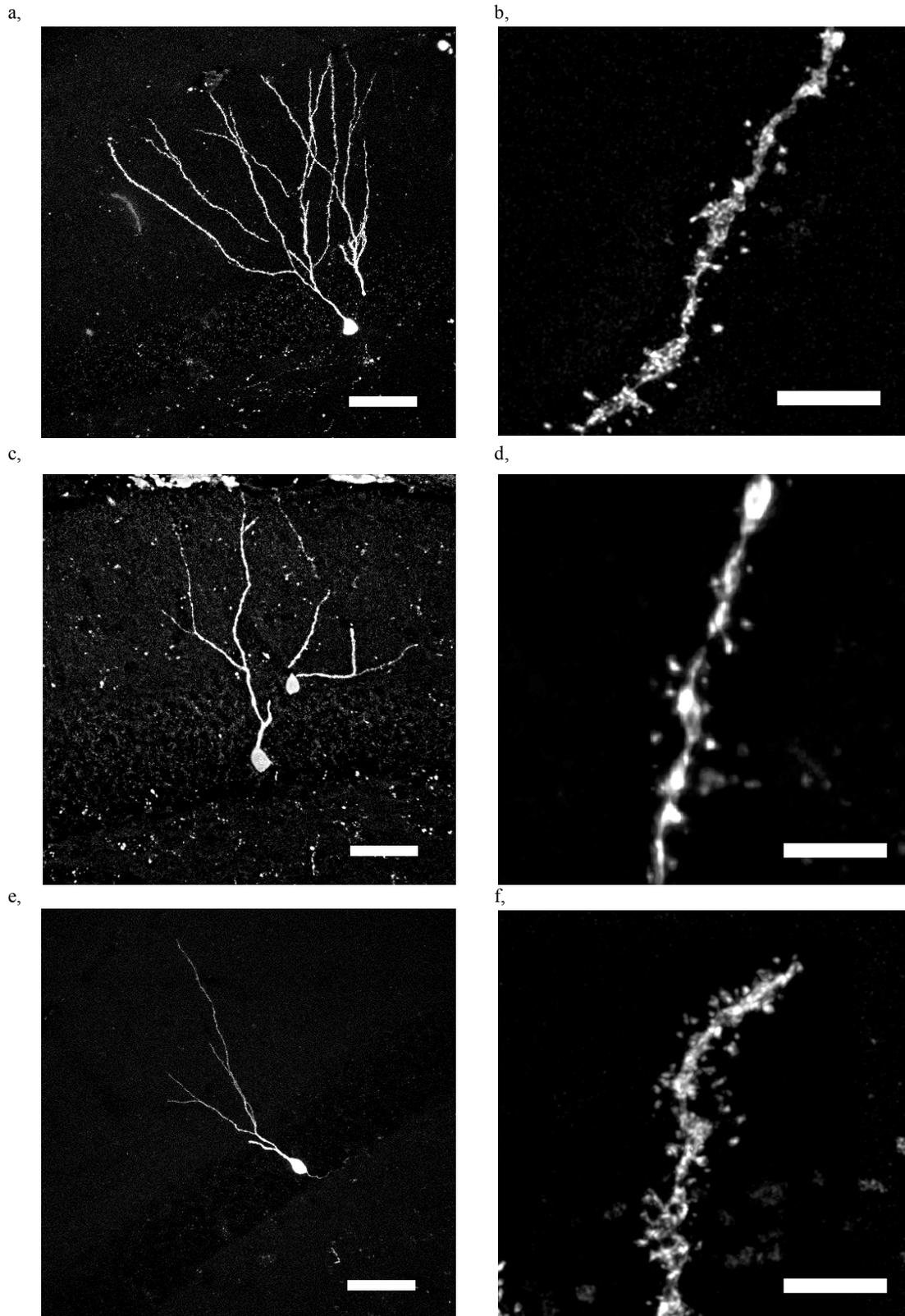


Abb. 27; Morphologie neu gebildeter Neurone, ihrer dendritischen Fortsätze und *spines* – hochauflösende Maximalintensitätsprojektionen (a,c,e) und Detailaufnahmen typischer GFP-markierter Dendritenabschnitte aus der Molekularzellschicht des hippocampalen Gyrus dentatus (b,d,f); im Vergleich zur Kontrollgruppe (a,b)

auffallend unterschiedliche Dendritenlänge und -verzweigungsdichte, wie auch Dichte und Konfiguration dendritischer *spines* bei transgenen mThy1 (c,d), bzw. hPDGF $\beta$  h-wt  $\alpha$ -Synuclein Tieren (e,f); Maßstab 50  $\mu$ m (a,c,e), bzw. 5 $\mu$ m (b,d,f)

Die dendritischen Fortsätze sind bei den mThy1 tg Tieren, nicht jedoch bei den hPDGF $\beta$  tg Tieren im Vergleich zu Kontrollen signifikant kürzer ( $p < 0,05$ ). Bei der mittleren Dichte dendritischer Verzweigungen unterscheiden sich die Gruppen nicht statistisch signifikant voneinander ( $p = 0,41$ ).  $\alpha$ -Synuclein führt demnach bei mThy1 tg Tieren zur Ausbildung signifikant kürzerer dendritischer Fortsätze als bei Kontrollen und hPDGF $\beta$  tg Tieren.

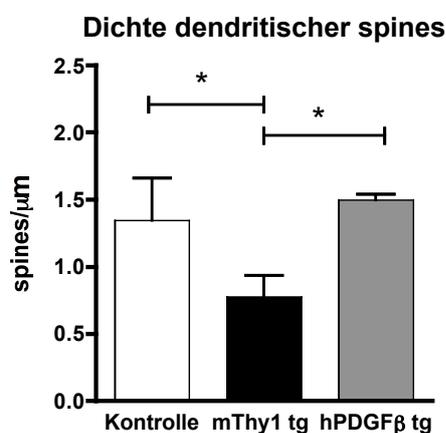
### *Dichte und Morphologie dendritischer spines*

Bei der qualitativen Untersuchung der dendritischen Ausläufer fällt neben einem Unterschied in der Form und Anzahl dendritischer *spines* ein Unterschied in der durchschnittlichen Dicke der Dendriten auf. Dendriten beider transgener Gruppen, insbesondere jedoch die der mThy1-Gruppe, weisen einen im Verlauf stärkeren Durchmesser auf.

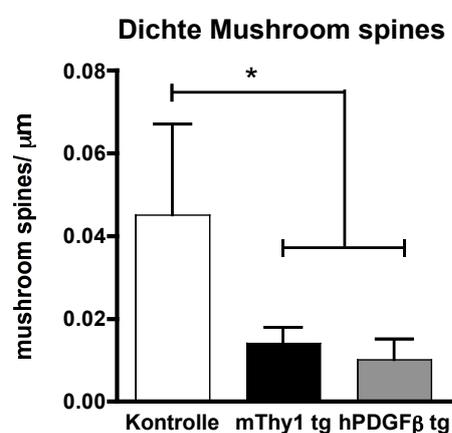
Die quantitative Analyse der dendritischen *spines* zeigt bei Tieren der Thy1 tg Gruppe eine im Vergleich zu Kontrolle und PDGF tg Gruppe signifikant ( $p < 0,05$ ) verminderte Dichte aller *spines*. Zwischen Kontrolle und PDGF tg Gruppe liegt indes kein signifikanter Unterschied vor ( $p > 0,05$ ).

Sowohl bei der Dichte der *mushroom spines* als auch ihrem Anteil an der Gesamtzahl dendritischer *spines* liegt ein bei den tg Gruppen signifikant verminderter Wert vor ( $p < 0,05$ ).

a,



b,



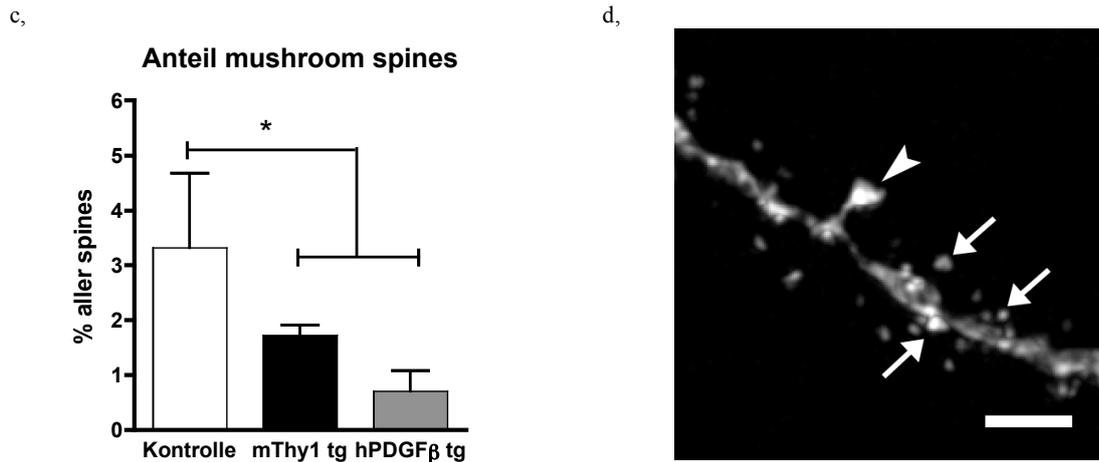


Abb. 28; Dichte aller dendritischen *spines* (a), *mushroom spines* (b), sowie prozentuales Verhältnis der *mushroom spines* zu allen *spines* (c); Abbildung eines Dendritenabschnittes mit dendritischen *spines* (Pfeile), sowie eines *mushroom spines* (Pfeilspitze) (d); Maßstab 2  $\mu\text{m}$

Parameter	Kontrolle	mThy1 h-wt $\alpha$ -Syn tg	hPDGF $\beta$ h-wt $\alpha$ -Syn tg	p
Dichte dendritischer <i>spines</i>	1,35 $\pm$ 0,32 / $\mu\text{m}$	0,78 $\pm$ 0,16 / $\mu\text{m}$	1,50 $\pm$ 0,42 / $\mu\text{m}$	0,02 * $\diamond < 0,05$ * $\ddagger < 0,05$ *
Anteil <i>mushroom spines</i> an allen <i>spines</i>	3,32 $\pm$ 1,36 %	1,72 $\pm$ 0,19 %	0,71 $\pm$ 0,37 %	0,04 *
Dichte der <i>mushroom spines</i>	0,045 $\pm$ 0,022 / $\mu\text{m}$	0,014 $\pm$ 0,004 / $\mu\text{m}$	0,010 $\pm$ 0,005 / $\mu\text{m}$	0,04 *
Dendritenlänge pro Neuron	557,15 $\pm$ 68,98 $\mu\text{m}$	334,00 $\pm$ 64,07 $\mu\text{m}$	382,45 $\pm$ 87,34 $\mu\text{m}$	0,0074 ** $\diamond < 0,05$ *
Verzweigungspunkte der Dendriten pro Zelle	5,22 $\pm$ 1,75	3,75 $\pm$ 0,87	4,57 $\pm$ 0,33	0,41 *

Tab 5; Analysen an Dendriten und *spines*; signifikante Unterschiede zwischen Gruppen sind wie folgt gekennzeichnet:  $\diamond$  Kontrolle vs. mThy1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein tg;  $\dagger$  Kontrolle vs. hPDGF $\beta$  h-wt  $\alpha$ -Synuclein tg;  $\ddagger$  mThy1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein tg vs. hPDGF $\beta$  h-wt  $\alpha$ -Synuclein tg

## Diskussion

In den vergangenen Jahren wiesen u.a. folgende Untersuchungen auf eine Beeinträchtigung der adulten Neurogenese beim Parkinson Syndrom hin: tg hPDGF $\beta$  h-wt  $\alpha$ -Synuclein Mäuse zeigen eine reduzierte adulte Neurogenese (Winner et al., 2004). In einer kleinen Fallserie konnte bei Patienten mit PD, bzw. PDD, eine mögliche Korrelation zwischen einer verringerten Anzahl neuronaler Progenitorzellen des Gyrus dentatus und einer Einschränkung kognitiver Fähigkeiten nachweisen werden (Höglinger et al., 2004). In beiden Fällen ist h-wt  $\alpha$ -Synuclein in den neurogenen Arealen des ZNS überexprimiert. Es ist daher möglich, daß dieses Protein einen Effekt auf neurale Progenitorzellen, bzw. die Vorgänge der adulten Neurogenese hat, und dies mit einer Abnahme der olfaktorischen, bzw. kognitiven Leistung in Zusammenhang steht.

Der Nachweis hierfür wird auf absehbare Zeit beim Menschen aus methodischen und ethischen Gründen nicht zu erbringen sein, weshalb bis auf weiteres die Simulation im Tiermodell den bestmöglichen Weg zur Erforschung dieses Zusammenhangs bietet.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist neben einer quantitativen Analyse der adulten Neurogenese in der tg mThy1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein Maus, ein Vergleich zu der schon bekanntem tg hPDGF $\beta$  h-wt  $\alpha$ -Synuclein Maus, sowie eine qualitative Untersuchung der Dendriten und dendritischen *spines* neu gebildeter Neurone in diesen beiden tg Mausstämmen. Diese Arbeit stellt somit einen weiteren Baustein zum Verständnis der quantitativen und qualitativen Wirkung neuronal exprimierten  $\alpha$ -Synucleins auf die adulte Neurogenese dar.

### ***1. Transgenes mThy1 h-wt $\alpha$ -Synuclein vermindert die Anzahl reifer Neuroblasten im Gyrus dentatus***

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten tg mThy1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein Mäuse akkumulieren  $\alpha$ -Synuclein u.a. im neurogenen Areal des Hippocampus. Zur Charakterisierung und Beurteilung der adulten Neurogenese im DG des Hippocampus wurden die Zellproliferation, die Reifung und Differenzierung der Neuroblasten, das Überleben neu gebildeter Zellen, wie auch die Apoptoserate untersucht.

