

Aus dem
Medizinischen Zentrum für Nervenheilkunde der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. J. C. Krieg
Klinik für Neurologie, Direktor: Prof. Dr. W. H. Oertel

**Die dopaminerge Beeinflussung der adulten Neurogenese:
In vivo Untersuchungen im MPTP-Modell bei nicht-humanen
Primaten**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin (Dr. med.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Nils Freundlieb, geb. in Hamburg

Marburg, 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 29.
Mai 2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Rothmund

Referent: Prof. Dr. W.H. Oertel

Koreferent: Prof. Dr. E. Weihe

meinen Eltern

I. Einleitung.....	1
1. Das idiopathische Parkinson Syndrom.....	1
1.1 Epidemiologie und Kosten.....	3
1.2 Klinik.....	4
1.3 Ätiopathogenese.....	6
1.4 Therapie.....	9
1.5 Funktionelle Anatomie der Basalganglien.....	12
1.6 Experimentelle Modelle der Parkinson Krankheit.....	14
2. Adulte Neurogenese.....	16
2.1 Neurogene Zonen: die Subventrikuläre Zone.....	17
2.2 Neurogene Zonen: der Gyrus dentatus des Hippocampus.....	18
2.3 Die dopaminerge Beeinflussung der Neurogenese.....	19
2.4 Nachweismethoden.....	22
3. Ethik von Tierversuchen.....	24
4. Zielsetzung.....	27
II. Materialien und Methoden.....	28
1. Materialien und Bezugsquellen.....	28
1.1 Chemikalien.....	28
1.2 Antikörper.....	28
1.3 Versuchstiere.....	29
2. MPTP- und BrdU-Behandlung.....	29
3. Tracing Studien.....	32
4. Gewebeaufbereitung.....	32
5. Puffer und Lösungen.....	33
6. Allgemeine histologische Färbungen.....	34
7. Immunfärbungen.....	35
8. Auswertung.....	38
III. Ergebnisse.....	40
1. Die Neurogenese ist bei alten Affen verringert.....	40
2. Dopaminerge Fasern liegen in enger Nähe zu proliferierenden subventrikulären Zellen.....	42
3. Fasern aus der <i>pars compacta</i> der Substantia nigra projizieren räumlich geordnet in die Subventrikuläre Zone.....	43
4. Eine Verringerung der dopaminergen Innervation führt zu einer herabgesetzten Neurogenese.....	46
5. Die Verringerung der Neurogenese ist abhängig von dem Grad der dopaminergen Denervation.....	48
IV. Diskussion.....	50
1. Anatomie der nigrostriatalen Innervation.....	50
2. Die Funktion der nigrostriatalen Projektion prä- und postnatal.....	53
3. Räumliche Unterschiede innerhalb der SVZ.....	56
4. Funktion der dopaminergen Stimulation der Neurogenese innerhalb der SVZ.....	59
5. Ausblick.....	63
V. Abkürzungsverzeichnis.....	66
VI. Zusammenfassung.....	67
VII. Literaturverzeichnis.....	68
VIII. Danksagung.....	79

I. Einleitung

Nach dem Morbus Alzheimer ist der Morbus Parkinson, auch idiopathisches Parkinson-Syndrom (IPS) genannt, die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung und die häufigste neurologische Erkrankung der Basalganglien. Ein frühzeitiges Erkennen der Symptome ist wesentlich, um in den Krankheitsverlauf mildernd und verlangsamernd eingreifen zu können, sollten potente neuroprotektive Medikamente in naher Zukunft Realität werden (Dekosky & Marek, 2003). Dafür sind genaue Kenntnisse der Pathophysiologie gerade der frühen Krankheitsstadien und der Ursache der Frühsymptome notwendig. Um Erkenntnisse über ein prominentes Frühsymptom des IPS, einer ausgeprägten Riechstörung, zu erlangen, wurde in dieser Arbeit die Pathologie des IPS mit der adulten Neurogenese verknüpft. Adulte Neurogenese bezeichnet die Tatsache, dass im adulten Gehirn von Säugetieren einschließlich des Menschen bis ins hohe Lebensalter Nervenzellen produziert werden. Dabei soll der Hypothese nachgegangen werden, dass ein bei dem IPS entstehender Mangel des Neurotransmitters Dopamin eine verringerte Neurogeneserate verursacht, die wiederum Ursache für die Riechstörung ist.

In der Einleitung sollen die Grundlagen für die vorliegende Arbeit vorgestellt werden. Es sollen zuerst kurz die wichtigsten Fakten über das IPS zusammengefasst werden. Danach soll das Phänomen „adulte Neurogenese“ erläutert und Forschungsergebnisse, die einen Zusammenhang über das IPS und die adulte Neurogenese herstellen, vorgestellt werden. Da in dieser Arbeit nicht-humane Primaten als Tiermodell des IPS benutzt wurden, soll ein kurzer Abschnitt die damit einhergehenden ethischen Fragen beleuchten. Die Einleitung endet mit einer Beschreibung der Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.

1. Das idiopathische Parkinson Syndrom

James Parkinson veröffentlichte 1817 die Schrift „An assay on the Shaking Palsy“, in der er die grundlegenden Merkmale der Krankheitsentität der Parkinson Krankheit

durch das Beschreiben von sechs Patienten beschrieb. Interessanterweise betreute er nur einen dieser Patienten für längere Zeit, zwei waren ihm nur aufgrund ihres langsamen und nach vorne gebeugtem Gang auf den Straßen von London aufgefallen. Es ist beeindruckend, wie exakt J. Parkinson mit den damaligen, im wesentlichen auf eine genaue Anamnese und eine gute Beobachtungsgabe beschränkten Mitteln, die Krankheit, die heute seinen Namen trägt, klassifizieren konnte¹. Als ein prominenter früher Patient schilderte übrigens fast zeitgleich Wilhelm von Humboldt (1767-1835) in einigen seiner Briefe sehr plastisch seine eigenen Parkinson-Symptome, die er jedoch als ‚vorzeitiges Altern‘ diagnostizierte.

Heute wird unter dem Oberbegriff des Parkinson-Syndroms das Idiopathische Parkinson Syndrom (IPS), das familiäre Parkinson-Syndrom (derzeit bekannte Formen: PARK1 bis 8, PARK 10,11) sowie die symptomatischen und die atypischen Parkinsonsyndrome zusammengefasst. Ihnen gemeinsam ist ein Symptomenkomplex aus Bewegungsarmut (Bradykinese), Erhöhung des Muskeltonus (Rigor), einem feinschlägigen Zittern (Tremor) und nicht-motorischen Symptomen, die in unterschiedlicher Intensität und mit unterschiedlicher Progression ausgebildet sein können. Die Symptome werden im Wesentlichen hervorgerufen durch ein Defizit des Neurotransmitters Dopamin in großen Teilen des Gehirns, vor allem im Striatum. Ursache für den Dopaminmangel ist ein progredienter Untergang dopaminproduzierender (dopaminerg) Zellen in der Substantia Nigra.

Unterschiede der Krankheitsentitäten des Parkinson-Syndroms bestehen vor allem in der Ätiologie und im zeitlichen Auftreten der Symptome.

Während es beim IPS aus bisher noch ungeklärten Gründen zu einem Untergang der nigralen dopaminergen Neurone kommt, konnten bei den familiären Formen des IPS Genmutationen als Ursache identifiziert werden (Vila & Przedborski, 2004).

Symptomatische (oder sekundäre) Parkinsonsyndrome hingegen können vaskuläre oder metabolische Ursachen haben oder medikamentös ausgelöst werden. Weiterhin können sie nach Infektionen auftreten, toxisch bedingt sein oder wie z.B. im Falle von einigen Boxern posttraumatisch entstehen.

¹ Neben seiner Arbeit als Arzt war J. Parkinson seinen Zeitgenossen auch als Autor sozialistischer Schriften, als Gründungsmitglied der englischen Geology Society sowie als beinahe verurteilter Mittäter in einem Attentatsversuch auf König George III bekannt.

Zu den so genannten atypischen Parkinson-Syndromen zählen die Multisystematrophie und die Progressive Supranukleäre Ophthalmoplegie (PSP). In einer britischen Studie betrug die altersadjustierte Prävalenz für MSA 4,4 pro 100.000 Einwohner und 6,4 pro 100.000 für PSP (Schrag et al., 1999). Weitere atypische Parkinson-Syndrome sind die Corticobasale Degeneration (CBD) und spinocerebelläre Atrophien. Auch die Lewy-Body-Demenz zählen einige Autoren zu den atypischen Parkinson-Syndromen. In den aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie wird die Lewy-Body-Demenz „höchstwahrscheinlich“ als eine Verlaufsform des IPS angesehen (s. Leitlinien Parkinson-Syndrome, 2005). Alle atypischen Parkinson-Syndrome zeichnen sich durch einen wesentlich schnelleren Krankheitsverlauf sowie erhebliche nicht-motorische Begleitsymptome aus.

Im Folgenden soll ausschließlich das IPS behandelt werden. Dabei sollen in einem ersten Schritt Epidemiologie, Klinik und Therapie kurz erläutert werden. Danach soll auf die funktionelle Anatomie der betroffenen Gehirnregionen und kurz auf die Ätiopathogenese eingegangen werden.

1.1 Epidemiologie und Kosten

In Deutschland sind gegenwärtig 250 000 bis 400 000 Personen am IPS erkrankt. Die Prävalenz liegt bei 100-200 / 100.000 und steigt mit dem Alter, so liegt sie in Europa bei 1.800 / 100.000 bei über 65-Jährigen und bei 2.600 / 100.000 bei über 85-Jährigen (de Rijk et al., 2000). Die jährliche Inzidenz bei über 65-Jährigen liegt für die Entwicklung eines Parkinson-Syndroms bei 530/100.000 und für ein klinisch diagnostiziertes IPS bei 326/100.000 (Baldereschi et al., 2000).

Seit Einführung der L-Dopa-Therapie ist die Überlebenszeit um 4,5 Jahre gestiegen (Maier-Hoehn; 1983) und die Krankheitsdauer von ca. 10 Jahren auf ca. 14 Jahre angestiegen. Patienten mit IPS tragen das 4,6fache Risiko, auf eine institutionelle Pflegeeinrichtung angewiesen zu sein (Berger et al., 2000). Die jährlichen Kosten betragen nach einer schwedischen und einer britischen Studie bis zu 13.800 € pro Patient und können in weiter fortgeschrittenen Stadien, in denen eine Hospitalisierung notwendig ist, auf bis zu 29.000 € ansteigen (Hagell et al., 2002; Findley et al., 2003).

Eine Frühdiagnostik kombiniert mit einer neuroprotektiven Therapie, welche die Krankheitssymptome und ihre Folgen weiter aufschieben, mildern oder ganz verhindern könnte, würde somit nicht nur für den Patienten und sein Umfeld eine Erleichterung darstellen, sondern auch das Gesundheitssystem deutlich entlasten.

1.2 Klinik

Symptome

Als die Kardinalsymptome des IPS bezeichnet man die Bradykinese, den Rigor und den Tremor. Zusätzlich wird häufig noch die posturale Instabilität hinzugezählt. Es sind auch nicht-motorische Symptome bekannt, die häufig schon vor den motorischen Symptomen auftreten und deswegen zur Frühdiagnostik benutzt werden können.

Bradykinese

Als Bradykinese bezeichnet man die Verlangsamung der Initiation von Willkürbewegungen mit progressiver Abnahme von Geschwindigkeit und Amplitude bei repetitiven Aktionen. Gerade für die Frühdiagnose wichtig sind ein anfangs häufig einseitig vermindertes Mitschwingen des Armes beim Gehen, ein immer kleinschrittiger werdendes Gangbild mit vielen Zwischenschritten in der Wendebewegung, immer stärker werdende Starthemmungen und die Unfähigkeit, rasch anzuhalten. Eine Hypomimie und Sprechschwierigkeiten lassen beim oberflächlichen Beobachter den Eindruck entstehen, der Patient sei teilnahms- und interesselos. Die Feinkoordination verschlechtert sich und das Schriftbild wird kleiner (Mikrographie). Im weiteren Verlauf kann sich die Bradykinesie bis zu motorischen Blocks verschlechtern, während derer der Patient wie festgewurzelt nicht von der Stelle kommt, was auch als *Freezing* bezeichnet wird.

Rigor

Eine anfänglich meist erst einseitig auftretende Erhöhung des Muskeltonus (wie beim Biegen eines Bleirohrs) wird als Rigor bezeichnet. Dieser äußert sich als eine Erhöhung des Widerstandes vor allem bei passiven Bewegungen aufgrund des gleichzeitigen Anspannens antagonistischer Muskeln. Als Unterschied zur Spastik

verbleibt das Ausmaß der Tonuserhöhung gleich, unabhängig von der Dehnungsgeschwindigkeit. Der Rigor verhindert besonders feinmotorische Arbeiten.

In der klinischen Untersuchung lässt sich häufig das sog. Zahnradphänomen auslösen, eine bei einer gleichmäßig vom Untersucher veränderten Gelenkstellung auftretende plötzliche Tonusveränderung, so dass eine ruckartige Bewegungsfolge über die gesamte Bewegungstrecke entsteht. Dies mag seine Ursache in einem begleitenden Tremor haben.