Dabei fällt auf, daß bei den tg mThy1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein Tieren die Anzahl reifer DCX-positiver Neuroblasten signifikant um 38% vermindert ist ( $p=0,04$ ). Auffällig ist hierbei, daß weder in der Summe aller Neuroblasten ( $p=0,19$ ), noch bei den frühen ( $p=0,16$ ) und intermediären ( $p=0,91$ ) Neuroblasten ein Unterschied zu Kontrolltieren besteht. Der negative Effekt des  $\alpha$ -Synucleins wird somit erst im Stadium der Neuritenreifung signifikant quantifizierbar.

In den übrigen Teilaspekten der adulten hippocampalen Neurogenese zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Die mitotische Aktivität der NPCs ist bei den tg Mäusen nicht vermindert ( $p=0,84$ ). Entgegen der initialen Hypothese beeinflusst h-wt  $\alpha$ -Synuclein weder Zellüberleben ( $p=0,77$ ) noch neuronale Differenzierungsrate ( $p=0,78$ ) – diese liegt jeweils bei etwa 66%. Daraus folgt, dass mThy1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein die Anzahl neu entstandener Neurone im DG nicht beeinflusst ( $p=0,79$ ). Ebenso wenig beeinflusst es die Anzahl aller apoptotischer Zellen oder apoptotischer Neurone zwischen den Gruppen ( $p=0,27$  bzw.  $p=0,54$ ), oder deren hippocampale Volumina ( $p=0,36$ ).

Im Vergleich hierzu hatte Winner et al. in der tg hPDGF $\beta$  h-wt  $\alpha$ -Synuclein Maus einen deutlichen Effekt von  $\alpha$ -Synuclein auf verschiedene Teilaspekte der adulten hippocampalen Neurogenese beobachtet: Die Zahl reifer Neuroblasten im DG des Hippocampus war stärker reduziert (um 64%), als in der vorliegenden Arbeit. Bei den tg Tieren zeigte sich darüber hinaus beim Zellüberleben eine um 54% signifikant reduzierte Zahl BrdU-positiver Zellen. Das Verhältnis sich neuronal differenzierender NPCs unterschied sich zwischen den Gruppen nicht und lag bei 76%. In der Summe wurden daher 38% weniger neue Neurone im DG des Hippocampus nachgewiesen. Die Analyse der TUNEL-Färbung ergab bei tg Tieren eine gegenüber der Kontrollgruppe über 50% gesteigerte Apoptoserate im DG. Die Zellproliferation war von der  $\alpha$ -Synucleinexpression unbeeinflusst. Die verminderte adulte Neurogenese der tg hPDGF $\beta$  h-wt  $\alpha$ -Synuclein Tiere ist also bei unbeeinflusster Differenzierung durch ein vermindertes Überleben und eine erhöhte Apoptoserate der reifenden NPCs bedingt. Dabei ist das Stadium der reifen Neuroblasten der Zeitpunkt, ab dem dieser Effekt beobachtbar wird (Winner et al., 2004).

Nuber et al. konnte bei tg Mäuse mit konditionaler Expression von h-wt  $\alpha$ -Synuclein unter regulatorischer Kontrolle des *Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II alpha* (CaMK)-Promotors ähnliche Beobachtungen machen: Die Analyse der hippocampalen adulten Neurogenese ergab bei unveränderter Proliferation ein vermindertes Überleben neu

gebildeter Zellen bei unveränderter neuronaler Differenzierung. Daraus ergab sich eine um 49% signifikant verminderte Anzahl neu gebildeter hippocampaler Neurone. Weiter konnte eine signifikant verminderte Zahl DCX-positiver Neuroblasten bei den tg Tieren nachgewiesen werden. Dies weist darauf hin, daß die Überexpression von  $\alpha$ -Synuclein im Neuroblastenstadium das Überleben der reifenden Neurone beeinflusst. Erstmals konnte in diesem tg Modell der negative Effekt auf die hippocampale adulte Neurogenese eindeutig h-wt  $\alpha$ -Synuclein zugeordnet werden, da dieser Effekt durch Unterbrechung der Expression reversibel war (Nuber et al., 2008).

Die hippocampale Neurogenese der tg h-wt  $\alpha$ -Synuclein Mausmodelle hat gemein, daß ein quantitativer Effekt erstmals bei der Population der reifen Neuroblasten (mThy1 & hPDGF $\beta$ ), bzw. Neuroblasten (CaMK) nachweisbar ist. Dieser ist bei den tg hPDGF $\beta$  Tieren stärker ausgeprägt, als bei den tg mThy1 Tieren (um 64% bzw. 38% verringerte Zellzahl gegenüber Kontrollen). Die Tatsache, daß bei den tg hPDGF $\beta$  und CaMK Tieren die Summe aller DCX+ Neuroblasten signifikant verringert ist, könnte darauf hindeuten, daß in diesen Tieren  $\alpha$ -Synuclein schon in früheren Neuroblastenstadien seine Wirkung entfaltet.

Der Hauptunterschied in Bezug auf die quantitative adulte Neurogenese ist das Zellüberleben, welches bei tg CaMK & hPDGF $\beta$  Tieren vermindert ist (letztere um 54%), sich jedoch bei tg mThy1 Tieren nicht signifikant von Kontrollen unterscheidet. Analog ist bei tg hPDGF $\beta$  Tieren die apoptotische Aktivität im Gegensatz zu tg mThy1 Tieren erhöht. Die neuronale Differenzierung fällt mit 76% (hPDGF $\beta$ ), bzw. 66% (mThy1) zwischen den Gruppen unterschiedlich aus, unterscheidet sich jedoch bei allen drei tg Mausstämmen nicht von den jeweils durchgeführten Kontrollen (C57BL6/DBA). Der Grund für den prozentualen Unterschied zwischen mThy1 und hPDGF $\beta$  ist letztlich unbekannt – die Unterschiede können durch die Verwendung von Kontrolltieren mit nicht 100% gleichem genetischen Hintergrund bedingt sein.

Die Auswirkungen der  $\alpha$ -Synucleinexpression auf die adulte hippocampale Neurogenese treten bei CaMK und hPDGF $\beta$  ab dem frühen, bei mThy1 Tieren ab dem reifen Neuroblastenstadium auf. tg mThy1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein beeinflusst im Gegensatz zu tg hPDGF $\beta$  & CaMK h-wt  $\alpha$ -Synuclein nicht das Zellüberleben neu gebildeter Neurone und führt daher zu einer nur diskret beeinflussten adulten Neurogenese im DG. tg mThy1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein hat keinen Einfluss auf das Volumen des Hippocampus.

## ***II. Der Effekt von h-wt $\alpha$ -Synuclein auf die adulte Neurogenese ist abhängig von dessen temporalen Expressionsmuster und Expressionsmenge - frühe Transgenexpression beeinträchtigt reife Neurone stärker***

Die Koexpressionsstudie im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit konnte zeigen, daß zwischen den tg Mausstämmen (mThy1 und hPDGF $\beta$ ) ein unterschiedliches temporales  $\alpha$ -Synuclein-Expressionsmuster vorliegt. Diese kann den unterschiedlichen Effekt auf die adulte Neurogenese bei den beiden Gruppen erklären. Während die Expression von  $\alpha$ -Synuclein unter der regulatorischen Kontrolle von mThy1 erst nach dem Stadium der migrierenden Neuroblasten beginnt (erste Koexpression mit Calretinin), exprimieren in den tg hPDGF $\beta$  Tieren neu geborene Zellen und die sich daraus entwickelnden Neurone schon ab dem Stadium der NPCs kontinuierlich  $\alpha$ -Synuclein. Der Zeitpunkt im Leben einer individuellen Zelle, zu dem h-wt  $\alpha$ -Synuclein erstmals nachweisbar ist, und ab dem es seine Wirkung entfalten kann, liegt somit bei tg hPDGF $\beta$  Tieren etwa 14 Tage früher als bei tg mThy1 Tieren. Das in der Zelle vorhandene Transgen liegt während einer vulnerablen Phase der Zellentwicklung früher und länger vor.

Vergleichbare Daten lagen bislang nur für die phylogenetische Aktivität der beiden Promotoren vor: mThy1 ruft demnach eine stabile, neuronale Expression ab dem siebten postnatalen Tag hervor, wohingegen hPDGF $\beta$  schon pränatal aktiv ist (Sasahara et al., 1991; Lüthi et al., 1997). Analog hierzu ist auch die temporale Expression bei erwähnten tg CaMK h-wt  $\alpha$ -Synuclein Tieren zu sehen: In Tieren, die die A30P Mutante des humanen  $\alpha$ -Synucleins unter konditionaler regulatorischer Kontrolle des CaMK Promotors exprimieren, konnte eine Transgenexpression bei DCX-positiven Neuroblasten nachgewiesen werden (Marxreiter et al., 2009). Im Vergleich zu den in dieser Arbeit untersuchten tg mThy1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein Tieren weist dies auf eine frühere Expression auf zellulärer Ebene hin. Dies spiegelt sich im Vergleich zu tg mThy1 Mäusen in einem stärkeren Einfluss auf die hippocampale Neurogenese wieder (Nuber et al., 2008).

Diese Arbeit zeigt erstmals, daß sich die Aktivität des mThy1, bzw. hPDGF $\beta$  Promotors in Bezug auf die beginnende Transgenexpression auch während der adulten Neurogenese zellindividuell unterscheidet. Dieser Aspekt könnte für die Wahl eines geeigneten Promotors für zukünftige tg Mausmodelle von Bedeutung sein.

Das Ausmaß der Expression von  $\alpha$ -Synuclein ist im Vergleich zum Menschen bei der in dieser Arbeit charakterisierten tg mThy1 h-wt Maus der Linie 61 um den Faktor 10 erhöht. Die ebenfalls untersuchten tg hPDGF $\beta$  h-wt Tieren der Linie D weisen hingegen nur etwa 45% der menschlichen mRNA und etwa 80% der menschlichen Proteinexpression auf (Masliah et al., 2000). Im direkten Vergleich der transgenen Stämme weist homogenisiertes Gewebe des fronto-parietalen Cortex der tg mThy1 Tiere ein 8-fach erhöhtes Niveau an h-wt  $\alpha$ -Synuclein mRNA, sowie eine 4-fach erhöhte Expression des Transgens auf. Diese Ergebnisse konnten auch in primären cortikalen Zellkulturen bestätigt werden, die ebenfalls eine 4-fach gesteigerte h-wt  $\alpha$ -Synuclein mRNA-Menge in Neuronen der tg mThy1 Tiere nachwiesen. In situ Hybridisierung zeigt bei beiden Stämmen eine Expression im Gyrus dentatus (Rockenstein et al., 2002).

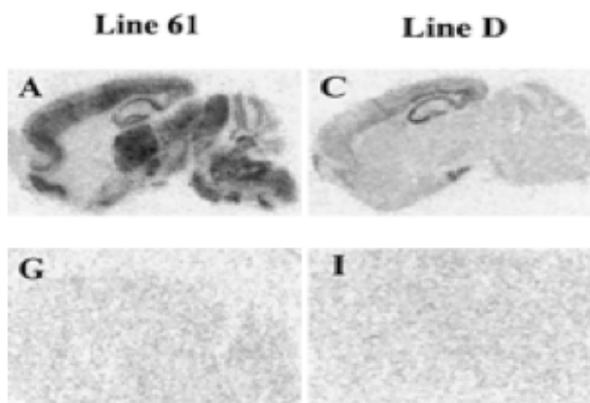


Abb. 29; Charakteristisches h-wt  $\alpha$ -Synuclein Expressionsmusters der untersuchten, transgenen Mausstämme mThy1 (A,G) und hPDGF $\beta$  (C,I); in situ hybridisierungen mit antisense (A,C), bzw. sense-Proben (G,H) zeigen höchste mRNA-Expression in Neocortex, Hippocampus, olfaktorischem System, Thalamus und Substantia nigra bei mThy1 Tieren, sowie Neocortex, Hippocampus und olfaktorischem System der hPDGF $\beta$  Tiere (Rockenstein et al., 2002)

Ob sich die Menge an  $\alpha$ -Synuclein in individuellen Neuronen des DG zwischen den tg Stämmen unterscheidet ist nicht bekannt. Eine mögliche experimentelle Strategie hierfür wäre die Laser Mikrodissektion einzelner Zellen des DG und anschließende Analyse der h-wt  $\alpha$ -Synuclein RNA-, bzw. Proteinexpression. Bislang ist somit bei den tg mThy1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein Tieren von einer höheren Konzentration an  $\alpha$ -Synuclein in Granulärzellen des DG auszugehen, als bei tg hPDGF $\beta$  h-wt  $\alpha$ -Synuclein Tieren.

Erkenntnisse aus zellfreien Versuchssystemen, Hefezellen, aus embryonalen Mausstammzellen differenzierten Neuronen, transgenen Mäusen, sowie den SNCA-Gendupli-

kationen, bzw. -triplikationen beim Menschen deuten auf eine konzentrationsabhängige Toxizität von  $\alpha$ -Synuclein, bzw. seiner Oligomere hin (Outeiro and Lindquist, 2003; Singleton et al., 2003; Chartier-Harlin et al., 2004; Yamashita et al., 2006; Gitler et al., 2008; Zhou et al., 2008). Entsprechend der in der Einleitung formulierten Hypothese wäre daher für die tg mThy1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein Maus ein weit stärker negativer Effekt auf die adulte Neurogenese zu erwarten, als bei der tg hPDGF $\beta$  h-wt  $\alpha$ -Synuclein Maus.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen jedoch darauf schließen, daß nicht die absolute Menge des exprimierten  $\alpha$ -Synucleins maßgeblich für den negativen Effekt auf Reifung und Überleben ist, sondern vielmehr die Dauer der zellindividuellen Expression.

Vielleicht noch wichtiger als die längere, absolute Expressionsdauer allein, fällt der Zeitpunkt der beginnenden Expression in den tg hPDGF $\beta$  Tieren in die ersten 14 Tage im Leben dieser Zelle, und damit in eine kritische Periode der Entwicklung: so entscheidet sich in den ersten 3-4 Wochen im Leben eines zukünftigen Neurons dessen Überleben und die Integration in bestehende Schaltkreise (Zhao et al., 2006). Ersteres ist vor allem in den ersten beiden Wochen von externen Stimuli, wie etwa dem Lernen räumlicher Orientierung, abhängig (Kee et al., 2007). Sensorischer Input ist für das Überleben in diesem Zeitraum, in dem nicht nur Polarisation, Migration, Wachstum von Axon und Dendriten, sondern auch Vorgänge erhöhter synaptischer Plastizität und der elektrophysiologischen Reifung stattfinden, essentiell (Zhao et al., 2008).