Tremor

Der typische Parkinsontremor ist ein meist einseitig beginnender Ruhetremor mit einer Frequenz von 4-6 Hz, der sich bei psychischer Belastung häufig verstärkt. Er entsteht durch das alternierende Kontrahieren vorwiegend distaler antagonistischer Muskeln. Der Ruhetremor verschwindet bei Bewegung der Extremität, wird aber häufig von einem Haltetremor höherer Frequenz begleitet. Wenn über Jahre hinweg bei einem Patienten kein Tremor auftritt, sollte die Diagnose IPS überprüft werden.

Posturale Instabilität

Posturale Instabilität tritt bei Parkinson Patienten häufig als letztes der Kardinalsymptome auf. Sie lässt sich am einfachsten dadurch nachweisen, dass der Untersucher den Patienten nach Ankündigung nach hinten schubst, woraufhin der Patient die Bewegung erschwert stabilisieren kann, eventuell mit mehreren Ausfallschritten das Fallen verhindert oder sogar fiele, würde der Untersucher ihn nicht halten. Der Ausfall der Haltungsreflexe trägt zur vermehrten Fallneigung bei. Tritt eine posturale Instabilität schon am Anfang der Erkrankung auf, ist an ein atypisches Parkinson-Syndrom zu denken.

Nicht-motorische Symptome

Neben den Kardinalsymptomen gibt es noch viele vegetative, kognitive und neuropsychiatrische Symptome, von denen einige schon als Frühsymptom für die Parkinsonfrüherkrankung wichtig sind. So sind autonome Symptome wie Seborrhoe, Sialorrhoe, Störungen des Schwitzens mit Hyper- und Hypohidrose, Verstopfung und teilweise erheblicher Gewichtsverlust häufig mit dem IPS vergesellschaftet. Im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit kann es zu erektiler Dysfunktion, orthostatischer Hypotension und Dranginkontinenz kommen.

Zu den psychischen Symptomen des IPS zählen eine Verlangsamung des Denkens und eine verminderte Fähigkeit, Strategien und Denkkonzepte zu wechseln. Schon 1862 beschrieb Charcot das Auftreten einer Demenz in späten Stadien der Krankheit. Die Wahrscheinlichkeit eines Parkinson-Patienten, eine Demenz zu entwickeln, liegt bei bis zu 30% (Rajput et al., 1984). Bronnick et al. fanden in 72 % der untersuchten Patienten psychiatrische Symptome, vor allem Depression (Bronnick et al., 2005).

Als nicht-motorische Symptome, die schon früh im Krankheitsverlauf auftreten können, sind ophthalmologische Probleme wie z. B. trockene Augen und ungenügende Konvergenz beschrieben (Biousse et al., 2004).

Ein weiteres, wesentlich besser beschriebenes Frühsymptom mit bis jetzt noch ungeklärter Ätiologie ist eine Riechstörung (Hyposmie), die sich in einer erschwerten Unterscheidung ähnlicher Gerüche (reduzierte Geruchsdiskrimination) sowie im reduzierten Erkennen bestimmter Duftstoffe (reduzierte Wahrnehmungsschwelle) äußert. Schon im frühesten Krankheitsstadium konnten wesentliche Verschlechterungen des Geruchssinns dokumentiert werden (Doty et al., 1992, Tissingh et al., 2001). Auch asymptotische Verwandte von Parkinson-Patienten scheinen häufig unter Riechstörungen zu leiden. In manchen dieser hyposmotischen Verwandten wurde eine subklinische Degeneration des nigrostriatalen dopaminergen Systems nachgewiesen. Somit gilt eine Riechstörung zunehmend als präklinischer Vorhersageparameter für das spätere Auftreten eines IPS (Ponsen et al., 2004). Interessanterweise ist das reduzierte Geruchsvermögen durch Anti-Parkinson-Medikamente nicht unmittelbar zu beeinflussen. Dies lässt auf eine allenfalls indirekt mit der reduzierten dopaminergen Neurotransmission zusammenhängende Ursache schließen. Diese Arbeit soll einen möglichen Erklärungsansatz für die Riechstörung als Frühsymptom überprüfen.

1.3 Ätiopathogenese

Das hervorstechendste Merkmal des IPS ist die Degeneration des nigrostriatalen dopaminergen Pfades, wodurch ein Dopaminmangel vor allem im Striatum entsteht, der die typischen Parkinson-Syndrome Bradykinese, Rigor und Tremor erzeugt.

Folgender Pathomechanismus wird für den Zelltod der dopaminergen Neurone verantwortlich gemacht: Ein auslösendes Agens, so z.B. bestimmte toxische Stoffe oder ein mutantes α -Synuklein-Molekül, setzt eine Kaskade von sich in ihrer Wirkung ergänzenden Faktoren wie mitochondriale Dysfunktion, oxidativer Stress, proteasomale Dysfunktion, Exzitotoxizität, Neuroinflammation und Apoptose in Gang (Przedborski, 2005). Hierdurch werden c-Jun *N*-Kinasen (Hunot et al., 2004), cyclin-abhängigen Kinasen (Smith et al., 2003) und weitere Apoptose-Mechanismen (Vila et al., 2001; Höglinger et al. 2007) aktiviert. Dieses führt zu einem Absterben der dopaminergen Zellen. Der kontinuierliche und sich über Jahre hinweg ziehende Prozess degenerierender dopaminergener Neurone verursacht damit ein sich immer mehr verringerndes Dopaminniveau im ZNS. Ein dopaminergener Verlust im Striatum von mindestens 60% bis 80% führt zu der typischen Parkinson-Symptomatik (Bernheimer et al., 1973; Hornykiewicz, 1963).

Das IPS ist jedoch keine reine Dopamin-Mangel-Krankheit, da histologische Abnormalitäten auch in nicht-dopaminergen Zellgruppe wie dem noradrenergen Locus coeruleus, den serotoninergen Raphe-Kernen und dem cholinergen Nucleus basalis Meynert auftreten (Jellinger, 1991, Braak et al., 2002):

- Im Locus coeruleus, der mit lediglich ca. 3000 Neuronen die meisten noradrenergen Neuronen im Gehirn enthält, wurde bei Parkinson-Kranken abhängig von der symptomatischen Ausprägung des IPS ein Neuronenverlust zwischen 28 und 90 Prozent nachgewiesen (Jellinger, 1991). Die Veränderung der noradrenergen Transmission wird als Ursache der dementiellen und depressiven Symptomatik des IPS angesehen.
- Geringer ausgeprägt sind Verluste der serotonergen Neurone, die nahezu vollständig in einer Gruppe von Kernen in der Mittellinie des Hirnstammes liegen, den Raphe-Kernen. Verluste liegen zwischen 0 und 42 Prozent, wobei bei depressiven Patienten gewöhnlich eine höhere Schädigung zu finden ist.
- Der Zellverlust der cholinergen Neurone im Nucleus basalis Meynert sowie im Nucleus tegmenti pedunculopontinus und dem Nucleus Westphal-Edinger wird für die dementielle Symptomatik und Abnormalitäten des Ganges und der Haltung verantwortlich gemacht.

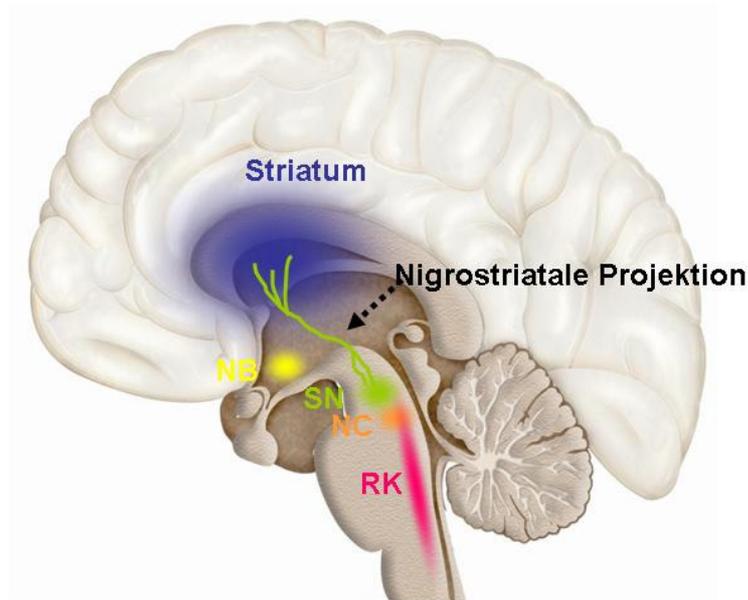


Abb. 1:
Schema der Degenerationsorte bei der Parkinson-Krankheit.
Für eine bessere Übersicht sind die Kerngebiete auf einen midsagittalen Schnitt projiziert.
SN: Substantia nigra; NC: Nucleus coeruleus;
RK: Raphe-Kerne; NB: Nucleus basalis Meynert
Erstellt mit freundlicher Hilfe von O. Arias-Carrion

Der Vollständigkeit halber sei noch erwähnt, dass für eine definitive, auch histopathologisch gesicherte Diagnose neben dem Verlust vor allem nigrostriataler Neurone auch der Nachweis von Lewy-Körperchen (Lewy bodies, LBs) und/oder Lewy-Neuriten (LN) gefordert wird. LBs sind sphärische, eosinophile zytoplasmatische Aggregate verschiedenster Proteine, so vor allem α -Synuklein, Parkin, einige Neurofilamente und Ubiquitin. Hauptkomponente scheint das α -Synuklein zu sein (Dauer et al., 2003). LN sind spindel- oder fadenförmige Einschlusskörperchen in den Zellfortsätzen. LBs und LN sind in jeder betroffenen Hirnregion zu finden. Die Funktion der LBs im pathogenetischen Prozess des IPS ist noch unklar. Braak et al. benutzen die räumliche Verteilung der LBs und der LN für eine histologische Stadieneinteilung des IPS (Braak et al., 2002).

1.4 Therapie

Trotz intensiver Forschung ist die Ursache der Degeneration der Substantia Nigra mit dem daraus folgenden nigrostriatalen Dopaminmangel noch unbekannt. Somit kann eine Therapie derzeit nur symptomatisch im Ausgleichen des Dopaminmangels liegen.

Trotzdem soll vorangestellt werden, dass für den Patienten ein optimales Ergebnis neben der medikamentösen Behandlung auch eine psychosoziale, physiotherapeutische und logopädische Betreuung -soweit notwendig- angestrebt werden muss. Weiterhin sollte nicht vergessen werden, dass auch das nahe Umfeld des Erkrankten aufgrund der langen Krankheitsdauer häufig sehr belastet wird.

Die symptomatische Behandlung des Morbus Parkinson basiert auf der Substitution des striatalen Dopamin-Defizits, das durch die neurodegenerativen Prozesse präsynaptisch entsteht. Dies ist nur so lange möglich, bis auch die Dichte der präsynaptischen dopaminergen Nervenendigungen im Striatum unterhalb eines kritischen Niveaus fällt. Dieser im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung auftretende Zustand verursacht manche Wirkungsveränderungen der Pharmakotherapie, denen dann durch einen Wechsel der Medikamente Rechnung getragen werden muss.

L-Dopa

Da Dopamin selbst nicht durch die Blut-Hirn-Schranke dringt, wird dessen Vorstufe L-Dopa zusammen mit einem peripheren Dekarboxylase-Hemmer verwendet. Zusammen bilden sie den Goldstandard für die Behandlung des IPS². L-DOPA (mit einem Dekarboxylase-Hemmer) ist als Monotherapie allen anderen Parkinson-Medikamenten in seiner symptomatischen Wirkung überlegen, verzögert jedoch nicht den Krankheitsprogress und trägt selbst zur Entstehung von Therapiekomplicationen in späteren Krankheitsstadien bei. Weiterhin von Nachteil ist die fehlende Spezifität zum nigrostriatalen System, welches Nebenwirkungen wie psychiatrische Veränderungen (z.B. Halluzinationen) und vegetative Störungen (z.B. orthostatische

² Für die erste wirksame und rational begründete Therapie einer neurologischen Erkrankung erhielt im Zusammenhang mit der Entwicklung der Therapie mit L-DOPA A. Carlsson im Jahr 2000 den Nobelpreis für Medizin

Hypotension) verursachen könnte (Javoy-Agid & Agid, 1980). Ein Nachteil der Therapie mit L-DOPA ist, dass ab einer Therapiedauer von etwa 5 Jahren die Wirksamkeit von L-DOPA nachlässt, so dass fast 75% der Patienten keine gleichmäßige und effektive Antwort auf das Medikament mehr zeigen (Fahn et al., 1999). In diesem Stadium kommt es zum Auftreten von Wirkfluktuationen, welche initial dem schwankenden Plasmaspiegel von L-DOPA folgen, später aber auch ohne Bezug zum Plasmaspiegel auftreten. Andererseits gilt als gesichert, dass durch die Einführung der L-Dopa-Therapie die Lebenserwartung von Parkinson-Patienten durch die Vermeidung krankheitsbedingter Komplikationen wie Stürze und Aspirationspneumonien deutlich gestiegen ist.