Als zellulärer Mechanismus des Überlebens konnte die Aktivität des NMDA-Rezeptors in der dritten Woche n.G. identifiziert werden (Tashiro et al., 2006b). Die Assoziation toxischer  $\alpha$ -Synucleinmetaboliten mit dem präsynaptischen Kompartiment (Kramer and Schulz-Schaeffer, 2007) könnte über Mechanismen der Deafferenzierung und transsynaptischen Atrophie über diese Zeitpunkt- und rezeptorabhängige Regulation des Zellüberlebens den deutlicheren Effekt früh exprimierten h-wt  $\alpha$ -Synucleins erklären. Zur Untermauerung dieser These wäre der Vergleich der Aktivität des NMDA-Rezeptors bei  $\alpha$ -Synuclein exprimierenden Neuroblasten der beiden transgenen Mausstämmen ein möglicher experimenteller Ansatz.

Darüber hinaus weisen auch andere Indizien auf eine vom Entwicklungsstand der Zelle abhängigen Effekt des  $\alpha$ -Synucleins auf Überleben und Differenzierung hin. *In-vitro* Studien, in denen die lentivirale Transfektion mit h-wt, bzw. A53T  $\alpha$ -Synuclein vor der neuronalen Differenzierung embryonaler Stammzellen durchgeführt wurde, zeigen einen

deutlich negativen Effekt auf Differenzierungsverhalten, Überleben, Neuritenmorphologie und gesteigerte Apoptose (Crews et al., 2008).

Mit  $\alpha$ -Synuclein transfizierte, neuronal differenzierte Neuroblastomzellen bilden signifikant schneller perinukleäre Aggregate, die Lewykörperchen bzw. Aggresomen ähneln, als nichtdifferenzierte Zellen (Hasegawa et al., 2004). Die Bildung von sog. Aggresomen - perinukleären Einschlüssen - ist als möglicherweise protektive Mechanismus gegen pathologische Proteinhäufung bei eukaryotischen Zellen bekannt (Johnston et al., 1998). Es erscheint daher möglich, daß differenzierte Neurone über effektivere protektive Mechanismen gegen schädliche  $\alpha$ -Synucleinspezies verfügen, als NPCs.

Obwohl bei tg hPDGF $\beta$  Tieren die  $\alpha$ -Synucleinexpression schon im frühen Stadium der NPCs nachgewiesen werden kann, tritt erst ab der Population der reifen Neuroblasten eine im Vergleich zu Kontrollen verminderte Zellzahl auf. Zwischen diesen beiden Zeitpunkten im Leben einer NPC liegen etwa 10-14 Tage. Dagegen folgen bei den tg mThy1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein Mäusen der Zeitpunkt der mittels Immunfluoreszenz erstmalig nachweisbaren Transgenexpression bzw. der verringerten Anzahl reifer Neuroblasten zeitlich direkt aufeinander. Unter dem mThy1 Promotor erfolgt die Wirkung des  $\alpha$ -Synucleins auf die Zellreifung mit einer kürzeren Latenz. Gleichzeitig beträgt die absolute Menge exprimierten  $\alpha$ -Synucleins bei den tg mThy1 Tieren das 4-fache der Expression bei den tg hPDGF $\beta$  Tieren. Angesichts der geringeren absoluten Proteinexpression des hPDGF $\beta$  Promotors erscheint es daher möglich, daß sich erst ab Überschreiten einer gewissen Proteinmenge oder – Konzentration ein toxischer und damit quantifizierbarer Effekt einstellt.

Die früh beginnende, auf einem niedrigen Expressionsniveau verlaufende Akkumulation von h-wt  $\alpha$ -Synuclein wirkt sich negativ auf Reifung und Zellüberleben aus, wohingegen die zu einem späteren Zeitpunkt einsetzende Akkumulation auf höherem Expressionsniveau zwar die Reifung, jedoch nicht das Überleben neu gebildeter Neurone beeinflusst.

In tg Tiermodellen entscheidet die Promotorkinetik über das regionale und temporale Expressionsmuster, wie auch die absolute Menge der Expression eines Transgens. Die vorliegenden Daten deuten daher darauf hin, daß sowohl der Zeitpunkt der beginnenden Expression wie auch die absolute Menge exprimierten h-wt  $\alpha$ -Synucleins für unterschiedliche Aspekte der adulten hippocampalen Neurogenese verantwortlich sind.

### III. Möglicher Einfluss der glialen Expression von h-wt $\alpha$ -Synuclein auf Vorgänge der adulten Neurogenese

Neben quantitativer Proteinexpression und temporalem Expressionsmuster unterscheiden sich die beiden Mausstämme auch in der glialen Expression von h-wt  $\alpha$ -Synuclein. Diese Beobachtung ist vor allem für hPDGF $\beta$  Tiere der Linie M, jedoch auch für die Linien A und D dokumentiert. So beträgt das Verhältnis neuronal zu glial exprimierten  $\alpha$ -Synucleins in primären Zellkulturen der tg mThy1 Tiere etwa 13:1, bei primären Zellkulturen von tg hPDGF $\beta$ -Tieren der Linie M jedoch nur etwa 1,3:1 (siehe Abb. 30). Des Weiteren liegt in glialen hPDGF $\beta$ -, im Vergleich zu mThy1-Kulturen, etwa die doppelte Menge  $\alpha$ -Synucleins vor (Rockenstein et al., 2002). All diese Befunde sprechen für eine weit stärkere Präsenz glialen h-wt  $\alpha$ -Synucleins in den Tieren der tg hPDGF $\beta$  Gruppe.

Anhand eines tg Mausmodells konnte gezeigt werden, daß die exklusive Expression von  $\alpha$ -Synuclein in Oligodendroglia alleine zu axonalem Schaden und neuronaler Degeneration führt (Yazawa et al., 2005). Diese Neurodegeneration wird über die Aktivierung von Microglia vermittelt (Stefanova et al., 2007). Anhand von Nurr1, einem nukleären Rezeptor, dessen Mutationen mit seltenen familiären Formen von PD assoziiert ist, konnte unlängst auch ein molekularer Mechanismus für den toxischen Effekt von Microglia und Astrozyten auf dopaminerge Neurone gezeigt werden (Saijo et al., 2009). Passend zu ihrer geringeren glialen Expression konnte für die tg mThy1 Tiere keine Aktivität von Microglia nachgewiesen werden (Fernagut et al., 2007). Für die tg hPDGF $\beta$  Tiere steht dieser Nachweis noch aus.

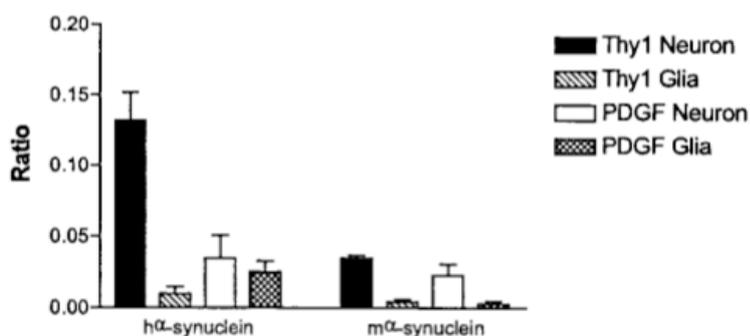


Abb. 30; Vergleich der neuronalen und glialen mRNA-Expression humanen und murinen wt  $\alpha$ -Synucleins in primären Zellkulturen; Daten stammen von Tieren der Linien 61 (mThy1), bzw. M (hPDGF $\beta$ ) der untersuchten transgenen Mausstämme (Rockenstein et al., 2002)

Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, daß die unterschiedlich stark beeinträchtigte adulte Neurogenese zumindest teilweise durch glial exprimiertes  $\alpha$ -Synuclein und darüber aktivierte Microglia bedingt ist. Ein quantitativer Vergleich der Microgliaaktivität zwischen den beiden tg Mausstämmen könnte dies klären.

#### ***IV. Transgenes mThy1 h-wt $\alpha$ -Synuclein vermindert die dopaminerge und neuronale Differenzierung neu gebildeter Neurone der Glomerulär- und Granulärzellschicht des Bulbus olfactorius***

Die tg mThy1 Tiere akkumulieren h-wt  $\alpha$ -Synuclein im olfaktorischen System. Auch in SVZ und OB wurden daher die mitotische Aktivität, das Zellüberleben und die Differenzierung neu gebildeter Zellen untersucht. Das wichtigste Ergebnis ist, daß bei den tg Tieren im Vergleich zu Kontrollen in der GLOM eine signifikante Verringerung der Anzahl neu geborener, dopaminerger Neurone um 61% zu beobachten ist ( $p=0,04$ ). Hierfür ist bei unverändertem Zellüberleben ( $p=0,52$ ) eine 55%ige Verringerung der dopaminergen Differenzierung neu geborener Neurone von 5,5% (Kontrolle) auf 2,5% (tg mThy1) verantwortlich, wenngleich hierfür die Signifikanzschwelle nicht ganz erreicht wird ( $p=0,07$ ). Gleichzeitig ist in der GCL des OB bei unverändertem Überleben ( $p=0,95$ ) und Differenzierungsverhalten ( $p=0,10$ ) die Summe neu gebildeter Neurone um 6% vermindert – hierbei wird die Signifikanzschwelle knapp erreicht ( $p=0,05$ ). Diese Reduktion neu gebildeter Neuronen scheint dabei eindeutig durch das veränderte Differenzierungsverhalten (GCL:  $p=0,10$ ; GLOM:  $p=0,07$ ) der reifenden Zellen im OB bedingt zu sein.

Dabei unterscheiden sich die Volumina von GLOM und GCL zwischen tg mThy1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein Maus und Kontrolltieren nicht. Dies ist mit der Beobachtung vereinbar, dass sich die adulte Neurogenese im Differenzierungsverhalten, jedoch nicht bezüglich des Zellüberlebens unterscheidet.

Im Vergleich hierzu zeigt sich bei der tg hPDGF $\beta$  h-wt  $\alpha$ -Synuclein Maus ein deutlicherer Effekt des Transgens auf die adulte Neurogenese im System SVZ/OB: Bei unveränderter Proliferation in der SVZ ist bei den tg Tieren ein um 50% signifikant

reduziertes Überleben neu gebildeter Zellen im OB nachweisbar. In der GLOM ist bei einem unveränderten Anteil dopaminerger Differenzierung der neu gebildeten Zellen (17%) eine Abnahme der Anzahl neu gebildeter, dopaminerger Zellen um 59% zu beobachten. In der GCL bleibt das Verhältnis neuronaler Differenzierung ebenso unverändert (93%), wodurch in der Summe die Anzahl neu gebildeter Neurone um 50% vermindert ist. In beiden Arealen ist ein signifikanter Anstieg der apoptotischen Aktivität quantifizierbar. Analog zu den Beobachtungen aus dem DG des Hippocampus wurde gefolgert, daß die verminderte adulte Neurogenese der tg hPDGF $\beta$  h-wt  $\alpha$ -Synuclein Tiere durch ein vermindertes Überleben und eine erhöhte Apoptoserate der reifenden NPCs bedingt ist (Winner et al., 2004).

Für die tg hPDGF $\beta$  h-wt  $\alpha$ -Synuclein Maus wurden diese Daten durch eine weitere Analyse an gealterten Tieren ergänzt. Dabei konnte auch für Tiere im Alter von 15 Monaten eine verminderte adulte Neurogenese im System SVZ/OB nachgewiesen werden, wofür ebenso das verminderte Überleben neu gebildeter Zellen bei unveränderter Differenzierung verantwortlich ist (Winner et al., 2007).

Auffällig ist, daß sich die Ursachen für die verminderte adulte Neurogenese im System SVZ/OB zwischen den verschiedenen tg Mausstämmen deutlich unterscheiden. Bei jungen wie alten tg hPDGF $\beta$  Tieren ist das Überleben vermindert, wohingegen bei den tg mThy1 Tieren die dopaminerge, bzw. neuronale Differenzierung beeinträchtigt ist.

Letzteres deckt sich mit *in vitro* Experimenten, in denen die Überexpression von h-wt  $\alpha$ -Synuclein in aus humanen embryonaler Stammzellen reifenden Neuronenkulturen eine deutlich reduzierte Differenzierung zu TH+/GABA+ doppelt positiven Neuronen, wie sie für Neurone im Bulbus olfactorius typisch sind, zeigte (Schneider et al., 2007). Darüber hinaus konnte bei tg Mäusen mit konditionaler Expression von h-wt  $\alpha$ -Synuclein unter der regulatorischen Kontrolle des CaMK-Promotors der reversible Einfluss des Transgens auf die Menge synthetisierten Dopamins im OB gezeigt werden: bei aktiver Expression von  $\alpha$ -Synuclein war signifikant weniger Dopamin im Gewebe des OB nachweisbar, was durch die Unterbrechung der Expression wieder auf das Niveau unbehandelter Kontrollen angehoben werden konnte (Nuber et al., 2008). Die hierfür verwendete Methode der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) hat jedoch den Nachteil, daß nur eine Aussage über den Neurotransmittergehalt, nicht jedoch die Anzahl entsprechend differenzierter Zellen gemacht werden kann. Ob in diesem tg h-wt  $\alpha$ -Synuclein Mausstamm die Anzahl dopaminerg differenzierter, neu gebildeter Neurone in der GLOM vermindert ist, ist nicht bekannt.

Die zwischen den tg Mausstämmen unterschiedliche Wirkung von h-wt  $\alpha$ -Synuclein auf die adulte Neurogenese im System SVZ/OB ist als Folge ihrer unterschiedlichen temporalen, lokalen und absoluten  $\alpha$ -Synucleinexpression zu interpretieren. Analog zu den Überlegungen zur adulten hippocampalen Neurogenese kann man folgern, daß *a*, sich die zellautonom früh beginnende, auf einem niedrigen Expressionsniveau verlaufende Akkumulation von h-wt  $\alpha$ -Synuclein negativ auf Reifung und Zellüberleben auswirkt (tg hPDGF $\beta$ ); *b*, die zu einem späteren Zeitpunkt einsetzende Akkumulation von h-wt  $\alpha$ -Synuclein auf höherem Expressionsniveau zwar die Differenzierung, jedoch nicht das Überleben neu gebildeter Neurone negativ beeinflusst (tg mThy1).