Dopamin-Agonisten

In Deutschland stehen derzeit 8 Dopamin-Agonisten für die Behandlung des Morbus Parkinson zu Verfügung. Man teilt diese in Ergot- und Non-Ergot-Derivate ein. In placebokontrollierten Studien konnte sowohl die Wirksamkeit der symptomatischen Monotherapie der neuen Präparate nachgewiesen werden. Auch zeigte sich bei einer frühen Kombinationstherapie mit L-DOPA eine Besserung der mit L-DOPA-assoziierten Fluktuationen sowie eine geringere Anzahl und Dauer von Dyskinesien. So konnten Studien zeigen, dass die initiale Monotherapie mit Dopamin-Agonisten oder die frühe Kombination von L-Dopa mit Dopamin-Agonisten das Auftreten von Dyskinesien und anderen motorischen Komplikationen hinausschiebt (Parkinson Study Group 2000; Storch et al., 2005; Oertel et al., 2006).

Erste Hinweise auf eine Verlangsamung des Krankheitsverlaufes durch eine Agonistentherapie (LeWitt et al., 2004) könnten die Bedeutung dieser Medikamente in Zukunft eventuell noch verstärken. So scheint unter Dopamin-Agonisten-Therapie eine Abnahme der nigrostriatalen Funktion geringer zu sein als unter L-Dopa-Gabe, was auf einen protektiven Effekt der Medikamente weist (Whone et al., 2003; Wooten, 2003). Als wesentliche Nebenwirkungen ist auf Übelkeit, orthostatische Dysregulation, Beinödeme, Psychosen sowie einer vermuteten vermehrten Tagesmüdigkeit und Fibrosen hinzuweisen. Besonders Herzklappenfibrosen wurden bei mit Ergot-Dopamin-Agonisten, nicht jedoch mit Non-Ergot-Agonisten behandelten Patienten nachgewiesen (Van Camp et al., 2004; Junghanns et al., 2007).

MAO-B- und COMT-Inhibitoren

Auch über die Hemmung der beiden Dopamin-abbauenden Enzyme Monoaminoxidase B (MAO-B) und Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT) kann die Konzentration von Dopamin im synaptischen Spalt erhöht werden. In Deutschland sind zurzeit die COMT- Inhibitoren Entacapon und Tolcapon erhältlich, für die vor allem bei der Behandlung von Wirkungsfluktuation einer L-DOPA-Therapie eine Wirksamkeit nachgewiesen wurde³.

Der Effekt einer Therapie mit MAO-B-Hemmern auf die Symptome des IPS ist nur gering ausgeprägt (Elizan et al., 1989), jedoch werden neuroprotektive Eigenschaften von Selegilin und besonders Rasagilin diskutiert (Tabakman et al., 2004).

NMDA-Antagonisten

Die NMDA-Antagonisten Amantadin und Budipin hemmen einen beim IPS vorliegenden relativen Überschuss der glutamatergen kortikostriatalen Neurotransmission. Sie werden vor allem bei der Behandlung von L-DOPA-assoziierten Dyskinesien sowie zur Tremorbehandlung eingesetzt. Bei Budipin ist als Nebenwirkung eine Verlängerung der QT-Zeit mit dem Risiko lebensgefährlicher Herzrhythmusstörungen beschrieben, was eine engmaschige kardiologische Kontrolle erfordert.

Anticholinergika

Anticholinergika sind die ältesten Parkinson-Medikamente, deren Wirksamkeit auf der Wiederherstellung der gestörten Balance zwischen dem striatalem Acetylcholin und Dopamin begründet sein soll. Trotz fehlender Studien werden Anticholinergika vor allem bei vorherrschendem Ruhetremor eingesetzt. Da kognitive Dysfunktionen und dementielle Prozesse durch eine anticholinerge Therapie noch weiter verschlechtert werden, sollten Anticholinergika nur bei starken vegetativen Symptomen oder bei einem mit der Standardtherapie nicht beherrschbaren Tremor eingesetzt werden.

³ Aufgrund schwerer Hepatitiden mit Todesfolge bei einigen Patienten (Assal et al., 1998) ruhte die Zulassung von Tolcapon bis Anfang 2005, nach einer erneuten Evaluierung der Datenlage wurde es jedoch wieder zugelassen. Trotzdem sollten die Leberwerte (Transaminasen) bei einer Tolcapon-Therapie regelmäßig kontrolliert werden.

Chirurgische Verfahren

Bei der tiefen Hirnstimulation schalten stereotaktisch implantierte Elektroden präzise mittels Hochfrequenzstimulation Zielgebiete reversibel aus (Limousin et al., 1995). Erste 5-Jahres-Studien belegen eine anhaltende Wirkung für die Stimulation des Nucleus subthalamicus. Weitere Stimulationsorte wie der Globus pallidus oder der Nucleus ventralis intermedius des Thalamus werden nur in besonderen Fällen benutzt. Der Vorteil der tiefen Hirnstimulation liegt in der individuell anpassbaren elektrischen Stimulation. Obwohl erste Ergebnisse auf eine geringe Letalität oder bleibenden schweren Morbidität zwischen 0,5 und 3% wiesen (Leitlinien Parkinson-Syndrome 2005), zeigen aktuelle Studien einen wesentlich höheren Anteil an schwersten Nebenwirkungen (Deuschl et al., 2006), so dass eine chirurgische Intervention nur bei sehr sorgfältig ausgewählten Patienten als letzte Maßnahme nach Versagen aller medikamentösen Hilfen eingesetzt werden sollte.

1.5 Funktionelle Anatomie der Basalganglien

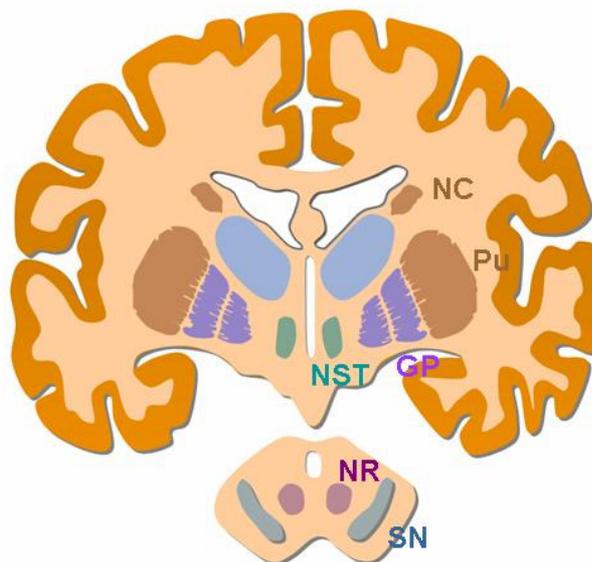


Abb. 2: Schema der Basalganglien in einem coronaren Schnitt
NC: Nucleus caudatus; Pu: Putamen; beide zusammen bilden das Striatum
GP: Globus pallidus; NST: Nucleus subthalamicus; NR: Nucleus ruber
SN: Substantia nigra

Erstellt mit freundlicher Hilfe von O. Arias-Carrion

Das IPS betrifft vor allem die Basalganglien, deren funktionelle Anatomie im Folgenden kurz beschrieben werden soll. Zu den Kernen der Basalganglien zählen Striatum (durch die Fasern der Capsula interna in den Nucleus caudatus und das Putamen geteilt), Globus Pallidus mit einem internen und einem externen Segment, Nucleus subthalamicus, Nucleus ruber und die Substantia nigra (SN) mit ihren zwei Teilen pars compacta und pars reticularis. Vier von ihnen bilden einen Regelkreis zur Bewegungssteuerung: das Striatum, der Globus pallidus, die SN und der Nucleus subthalamicus. In diesem Regelkreis werden Bewegungsinitiationen aus dem Kortex bearbeitet, Störimpulse herausgefiltert und Bewegungen vor allem hinsichtlich Ausmaß, Richtung, Kraft und Geschwindigkeit gesteuert. Beim IPS gerät dieser Regelkreis durch das Absterben der nigralen dopaminergen Neurone aus dem Gleichgewicht, wodurch die motorischen Symptome entstehen.

Grundlagen für eine eingehende Erforschung der Substantia Nigra und seiner umliegenden Kerngebiete legten Dahlström und Fuxe im Jahr 1964. Sie markierten mit einer histochemischen Methode alle monoaminergen (und damit auch der dopaminergen) Zellgruppen im Hirnstamm der Ratte und nummerierten diese von kaudal nach kranial durch (Dahlström & Fuxe, 1964). Im Mittelhirn (Mesenzephalon) identifizierten sie drei Hauptgruppen dopaminproduzierender Zellen: das peri- und retrorubrale Feld (A8), die SN (A9) und das Ventrale Tegmentale Areal (VTA, A10). Zellen der Gruppe A8 liegen im lateralen Tegmentum kaudal vom Nucleus ruber. Ventromedial verschmilzt diese Gruppe mit der Gruppe A9. Diese enthält etwa 75% der dopaminergen mesenzephalen Zellen und entspricht in etwa dem nach morphologischen Kriterien als Pars compacta bezeichneten Teil der SN. Die Gruppe A10 liegt medial von der SN und ventral vom Nucleus ruber und wird ventral vom Nucleus interpeduncularis begrenzt. Die Mehrzahl der Zellen der Gruppe A10 liegt somit innerhalb des durch morphologische Kriterien definierten ventralen tegmentalen Areals (VTA). Die exakten anatomischen Grenzen der einzelnen Gebiete wurden später im Primatenhirn nach Verteilung der Nissl-positiven Neurone (Francois et al., 1985) oder nach der Immunreaktivität für Dopamin (Arsenault et al., 1988) bestimmt.

Bezüglich der von den drei Arealen innervierten Regionen ist bekannt, dass Axone aus A8 vor allem den ventrokaudalen Teil des Putamens erreichen. Auch der ventrale Teil von A9 sendet dopaminerge Fasern in den sensomotorischen Teil des Striatums und versorgt damit zusammen mit A8 das Putamen mit Dopamin. Der dorsale Teil von A9

innerviert hingegen vor allem den assoziativen Teil des Nucleus caudatus. Dopaminerge Zellen aus A10 sind vor allem für die Innervation des Nucleus accumbens und den ventro-medialen Teil des Striatums verantwortlich (Francois et al. 1999). Alle mesenzephalen Gruppen projizieren also hauptsächlich zu einem spezifischen Teil des Striatums, partizipieren aber zusätzlich durch ein weites Aussprossen auch zu einem kleinen Anteil an der Innervation des restlichen Striatums. Ob und in welcher Weise auch der am weitesten medial gelegene Teil des Striatums innerviert wird, sollte im Rahmen dieser Arbeit erforscht werden.

1.6 Experimentelle Modelle der Parkinson Krankheit

Obwohl die Parkinsonkrankheit nur beim Menschen auftritt, konnten Tiermodelle etabliert werden, die wesentliche Aspekte wie z.B. den Verlust an dopaminerger Innervation verlässlich reproduzieren können.

Hierfür werden neben transienten pharmakologischen Manipulationen (z.B. durch Reserpin), chirurgischen Eingriffen und genetischen Veränderungen vor allem neurotoxische Modelle verwendet, die zu einer präferentiellen Zerstörung dopaminerger Neurone des Mittelhirns führen. Bei letzterem spielen vor allem 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP), 6-Hydroxydopamin (6-OHDA), Rotenon und Annonacin eine führende Rolle. Hier soll nur auf den Pathomechanismus von MPTP näher eingegangen werden soll, da MPTP in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde.

1979 wurde erstmals bei mehreren kalifornischen Drogenabhängigen, die sich ein neuartiges „synthetisches Heroin“ injiziert hatten, ein schweres und irreversibles Parkinson-Syndrom berichtet, welches gut auf eine L-Dopa-Therapie reagierte (Davis et al., 1979). Nach einer chemischen Analyse des „synthetischen Heroins“ wurde vier Jahre später neben dem eigentlichen Wirkstoff Meperiden auch MPTP gefunden und als pathogener Faktor vorgeschlagen (Langston et al., 1983). Dieser entsteht, wenn bei der Synthese von Meperiden nicht langsam und mit niedriger Wärmezufuhr gearbeitet wird. Zusätzlich konnten die Autoren noch im gleichen Jahr von einem Parkinson-Syndrom bei einem mit MPTP arbeitenden Chemiker berichteten (Langston &

Ballard, 1983). MPTP zeigte jedoch bei den typischen Versuchstieren, den Ratten, keine oder nur eine sehr geringe neurotoxische Wirkung, so dass erst bei der Verwendung von nicht-menschlichen Primaten die selektive destruktive Wirkung von MPTP auf dopaminerge Neurone beschrieben werden konnte (Burns et al., 1983). Seitdem gilt MPTP als Goldstandard der experimentellen Parkinson-Modelle.

Nach systemischer Administration flutet MPTP aufgrund seiner hohen Lipophilie schnell im Gehirn an, wird in den Astrozyten durch das Enzym Monoaminoxidase B (MAO-B) zu 1-Methyl-4-phenyl-1,2-dihydropyridiniumion (MPDP⁺) umgesetzt und dann spontan zu 1-Methyl-4phenyl-pyridiniumion (MPP⁺) oxidiert. Aus den Gliazellen freigesetzt, wird MPP⁺ über den Dopamin-Transporter in dopaminergen Zellen akkumuliert (Javitch et al., 1985). MPP⁺ wird dann entweder durch das Transportprotein VMAT-2 in synaptosomale Vesikel transportiert oder akkumuliert in den Mitochondrien (Singer et al., 1987), bindet dann an den Komplex I der Atmungskette (Nicklas et al., 1985) und stoppt damit den Elektronentransport, was zu einem ATP-Mangel in der Zelle und zu einem Anstieg von freien Radikalen und damit zu einem Absterben der dopaminergen Neurone führt.

Nachteilig am MPTP-Modell ist die Tatsache, dass im Gegensatz zum IPS keine Degeneration des Locus coeruleus oder der Raphekerne und damit auch kein verringertes Niveau an Noradrenalin und Serotonin auftritt. Außerdem fehlt den Tieren als wesentliches motorisches Symptom des IPS der Ruhetremor fast immer. Zusätzlich werden keine LB oder LN gebildet. Herauszuheben ist zusätzlich, dass die ein- oder mehrmalige Injektion von MPTP ein akutes oder bestenfalls subakutes Degenerationsmodell darstellt und damit in keiner Weise den langsam progredienten Verlauf des IPS simulieren kann.

2. Adulte Neurogenese

Aristoteles berichtete schon 300 v. Chr., dass Eidechsen ganze Gliedmaßen und Taubenküken sogar ihre Augen regenerieren können (s. Odelberg, 2004). Trotz der Behauptung Spallanzanis 1769, dass Schnecken sogar ihren Kopf regenerieren können⁴, wurde hinsichtlich höhergestellter Wirbeltiere jedoch bis in die zweite Hälfte des zwanzigsten Jahrhunderts von einer wesentlich eingeschränkteren Regenerationsfähigkeit ausgewachsener Organe ausgegangen. Insbesondere bezüglich des zentralen Nervensystems galt, dass Neurone, einmal in der frühen Entwicklung gebildet, nur noch dem frühen oder späten Untergang geweiht sind. So schrieb der große Neuropathologe Santiago Ramon y Cajal 1928: „(..)Once development was ended, the fonts of growth and regeneration of the axons and dendrites dried up irrevocably. In adult centres the nerve paths are something fixed, ended, immutable. Everything may die, nothing may be regenerated(..)“ (Ramon y Cajal, 1928). Diese von einigen Forschern als „no-new-neuron-Dogma“ bezeichnete Festlegung verlangsamte die Forschung über Plastizität im zentralen Nervensystem über ein halbes Jahrhundert. Wie beinahe jedes Organ besitzt jedoch auch das Gehirn von Säugetieren in beschränktem Umfang die Fähigkeit, über die gesamte Lebensspanne hinaus neue Parenchymzellen zu produzieren. Erste Ergebnisse dieser so genannten „adulten Neurogenese“ wurde schon 1962 von J. Altman publiziert (Altman, 1962), aber erst mit der histologischen Identifizierung von neuronalen Stammzellen in adulten Gehirn (Reynolds & Weiss, 1992; Kilpatrick & Bartlett, 1993) gewann die Forschung über adulte Neurogenese an Momentum. So konnte 1997 erstmals unzweifelhaft die adulte Neurogenese im Gyrus dentatus des phylogenetisch mit den Primaten in der Gruppe Euarchonta eingestuften Spitzhörnchen (*Tupaia belangeri*) nachgewiesen werden (Gould et al., 1997), worauf 1998 eine Studie zum Nachweis adulter Neurogenese bei Menschen mindestens bis zu einem Alter von 72 Jahren erschien (Eriksson et al., 1998).

Die kontinuierliche Produktion von Neuronen unter physiologischen Umständen ist bei Säugetieren wahrscheinlich nur auf wenige, besonders spezialisierte Areale

⁴ Dies führte laut Zeitzeugen im späten achtzehnten Jahrhundert zu einem beispiellosen Angriff auf Schnecken seitens der Öffentlichkeit.

beschränkt, die als neurogene Zonen bezeichnet werden: die Subventrikuläre Zone (SVZ) sowie die Subgranuläre Zone (SGZ) im Gyrus dentatus des Hippocampus (HC).

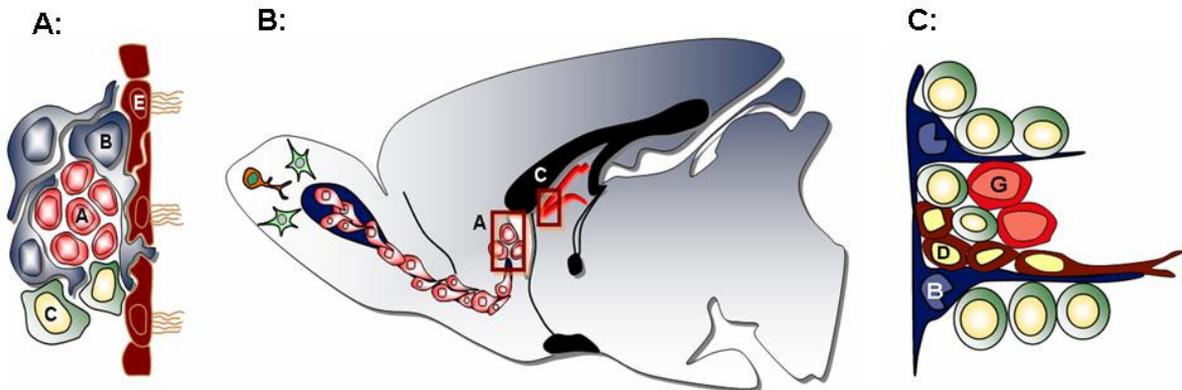


Abb. 3: Schema der neurogenen Zonen

A: Schema des histologischen Aufbaus der subventrikulären Zone (SVZ). B-Zellen produzieren die C-Zellen, die die Neuroblasten (A-Zellen) erzeugen. Die SVZ wird durch das Ependym E vom Ventrikel abgegrenzt.

B: Sagittalschnitt durch ein Mäusehirn. In der SVZ (A) gebildete Neuroblasten wandern entlang des Rostralen Migratorischen Stroms (RMS) in den Riechkolben, um sich dort in Neurone auszdifferenzieren. Neugebildete Zellen im Hippocampus verbleiben dort.

C: Schema der Subgranulären Zone (SGZ). Radiale Astrozyten (B) erzeugen D-Zellen (D), die sich wiederum teilen und sich über Zwischenstufen in Zellen der Granulären Schicht differenzieren (G-Zellen).

Erstellt mit freundlicher Hilfe von O. Arias-Carrion

2.1 Neurogene Zonen: die Subventrikuläre Zone

Die **Subventrikuläre Zone (SVZ)** ist eine wenige Zell-Lagen breite Schicht lateral der seitlichen Ventrikel direkt unterhalb des Ependyms und medial des Striatums. In Nagetieren wurde folgender Proliferationsablauf postuliert, der dann auch auf Primaten übertragen wurde: Stammzellen mit Astrozyten-ähnlichen Eigenschaften und einem geringen Mitoseindex, sog. B-Zellen, produzieren die „transiently amplifying progenitor cells“ oder C-Zellen, die einen sehr hohen Teilungsindex besitzen. Die C-Zellen wiederum bringen die neuralen Vorläuferzellen, die Neuroblasten oder A-Zellen, hervor (Doetsch et al., 1997; Doetsch, 2003). Die Neuroblasten wandern entlang eines definierten Weges, dem Rostralen Migratorischen Strom (RMS), in den Riechkolben (*bulbus olfactorius*, BO) (Lois & Alvarez-Buylla, 1994, Kornack & Rakic, 2001,

Curtis et al., 2007). Obwohl ein Teil der in den BO einwandernden Zellen durch Apoptose abstirbt (Biebl et al., 2000), differenzieren sich die restlichen Neuroblasten in drei verschiedene Typen von Interneuronen und integrieren sich in schon vorhandene neuronale Netzwerke in zwei verschiedenen Schichten, der granulären Zellschicht und der periglomerulären Zellschicht. 95% der neuen Neurone finden sich in der granulären Schicht und benutzen Gamma-Aminobuttersäure (gamma-aminobutyric acid, GABA) als Transmitter, die verbleibenden 5% integrieren sich in der periglomerulären Schicht und sind größtenteils auch GABAerg. Ca. 0.5% der Population an neuen Neuronen benutzen jedoch auch Dopamin als Neurotransmitter (Gall et al., 1987; Winner et al., 2002).

Ein gezieltes Stimulieren der Produktion dieser dopaminergen Neurone könnte eine zukünftige Therapieoption des IPS darstellen. In jungen adulten Ratten werden einige zehntausend Zellen pro Tag im adulten BO generiert und überleben auch bis zu 2 Jahre nach einer Markierung mit BrdU (Winner et al., 2002). Riechen spielt bei Nagern eine wesentliche Rolle in der Regulierung der Neurogenese im BO (Petreanu & Alvarez-Buylla, 2002). Die neuen Neurone scheinen sich auch funktionell zu integrieren. So führt im Tiermodell die Stimulation von Riechnerven zu Aktionspotentialen in den neu integrierten Interneuronen (Belluzzi et al., 2003) und eine Erhöhung oder Verringerung der Zahl neugeborener Neurone führt zu einer verringerten bzw. erhöhten Leistung des Riechgedächtnisses (Gheusi et al., 2000; Rochefort et al., 2002; Scotto-Lomassese et al., 2003). Diese Funde bekräftigen die Hypothese, dass eine bei dem IPS verringerte Neurogenese verantwortlich sein könnte für eine Riechstörung, die häufig bereits im frühen Krankheitsverlauf beobachtet wird.

2.2 Neurogene Zonen: der Gyrus dentatus des Hippocampus

Im Gyrus dentatus des HC werden relativ zur SVZ wesentlich weniger Neurone produziert, die aus einer anthropozentrischen Sicht jedoch funktionell wesentlich wichtiger sein können, da der HC als „Tor zum Gedächtnis“ deklarative Informationen prozessiert und evaluiert, bevor diese für lange Zeit in neokortikalen Regionen gespeichert werden. Das Langzeit-Gedächtnis wird als wesentliche Voraussetzung

angesehen für menschliche Leistungen wie Bewusstsein und dem Gefühl einer relativ stabilen Identität über längere Zeitspannen.

In vivo residieren die neuronalen hippocampalen Vorläuferzellen in der Subgranulären Zone (SGZ), einer hoch vaskularisierten, dünnen Zellschicht zwischen der granulären und der plexiformen Schicht des Gyrus dentatus. Die SGZ enthält neben den angenommenen Stammzellen mit Astrozyten-ähnlichen Eigenschaften auch neuronale und gliale Vorläuferzellen sowie Neurone in unterschiedlichen Entwicklungsstadien (Seri et al., 2004; Filippov et al., 2003; Ambrogini et al., 2004). Ähnlich wie die Nomenklatur in der SVZ werden unterschiedliche Zellpopulationen unterschieden: radiale Gliazellen teilen sich und erzeugen die so genannten D1-Zellen (den „*transiently amplifying precursor cells*“), die sich wiederum teilen und über Zwischenstufen (D2, D3) in postmitotische granuläre Zellen ausreifen (Seri et al., 2004). Diese integrieren sich in die granuläre Schicht und übernehmen funktionelle Aufgaben. So konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass neue granuläre Zellen funktionierende Verbindungen zu umliegenden Zellen aufbauen und elektrophysiologische Antworten zeigen, die sehr ähnlich denen der umliegenden Zellen sind (Van Praag et al., 2002, Carlen et al., 2002). Neurogenese im HC wurde in verschiedenen Studien verantwortlich gemacht für mnestiche Funktionen mit Betonung des räumlichen Gedächtnisses (Malberg et al., 2000, Santarelli et al., 2003). Weiterhin wird eine verringerte hippocampale Neurogenese in Verbindung gebracht mit Depressionen: Patienten mit einer „Major Depression“ können einen atrophierten HC besitzen (Sheline et al., 1996), Antidepressiva erhöhen im Tierversuch die Neurogeneserate und verlieren ihre klinische Wirksamkeit, wenn die Neurogenese gehemmt ist (Malberg et al., 2000, Santarelli et al., 2003).

2.3 Die dopaminerge Beeinflussung der Neurogenese

Schon früh konnte gezeigt werden, dass die adulte Neurogenese durch externe und interne Faktoren beeinflussbar ist. Dies weckte die Hoffnung, durch genaue Kenntnisse der Stimulationsmechanismen die Bildung neuer Nervenzellen für Reparaturen in einem pathologisch degenerierten Gehirn zu nutzen. So wurden die unterschiedlichsten die Neurogenese beeinflussenden Faktoren identifiziert, wie z. B.

Stress, Sexualhormone, eine stimulierende Umwelt und körperliche Bewegung, Ischämie oder Geruch (Gould et al., 1997; Lenington et al., 2003; Kempermann et al., 1997; Tonchev et al., 2005; Rochefort et al., 2002). Als stärkster bekannter negativer Faktor für die Neurogeneserate wurde das Alter identifiziert: Während ein relativ hohes Niveau postnatal und in früher Jugend vorherrscht, nimmt die Neurogeneserate mit zunehmendem Alter fast hyperbolisch ab, ohne jedoch vollkommen zu verschwinden (Seki & Arai, 1995; Eriksson et al., 1998; Quinones-Hinojosa et al., 2006).