#### ***V. Möglicher Einfluss der durch h-wt $\alpha$ -Synuclein verringerten Neurogenese auf das olfaktorische Defizit der mThy1 tg Tiere***

Die tg mThy1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein Maus ist in Bezug auf motorische und nicht-motorische Aspekte ihres Verhaltens gut charakterisiert. Bei Untersuchungen zum Riechvermögen zeigen tg mThy1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein Tiere im Alter von drei und neun Monaten altersabhängige, signifikante Defizite in unterschiedlichen Aspekten der Wahrnehmung und Unterscheidung von Gerüchen. Neben dem direkten Einfluss Proteinase K-resistenter  $\alpha$ -Synuclein Einschlüsse im OB wurde als mögliche Ursachen hierfür eine verminderte adulte Neurogenese im System SVZ/OB, wie sie bei vergleichbaren tg  $\alpha$ -Synuclein Tieren nachgewiesen wurde, diskutiert (Fleming et al., 2008).

Die Ergebnisse mehrerer Publikationen stützen letzteren möglichen Zusammenhang, indem sie die diskreten Funktionsausfälle, wie sie aus einer verminderten adulten OB Neurogenese folgen, genau untersuchen: Bei tg NCAM<sup>-/-</sup> Mäusen, deren OB Neurogenese durch ein Migrationsdefizit der NPCs vermindert ist, führt eine daraus bedingt verringerte Anzahl GABA-erger Interneurone in der GCL des OB im Alter von 10 bis 14 Monaten zu Schwächen bei der Geruchsunterscheidung (Gheusi et al., 2000). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, daß das altersabhängige Defizit bei der Unterscheidung feiner Geruchsunterschiede bei wt Tieren nicht auf einer veränderten absoluten Zahl olfaktorischer Interneurone, sondern auf der verminderten Bildung und Integration derselben beruht. Es konnte dabei ein Zusammenhang zwischen einer signifikanten Abnahme neu gebildeter

dopaminerg differenzierter Neurone in der GLOM des OB und einer verminderten Geruchsdiskrimination nachwiesen werden (Enwere et al., 2004).

Studien, die die Reifung oder Migration von Neuroblasten für kürzere Zeiträume artifiziell unterbanden konnten keine Auswirkungen auf die Geruchsdiskrimination nachweisen (Imayoshi et al., 2008; Breton-Provencher et al., 2009). Bei der Interpretation dieser Erkenntnisse muss jedoch beachtet werden, daß: *a*, Breton-Provencher et al. als auch Imayoshi et al. im OB nur die Veränderungen in der GCL untersucht haben und *b*, unterschiedliche Versuchsparadigmen zur Testung des Geruchsvermögens verwendet wurden.

Die tg mThy1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein Maus zeigt in der vorliegenden Arbeit signifikant weniger neu gebildete dopaminerge Interneurone der GLOM, sowie grenzwertig signifikant weniger neu gebildete Neurone in der GCL des OB. Das Niveau der Reduktion der BrdU/TH doppelt-positiven Zellen der GLOM liegt fast auf dem von Enwere et al. Gezeigten (siehe Tab. 6). Dieses Neurogenesedefizit erscheint somit als der wahrscheinlichste Grund für die von Fleming et al. gezeigten Verhaltensdefizite in der Geruchswahrnehmung der tg mThy1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein Maus. Dies ist ein Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang, daß h-wt  $\alpha$ -Synuclein über eine verminderte adulte Neurogenese zu Defiziten in der Geruchsdiskrimination führt.

	GLOM: BrdU/TH <sup>+</sup> Zellen
(Enwere et al., 2004)	-71%
mThy1 h-wt $\alpha$ -Synuclein Maus	-61%

Tab. 6; Reduktion der durch adulte Neurogenese in der Glomerulärzellschicht gebildeten dopaminergen Neurone bei wt Tieren im Alter von 24 Monaten im Vergleich zu Tieren im Alter von 2 Monaten (Enwere et al., 2004) und tg mThy1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein Tieren im Vergleich zu wt Tieren

## ***VI. Methodik der Quantifizierung apoptotischer Zellen***

Im Unterschied zu vergleichbaren Arbeiten über die adulte Neurogenese in murinen Modellen des Morbus Parkinson (Winner et al., 2004; Winner et al., 2007) wurde in der vorliegenden Arbeit aus methodischen und konzeptionellen Gründen anstelle der *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling* (TUNEL)-Färbungen eine Immunfluoreszenzfärbung mit Casp-3 durchgeführt. Verschiedene Hinweise aus der Verwendung der TUNEL-Färbung bei humanen Gewebeproben von Parkinsonpatienten deuten auf mögliche Probleme dieser Methode hin: u.a. falsch positive Markierung nekrotischer Zellen und sich teilender Glia, sowie die starke Abhängigkeit des Ergebnisses von Gewebefixation und der Konzentration divalenter Kationen (Tatton et al., 2003).

Aus Gründen der unterschiedlichen Methodik sind die in Bezug auf die Apoptoserate unterschiedlichen Ergebnisse zwischen tg hPDGF $\beta$  Tieren und tg mThy1 Tieren nicht direkt vergleichbar. Dennoch decken sich bei beiden Gruppen die Ergebnisse aus der Untersuchung von Zellüberleben und Apoptose.

## ***VII. mThy1 h-wt $\alpha$ -Synuclein beeinträchtigt die Dendritenlänge neu gebildeter Neurone im adulten Hippocampus***

Die Ergebnisse aus dem dritten Teil dieser Arbeit dokumentieren, dass tg exprimiertes h-wt  $\alpha$ -Synuclein Auswirkungen auf die Ultrastruktur von Dendriten und *spines* neu gebildeter Neurone des hippocampalen DG hat. Neben der quantitativen Analyse der adulten Neurogenese geben diese Erkenntnisse wichtige Einsicht in die pathophysiologische Wirkung von h-wt  $\alpha$ -Synuclein auf zellulärer Ebene.

Erstmalig konnte die enge Lagebeziehung von  $\alpha$ -Synuclein zu dendritischen Spines neu gebildeter Neurone im Gyrus dentatus dokumentiert werden. Im Neuropil der synapsenreichen Molekularzellschicht konnte eine Koexpression von h-wt  $\alpha$ -Synuclein mit Synaptophysin, einem Marker präsynaptischer Vesikel, festgestellt werden. Dies entspricht

einer Lokalisation im präsynaptischen Kompartiment und deckt sich mit Beobachtungen an anderen tg mThy1 h-wt, bzw. A30P  $\alpha$ -Synuclein Mäusen (Kahle et al., 2000b). Für tg mThy1 A53T  $\alpha$ -Synuclein Mäuse konnte durch Elektronenmikroskopie eine Häufung von  $\alpha$ -Synuclein in Zytoplasma und Dendriten, seltener auch in Axonen nachgewiesen werden (van der Putten et al., 2000), was eine Akkumulation in Dendriten und ihren *spines* auch in den hier untersuchten Tieren nicht ausschließen lässt.

Die Untersuchung der Dendritenlänge mittels retroviralem Versuchsansatz zeigte hoch signifikant kürzere Zellfortsätze bei beiden transgenen Gruppen ( $p=0,0074$ ). Die mittlere Länge der Dendriten war bei neu geborenen Zellen der mThy1 tg Gruppe gegenüber Kontrollen signifikant um 40% verkürzt ( $p<0,05$ ), die der hPDGF $\beta$  tg Gruppe nur ungleich weniger. Die Dichte der dendritischen Verästelungen zeigte dagegen keine deutlichen Unterschiede zwischen den Gruppen.

Ähnliches lässt sich bei verschiedenen auf adenoviraler Transfektion basierenden Zellkultur- und Tiermodellen zum Morbus Parkinson beobachten: eine ausgedehnte Dendritenpathologie mit dystrophen, geschwollenen und fragmentierten Neuriten ist bei Modellen in Nagern und Primaten beschrieben (Kirik et al., 2002; Kirik et al., 2003). Ebenso zeigten in vitro Experimente an aus murinen embryonalen Stammzellen, bzw. humanen Neuroblastomzellen differenzierten, postmitotischen Neuronen, daß exprimiertes  $\alpha$ -Synuclein eine Verkürzung und Rarefizierung der dendritischen Fortsätze hervorruft (Lee et al., 2006; Crews et al., 2008).

Auch an Präparaten von Parkinsonpatienten wurden pathologische Veränderungen an Dendriten und *spines* in Substantia nigra, Locus coeruleus und Corpus striatum in kleinen Fallstudien mithilfe der Golgitechnik untersucht: Dendriten zeigen Auftreibungen (*varicosities*), eine Verkürzung ihrer Fortsätze, eine Ausdünnung ihrer Verzweigungen und eine geringere Dichte dendritischer *spines* (McNeill et al., 1988; Patt et al., 1991; Patt and Gerhard, 1993). Auch in Neuriten im Hippocampus von Patienten mit einer, durch Gentriflikation verursachten, autosomal-dominanten Form von PD, zeigen sich Anhäufung von  $\alpha$ -Synuclein mit nachfolgender schwerer Neuritenpathologie (Gwinn-Hardy et al., 2000).

Die Tatsache, daß bei neu geborenen Neuronen der tg mThy1 Gruppe in dieser Arbeit die stärkste Verkürzung der Dendriten festgestellt wurde, kann auf einen

konzentrationsabhängigen Effekt des Transgens hinweisen: in diesen Tieren liegt h-wt  $\alpha$ -Synuclein in einer höheren absoluten Menge vor. Eine ähnliche Beobachtung konnte bei *in vitro* Versuchen gemacht werden, in denen mit steigender  $\alpha$ -Synuclein Expression in differenzierten Neuronen ein zunehmender Prozentsatz dieser Zellen neuritische Degeneration in Form verkürzter und retrahierter Dendriten zeigte (Lee et al., 2006).

Verschiedene Hinweise auf die Mechanismen dieses offensichtlichen Zusammenhanges existieren: Speziell in Bezug auf das Axon konnte in tg mThy1 h-wt, bzw. A30P  $\alpha$ -Synuclein Tieren anhand der Proteinhäufung in Zellkörpern und Neuriten gezeigt werden, daß der anterograde, axonale Transport selektiv für  $\alpha$ -Synuclein gestört, jedoch nicht gänzlich unterbrochen ist (Kahle et al., 2000b).

An neuronal differenzierten humanen Neuroblastomzellen, sowie primären Kulturen muriner Hinterhorn ganglien lässt sich zeigen, daß aggregierte  $\alpha$ -Synucleinspezies über eine Störung des Microtubulinnetzwerkes u.a. zur Degeneration neuritischer Fortsätze führen (Lee et al., 2006). Der transmembranöse Rezeptor Notch-1 reguliert die Dendritogenese in neu geborenen Neuronen des postnatalen Gyrus dentatus (Breunig et al., 2007). Dessen Expression wird *in vitro* wie im tg Mausmodell durch h-wt  $\alpha$ -Synuclein herunterreguliert, was u.a. zu einer Verkürzung der Neuritenlänge führt (Crews et al., 2008).

Ein *rescue experiment* zur Reversibilität der Dendritenpathologie könnte analog zu dem von Crews et al. *in vitro* durchgeführtem Experiment wie folgt durchgeführt werden: Über einen retroviralen Ansatz könnte man tg  $\alpha$ -Synuclein Tieren *notch intracellular domain* (NICD) plus Fluoreszenzmarker, z.B. GFP, sowie als Kontrolle *red fluorescent protein* (RFP) ohne NICD, intrahippocampal injizieren und nach vier Wochen die neu gebildeten, GFP- bzw. RFP-markierten Neurone auf Unterschiede in ihrer dendritische Morphologie untersuchen.

### ***VIII. h-wt $\alpha$ -Synuclein beeinflusst die Dichte und Morphologie dendritischer spines neu gebildeter Neurone im adulten Hippocampus***

Tg exprimiertes  $\alpha$ -Synuclein hat in den untersuchten tg Tieren einen, zwischen den transgenen Gruppen unterschiedlichen, deutlichen Einfluss auf dendritische *spines* neu

geborener Neurone des adulten DG. So ist die Dichte der *spines* auf Dendriten der tg mThy1 Gruppe signifikant gegenüber Kontrollen und tg hPDGF $\beta$  Gruppe verringert ( $p=0,02$ ), wobei sich tg hPDGF $\beta$  Gruppe und Kontrollen kaum unterscheidet.

Während der adulten hippocampalen Neurogenese bilden sich ab der dritten Woche nach Geburt eines neuen Neurons dendritische Filopodien, die eine zentrale Rolle bei der Synaptogenese spielen (Zhao et al., 2006; Toni et al., 2007). Die sich aus manchen dieser Filopodien entwickelnden *spines* bedürfen der Stabilisation durch den Einbau und Aktivität von Glutamat-Rezeptoren (Bourne and Harris, 2008). Für Cortexneurone der dem IPS sehr ähnlichen DLB konnte ein Zusammenhang zwischen v.a. präsynaptisch akkumuliertem  $\alpha$ -Synuclein, dem Ausmaß der Herunterregulation prä- und vor allem post-synaptischer Markerproteine und dem Verlust dendritischer *spines* bewiesen werden. Neben der Integrität dendritischer *spines* inhibiert  $\alpha$ -Synuclein auch das absolute Niveau synaptischer Aktivität (Kramer and Schulz-Schaeffer, 2007). Der Zusammenhang zwischen  $\alpha$ -Synuclein und Verlust von Dendriten und Synapsen besteht, allein bleibt unklar ob Synuclein über eine Schädigung der synaptischen Aktivität zum Verlust der Spines führt, oder *vice versa*.