Weiterhin werden die SVZ und der HC von vielen Hirnregionen mit unterschiedlichen Transmittern innerviert. Für einige Botenstoffe konnte eine Beeinflussung der Neurogenese gezeigt werden. So scheint eine Blockierung der NMDA-Rezeptoren die Neurogenese zu verstärken (Bernabeu & Sharp, 2000). Eine Läsion im basalen Vorderhirn und damit einer Verringerung der cholinergen Innervation führt zu einer verringerten Neurogenese (Cooper-Kuhn et al., 2004). Die serotonerge Innervation hingegen scheint die Neurogenese im HC und der SVZ zu erhöhen (Brezun & Daszuta, 1999). Auch eine vermehrte Freisetzung von Noradrenalin erhöht die hippocampale Neurogeneserate durch eine höhere Überlebensrate der neugeborenen Zellen (Rizk et al., 2006) Für die vorliegende Arbeit am wichtigsten sind die Auswirkungen des Neurotransmitters Dopamin auf die Neurogenese. Erkenntnisse bezüglich des dopaminergen Einflusses auf die Proliferation innerhalb der neurogenen Zonen sollen im Folgenden vorgestellt werden.

Vorangestellt werden muss, dass Dopamin die Nervenzellen durch mindestens 5 verschiedene Rezeptoren stimuliert, die in zwei Gruppen mit häufig sehr unterschiedlicher Wirkung eingeteilt werden können: Die D1L-Subgruppe (D1 und D5) und die D2L-Subgruppe (D2, D3, D4) (Missale et al., 1998).

Im Rattenmodell führt eine Läsion der dopaminergen Innervation der SVZ durch 6-OHDA zu einer verringerten Zellproliferation, welche durch Administration von Levodopa oder Ropirinol, einem Agonisten für D2 und D3-Rezeptoren, wieder aufgehoben wird (Höglinger et al., 2004). Auch ohne vorangegangene dopaminerge Denervierung führt die Administration des D3-Rezeptor-Agonisten 7-OH-DPAT, zu einem Anstieg der Zahl neugeborener Vorläuferzellen in der SVZ *in vivo* (van Kampen et al., 2004). Dies kann *in vivo* durch die gleichzeitige Behandlung mit SB-277011-A, einem D3-Rezeptor-Antagonisten, wieder teilweise rückgängig gemacht

werden (van Kampen et al., 2004). Auch *in vitro* zeigt sich der Effekt reversibel durch die gleichzeitige Gabe von Sulpirid, einem Antagonisten der D2L-Rezeptorgruppe oder U-99194-A, einem selektiven Antagonisten des D3-Rezeptors (Coronas et al., 2004). Somit scheint bei Ratten der D3-Rezeptor für die dopaminerge Stimulation der Zellproliferation in der SVZ zu sorgen, unabhängig, ob vorher eine dopaminerge Läsion vorlag oder nicht.

Bei Mäusen ist die Datenlage etwas anders: Eine temporäre dopaminerge Denervation durch MPTP führt zu einer temporären Verringerung der Zellproliferation in der SVZ (Höglinger et al., 2004). Ebenso führt eine dopaminerge Läsion durch 6-OHDA zu einer verringerten Zellproliferation (Baker et al., 2004). Jedoch scheint bei Mäusen eine Stimulation der Neurogenese ohne vorausgegangene Läsion nicht über den D3-Rezeptor zu funktionieren, da die Administration von 7-OH-DPAT zu keinem Anstieg der Proliferation bei unlädierten Tieren führt, und auch U-99194-A, ein D3-Rezeptor-Antagonist, zu keiner Veränderung der Proliferation führt. Auch *knockout*- Mäuse für den D3-Rezeptor zeigen keinen Unterschied in der Zellzahl (Baker et al., 2005). Die Aktivierung eines der Rezeptoren der D2-Rezeptor-Subgruppe scheint jedoch stimulierende Wirkung auf die Zellteilung zu haben, da der Agonist der D2L-Rezeptorgruppe Bromocriptin in SVZ-Zellkulturen konzentrationsabhängig zu einem Anstieg der Zellproliferation führt, was durch die gleichzeitige Behandlung durch Sulpirid, einem Antagonisten der D2L-Rezeptorgruppe, wieder aufgehoben werden konnte (Höglinger et al., 2004). Somit scheint auch bei Mäusen ein Rezeptor der D2L-Subgruppe, aber nicht der D3-Rezeptor, für eine Stimulation der Zellproliferation verantwortlich zu sein.

Die Datenlage über eine dopaminerge Beeinflussung der Neurogenese bei nicht-menschlichen Primaten und beim Menschen ist noch spärlich. Höglinger et al. konnten zeigen, dass *post mortem* in Gehirnen von Parkinson-Patienten die Anzahl proliferierender Zellen in den neurogenen Zonen vermindert ist (Höglinger et al., 2004). Da jedoch alle beobachteten Patienten verschiedene Therapieregime erhielten und eventuell an Komorbiditäten litten, lässt sich diese Aussage nicht sicher verallgemeinern. Eine sichere Aussage über die positive Beeinflussung der adulten Neurogenese durch Dopamin auch bei Primaten konnte vor Durchführung der hier vorgestellten Arbeit nicht gemacht werden.

2.4 Nachweismethoden

Um neu gebildete Zellen nachzuweisen und damit a) die Existenz von neurogenen Zonen im adulten Individuum und b) deren Regulationsmöglichkeit nachzuweisen, wurden verschiedenen Methoden etabliert, die hier kurz vorgestellt werden sollen.

Die meisten Zellmoleküle befinden sich in einem konstanten Austausch; nach Abschluss der Zellteilung stellt die Desoxyribonucleinsäure (DNS) hingegen das wahrscheinlich stabilste Molekül innerhalb einer Zelle dar. Bei der Mitose wird die DNS dupliziert und bleibt danach relativ unverändert. Wenn zum Zeitpunkt der Zellteilung charakteristische Nukleosid-Derivate in der Zelle vorhanden sind, die dann in die DNS integriert werden, lassen sich diese zu einem späteren Zeitpunkt immunohistochemisch oder autoradiographisch nachweisen. Dadurch kann der Entstehungszeitpunkt der Zelle und damit auch das Alter der Zelle bestimmt werden.

Die ersten Studien, welche sich dieses Prinzips zur Markierung von DNS experimentell bedienen, benutzten mit Tritium radioaktiv markiertes Thymidin, welches den Versuchstieren systemisch injiziert wurde und von Zellen in der S-Phase aufgenommen und permanent in die DNS eingebaut wurde (Messier et al., 1958). Post mortem wurden dann Gewebsschnitte hergestellt und die Strahlung der markierten Thymidin-Moleküle durch eine Schwärzung einer Photoplatte nachgewiesen. Wesentliche Nachteile dieser Methode liegen darin, dass eine genaue dreidimensionale Rekonstruktion und somit die Doppelmarkierung einer Zelle mit anderen Markern nicht möglich ist. 1993 wurde eine nicht-radiographische Technik zum Nachweis von neu gebildeten Nervenzellen vorgestellt: Ein Thymidinanalog namens Desoxyuridin wurde mit Brom zu 5-bromo-2-deoxyuridin (BrdU) verknüpft, welches post mortem immunohistochemisch mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden kann (Corotto et al., 1993). BrdU kann in Kombination mit anderen Markern in einer sehr hohen räumlichen Auflösung mithilfe des konfokalen Laserscannmikroskops nachgewiesen werden. BrdU gilt deshalb als Goldstandard in der Neurogeneseforschung, obwohl die Autoradiographie sehr sensitiv und spezifisch ist (Rakic, 2002). Ein Argument gegen die BrdU-Methode ist, dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass hiermit auch apoptotische Vorgänge oder DNS-Reparaturmechanismen nachgewiesen werden (Rakic, 2002; Borta und Höglinger, 2007). So kann der Apoptose unter bestimmten Umständen vorausgehen ein abortiver

Versuch der Zellen, in den Zellzyklus einzusteigen und BrdU in die DNS einzubauen (El-Khodor et al., 2003; Höglinger et al., 2007). Auch während eines Reparaturvorganges oder einer Endo-Replikation der DNS kann es zu einem Einbau von BrdU kommen, da die DNS-Polymerase aktiv ist (Nowakowski & Hayes, 2000; Chase & Tolloczko, 1987). Bei einer Zellverschmelzung eines Neurons mit einer proliferierenden Gliazelle kann es zur falsch positiven Detektion kommen (Alvarez-Dolado et al., 2003; Borta & Höglinger, 2007). Um mögliche Falschaussagen zu vermeiden, wird BrdU meistens mit einer weiteren, unabhängigen Nachweismethode kombiniert.

Als BrdU-unabhängige Nachweismethode eignet sich z.B. die Transfektion von proliferierenden Zellen mit einem Retrovirus, um in den Tochterzellen die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) anzuregen. Einzelne neu gebildete Neuronen können dann histologisch nachgewiesen werden (Carlen et al., 2002).

Zusätzlich wurden Antikörper gegen endogen exprimierte Proteine entwickelt, die mit der Zellteilung assoziiert sind, so gegen PCNA (proliferating cell nuclear antigene) oder gegen mKi67. PCNA ist ein 36 kDa großes Protein, welches als Hilfsprotein der delta-DNA-Polymerase in der frühen G1- und S-Phase der Mitose exprimiert wird (Hall et al., 1990). Obwohl eine (seltene) Expression bei Zellreparaturen nicht ausgeschlossen werden kann, wird es häufig als Nachweismethode für proliferierende Zellen benutzt. mKi67 ist ein Protein, welches in der späten G1-,S-, G2- und M-Phase exprimiert wird, und durch den Antikörper Ki67 nachgewiesen wird (Scholzen & Gerdes, 2000). Im Unterschied zu den vorher beschriebenen markierten Nukleinsäuren markieren PCNA und Ki67 Proteine von Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme teilen.

Auch Antikörper gegen Proteine, die vor allem in jungen, noch nicht ausdifferenzierten Zellen exprimiert werden, können hilfreich sein. Häufig wird hierfür ein Antikörper gegen PSA-NCAM (polysialic acid – neural cell adhesion molecule) verwendet. Sowohl im Hippocampus als auch in der SVZ wird es von jungen, migrierenden Neuronen, den A-Zellen, exprimiert (Doetsch et al., 1997). Jedoch muss bedacht werden, dass es auch auf reaktiven Neuroglia nachgewiesen wurde (Oumesmar et al., 1995).

Da sowohl BrdU als auch mit Tritium markiertes Thymidin zytotoxisch ist, verbietet sich deren Gebrauch beim Menschen zum alleinigen Nachweis der Neurogenese. Ein völlig neues Konzept, welches auf dem Nachweis von in der Atmosphäre vorhandenem C14 beruht, umgeht diese Schwierigkeiten: Die überirdische Testung von Atombomben in den 60er und 70er Jahren des vergangenen Jahrhunderts führte zu einem erheblichen Anstieg des atmosphärischen C14, welches sonst in relativ geringen Mengen über lange Zeiträume konstant vorhanden ist. Nach dem Vertrag zum Verbot von Nuklearwaffentests 1963 nahm das Niveau an C14 durch die Aufnahme in Pflanzen exponentiell ab und wird sich in Zukunft wieder normalisieren. In Individuen, die während der Schwankung des C14-Gehalts leben, führen unterschiedliche Konzentrationen an dem durch die Nahrung aufgenommenen C14 zu unterschiedlichen Konzentrationen an in die DNS eingebautem C14. Somit lässt sich das Alter der Zelle durch massenspektrometrische Untersuchungen *post mortem* bestimmen (Spalding et al., 2005; Bhardwaj et al., 2006).

Alle hier geschilderten Nachweismethoden haben den entscheidenden Nachteil, dass die neuen Nervenzellen erst *post mortem* nachgewiesen werden können. So kann man bislang nicht im Zeitlauf die Proliferation, Migration und Differentiation von Stammzellen an einem individuellen Tier sequentiell darstellen. Zuverlässige nicht-invasive *in-vivo*-Nachweismethoden existieren noch nicht, obwohl erste Versuche mittels MRT vorgestellt wurden (Huddleston et al., 2005, Jiang et al., 2005).

3. Ethik von Tierversuchen

Die Durchführung von Tierversuchen wird von Seiten der Öffentlichkeit aus ethischen Gründen und unter Berufung auf das Tierschutzgesetz (TierSchG §1 „...Niemand darf einem Tier ohne vernünftigen Grund Schmerzen, Leiden oder Schäden zufügen...“) teilweise heftig kritisiert. Es wurden verstärkt Bemühungen unternommen, um die Anzahl der Tierversuche zu reduzieren und diese teilweise durch alternative Methoden, wie *in-vitro*-Modelle, Gewebekulturen oder Computersimulationen, zu ersetzen. Diese unterstützenswerte Entwicklung stößt jedoch schnell an ihre Grenzen: Während Zell-Zellkontakte und physiologische Eigenschaften mit Gewebekulturen oder Computersimulationen bis ins Detail erforscht werden können, stellen komplexe pathophysiologische Mechanismen wie die Krankheitsentität IPS des Menschen

jegliche Modellversuche vor unlösbare Probleme. Das Zusammenspiel unterschiedlicher Hirnregionen, in denen pathologische Prozesse häufig miteinander mannigfaltig vernetzt ihren Gang nehmen, kann auch mit Hochleistungscomputern nicht simuliert werden. Um ein System zu simulieren, müssen dessen Gesetzmäßigkeiten bekannt sein, was bei der Neurogenese nicht der Fall ist. Um Modelle zu schaffen, die Voraussetzungen für klinische Studien an humanen Patienten mit IPS darstellen können, sind Tiermodelle häufig unerlässlich. Tiermodelle bieten die Voraussetzung, aus einer Fülle von möglichen beeinflussenden Faktoren einzelne herauszuheben und nahezu isoliert zu betragen. Die Möglichkeit der Überwachung und Kontrolle verschiedenster Parameter vor, während und nach der Durchführung eines Tierversuches schafft die nötige Voraussetzung für eine Reproduzier- und Überprüfbarkeit der Versuche.