Bei der Analyse der *spines*-Subgruppen zeigt sich eine signifikant verminderte Dichte großer *mushroom spines* ( $p=0,04$ ), wie auch deren prozentuaalem Anteil an allen dendritischen *spines* zwischen Kontroll- und transgenen Tieren ( $p=0,04$ ). Beim genaueren Vergleich der beiden tg Mausstämme miteinander fällt auf, daß sowohl die Dichte aller dendritischen *spines* ( $p<0,05$ ) als auch der Anteil an reifen *mushroom spines* ( $p=0,0093$ ) zwischen den beiden transgenen Gruppen signifikant, bzw. hoch signifikant unterschiedlich ist, wobei in absoluten Zahlen die mThy1 Gruppe insgesamt weniger *spines*, jedoch mehr *mushroom spines* aufweist.

Eine mögliche Erklärung hierzu ist, daß der Mangel an *mushroom spines* in der hPDGF $\beta$  Gruppe als Mangel reifer synaptischer Verbindungen zu interpretieren ist, der durch eine erhöhte Anzahl an Filopodien und *spines* früherer Entwicklungsstufen kompensiert wird. Ein solcher Mechanismus ist als Reaktion auf die Blockade synaptischer Übertragung im Hippocampus bekannt (Kirov and Harris, 1999). Die in den beiden tg Mausstämmen unterschiedliche Dichte an *spines* und *mushroom spines* spiegelt über diesen Mechanismus wohl wiederum die unterschiedliche, temporale Expression von h-wt  $\alpha$ -Synuclein unter der regulatorischen Kontrolle von mThy1, bzw. hPDGF $\beta$  wieder.

Viele Studien zu *dendritischen spines* beim Morbus Parkinson oder anderen  $\alpha$ -Synucleinopathien beschäftigten sich bislang mit pathologischen Veränderungen u.a. an Neuronen in Striatum und präfrontalem Cortex im murinen Parkinsonmodell (Solis et al., 2007), an Neuronen des Neostriatums beim 6-Hydroxydopaminmodell für Parkinson in der Ratte (Ingham et al., 1998), an *medium-sized spiny neurons* des Nucleus caudatus bei Patienten mit DLB, bzw. Neostriatums bei Parkinsonpatienten (Zaja-Milatovic et al., 2005; Zaja-Milatovic et al., 2006), sowie an *medium-sized spiny neurons* des Nucleus caudatus und des Putamens bei Parkinsonpatienten (Stephens et al., 2005). Bei all diesen Studien wurden immer eine verminderte Dichte *dendritischer spines* beobachtet, die oft mit einer Verkürzung der dendritischen Fortsätze einhergeht.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die veränderte Morphologie der Dendriten und *spines* bei neu gebildeten Neuronen des hippocampalen DG dargestellt und untersucht. Bei Punkten wie der Dendritenlänge und der *spine* Dichte scheinen die Veränderungen bei IPS Patienten und tg  $\alpha$ -Synuclein Tieren sich grundsätzlich zu ähneln. Inwiefern sich diese Erkenntnisse auf die Verhältnisse im humanen Hippocampus übertragen lassen, kann nur eine Untersuchung der Neuritenmorphologie an humanen Präparaten klären.

## Zusammenfassung

Die Hypothese dieser Arbeit war, daß die Akkumulation von h-wt  $\alpha$ -Synuclein zu einer im Vergleich zu Kontrollen verminderten Bildung und Integration neuer Neurone des adulten Hippocampus und Bulbus olfactorius, sowie zu einer hippocampalen Volumenminderung führt.

Tg mThy1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein senkt im hippocampalen DG die Anzahl reifer Neuroblasten, ohne dabei die Proliferation von NPCs, das Überleben und Differenzierung neu gebildeter Neurone, oder das hippocampale Volumen zu beeinflussen.

Die höherer, absoluter Synucleinexpression in den neurogenen Arealen im tg mThy1 im Vergleich zum tg hPDGF $\beta$  Tiermodell hat einen geringeren quantitativen Effekt auf die adulte Neurogenese. Ursache hierfür ist wahrscheinlich das unterschiedliche temporale Expressionsverhalten der Promotoren.

Mithilfe eines retroviralen Ansatzes gelang es individuelle, neu geborene Neurone im hippocampalen DG zu markieren. Die Analyse der Dendritenlänge, des Grades der dendritischen Verzweigungen, sowie der Dichte dendritischer *spines* und *mushroom spines* zeigt unterschiedliche Effekte des tg h-wt  $\alpha$ -Synuclein. Diese sind in Abhängigkeit des temporalen und absoluten Expressionsmusters der beiden Promotoren als Resultat der zu unterschiedlichen Zeitpunkten einsetzenden Wirkung von  $\alpha$ -Synuclein auf die Dendritogenese zu interpretieren.

Tg mThy1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein führt über eine signifikant verminderte Differenzierung neu gebildeter Neurone in der GLOM zu einer verminderten OB Neurogenese und trägt hierüber möglicherweise zu den in anderen Veröffentlichungen beschriebenen olfaktorischen Defiziten dieser Tiere bei.

h-wt  $\alpha$ -Synuclein beeinflusst die Vorgänge der adulten Neurogenese demnach neben dem quantifizierbaren Effekt auf die Anzahl gebildeter Zellen auch qualitativ in Bezug auf die Morphologie einzelner Zellen.

Zusammenfassend sind die wichtigsten Aussagen dieser Arbeit, daß *a*, unter der regulatorischen Kontrolle von mThy1 die Akkumulation von h-wt  $\alpha$ -Synuclein im hippocampalen DG zu einer verminderten Anzahl reifer Neuroblasten führt; *b*, die Auswirkungen von h-wt  $\alpha$ -Synuclein auf die adulte Neurogenese in tg Tiermodellen nicht nur

durch das absolute sondern auch temporale Expressionsmuster der verwendeten Promotoren beeinflusst wird; *c*, für die tg mThy1 h-wt  $\alpha$ -Synuclein Maus eine durch die  $\alpha$ -Synucleinakkumulation signifikant verminderte adulte OB-Neurogenese in der GLOM nachweisbar ist, welche möglicherweise mit deren olfaktorischen Defiziten in Zusammenhang steht; *d*, ultrastrukturelle Veränderungen an Dendriten und *spines* neu gebildeter Neurone des DG bei tg Tieren Ähnlichkeiten zu den beim Parkinsonpatienten beobachteten pathologischen Veränderungen einzelner Zellen aufweisen.

## **Danksagung, Erklärung & Lebenslauf**

*Die folgenden Personen und Institutionen haben auf verschiedene Weise das Erstellen dieser Arbeit ermöglicht. Ihnen gilt hierfür mein aufrichtiger Dank:*

*- Prof. Dr. med. Jürgen Winkler und der Universität Regensburg für die Gewährung des Stipendiums im Rahmen des Austauschprogrammes der medizinischen Fakultäten Regensburg / UCSD San Diego*

*- Prof. Fred H. Gage und des gesamten Teams des Laboratory of Genetics LOG-G am Salk Institute für die Möglichkeit in einem der produktivsten neurowissenschaftlichen Labore überhaupt als Gaststudent arbeiten zu dürfen*

*- der Studienstiftung des Deutschen Volkes für die Gewährung eines Kurzzeitstipendiums für den Aufenthalt in San Diego*

*- dem Team der neurologischen Forschung am Bezirksklinikum Regensburg, namentlich Prof. Dr. Ludwig Aigner, PD Sebastien Couillard-Despres und Stefan Aigner für die Vor- und Nachbereitung der Experimente im neurologischen Labor in Regensburg*

*- Prof. Dr. med. U. Bogdahn für die Möglichkeit am Lehrstuhl für Neurologie diese Arbeit einreichen zu dürfen*

*Vor allem möchte ich mich aber bei PD Dr. med. Beate Winner, meiner Betreuerin und Tutorin, für die lehrreiche und spannende Zusammenarbeit bedanken. In den Stunden gemeinsamen Arbeitens brachte sie mich geduldig den Neurowissenschaften näher: sie lehrte mich von Konzeption bis Umsetzung die Schritte zu einem wissenschaftlichen Projekt und brachte mir das wissenschaftliche Denken und die dafür nötigen Techniken bei. Die gemeinsame Zeit hat mein Interesse an der neurologischen Forschung weiter gesteigert. Hierfür gebührt ihr mein aufrechter Dank.*

## **Erklärung**

Die konzeptionelle Planung der in dieser Dissertation beschriebenen Experimente, sowie die Überwachung ihrer Ausarbeitung erfolgte durch Frau PD Dr. med. Beate Winner.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Sebastian Schreglmann

Zürich, den 11.08.10

## Lebenslauf

Sebastian Robert Schreglmann

Stäblistr.11, 8006 Zürich, CH

geboren am 15. Oktober 1981 in Weiden i. d. Oberpfalz

e-mail: sebastian.schreglmann@googlemail.com

- 02/2010 – aktuell      Anstellung als Assistenzarzt  
Neurologische Klinik des UniversitätSpital Zürich, CH
- 14.01.2010              Approbation als Arzt
- 17.11.2009              Studienabschluss und Examen  
Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg, Examensnote 2,0
- 08/2008 – 08/2009      Praktisches Jahr - Wahlfach Neurologie
- 02/2008 - 08/2008      Experimentelle Dr-Arbeit bei PD Dr. B. Winner  
Laboratory of Genetics, Prof. Fred H. Gage  
Salk Institute of Biological Studies, La Jolla, CA, USA  
Independent Research Exchange (IRE) Stipendium der Universitäten  
Regensburg und UCSD San Diego
- 08/2005 – 08/2006      Auslandsjahr, Leeds Medical School, University of Leeds, UK
- 12/2002 -09/2009      Stipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes
- 08/2006 – 02/2008      Universität Regensburg, Studium der Humanmedizin  
10/2002 – 08/2005
- 09/2001 – 07/2002      Zivildienst
- 09/1992 – 06/2001      Gymnasium Eschenbach i. d. Opf., Abitur (Notenschnitt 1,1)

---

## Literaturverzeichnis

- Adler CH (2005) Nonmotor complications in Parkinson's disease. *Mov Disord* 20 Suppl 11:S23-29.
- Alonso M, Viollet C, Gabellec M-M, Meas-Yedid V, Olivo-Marin J-C, Lledo P-M (2006) Olfactory discrimination learning increases the survival of adult-born neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 26:10508-10513.
- Altman J, Das GD (1965a) Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature* 207:953-956.
- Altman J, Das GD (1965b) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319-335.
- Alvarez-Buylla A, Lim DA (2004) For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41:683-686.
- Anthony TE, Klein C, Fishell G, Heintz N (2004) Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron* 41:881-890.
- Apaydin H, Ahlskog JE, Parisi JE, Boeve BF, Dickson DW (2002) Parkinson disease neuropathology: later-developing dementia and loss of the levodopa response. *Arch Neurol* 59:102-112.
- Belluzzi O, Benedusi M, Ackman J, LoTurco JJ (2003) Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 23:10411-10418.
- Ben-Hur T, Rogister B, Murray K, Rougon G, Dubois-Dalcq M (1998) Growth and fate of PSA-NCAM+ precursors of the postnatal brain. *J Neurosci* 18:5777-5788.
- Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG (2000) Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 291:17-20.
- Borta A, Höglinger GU (2007) Dopamine and adult neurogenesis. *J Neurochem* 100:587-595.
- Bourne JN, Harris KM (2008) Balancing Structure and Function at Hippocampal Dendritic Spines. *Annu Rev Neurosci*.
- Braak H, Del Tredici K (2008) Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. *Neurology* 70:1916-1925.
- Braak H, Rüb U, Del Tredici K (2006) Cognitive decline correlates with neuropathological stage in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 248:255-258.
- Breton-Provencher V, Lemasson M, Peralta MR, Saghatelian A (2009) Interneurons produced in adulthood are required for the normal functioning of the olfactory bulb network and for the execution of selected olfactory behaviors. *J Neurosci* 29:15245-15257.
- Breunig JJ, Silbereis J, Vaccarino FM, Sestan N, Rakic P (2007) Notch regulates cell fate and dendrite morphology of newborn neurons in the postnatal dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:20558-20563.

- Breunig JJ, Sarkisian MR, Arellano JI, Morozov YM, Ayoub AE, Sojitra S, Wang B, Flavell RA, Rakic P, Town T (2008) Primary cilia regulate hippocampal neurogenesis by mediating sonic hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:13127-13132.
- Brown JP, Couillard-Després S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG (2003) Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol* 467:1-10.
- Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK (1993) Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8033-8037.
- Burton EJ, McKeith IG, Burn DJ, Williams ED, O'Brien JT (2004) Cerebral atrophy in Parkinson's disease with and without dementia: a comparison with Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies and controls. *Brain* 127:791-800.
- Cajal SRy (1928) *Degeneration and Regeneration of the Nervous system*. New York: Hafner.
- Camicioli R, Moore MM, Kinney A, Corbridge E, Glassberg K, Kaye JA (2003) Parkinson's disease is associated with hippocampal atrophy. *Mov Disord* 18:784-790.
- Cao L, Jiao X, Zuzga DS, Liu Y, Fong DM, Young D, During MJ (2004) VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nat Genet* 36:827-835.
- Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo PM (2003) Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci* 6:507-518.
- Chapouton P, Jagasia R, Bally-Cuif L (2007) Adult neurogenesis in non-mammalian vertebrates. *Bioessays* 29:745-757.
- Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M, Waucquier N, Defebvre L, Amouyel P, Farrer M, Destée A (2004) Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 364:1167-1169.
- Chen S, Botteri F, van der Putten H, Landel CP, Evans GA (1987) A lymphoproliferative abnormality associated with inappropriate expression of the Thy-1 antigen in transgenic mice. *Cell* 51:7-19.
- Churchyard A, Lees AJ (1997) The relationship between dementia and direct involvement of the hippocampus and amygdala in Parkinson's disease. *Neurology* 49:1570-1576.
- Clelland CD, Choi M, Romberg C, Clemenson GD, Fragniere A, Tyers P, Jessberger S, Saksida LM, Barker RA, Gage FH, Bussey TJ (2009) A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* 325:210-213.
- Cookson MR (2009) alpha-Synuclein and neuronal cell death. *Mol Neurodegener* 4:9.
- Corotto FS, Henegar JR, Maruniak JA (1994) Odor deprivation leads to reduced neurogenesis and reduced neuronal survival in the olfactory bulb of the adult mouse. *Neuroscience* 61:739-744.
- Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG, Aigner L (2005) Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci* 21:1-14.

- Crews L, Mizuno H, Desplats P, Rockenstein E, Adame A, Patrick C, Winner B, Winkler J, Masliah E (2008) Alpha-synuclein alters Notch-1 expression and neurogenesis in mouse embryonic stem cells and in the hippocampus of transgenic mice. *J Neurosci* 28:4250-4260.
- de Lau LM, Breteler MM (2006) Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet neurology* 5:525-535.
- Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703-716.
- Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2002) EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36:1021-1034.
- Domínguez MI, Blasco-Ibáñez JM, Crespo C, Marqués-Marí AI, Martínez-Guijarro FJ (2003) Calretinin/PSA-NCAM immunoreactive granule cells after hippocampal damage produced by kainic acid and DEDTC treatment in mouse. *Brain Res* 966:206-217.
- Duman RS, Monteggia LM (2006) A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* 59:1116-1127.
- Enwere E, Shingo T, Gregg C, Fujikawa H, Ohta S, Weiss S (2004) Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *J Neurosci* 24:8354-8365.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313-1317.
- Espósito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ, Schinder AF (2005) Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci* 25:10074-10086.
- Farlow MR, Cummings J (2008) A modern hypothesis: The distinct pathologies of dementia associated with Parkinson's disease versus Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 25:301-308.
- Fernagut PO, Hutson CB, Fleming SM, Tetreault NA, Salcedo J, Masliah E, Chesselet MF (2007) Behavioral and histopathological consequences of paraquat intoxication in mice: effects of alpha-synuclein over-expression. *Synapse* 61:991-1001.
- Fischer D, Bieber T, Li Y, Elsässer HP, Kissel T (1999) A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res* 16:1273-1279.
- Fleming SM, Tetreault NA, Mulligan CK, Hutson CB, Masliah E, Chesselet MF (2008) Olfactory deficits in mice overexpressing human wildtype alpha-synuclein. *Eur J Neurosci* 28:247-256.
- Freichel C, Neumann M, Ballard T, Müller V, Woolley M, Ozmen L, Borroni E, Kretschmar HA, Haass C, Spooen W, Kahle PJ (2007) Age-dependent cognitive decline and amygdala pathology in alpha-synuclein transgenic mice. *Neurobiol Aging* 28:1421-1435.
- Fukuda S, Kato F, Tozuka Y, Yamaguchi M, Miyamoto Y, Hisatsune T (2003) Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci* 23:9357-9366.

- Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433-1438.
- Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV (2004) GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* 7:1233-1241.
- Ge S, Yang CH, Hsu KS, Ming GL, Song H (2007) A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron* 54:559-566.
- Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL, Song H (2006) GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439:589-593.
- Gheusi G, Cremer H, McLean H, Chazal G, Vincent JD, Lledo PM (2000) Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:1823-1828.
- Giasson BI, Duda JE, Quinn SM, Zhang B, Trojanowski JQ, Lee VM (2002) Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. *Neuron* 34:521-533.
- Gitler AD, Bevis BJ, Shorter J, Strathearn KE, Hamamichi S, Su LJ, Caldwell KA, Caldwell GA, Rochet JC, McCaffery JM, Barlowe C, Lindquist S (2008) The Parkinson's disease protein alpha-synuclein disrupts cellular Rab homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:145-150.
- Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA (1999) Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* 23:257-271.
- Golbe LI, Mouradian MM (2004) Alpha-synuclein in Parkinson's disease: light from two new angles. *Ann Neurol* 55:153-156.
- Goldman JE, Yen SH, Chiu FC, Peress NS (1983) Lewy bodies of Parkinson's disease contain neurofilament antigens. *Science* 221:1082-1084.
- Goldman SA, Nottebohm F (1983) Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2390-2394.
- Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E (1998) Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3168-3171.
- Gratzner HG (1982) Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218:474-475.
- Gwinn-Hardy K, Mehta ND, Farrer M, Maraganore D, Muentner M, Yen SH, Hardy J, Dickson DW (2000) Distinctive neuropathology revealed by alpha-synuclein antibodies in hereditary parkinsonism and dementia linked to chromosome 4p. *Acta Neuropathol* 99:663-672.
- Hack I, Bancila M, Loulier K, Carroll P, Cremer H (2002) Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis. *Nat Neurosci* 5:939-945.
- Han YG, Spassky N, Romaguera-Ros M, Garcia-Verdugo JM, Aguilar A, Schneider-Maunoury S, Alvarez-Buylla A (2008) Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nat Neurosci* 11:277-284.

- Hasegawa T, Matsuzaki M, Takeda A, Kikuchi A, Akita H, Perry G, Smith MA, Itoyama Y (2004) Accelerated alpha-synuclein aggregation after differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Res* 1013:51-59.
- Hastings NB, Gould E (1999) Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J Comp Neurol* 413:146-154.
- Hawkes CH, Shephard BC, Daniel SE (1997) Olfactory dysfunction in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 62:436-446.
- Höglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I, Hirsch EC (2004) Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci* 7:726-735.
- Ibáñez P, Bonnet AM, Débarges B, Lohmann E, Tison F, Pollak P, Agid Y, Dürr A, Brice A (2004) Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet* 364:1169-1171.
- Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Takao K, Miyakawa T, Yamaguchi M, Mori K, Ikeda T, Itohara S, Kageyama R (2008) Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci* 11:1153-1161.
- Ingham CA, Hood SH, Taggart P, Arbuthnott GW (1998) Plasticity of synapses in the rat neostriatum after unilateral lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathway. *J Neurosci* 18:4732-4743.
- Johnston JA, Ward CL, Kopito RR (1998) Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* 143:1883-1898.
- Kahle PJ, Neumann M, Ozmen L, Haass C (2000a) Physiology and pathophysiology of alpha-synuclein. Cell culture and transgenic animal models based on a Parkinson's disease-associated protein. *Ann N Y Acad Sci* 920:33-41.
- Kahle PJ, Neumann M, Ozmen L, Muller V, Jacobsen H, Schindzielorz A, Okochi M, Leimer U, van der Putten H, Probst A, Kremmer E, Kretzschmar HA, Haass C (2000b) Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha -synuclein in human and transgenic mouse brain. *J Neurosci* 20:6365-6373.
- Kee N, Teixeira CM, Wang AH, Frankland PW (2007) Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat Neurosci* 10:355-362.
- Kempermann G, Gage FH (2002) Genetic determinants of adult hippocampal neurogenesis correlate with acquisition, but not probe trial performance, in the water maze task. *Eur J Neurosci* 16:129-136.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493-495.
- Kirik D, Annett LE, Burger C, Muzyczka N, Mandel RJ, Björklund A (2003) Nigrostriatal alpha-synucleinopathy induced by viral vector-mediated overexpression of human alpha-synuclein: a new primate model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2884-2889.
- Kirik D, Rosenblad C, Burger C, Lundberg C, Johansen TE, Muzyczka N, Mandel RJ, Björklund A (2002) Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system. *J Neurosci* 22:2780-2791.

- Kirov SA, Harris KM (1999) Dendrites are more spiny on mature hippocampal neurons when synapses are inactivated. *Nat Neurosci* 2:878-883.
- Klempin F, Kempermann G (2007) Adult hippocampal neurogenesis and aging. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 257:271-280.
- Kollias G, Spanopoulou E, Grosveld F, Ritter M, Beech J, Morris R (1987) Differential regulation of a Thy-1 gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:1492-1496.
- Kramer ML, Schulz-Schaeffer WJ (2007) Presynaptic alpha-synuclein aggregates, not Lewy bodies, cause neurodegeneration in dementia with Lewy bodies. *J Neurosci* 27:1405-1410.
- Krüger R, Kuhn W, Müller T, Woitalla D, Graeber M, Kösel S, Przuntek H, Epplen JT, Schöls L, Riess O (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 18:106-108.
- Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH (1997) Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* 17:5820-5829.
- Lai K, Kaspar BK, Gage FH, Schaffer DV (2003) Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci* 6:21-27.
- Lang AE, Lozano AM (1998a) Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med* 339:1130-1143.
- Lang AE, Lozano AM (1998b) Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* 339:1044-1053.
- Lee HJ, Lee SJ (2002) Characterization of cytoplasmic alpha-synuclein aggregates. Fibril formation is tightly linked to the inclusion-forming process in cells. *J Biol Chem* 277:48976-48983.
- Lee HJ, Khoshaghideh F, Lee S, Lee SJ (2006) Impairment of microtubule-dependent trafficking by overexpression of alpha-synuclein. *Eur J Neurosci* 24:3153-3162.
- Lee MK, Stirling W, Xu Y, Xu X, Qui D, Mandir AS, Dawson TM, Copeland NG, Jenkins NA, Price DL (2002) Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 --> Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:8968-8973.
- Lewis PF, Emerman M (1994) Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J Virol* 68:510-516.
- Lewy FH (1912) Paralysis agitans I. Pathologische Anatomie. In: *Handbuch der Neurologie* (Lewandowsky M, ed), p 920. Berlin: Springer.
- Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Désiré L, Mira H, Consiglio A, Lein ES, Jessberger S, Lansford H, Dearie AR, Gage FH (2005) Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* 437:1370-1375.
- Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2000) Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28:713-726.

- Litvan I, Bhatia KP, Burn DJ, Goetz CG, Lang AE, McKeith I, Quinn N, Sethi KD, Shults C, Wenning GK, Committee MDSSI (2003) Movement Disorders Society Scientific Issues Committee report: SIC Task Force appraisal of clinical diagnostic criteria for Parkinsonian disorders. *Mov Disord* 18:467-486.
- Liu S, Wang J, Zhu D, Fu Y, Lukowiak K, Lu YM (2003) Generation of functional inhibitory neurons in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 23:732-736.
- Liu X, Wang Q, Haydar TF, Bordey A (2005) Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci* 8:1179-1187.
- Lledo PM, Saghatelian A (2005) Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: joining the network, life-death decisions, and the effects of sensory experience. *Trends Neurosci* 28:248-254.
- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS (2006) Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 7:179-193.
- Lois C, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1996) Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271:978-981.
- Lüthi A, van der Putten H, Botteri FM, Mansuy IM, Meins M, Frey U, Sansig G, Portet C, Schmutz M, Schröder M, Nitsch C, Laurent JP, Monard D (1997) Endogenous serine protease inhibitor modulates epileptic activity and hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 17:4688-4699.
- Mak GK, Enwere EK, Gregg C, Pakarainen T, Poutanen M, Huhtaniemi I, Weiss S (2007) Male pheromone-stimulated neurogenesis in the adult female brain: possible role in mating behavior. *Nat Neurosci* 10:1003-1011.
- Maraganore DM, de Andrade M, Elbaz A, Farrer MJ, Ioannidis JP, Krüger R, Rocca WA, Schneider NK, Lesnick TG, Lincoln SJ, Hulihan MM, Aasly JO, Ashizawa T, Chartier-Harlin MC, Checkoway H, Ferrarese C, Hadjigeorgiou G, Hattori N, Kawakami H, Lambert JC, Lynch T, Mellick GD, Papapetropoulos S, Parsian A, Quattrone A, Riess O, Tan EK, Van Broeckhoven C, Consortium GEoPsDG-P (2006) Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease. *JAMA* 296:661-670.
- Marxreiter F, Nuber S, Kandasamy M, Klucken J, Aigner R, Burgmayer R, Couillard-Despres S, Riess O, Winkler J, Winner B (2009) Changes in adult olfactory bulb neurogenesis in mice expressing the A30P mutant form of alpha-synuclein. *Eur J Neurosci* 29:879-890.
- Maslah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Mallory M, Hashimoto M, Takeda A, Sagara Y, Sisk A, Mucke L (2000) Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science* 287:1265-1269.
- Matsuoka Y, Vila M, Lincoln S, McCormack A, Picciano M, LaFrancois J, Yu X, Dickson D, Langston WJ, McGowan E, Farrer M, Hardy J, Duff K, Przedborski S, Di Monte DA (2001) Lack of nigral pathology in transgenic mice expressing human alpha-synuclein driven by the tyrosine hydroxylase promoter. *Neurobiol Dis* 8:535-539.
- Mattila PM, Rinne JO, Helenius H, Dickson DW, Røyttä M (2000) Alpha-synuclein-immunoreactive cortical Lewy bodies are associated with cognitive impairment in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 100:285-290.

- McNaught KS, Shashidharan P, Perl DP, Jenner P, Olanow CW (2002) Aggresome-related biogenesis of Lewy bodies. *Eur J Neurosci* 16:2136-2148.
- McNeill TH, Brown SA, Rafols JA, Shoulson I (1988) Atrophy of medium spiny I striatal dendrites in advanced Parkinson's disease. *Brain Res* 455:148-152.
- Meyer RL (1978) Evidence from thymidine labeling for continuing growth of retina and tectum in juvenile goldfish. *Exp Neurol* 59:99-111.
- Ming GL, Song H (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 28:223-250.
- Mirescu C, Gould E (2006) Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus* 16:233-238.
- Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2008) Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* 3:265-278.
- Nácher J, Varea E, Miguel Blasco-Ibáñez J, Gómez-Climent MA, Castillo-Gómez E, Crespo C, Martínez-Guijarro FJ, McEwen BS (2007) N-methyl-d-aspartate receptor expression during adult neurogenesis in the rat dentate gyrus. *Neuroscience* 144:855-864.
- Nagano-Saito A, Washimi Y, Arahata Y, Kachi T, Lerch JP, Evans AC, Dagher A, Ito K (2005) Cerebral atrophy and its relation to cognitive impairment in Parkinson disease. *Neurology* 64:224-229.
- Naviaux RK, Costanzi E, Haas M, Verma IM (1996) The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *J Virol* 70:5701-5705.
- Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Kriegstein AR (2007) Contribution of intermediate progenitor cells to cortical histogenesis. *Arch Neurol* 64:639-642.
- Nuber S, Petrasch-Parwez E, Winner B, Winkler J, von Hörsten S, Schmidt T, Boy J, Kuhn M, Nguyen HP, Teismann P, Schulz JB, Neumann M, Pichler BJ, Reischl G, Holzmann C, Schmitt I, Bornemann A, Kuhn W, Zimmermann F, Servadio A, Riess O (2008) Neurodegeneration and motor dysfunction in a conditional model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 28:2471-2484.
- Opazo F, Krenz A, Heermann S, Schulz JB, Falkenburger BH (2008) Accumulation and clearance of alpha-synuclein aggregates demonstrated by time-lapse imaging. *J Neurochem* 106:529-540.
- Outeiro TF, Lindquist S (2003) Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. *Science* 302:1772-1775.
- Outeiro TF, Putcha P, Tetzlaff JE, Spoelgen R, Koker M, Carvalho F, Hyman BT, McLean PJ (2008) Formation of toxic oligomeric alpha-synuclein species in living cells. *PLoS ONE* 3:e1867.
- Padovani A, Costanzi C, Gilberti N, Borroni B (2006) Parkinson's disease and dementia. *Neurol Sci* 27 Suppl 1:S40-43.
- Parkinson J (1817) *An Essay on the Shaking Palsy*. London: Sherwood Neely Jones.
- Patt S, Gerhard L (1993) A Golgi study of human locus coeruleus in normal brains and in Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 19:519-523.