Die benutzten Spezies reichen von Insekten wie *Drosophila melanogaster* (Whitworth et al., 2006), über Nager wie Ratte oder Maus hin zu nichtmenschlichen Primaten. Nagetiere werden am häufigsten als Tiermodelle für das IPS verwandt, weil sie als Säugetiere dem Menschen als gemeinsame Mitglieder der Überordnung Euarchontoglires taxonomisch relativ nahe stehen und wegen der kurzen Replikationszeit und der relativ einfachen Tierhaltung geeignet sind für Arbeiten, die eine große Anzahl an Säugetieren erfordern. Nachteile bestehen z.B. in der unterschiedlichen Vulnerabilität gegenüber Neurotoxinen und einer imperfekten Homologie der klinischen Symptome. Während über die meisten taxonomischen Ordnungsgrenzen hinweg die adulte SVZ und SGZ als hauptsächliche Quelle neu gebildeter Nervenzellen akzeptiert sind, scheint sich das Schicksal der dort gebildeten Neuroblasten zwischen Nagern und Primaten sehr zu unterscheiden. Während so z. B. pathologische Stimuli wie eine ischämische Läsion bei Nagern zu einem Auswandern von neugeborenen Zellen in Fokusrichtung führen, konnte dies bei Primaten nicht nachgewiesen werden (Arvidsson et al., 2002; Tonchev et al., 2005). Dies zeigt, dass Erkenntnisse bezüglich der Neurogenese nicht direkt vom Nager auf Primaten übertragen werden können.

In den meisten Studien werden relativ junge Tiere benutzt. Der stärkste bekannte negative Beeinflussungsfaktor der Neurogenese ist jedoch das Alter. Das IPS tritt hauptsächlich im späten Lebensalter auf, so dass der nichtmenschliche Primat im fortgeschrittenen Lebensalter als optimales experimentelles Modellsystem gilt.

Um Erkenntnisse über die humane adulte Neurogenese unter den pathologischen Umständen der Parkinson-Krankheit zu gewinnen, die einerseits die nötigen Voraussetzungen einer reproduzierbaren und definierbaren experimentellen Umgebung und andererseits die größte Wahrscheinlichkeit der Übertragbarkeit auf den Menschen bieten, gibt es zum jetzigen Zeitpunkt kein anderes Modell als das Primatenmodell. Unter der Voraussetzung, dass konkret und zielorientiert Erkenntnisse zur Verringerung oder Verhinderung menschlichen Leidens gesucht werden und das Leiden und die Anzahl der dafür benötigten Tiere auf ein Mindestmaß reduziert wird, scheinen dem Autor dieser Arbeit auch Versuche mit Primaten ethisch vertretbar. In dieser Arbeit sollen die Ursachen bisher unverstandener pathologischer Vorgänge der Parkinson Krankheit wie dem Frühsymptom Riechstörung erforscht werden und Voraussetzungen für eine eventuelle zukünftige Stimulation endogener Reparaturmechanismen geschaffen werden.

4. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist, den Einfluss von Dopamin auf die Neurogenese bei alten Primaten zu überprüfen. Dieser Versuch soll ein Modell des menschlichen IPS darstellen, da bei dieser Erkrankung eine erhebliche Reduzierung des dopaminergen Niveaus entsteht. Bei dem IPS tritt als Frühsymptom eine Riechstörung auf. In dieser Arbeit soll der Hypothese nachgegangen werden, dass der Zusammenhang zwischen der verringerten dopaminergen Innervation und der Riechstörung in einer verringerten Neurogenese in der SVZ liegt. Grundlegend für diese Arbeit sind folgende zwei Sachverhalte: a) im adulten Gehirn von Säugetieren werden bis ins hohe Alter hinein aus Vorläuferzellen neue Nervenzellen gebildet, und b) diese neuen Nervenzellen übernehmen funktionelle Aufgaben. So konnte im Tierversuch nachgewiesen werden, dass eine verringerte Neurogenese zu einer verringerten Riechleistung führt.

Um eine mögliche Verknüpfung zwischen einer verringerten dopaminergen Innervation und einer verringerten Riechleistung zu überprüfen, müssen folgende, bisher noch unbewiesene Einzelhypothesen verifiziert werden:

- 1) Unterscheidet sich die SVZ zwischen alten und jungen Primaten?
- 2) Gibt es eine direkte dopaminerge Innervation der SVZ im Primaten?
- 3) Hat eine solche Innervation funktionelle Auswirkungen auf die Neurogenese, insbesondere auch bei Primaten im hohen Lebensalter?
- 4) Ist die Innervation räumlich organisiert und beeinflusst unterschiedliche Areale der SVZ in unterschiedlichen Maßen?

Eine Beantwortung dieser Fragen würde neue Erkenntnisse zur Pathogenese der IPS liefern und möglicherweise eine Erklärung für ein klinisch bedeutsames Frühsymptom bieten. Eine bessere Charakterisierung der Regulationsmechanismen adulter Neurogenese bietet weiterhin Ansatzpunkte, das körpereigene Regenerationspotential in der Zukunft therapeutisch nutzbar zu machen.

II. Materialien und Methoden

1. Materialien und Bezugsquellen

1.1 Chemikalien

1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP)	Sigma, St. Louis, MO
Biotin Dextran Amin (BDA)	Sigma, St. Louis, MO
5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU)	Sigma, St. Louis, MO
Diaminobenzidin (DAB)	VectorLaboratories, Burlingame, CA
Ziegenserum (Normal Goat Serum; NGS)	Sigma, St. Louis, MO
Pferdeserum (Normal Horse Serum; NHS)	Sigma, St. Louis, MO
Avidin+Biotin (Vectastain)	VectorLaboratories, Burlingame, CA

1.2 Antikörper

Primäre Antikörper	Verdünnung	Produzent
Ratte anti BrdU	1:200	ImmunologicalsDirect, Oxfordshire, UK
Maus anti PCNA	1:500	Dako, Glostrup, Dänemark
Maus IgM anti PSA-NCAM	1:400	Chemicon, Temecula, CA
Kaninchen anti Tyrosin	1:500	Pel-Freez, Compiègne, Frankreich
Hydroxylase (TH)		
Kaninchen anti Dopamin	1:500	Chemicon, Temecula, CA
transporter (DAT)		
Kaninchen anti Dopamin-beta	1:500	Chemicon, Temecula, CA
Hydroxylase		
Maus anti Ki67	1:100	Novocastra, Newcastle, United Kingdom
Sekundäre Antikörper	Verdünnung	Produzent
Cy3 konjugiertes Ziegen anti	1:200	Jackson Laboratories, West Grove, PA
Ratte IgG		
FITC konjugiertes Ziegen anti	1:200	Jackson Laboratories, West Grove, PA
Ratte IgG		

biotinyliertes Ziege anti Maus IgM	1:1000	Chemicon, Temecula, CA
biotinyliertes Schaf anti Maus IgG	1:200	Chemicon, Temecula, CA
Cy3 konjugiertes Ziege anti Kaninchen IgG	1:200	Jackson Laboratories, West Grove, PA
FITC konjugiertes Ziege anti Kaninchen IgG	1:200	Jackson Laboratories, West Grove, PA

1.3 Versuchstiere

Alle Tierexperimente wurden gemäß der European Council Direktive aus dem Jahre 1986 (86/609/EEC) durchgeführt. Die Tierexperimente wurden in den Räumen der Tierversuchsanstalt des Hôpital Pitie-Salpetrière durchgeführt. Die Experimente waren von der zuständigen lokalen Tierschutzbehörde genehmigt. Die Tiere wurden unter Standardkonditionen (12-stündige Licht-Dunkel-Wechsel, 23°C, 50% Luftfeuchte) gehalten. Ihr Alter wurde durch das Alter bei Fang zuzüglich der Dauer in Gefangenschaft sowie entsprechend ihres Zahnstatus und ihrer Fellfarbe bestimmt.

Für die Tracing-Studien wurden drei Äthiopische Grünmeerkatzen (*Clorocebus aethiops*) benutzt, die zwischen 4 und 6 Jahre alt waren und zwischen 5,5 und 6,5 kg wogen. Um die Auswirkung der dopaminergen Denervation zu studieren, wurden sechs Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) verwendet, die zwischen 20 und 25 Jahre alt waren und zwischen 8,0 und 15,0 kg wogen. Zwei junge Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) mit einem Gewicht von 3,5 bzw. 4,0 kg und einem Alter von 4 bzw. 6 Jahren wurden benutzt, um die altersabhängigen Veränderungen der SVZ zu charakterisieren.

Anzahl	Deutscher Name	Lateinischer Name	Alter	Gewicht
3	Äthiopische Grünmeerkatze	<i>Clorocebus aethiops</i>	4 – 6 Jahre	5,5 – 6,5 kg
6	Rhesusaffen	<i>Macaca mulatta</i>	20 – 25 Jahre	8,0 – 15,0 kg
2	Javaneraffen	<i>Macaca fascicularis</i>	4 – 6 Jahre	3,5 – 4,0 kg

Alle Tiere wurden bei BioPrim, Baziège, Frankreich erworben und waren zuvor für keinerlei Experimente benutzt worden.

2. MPTP- und BrdU-Behandlung

Um die proliferierenden Zellen zu markieren, wurde sechs zwischen 20 und 25 Jahre alte Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) das Thymidin-Analog 5-Bromo-2-Deoxyuridin (BrdU) unter Anästhesie mit 10mg/kg Körpergewicht (KG) Ketamin injiziert. Dafür wurde BrdU in einer Lösung zu 5mg/ml in 0,9%NaCl mit 7mM NaOH gelöst und mit 40mg BrdU/kg KG injiziert. Damit auch die sich nur selten teilenden Vorläuferzellen markiert werden, wurde BrdU zehnmal in zwei- bis dreitägigen Abständen über eine dreiwöchige Periode injiziert, so dass eine kumulative Dosis von 400mg BrdU/kg KG erreicht wurde.

Identifikation der MPTP-Versuchstiere

Bezeichnung	Gewicht	MPTP	
		Anzahl von Injektionen à 0,4 mg/kg KG	Kumulative Gesamtdosis (mg/kg KG)
MMv1	15,5 kg		
MMv2	8,5 kg		
MMv3	11 kg		
MMv4	8,5 kg	6	2,4
MMv5	12,4 kg	5	2,0
MMv6	10 kg	4	1,6

Einzig von MMv6 war ein genaues Alter von 21 Jahren bekannt. Das genaue Alter der anderen Tiere war nicht bekannt, da sie nicht in einer Versuchsanstalt geboren wurden. Aber alle Tiere lebten für mindestens 15 Jahre in einem pharmazeutischen Labor und waren zum Zeitpunkt ihrer Gefangennahme ungefähr 5 Jahre alt.

Um eine profunde und stabile dopaminerge Denervation zu erreichen, wurden drei der sechs Rhesusaffen zusätzlich 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (MPTP) (0,4mg/kg KG, aufgelöst in sterilem NaCl *ad injectabilia*) in 2-3-tägigen Abständen intramuskulär (i.m.) unter Anästhesie durch Ketamin (10mg/kg KG) injiziert. Dies entspricht einem etablierten Schema (Elsworth et al., 1987), welches geringfügig abgewandelt wurde, indem die Intervalle zwischen den Injektionen leicht verlängert wurden, da ältere Tiere eine höhere Empfindlichkeit gegenüber MPTP zeigen. Jeden zweiten bis dritten Tag wurde das motorische Verhalten der intoxikierten Tiere von der gleichen Person nach einem standardisierten Schema evaluiert. Je 0 bis 3 Punkte konnten für folgende sieben Parameter vergeben werden, so dass eine maximale Punktzahl von 21 Punkten erreichbar waren: Spontane Aktivität im Käfig, Haltung, Gleichgewicht, Ernährung, Bradykinesie und Tremor (modifiziert nach Schneider & Kovelowski, 1990). Zusätzlich wurden die Tiere während der Nahrungsaufnahme für je 15 Minuten gefilmt. Die MPTP-Injektionen wurden bis zum Erreichen eines stabilen Parkinson-Syndroms wiederholt, so dass 4 bis 6 Injektionen pro Tier und damit eine kumulative Dose von 1,6 bis 2,4 mg/kg KG erreicht wurde. Drei weitere zwischen 20 und 25 Jahre alte Kontrollaffen erhielten identische Volumina an 0,9% NaCl injiziert. Zwei der drei intoxikierten und alle Kontrolltiere wurden 5 Wochen nach der letzten MPTP oder NaCl-Injektion durch eine tödliche Dosis an Ketamin getötet und mit 2l 0,9% NaCl-Lösung transkardial perfundiert. Ein MPTP-intoxikiertes Tier zeigte schon in der dritten Woche nach der ersten MPTP-Injektion so starke Beeinträchtigungen, dass es 22 Tage nach der ersten MPTP-Injektion durch eine tödliche Dosis an Ketamin geopfert wurde.