- Patt S, Gertz HJ, Gerhard L, Cervós-Navarro J (1991) Pathological changes in dendrites of substantia nigra neurons in Parkinson's disease: a Golgi study. *Histol Histopathol* 6:373-380.
- Petreanu L, Alvarez-Buylla A (2002) Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci* 22:6106-6113.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276:2045-2047.
- Price J, Turner D, Cepko C (1987) Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:156-160.
- Ramírez-Castillejo C, Sánchez-Sánchez F, Andreu-Agulló C, Ferrón SR, Aroca-Aguilar JD, Sánchez P, Mira H, Escribano J, Fariñas I (2006) Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci* 9:331-339.
- Richard IH, Papka M, Rubio A, Kurlan R (2002) Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies: one disease or two? *Mov Disord* 17:1161-1165.
- Riekkinen P, Kejonen K, Laakso MP, Soininen H, Partanen K, Riekkinen M (1998) Hippocampal atrophy is related to impaired memory, but not frontal functions in non-demented Parkinson's disease patients. *Neuroreport* 9:1507-1511.
- Rochefort C, Gheusi G, Vincent J-D, Lledo P-M (2002) Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *J Neurosci* 22:2679-2689.
- Rockenstein E, Mallory M, Hashimoto M, Song D, Shults CW, Lang I, Masliah E (2002) Differential neuropathological alterations in transgenic mice expressing alpha-synuclein from the platelet-derived growth factor and Thy-1 promoters. *J Neurosci Res* 68:568-578.
- Saghatelian A, de Chevigny A, Schachner M, Lledo PM (2004) Tenascin-R mediates activity-dependent recruitment of neuroblasts in the adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* 7:347-356.
- Saijo K, Winner B, Carson CT, Collier JG, Boyer L, Rosenfeld MG, Gage FH, Glass CK (2009) A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell* 137:47-59.
- Sasahara M, Fries JW, Raines EW, Gown AM, Westrum LE, Frosch MP, Bonthron DT, Ross R, Collins T (1991) PDGF B-chain in neurons of the central nervous system, posterior pituitary, and in a transgenic model. *Cell* 64:217-227.
- Saxe MD, Battaglia F, Wang J-W, Malleret G, David DJ, Monckton JE, Garcia ADR, Sofroniew MV, Kandel ER, Santarelli L, Hen R, Drew MR (2006) Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:17501-17506.
- Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J (2004) Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429:184-187.

- Schneider BL, Seehus CR, Capowski EE, Aebischer P, Zhang SC, Svendsen CN (2007) Over-expression of alpha-synuclein in human neural progenitors leads to specific changes in fate and differentiation. *Hum Mol Genet* 16:651-666.
- Scott K (2008) Chemical Senses: Taste and Olfaction. In: *Fundamental Neuroscience*, 3rd Edition (Squire LR, Berg D, Bloom FE, Lac Sd, Gosh A, Spitzer NC, eds): Academic Press.
- Seri B, García-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 21:7153-7160.
- Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, Vincent P, Pumiglia K, Temple S (2004) Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 304:1338-1340.
- Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, Cross JC, Weiss S (2003) Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science* 299:117-120.
- Shors TJ, Townsend DA, Zhao M, Kozorovitskiy Y, Gould E (2002) Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus* 12:578-584.
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muentner M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K (2003) alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302:841.
- Solis O, Limón DI, Flores-Hernández J, Flores G (2007) Alterations in dendritic morphology of the prefrontal cortical and striatum neurons in the unilateral 6-OHDA-rat model of Parkinson's disease. *Synapse* 61:450-458.
- Song H, Stevens CF, Gage FH (2002) Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417:39-44.
- Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M (1998) alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6469-6473.
- Stefanova N, Reindl M, Neumann M, Kahle PJ, Poewe W, Wenning GK (2007) Microglial activation mediates neurodegeneration related to oligodendroglial alpha-synucleinopathy: implications for multiple system atrophy. *Mov Disord* 22:2196-2203.
- Stephens B, Mueller AJ, Shering AF, Hood SH, Taggart P, Arbuthnott GW, Bell JE, Kilford L, Kingsbury AE, Daniel SE, Ingham CA (2005) Evidence of a breakdown of corticostriatal connections in Parkinson's disease. *Neuroscience* 132:741-754.
- Suh H, Consiglio A, Ray J, Sawai T, D'Amour KA, Gage F (2007) In Vivo Fate Analysis Reveals the Multipotent and Self-Renewal Capacities of Sox2(+) Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus. *Cell Stem Cell* 1:515-528.
- Takasaki Y, Deng JS, Tan EM (1981) A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation. *J Exp Med* 154:1899-1909.

- Tam CW, Burton EJ, McKeith IG, Burn DJ, O'Brien JT (2005) Temporal lobe atrophy on MRI in Parkinson disease with dementia: a comparison with Alzheimer disease and dementia with Lewy bodies. *Neurology* 64:861-865.
- Tashiro A, Zhao C, Gage FH (2006a) Retrovirus-mediated single-cell gene knockout technique in adult newborn neurons in vivo. *Nat Protoc* 1:3049-3055.
- Tashiro A, Sandler VM, Toni N, Zhao C, Gage FH (2006b) NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature* 442:929-933.
- Tatton WG, Chalmers-Redman R, Brown D, Tatton N (2003) Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol* 53 Suppl 3:S61-70; discussion S70-62.
- Toni N, Teng EM, Bushong EA, Aimone JB, Zhao C, Consiglio A, van Praag H, Martone ME, Ellisman MH, Gage FH (2007) Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat Neurosci* 10:727-734.
- Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T (2005) GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron* 47:803-815.
- Ueki T, Tanaka M, Yamashita K, Mikawa S, Qiu Z, Maragakis NJ, Hevner RF, Miura N, Sugimura H, Sato K (2003) A novel secretory factor, Neurogenesis-1, provides neurogenic environmental cues for neural stem cells in the adult hippocampus. *J Neurosci* 23:11732-11740.
- Van Broeck B, Vanhoutte G, Cuijt I, Pereson S, Joris G, Timmermans JP, Van der Linden A, Van Broeckhoven C, Kumar-Singh S (2008) Reduced brain volumes in mice expressing APP-Austrian mutation but not in mice expressing APP-Swedish-Austrian mutations. *Neurosci Lett* 447:143-147.
- van der Putten H, Wiederhold KH, Probst A, Barbieri S, Mistl C, Danner S, Kauffmann S, Hofele K, Spooren WP, Rugg MA, Lin S, Caroni P, Sommer B, Tolnay M, Bilbe G (2000) Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein. *J Neurosci* 20:6021-6029.
- van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH (1999) Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13427-13431.
- Wakabayashi K, Tanji K, Mori F, Takahashi H (2007) The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. *Neuropathology* 27:494-506.
- Wang LP, Kempermann G, Kettenmann H (2005) A subpopulation of precursor cells in the mouse dentate gyrus receives synaptic GABAergic input. *Mol Cell Neurosci* 29:181-189.
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ (1991) Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 231:482-497.
- Winner B, Cooper-Kuhn CM, Aigner R, Winkler J, Kuhn HG (2002) Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 16:1681-1689.
- Winner B, Lie DC, Rockenstein E, Aigner R, Aigner L, Masliah E, Kuhn HG, Winkler J (2004) Human wild-type alpha-synuclein impairs neurogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:1155-1166.

- Winner B, Rockenstein E, Lie DC, Aigner R, Mante M, Bogdahn U, Couillard-Despres S, Masliah E, Winkler J (2007) Mutant alpha-synuclein exacerbates age-related decrease of neurogenesis. *Neurobiol Aging*.
- Wurmser AE, Palmer TD, Gage FH (2004) Neuroscience. Cellular interactions in the stem cell niche. *Science* 304:1253-1255.
- Yamashita H, Nakamura T, Takahashi T, Nagano Y, Hiji M, Hirabayashi T, Amano T, Yagi T, Sakai N, Kohriyama T, Matsumoto M (2006) Embryonic stem cell-derived neuron models of Parkinson's disease exhibit delayed neuronal death. *J Neurochem* 98:45-56.
- Yazawa I, Giasson BI, Sasaki R, Zhang B, Joyce S, Uryu K, Trojanowski JQ, Lee VM (2005) Mouse model of multiple system atrophy alpha-synuclein expression in oligodendrocytes causes glial and neuronal degeneration. *Neuron* 45:847-859.
- Zaja-Milatovic S, Keene CD, Montine KS, Leverenz JB, Tsuang D, Montine TJ (2006) Selective dendritic degeneration of medium spiny neurons in dementia with Lewy bodies. *Neurology* 66:1591-1593.
- Zaja-Milatovic S, Milatovic D, Schantz AM, Zhang J, Montine KS, Samii A, Deutch AY, Montine TJ (2005) Dendritic degeneration in neostriatal medium spiny neurons in Parkinson disease. *Neurology* 64:545-547.
- Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atarés B, Llorens V, Gomez Tortosa E, del Ser T, Muñoz DG, de Yebenes JG (2004) The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 55:164-173.
- Zhao C, Deng W, Gage FH (2008) Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132:645-660.
- Zhao C, Teng EM, Summers RG, Ming GL, Gage FH (2006) Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 26:3-11.
- Zhou W, Milder JB, Freed CR (2008) Transgenic mice overexpressing tyrosine-to-cysteine mutant human alpha-synuclein: a progressive neurodegenerative model of diffuse Lewy body disease. *J Biol Chem* 283:9863-9870.
- Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ (1999) Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 73:2886-2892.

# Anhang

## Abbildungsverzeichnis

Abbildungen:	Seite
Abb. 1; Entstehung neu gebildeter Granulärzellneurone aus neuronalen Stammzellen der Subgranulärzellschicht im Gyrus dentatus des Hippocampus; (1) Typ I & II NPCs der Subgranulärzellschicht wandern (2) in das hiläre Drittel des Gyrus dentatus, wo sie über einen Zeitraum von etwa vier Wochen die Stadien (3-5) der Reifung von Axon, Dendriten, dendritischen spines und Synapsen durchlaufen, Afferenzen aus dem entorhinalen Cortex erhalten und Efferenzen zur CA3 Region aussenden; (Ming and Song, 2005).....	10
Abb. 2; Schematische Darstellung der adulten hippocampalen Neurogenese; zeitliche Abfolge wichtiger Entwicklungsschritte eines neu geborenen Neurons: Expression stadienspezifischer Marker, Wachstum der Neuriten und <i>spines</i> , elektrophysiologische Eigenschaften und funktionale Integration; (Zhao et al., 2008) .....	11
Abb. 3; Entstehung neuer Interneurone des OB aus NPCs der SVZ. Exemplarische Darstellung von (1) Generierung sog. <i>transit-amplifying C</i> Zellen aus dem ursprünglichen Stammzellpool der B Zellen; (2) Weiterentwicklung zu migrierenden Neuroblasten, den sog. A Zellen; (3) tangentielle <i>chain migration</i> entlang des rostralen Migrationsstroms; (4) radiale Migration und Integration als Granulärzellen und Periglomerulärzellen; (Ming and Song, 2005) .....	14
Abb. 4; Schematische Darstellung der an der im Bulbus olfactorius stattfindenden Informations-verarbeitung beteiligten Zellen; über inhibitorische dendrito-dendritische Synapsen dienen Periglomerulärzellen intraglomerulär der Signal-, interglomerulär der Kontrastverstärkung; Granulärzellen verstärken über ihre prinzipiell ähnliche Verschaltung ebenso Geruchscontraste; (Lledo et al., 2006).....	15
Abb. 5; Darstellung eines konzentrischen Lewykörperchens mit typischem eosinophilem Kern und blassem Halo in einem pigmentierten Neuron der Substantia nigra bei einem Patienten mit PD (A); Hämatoxilin/Eosinfärbung; .....	18
Abb. 6 Unterschiedliche Reifungsstadien eines LB: ungefärbtes Cytoplasma (A), zunehmende $\alpha$ -Synuclein-immunoreaktivität (B,C), Entstehung eines sog. <i>pale bodies</i> (D), <i>pale body</i> und LB in einer Zelle (E), bis zum klassischen Halo des LB (F), Immunhistochemische Färbung mit Antikörper gegen $\alpha$ -Synuclein; beide aus (Wakabayashi et al., 2007).....	18
Abb. 7; Paradigma der adulten Neurogenesestudie .....	25
Abb. 8; DCX-positive Neuroblasten-Subpopulationen der Subgranulärzellschicht des DG nach Reifestadium: frühe (a), intermediäre (b), reife Neuroblasten (c); Maßstab 20 $\mu$ m.....	31
Abb. 9; Fusionsgen mit humanem Wildtyp $\alpha$ -Synucleinelement unter der regulatorischen Kontrolle des hPDGF- $\beta$ Promotors (Masliah et al., 2000).....	35
Abb. 10; Paradigma der Analyse des temporalen Expressionsmusters von $\alpha$ -Synuclein in beiden tg Mausstämmen.....	36