Nach der Perfusion wurden die Gehirne entnommen, mitsagittal in zwei Hemisphären geteilt und diese dann durch koronare Schnitte weiter in kleinere Gewebeblöcke von etwa 1cm Dicke geschnitten. Die Blöcke der linken Hemisphäre wurden für ca. 10 min auf Trockeneis zwischengelagert und direkt danach bei -80°C in Plastiksäckchen gelagert, um diese biochemischen Analysen zugänglich zu machen. Die Blöcke der rechten Hemisphäre wurden für 3 Tage in 0,1 M PBS mit 4% Paraformaldehyd (PFA) und 5% Succrose postfixiert, anschließend für einen Tag in 0,1 M PBS mit 10% Succrose gewaschen und dann in zwanzigprozentiger Succrose mit 0,1 M PBS für

weitere 2 Tage gelagert, wonach die Blöcke bei -80°C bis zur weiteren Benutzung in Plastiksäckchen aufbewahrt wurden.

3. Tracing Studien

Um den Ursprung der dopaminergen Innervation der SVZ zu bestimmen, wurde der anterograde Tracer Biotin Dextran Amin (BDA) in das Mittelhirn von drei Äthiopischen Grünmeerkatzen (*Chlorocebus aethiops*) injiziert. Nach einer tiefen Anästhesie durch i.m. Injektionen von Ketamin (10mg/kg KG) wurden die Tiere für den weiteren Verlauf der Operation durch eine intratracheale Intubation mit 1% Fluothan und 50% Nitrogen Protoxid und 50% Sauerstoff in Anästhesie gehalten. Nach dem Platzieren in einen stereotaktischen Apparat wurde BDA (10% in 0,1 M PBS) iontophoretisch in 6,8 μ A-Pulsen einer Dauer von je 7 s in Intervallen von 7 s über einen 10-Minuten-Zeitraum in den drei Affen in verschiedenen Gehirnareale injiziert: a) der posterolaterale Teil der SN pars compacta (SNpc), b) der anteromediale Teil der SNpc und c) das retrorubrale Feld. Die exakten stereotaktischen Injektionen wurden durch die radiologische Visualisierung anatomischer Anhaltspunkte (Ventrikel, sowie die Commissura anterior (CA) und Commissura posterior (CP)) ermöglicht (Percheron et al., 1986). Zehn bis 12 Tage später wurden die Tiere wie oben beschrieben anästhesiert und in einem stereotaktischen Apparat unter Röntgensicht je ein Röhrchen vertikal in jede Hemisphäre senkrecht zu einer gedachten Ebene durch die CA und CP eingeführt. Anschließend wurden die Tiere durch eine Überdosis an Ketamin getötet und transkardial perfundiert mit 0,5 l heparinierter steriler NaCl-Lösung und 5 l steriler NaCl-Lösung mit 4% PFA und 2,5% Succrose. Anschließend wurde das Gewebe mit 1 l eiskaltem 0,1 M PBS mit 5% Succrose fixiert. Das Gehirn wurden aus dem Schädel entfernt, für einen Tag in 10% Succrose und für zwei weitere Tage in 20% Succrose getränkt und anschließend bei -80°C gelagert.

4. Gewebeaufbereitung

Herstellen von Gewebeschnitten

Die Gehirnblöcke wurden für die histologischen Färbungen auf einem Schlittenmikrotom in 50 μ m dicke Schnitte für das Tracing-Experiment und in 40 μ m dicke Schnitte für das MPTP-Experiment geschnitten. Hierfür wurden die Gehirnblöcke mit 30% Succrose auf einer mit Trockeneis und Ethanol gekühlten Metallplatte fixiert. Diese Metallplatte wurde in dem unter der Klinge verschiebbaren Schlitten befestigt. Das Kühlen der Metallplatte und des Blockes während des Schneidens erfolgte mittels Trockeneis. Die Schnitte wurden dann in mit 0,1 M PBS mit 0,2% Natriumazid gefüllten Plastikschalen bei 4°C gelagert.

Gelatinieren der Objektträger

3,5 g Gelatine und 0,35 g Chromkaliumsulfat wurden unter Erwärmung auf 60°C in 700 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gelöst. Im Wasserbad wurde die Gelatinelösung auf 50°C abgekühlt. Die Objektträger werden zum Entfetten kurz in 70% Ethanol getaucht, anschließend zweimal in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ und dann für einige Sekunden in die Gelatinelösung. Nachdem die Objektträger für 2 Stunden an der Luft getrocknet wurden, wurden sie ein zweites Mal

in die Gelatinelösung getaucht. Nach dem Trocken waren die Objektträger gebrauchsfertig.

5. Puffer und Lösungen

PB	H ₂ O dest.	10 l
10 l	Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	230 g
	NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	52,44 g
PBS	0,1 M PO ₄ ³⁻ -Puffer	500 ml
1 l	NaCl	8,8 g
	KCl	0,2 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
Tris HCl-Puffer	Tris	121,1 g
1 l	H ₂ O _{dest.}	1000ml
	pH 7,5 mit HCl einstellen	
TBS	Tris 1 M	500 ml
2 l	NaCl	17,6 g
	KCl	0,4 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 2000 ml
Boratpuffer	Borsäure	3,09 g
450 ml	H ₂ O _{dest.}	ad 450 ml
	pH 8,5 mit 5 N NaOH einstellen	
DAB – Färbelösung	Tris	20 ml
20 ml	DAB	10 mg
	H ₂ O ₂	2 µl
DAB Ni – Färbelösung	Tris	20 ml
20 ml	DAB	10 mg
	Ni	40 mg
	H ₂ O ₂	2 µl

4 % Paraformaldehyd:

4 g Paraformaldehyd wurden in 50 ml H₂O_{dest} nach Zugabe von 100 µl 10 N NaOH unter ständigem Rühren und Erwärmen auf 70°C gelöst. Nachdem sich das Paraformaldehyd vollständig gelöst hatte, wurden 50 ml 0,2 M PB hinzu gegeben und die Lösung durch einen Faltenfilter filtriert.

30% Saccharose-Lösung

400ml	Saccharose	150g
	0,1 M PB	400ml

Gelatine-Lösung

700ml	Gelatine	3,5 g
	Chromkaliumsulfat	0,35g
	H ₂ O _{dest}	700ml

6. Allgemeine histologische Färbungen

Nissl- Färbung

Die fixierten Gehirnschnitte wurden auf mit Gelatine beschichteten Objektträgern fixiert und für mindestens 2 Std. an der Luft getrocknet. Nach einem kurzen Bad in Xylen durchliefen die Schnitte eine absteigende Ethanolreihe. Ausgehend von einem 1:1 Ethanol/H₂O_{dest.}-Gemisch verweilten die Objektträger über Nacht in einer 100% Ethanollösung, wonach sie für jeweils 1-2 min in 90% (2x) und 70% Ethanol getaucht wurden. Nach einem kurzen Bad in H₂O_{dest.} wurde die Färbung mittels Inkubation in einer 1,5%igen Kresylviolettlösung durchgeführt. Die Einwirkzeit betrug 30 sec. Nachdem die Objektträger kurz in H₂O_{dest.} gewaschen wurden, durchliefen die Schnitte eine aufsteigende Ethanolreihe (70%, 90%, 100% (2x)), worauf zwei Bäder in Xylen folgten. Eine potentielle Über- bzw. Unterfärbung wurde durch weitere Alkoholbäder bzw. Wiederholen der Prozedur korrigiert. Die Schnitte wurden dann mit dem Eindeckmittel Eukitt (Labonord, Villeneuve d'Ascq, Frankreich) eingedeckelt.

DAPI-Färbung

Die fixierten Gehirnschnitte wurden auf mit Gelatine beschichteten Objektträgern montiert. Auf die noch feuchten Schnitte wurde mit einer Pipette 200µl DAPI (4'-6-diamino-2-Phenylindol, 50µg/ml, Roche, Meylan, Frankreich) getropft. Bei Raumtemperatur und im Dunkeln erfolgte eine Inkubation über 5 min, wonach die Objektträger 8 x 5 min in TBS gewaschen wurden und mit PVA-DABCO eingedeckelt wurden. Sowohl das Waschen als auch das anschließende Lagern erfolgte in Dunkeln.

Sudanschwarz

Um die unspezifische Hintergrundfluoreszenz zu verringern, wurden einige Immunfluoreszenz-markierten Schnitte nach dem Antrocknen auf mit Gelatine

beschichteten Objektträgern mit Sudanschwarz anfärbt. Dafür wurden ca. 150 µl gefiltertes Sudanschwarz mittels einer Spritze direkt auf das Gewebe getropft und für 5 min inkubiert. Nach einem zweiminütigen Bad in 70% Ethanol wurden die Schnitte acht Mal in PBS gewaschen und anschließend mit PVA-DABCO gedeckelt. Auch hier erfolgte das Prozedere sowie das anschließende Lagern im Dunkeln.

BDA

Für die BDA-Färbung wurden die Schnitte für eine Stunde in 1% Triton X-100 in 0,1 M PBS vorbehandelt und dann für zweimal je 24 Stunden mit dem Avidin Biotin Complex (ABCkit, Elite, Vector; 1:100 in 0,1 M PBS mit 1% Triton X-100) bei 20°C inkubiert. Zwischen den beiden Inkubationsschritten wurden die Schnitte in Tris-HCL-Puffer gewaschen. Zur Visualisierung wurden die Schnitte in Tris-Puffer mit 0,05% DAB, 0,2% Nickel und 0,06% Hydrogen-Peroxid für 5-10 min behandelt. Die Reaktion wurde durch mehrmaliges Waschen in Tris-Puffer gestoppt, worauf die Schnitte auf mit Gelatine beschichteten Objektträgern aufgezogen und mit PVA-DABCO gedeckelt wurden.

7. Immunfärbungen

Da die Schnitte für die Immunfärbungen freischwimmend in einer 0,1 M PBS-Lösung mit 0,2% NaN₃ gelagert wurden, erfolgte jegliche Färbung erst nach 3 x 8 min Waschungen in TBS. Wenn nicht anders angegeben, erfolgten alle Schritte bei Raumtemperatur.

Die mit Peroxidase konjugierten Sekundärantikörper wurden mit der DAB-Färbelösung sichtbar gemacht. Hierzu wurde 1-10 min in der Lösung inkubiert, wonach die Schnitte mehrfach in TBS/PBS gewaschen, in einer Petrischale mit 0,9% NaCl auf mit Gelatine beschichteten Objektträgern aufgezogen und mit Eukitt (Labonord, Villeneuve d'Ascq, Frankreich) gedeckelt wurden.

TH- Färbung

Inhibition der endogenen Peroxidase	TBS 0,25 M 3% H ₂ O ₂ 20% Methanol		15 min
Gewebepерmeabilisation	TBS 0,25 M 0,2% Triton X 100		15 min
Blockierungslösung	TBS 0,25 M 3% NGS 0,2% Triton X 100		30 min
Inkubation des Primärantikörpers	Maus anti-TH TBS 0,25 M 1% NGS 0,02% Thimerosal	1:500	48 h, 4°C
Inkubation des Sekundärantikörpers	TBS 0,25 M anti-Maus IgG biotinyliert	1:250	30 min

Materialien und Methoden

Amplifikation	TBS 0,1 M Avidin + Biotin	1:250	1h
---------------	------------------------------	-------	----

Zwischen allen Schritten erfolgte je dreimaliges Waschen in TBS 0,25 M für je 8 min.

BrdU- Färbung

Denaturierung der DNS	HCl 2 N Boratpuffer 0,1 M		30 min, 37°C 2 x 5 min
Inhibition der endogenen Peroxidase	TBS 0,25 M 3% H ₂ O ₂ 20% Methanol		15 min
Blockierungslösung	TBS 0,25 M 3% NGS 0,2% Triton X 100		30 min
Inkubation des Primärantikörpers	Ratte anti BrdU PBS 0,1 M 5% NGS 0,2% Triton X 100	1:200	48 h, 4°C
Inkubation des Sekundärantikörpers	FITC-konjugiertes anti Ratte IgG PBS 0,1 M	1:200	2 h

Zwischen allen Schritten erfolgte je sechsmaliges Waschen in PBS 0,1 M für je 5 min.

PCNA Färbung

Vorbehandlung	30% Ethanol 50% Ethanol 70% Ethanol 50% Ethanol 30% Ethanol		5 min 5 min 30 min, -20°C 5 min 5 min
Blockierungslösung	PBS 0,1 M 10 % NGS 0,3% Triton X		30 min
Inkubation des Primärantikörpers	Maus anti PCNA PBS 0,1 M 10 % NGS 0,3 % Triton X	1:500	12 h, 4°C
Inkubation des Sekundärantikörpers	anti Maus IgG biotinyliert PBS 0,1 M	1:200	2 h, RT
Amplifikation	PBS 0,1 M Avidin + Biotin	1:250	1 h

Zwischen allen Schritten erfolgte je sechsmaliges Waschen in PBS 0,1 M für je 5 min.