Abb. 11; Paradigma zur ultrastrukturellen Analyse der Dendriten und <i>spines</i> .....	38
Abb. 12; Arbeitsschritte der ultrastrukturellen Analyse an Dendriten und dendritischen <i>spines</i> neugeborener, hippocampaler Neurone; Aufsuchen retroviral gefärbter Neurone (grün) an der Grenze von Hilus (H) und Granulärzellschicht (GCL) des Gyrus dentatus (a); konfokal-mikroskopische z-Stapelaufnahme der Zelle mit Dendriten in drei Dimensionen und Umwandlung des 3-D-Datensatzes in eine zweidimensionale Maximalintensitätsprojektion; quantitative Auswertung der Verzweigungspunkte (b); selektive Stapelaufnahme einzelner Dendritenabschnitte in der Molekularzellschicht (Mol) unter 400-facher Vergrößerung, 2-D-Dekonvolution und quantitative Analyse der <i>spine</i> -Dichte und -Qualität (c); GFP-positive Neurone (grün), DAPI-positive Zellkerne (blau); Maßstab 100µm (a), 25µm (b), bzw. 5µm (c) .....	41
Abb. 13; DCX-positive Zellprofile in Subgranulärzellschicht und hilärem Drittel der Granulärzellschicht des Gyrus dentatus bei einem Kontroll- (a) und tg mThy1 h-wt $\alpha$ -Synuclein Tier (b); Gesamtanzahl DCX-positiver Zellprofile bei Kontroll- und Versuchsgruppe (c); Maßstab 20µm .....	44
Abb. 14; Anzahl DCX-positiver Zellprofile im Gyrus dentatus nach morphologischer Unterscheidung in frühe (a), intermediäre (b) und reife Neuroblasten (c); Maßstab 20µm .....	45
Abb. 15; Zellüberleben und zelluläre Differenzierung im Gyrus dentatus des Hippocampus: Stereologische Auszählung BrdU-positiver Zellprofile (a) und daraus berechnete Dichte BrdU-positiver Zellprofile (b); Zelluläre Differenzierung BrdU-positiver Zellen in Gyrus dentatus durch Analyse der Koexpression mit spezifischen Markern neuronaler Differenzierung (c); durchschnittliche Anzahl neu gebildeter Neurone des Gyrus dentatus (d); konfokalmikroskopische Darstellung eines BrdU/NeuN doppelt-positiven Zellprofils an der Grenze von Granulär- und Subgranulärzellschicht des Gyrus dentatus (e); Maßstab 10µm .....	46
Abb. 16; Zellproliferation im Gyrus dentatus anhand stereologischer Quantifizierung PCNA-positiver Zellprofile .....	47
Abb. 17; Gesamtzahl apoptotischer, Casp-3 einfach-positiver Zellen (a), bzw. Casp-3/NeuN-doppelt positiver Neurone (b) im Gyrus dentatus; Konfokalmikroskopische Aufnahme eines Casp-3/NeuN doppelt-positiven Zellprofils im Gyrus dentatus (c); Maßstab 10µm .....	48
Abb. 18; Volumetrie des DG .....	49
Abb. 19; Zellproliferation der Subventrikularzone; stereologische Quantifizierung PCNA-positiver Zellprofile	51
Abb. 20; Zellüberleben und zelluläre Differenzierung in der Glomerulärzellschicht des Bulbus olfactorius: Stereologische Auszählung BrdU-positiver Zellprofile (a) und daraus berechnete Dichte BrdU-positiver Zellprofile in der Glomerulärzellschicht (b); Anteil dopaminerg differenzierter NPCs durch Analyse der Koexpression von BrdU und TH (c); berechnete Anzahl neu gebildeter dopaminerg Neurone, $p=0,04$ (d); BrdU/NeuN/TH dreifach-positives Zelle in der Glomerulärzellschicht des Bulbus olfactorius (e); Maßstab 20µm .....	52
Abb. 21; Zellüberleben und zelluläre Differenzierung in der Glomerulärzellschicht des Bulbus olfactorius: Stereologische Auszählung BrdU-positiver Zellprofile (a) und daraus berechnete Dichte BrdU-positiver Zellprofile (b); Anteil neuronal differenzierter NPCs (c); berechnete Anzahl neu gebildeter Neurone der Granulärzellschicht, $p=0,05$ (d) .....	53

Abb. 22; Volumina der SVZ (a) und Granulärzell- (b) bzw. Glomerulärzellschicht des Bulbus olfactorius (c) ..	54
Abb. 23; Gyrus dentatus transgener mThy1 h-wt $\alpha$ -Synuclein Mäuse: Koexpression von h-wt $\alpha$ -Synuclein mit Markern der adulten Neurogenese; Exemplarisch hervorgehoben (weißer Pfeil) sind jeweils Zellen, die ein einfach-positives Färbeverhalten für SOX2 (a), GFAP (b), DCX (c), bzw. doppelt-positives Färbeverhalten für h-wt $\alpha$ -Synuclein mit Calbindin (d), Calretinin (e) und NeuN (f) zeigen; Maßstab 10 $\mu$ m .....	55
Abb. 24; Gyrus dentatus transgener hPDGF $\beta$ h-wt $\alpha$ -Synuclein Mäuse: Koexpression von h-wt $\alpha$ -Synuclein mit Markern der adulten Neurogenese; Exemplarisch hervorgehoben (weiße Pfeile) sind jeweils Zellen, die ein doppelt-positives Färbeverhalten für $\alpha$ -Synuclein mit SOX2 (a), GFAP (b), DCX (c) und Calbindin (d) zeigen; Maßstab 10 $\mu$ m.....	57
Abb. 25; Lagebeziehung zwischen transgen exprimiertem $\alpha$ -Synuclein und GFP-gefärbten Dendriten (grün) in der Molekularzellschicht des Gyrus dentatus; fleckiges Vorkommen von $\alpha$ -Synuclein (rot) in Neuropil und intrazellulär (b, Pfeile); In direkter Umgebung der GFP-gefärbten Dendriten Akkumulation in der Nähe zu dendritischen <i>spines</i> (a, Pfeile); Koexpression von $\alpha$ -Synuclein mit Synnaptophysin in Nähe der <i>spines</i> (c, Pfeile), wie auch im Neuropil (c, Pfeilspitzen); 3D-Rekonstruktionen konfokalmikroskopischer Z-Stapel- (a,b), bzw. Einzelebenenaufnahmen (c); Maßstab 5 $\mu$ m (c), bzw. gemäß Abbildung (a,b) .....	58
Abb. 26; Analyse der mittleren Dendritenlänge (a), bzw. Dichte der dendritischen Verzweigungen (b).....	59
Abb. 27; Morphologie neu gebildeter Neurone, ihrer dendritischen Fortsätze und <i>spines</i> – hochauflösende Maximalintensitätsprojektionen (a,c,e) und Detailaufnahmen typischer GFP-markierter Dendritenabschnitte aus der Molekularzellschicht des hippocampalen Gyrus dentatus (b,d,f); im Vergleich zur Kontrollgruppe (a,b).....	60
auffallend unterschiedliche Dendritenlänge und –verzweigungsdichte, wie auch Dichte und Konfiguration dendritischer <i>spines</i> bei transgenen mThy1 (c,d), bzw. hPDGF $\beta$ h-wt $\alpha$ -Synuclein Tieren (e,f); Maßstab 50 $\mu$ m (a,c,e), bzw. 5 $\mu$ m (b,d,f) .....	61
Abb. 28; Dichte aller dendritischen <i>spines</i> (a), <i>mushroom spines</i> (b), sowie prozentuales Verhältnis der <i>mushroom spines</i> zu allen <i>spines</i> (c); Abbildung eines Dendritenabschnittes mit dendritischen <i>spines</i> (Pfeile), sowie eines <i>mushroom spines</i> (Pfeilspitze) (d); Maßstab 2 $\mu$ m.....	62
Abb. 29; Charakteristisches h-wt $\alpha$ -Synuclein Ex-pressionsmusters der untersuchten, transgenen Mausstämme mThy1 (A,G) und hPDGF $\beta$ (C,I); in situ hybridisierungen mit antisense (A,C), bzw. sense-Proben (G,H) zeigen höchste mRNA-Expression in Neocortex, Hippocampus, olfaktorischem System, Thalamus und Substantia nigra bei mThy1 Tieren, sowie Neocortex, Hippocampus und olfaktorischem System der hPDGF $\beta$ Tiere (Rockenstein et al., 2002).....	67
Abb. 30; Vergleich der neuronalen und glialen mRNA-Expression humanen und murinen wt $\alpha$ -Synucleins in primären Zellkulturen; Daten stammen von Tieren der Linien 61 (mThy1), bzw. M (hPDGF $\beta$ ) der untersuchten transgenen Mausstämme (Rockenstein et al., 2002) .....	70

## Tabellen:

Tab.1; Tabellarischer Vergleich der beiden tg h-wt $\alpha$ -Synuclein Mausstämme in bezug auf Expressionsmuster und zelluläre Expression; * Abbildungen aus {Rockenstein, 2002, p01357} .....	22
Tab. 2; Liste der verwendeten primären und sekundären Antikörper .....	37
Tab. 3; Tabellarische Übersicht der Ergebnisse der quantitativen Analyse der adulten Neurogenese der transgenen mThy1 h-wt $\alpha$ -Synuclein Maus im Vergleich zu Kontrollen, nach anatomischen Strukturen und Zellpopulationen sortiert; * signifikant unterschiedlich .....	49
Tab. 4; Tabellarische Übersicht der Ergebnisse der quantitativen Analyse der adulten Neurogenese der transgenen mThy1 h-wt $\alpha$ -Synuclein Maus im Vergleich zu Kontrollen, nach anatomischen Strukturen und Zellpopulationen sortiert; * signifikant unterschiedlich ( $p < 0,05$ ) .....	54
Tab 5; Tabellarische Übersicht sämtlicher Messwerte und Signifikanzen der Dendriten- und Spine-Analyse; sofern sich signifikante Unterschiede zwischen Untergruppen ergaben sind diese angegeben: $\diamond$ Kontrolle vs. mThy1 h-wt $\alpha$ -Synuclein tg; $\dagger$ Kontrolle vs. hPDGF $\beta$ h-wt $\alpha$ -Synuclein tg; $\ddagger$ mThy1 h- wt $\alpha$ -Synuclein tg vs. hPDGF $\beta$ h-wt $\alpha$ -Synuclein tg; .....	62
Tab. 6; Relative Veränderungen der durch adulte Neurogenese im System Subventrikularzone/Bulbus olfactorius gebildeten Zellpopulationen; Vergleich zwischen wt Tieren im Alter von 24 Monaten {Enwere, 2004, p11804} und tg mThy1 h-wt $\alpha$ -Synuclein Tieren.....	74

*Abkürzungsverzeichnis*

Abkürzung:	Genauere Bezeichnung:	eingeführt auf Seite
A53T	SNCA-Punktmutation Alanin zu Threonin an Position 53	19
A30P	SNCA-Punktmutation Alanin zu Prolin an Position 30	19
ABC/ <i>Elite</i>	Avidin-Biotinylierter-Meerrettich-Peroxidase-Complex	28
AD	Alzheimer's disease/Morbus Alzheimer	17
AK	Antikörper	27
BDNF	brain-derived neurotrophic factor	9
BMP	bone morphogenic protein	10
bp	base pair / Basenpaar	35
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin	26
Casp-3	Caspase-3	34
CMV-gp	CMV-Verstärker	39
DAB	3,3'-Diaminobenzidin	28
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochlorid Hydrat	28
DCX	Doublecortin	12
DG	dentate gyrus / Gyrus dentatus	8
DLB	lewy body dementia / Demenz vom Lewykörperchen Typ	19
E46K	SNCA-Punktmutation Glutamat zu Lysin an Position 46	19
EGF	epidermal growth factor	13
EGFR	epidermal growth factor receptor	13
FBS	Fetal bovines Serum / fetales Kälberserum	38
FGF-2	fibroblast growth factor-2	13
GABA	gamma-amino-butyric-acid	10
GFAP	glial fibrillary acidic protein	9
GCL	granule cell layer / Granulärzellschicht	10
GCs	granule cells / Granulärzellen	15
GFP	green fluorescent protein	39
GLOM	glomerular cell layer / Glomerulärzellschicht	15
h	human	19
hPDGF $\beta$	human platelet derived growth factor $\beta$	23
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium	38
IPS	Idiopathisches / sporadisches Parkinson Syndrom	17
LB	lewy bodies / Lewy-Körperchen	18
LN	lewy neurites / Lewy-Neuriten	19
LTP	Long Term Potentiation / Langzeitpotenzierung	12
m	murin	23

MIP	maximum intensity projection / Maximal-Intensitäts-Projektion	42
MOL	molecular cell layer / Molekularzellschicht	11
MWM	Morris water maze	12
NeuN	neuronal nuclear antigen	12
n.G.	nach Geburt	11
NICD	notch intracellular domain / Notch intrazelluläre Domäne	77
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat	10
NPC	neural precursor cell / Neuronale Vorläuferzelle	9
OB	olfactory bulb / Bulbus olfactorius	8
PCNA	proliferating cell nuclear antigen	31
PD	Parkinson`s disease / Parkinson-Syndrom	17
PDD	Parkinson disease dementia / Demenz vom Parkinsontyp	21
PEDF	pigmented-epithelium derived factor	14
PEI	Polyethylenimine linear	38
PFA	4% Paraformaldehyd in 0,1M Phosphatpuffer	26
PGCs	periglomerular cells / periglomeruläre Zellen	15
PSA-NCAM	polysialic neural cell adhesion molecule	12
PVA/Dabco	Polyvenylalkohol/1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan	28
RMS	rostral migratory stream / rostraler Migrationsstrom	14
SD	standard deviation / Standardabweichung	43
Shh	sonic hedgehog	9
SGZ	subgranular zone / Subgranulärzellschicht	8
SNCA	$\alpha$ -Synuclein Gen	19
spines	Dendritische Dornfortsätze	11
SVZ	Subventrikularzone	8
TBS	tris buffered saline	28
TBS++	0,25% Triton-X in 0,1M TBS	28
tg	transgen	22
TH	tyrosine hydroxylase / Tyrosinhydroxylase	33
VBM	Voxel Basierter Morphometrie	21
VEGF	vascular endothelial growth factor	10
VSV-G	Hüllglykoprotein des Vesikulären Stomatitis Rhabdovirus	39
WPRE	posttranskriptionales Regulatorelement des Woodchuck Hepatitis Virus	39
wt	wildtype	19
ZNS	Zentralnervensystem	22