PSA-NCAM-Färbung

Inhibition der endogenen Peroxidase	50% Ethanol 0,3% H ₂ O ₂		30 min
Waschen	PBS 0,1 M		6 x 5 min
Blockierungslösung	PBS 0,1 M 10% NGS 0,3% Triton X 100		30 min
Inkubation des Primärantikörpers	Maus anti PSA-NCAM PBS 0,1 M 10 % NGS 0,3% Triton X 100	1:400	12 h, 4°C
Inkubation des Sekundärantikörpers	anti Maus IgM biotinyliert	1:1000	2 h
Amplifikation	PBS 0,1 M Avidin + Biotin	1:250	1 h

Zwischen allen Schritten erfolgte je sechsmaliges Waschen in PBS 0,1 M für je 5 min.

Ki67-Färbung

Inhibition der endogenen Peroxidase	50% Ethanol 0,3% H ₂ O ₂		30 min
Waschen	PBS 0,1 M		6 x 5 min
Blockierungslösung	PBS 0,1 M 10% NGS 0,3% Triton X 100		30 min
Inkubation des Primärantikörpers	Maus anti PSA-NCAM PBS 0,1 M 10 % NGS 0,3% Triton X 100	1:400	12 h, 4°C
Inkubation des Sekundärantikörpers	anti Maus IgM biotinyliert	1:1000	2 h
Amplifikation	PBS 0,1 M Avidin + Biotin	1:250	1 h

Zwischen allen Schritten erfolgte je sechsmaliges Waschen in PBS 0,1 M für je 5 min.

8. Auswertung

Mikroskopie

Die lichtmikroskopischen Analysen (insbesondere die Quantifizierungen) erfolgten mittels eines Mikroskops (Axioplan 2, Zeiss, Deutschland) unter Verwendung eines 100x Öl-Objektives. Die Zellzählungen wurden mittels eines semiautomatischen Stereologie-Systems (ExploraNova Mercator, La Rochelle Frankreich) vollzogen.

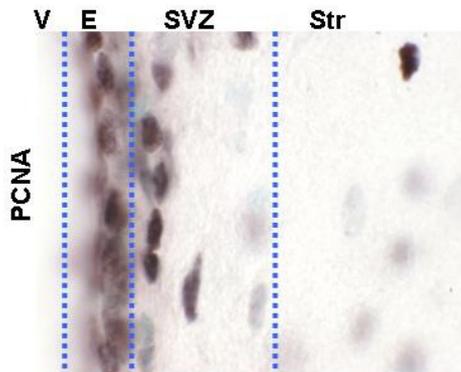
Die Auswertung und Bildgebung mehrfach fluoreszent markierter Gehirnschnitte erfolgte mit einem konfokalen Laserscanmikroskop (Leica DM IRBE, Deutschland) unter Verwendung eines 40x Öl-Objektives. Die erzeugten Bilder wurden mit dem Bildbearbeitungsprogramm Photoshop (Adobe, San Jose, USA) weiterverarbeitet.

Quantitative Auswertung

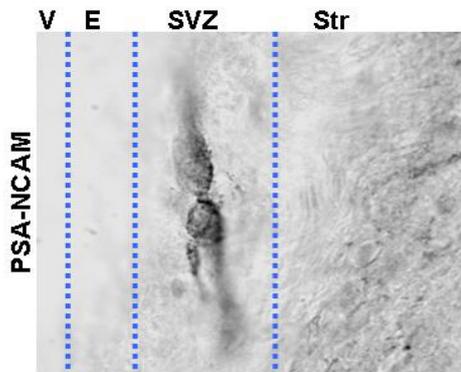
Die SVZ wurde in je vier koronaren Schnitten mit einem gleichmäßigen Abstand und gleicher Anatomie mit dem ExploraNova Mercator Stereologiesystem analysiert. Dabei umfassten die Schnitte die vollständige rostrokaudale (von 7mm anterior bis 1mm posterior der Commissura anterior) sowie die dorsoventrale (vom Corpus callosum bis zur Vena thalamostriata) Ausdehnung der SVZ (Martin & Bowden, 1996). Als mediale Begrenzung wurde die ependymale Zellschicht definiert, die das Gewebe gegenüber den lateralen Ventrikeln abgrenzt. Vereinzelt vorhandene positive Zellen innerhalb der ependymalen Schicht wurden nicht mitgezählt. Bei der PCNA-Färbung wurde zur lateralen Seite hin aufgrund von morphologischen Unterschieden, d.h., relativ dicht stehende, elongierte und stark immunopositive Zellkerne in der SVZ versus weiter auseinander stehenden runden und wenigen, schwach angefärbten Zellkernen im Striatum unterschieden. Bei der PSA-NCAM-Färbung wurde der Bereich an positiv gefärbten Zellen lateral des Ventrikel als zu zählendes Areal definiert. Da durch diese Zählweise die medio-laterale Ausdehnung der SVZ abhängig von der Zellzahl innerhalb der SVZ unterschiedlich ausfiel, wurden die Zahlen nicht als Zellen/mm³, sondern als Zellen/dorsoventrale Länge der SVZ (mm) angegeben. Somit konnte eine Verzerrung der Zahlen, die unweigerlich bei Angabe der Zelldichte entstanden wäre, verhindert werden. Bezüglich der dorsoventralen Ausdehnung wurden positiv markierte Zellen nur gezählt, wenn sich diese lateral der Ventrikel befanden. Besonders in den anterioren Sektionen auftauchenden Häufungen an immunopositiven Zellen ventral der Ventrikel als Anfang des Rostralen Migratorischen Stroms (RMS) oder vereinzelte positive Zellen in den laterodorsalen Ausläufern der Ventrikel wurden nicht mitgezählt, um eine einheitliche Zählung zu gewährleisten. Weiterhin wurden nur gleichmäßig angefärbte, von der Umgebung scharf abgegrenzte Nuclei gezählt, um eine Verwechslung mit eventuellen unspezifischen Färbefaktoren zu vermeiden.

Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM ausgewiesen. Normale, parametrische Daten wurden mit einem zweiseitigen, ungepaarten t-Test verglichen. p-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant behandelt.

Abb. 4: Erläuterung zur quantitativen Auswertung



PCNA: Die SVZ ist charakterisiert durch mehrere Zelllagen einzelner Zellen mit einem länglichen Zellkern, die häufig in Gruppen liegen. Im Striatum (Str) hingegen liegen nur sehr vereinzelt angefärbte rundliche Zellkerne. Das Ependym stellt sich als eine schwach angefärbte, einschichtige Zelllage dar, die die SVZ vom Ventrikel (V) abtrennt.



PSA-NCAM: Die sehr spezifische Färbung lässt nur die Zellkörper der migrierenden Neuroblasten innerhalb der SVZ sichtbar werden. Weder im Ependym (E) noch im Striatum (Str) sind Zellen erkennbar.

III. Ergebnisse

1. Die Neurogenese ist bei alten Affen verringert

Eine eingehende Quantifizierung und Charakterisierung der Neurogenese im hohen Lebensalter beim Primaten existierte vor dieser Arbeit noch nicht. Aus Versuchen mit Nagern ist bekannt, dass das Alter den stärksten bekannten negativen Faktor zur Beeinflussung der Neurogeneserate darstellt. Das IPS tritt vor allem im fortgeschrittenen Lebensalter auf. Um die Pathogenese der Krankheit möglichst exakt im Tiermodell nachzustellen, wurden in dieser Arbeit sehr alte Primaten benutzt.

Um Voraussetzungen für die weiteren Versuche zu schaffen, wurde in einem ersten Schritt die SVZ von Primaten mit einem Lebensalter von über 20 Jahren charakterisiert und mit der zweier junger erwachsenen Primaten mit einem Alter von 4 respektive 5 Jahren verglichen.

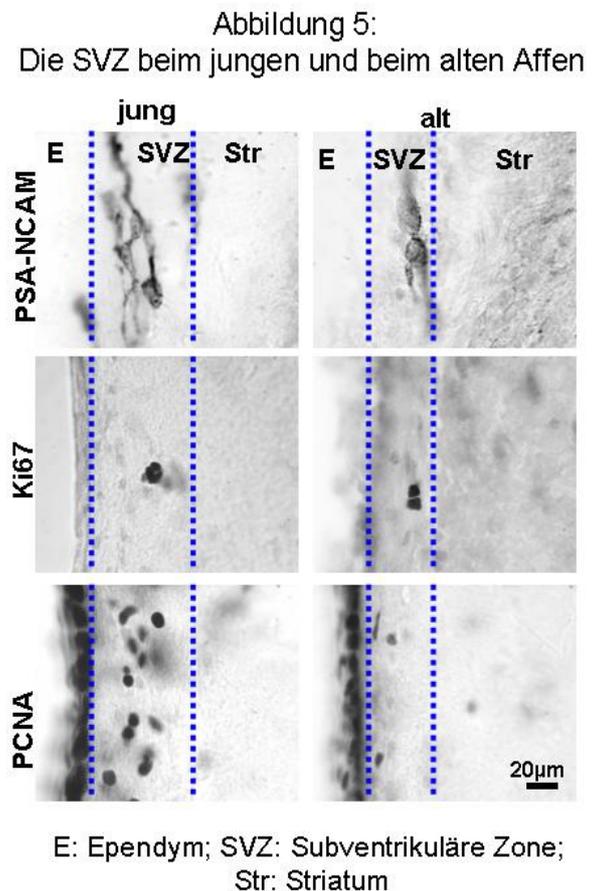
Aus beiden Altersgruppen wurden Schnitte in gleichen Bereichen der SVZ ausgewählt und mit Antikörpern gegen PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen, ein bei der Zellteilung beteiligtes Protein), Ki67 (ein weiteres bei der Zellteilung exprimiertes Protein) und PSA-NCAM (polysialic acid-neural cell adhesion molecule, ein bei der Migration von jungen Neuroblasten exprimiertes Protein) angefärbt.

Mit allen Antikörpern ließen sich Zellen in der SVZ sowohl bei den jungen als auch bei den alten Tieren darstellen. Da eine geringe Proliferation (vor allem glialer und endothelialer Zellen) auch in den übrigen Hirnbereichen stattfindet, waren mit den Antikörpern gegen PCNA und Ki67 angefärbten Zellen auch vereinzelt außerhalb der SVZ zu finden. Hier war jedoch keine strukturierte Zytoarchitektur der gefärbten Zellen zu erkennen, und die Zellen erschienen zufällig und gleichmäßig im Parenchym verteilt. Während der Antikörper gegen PCNA sehr viele Zellkerne innerhalb der SVZ und einige in der ependymalen Schicht liegenden Zellen anfärbte, waren sehr viel weniger Ki67 positive Zellkerne zu finden. PSA-NCAM wird im Perykaryon exprimiert, so dass Färbungen gegen dieses Protein den gesamten Zellkörper mit

seinen Ausläufern darstellten. PSA-NCAM positive Zellen lagen häufig in Gruppen zusammen und zeigten häufig eine bipolare Zellformation.

Auch wenn die Morphologie der alten SVZ und ihrer Zellen im Wesentlichen der der jungen SVZ glich, unterschieden sich beide in einigen Punkten:

- Die Gesamtanzahl an markierten Zellen war in der alten SVZ wesentlich geringer, was zur Folge hatte, dass auch der mediolaterale Durchmesser der SVZ geringer wurde. Sowohl die ventrodorsale als auch die anteroposteriore Verteilung der Zellen erschien hingegen nicht wesentlich verändert.
- Die Lücke zwischen Zellen des Ependyms und der SVZ schrumpfte auf wenige Mikrometer zusammen, womit eine Unterscheidung zwischen beiden teilweise erschwert wurde.
- Die PSA-NCAM positiven Zellen selbst erschienen kleiner und die PCNA-positiven Zellkerne weniger rund.



Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass eine Neurogenese auch bei adulten Primaten bis ins hohe Lebensalter vorhanden bleibt. Der Ort der Proliferation, die SVZ, scheint über die Lebensspanne relativ unverändert fortzubestehen ebenso wie die Verteilung der proliferierenden Zellen darin. Jedoch scheinen sich die SVZ, ihre Grenzstruktur zur ependymalen Schicht und die proliferierenden Zellen selbst leichtgradig zu verkleinern. Auch die Proliferationsrate selbst ist bei den alten Tieren deutlich verringert. Somit ist nicht auszuschließen, dass beeinflussende Faktoren der Neurogenese im Alter anders als in der Jugend wirken.

Um diesen Differenzen Rechnung zu tragen und den Beginn des IPS im hohen Alter so exakt wie möglich im Tiermodell zu simulieren, wurden die folgenden Versuche, wenn möglich, an über 20 Jahre alten Makaken durchgeführt.

2. Dopaminerge Fasern liegen in enger Nähe zu proliferierenden subventrikulären Zellen

In der SVZ von Nagern liegen dopaminerge Fasern in enger räumlicher Nähe zu sich teilenden Zellen. Diese Zellen exprimieren Dopamin-Rezeptoren, deren Stimulation die Neurogeneserate erhöht (Höglinger et al., 2004). Um zu erforschen, ob die Grundlagen für einen ähnlichen Mechanismus auch bei nicht-menschlichen Primaten vorhanden sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob dopaminerge Fasern auch im Primaten in räumlicher Nähe zu proliferierenden Zellen in der SVZ liegen.

Zur Detektion der Proliferation wurden sechs alten Primaten in zwei- bis dreitägigen Abständen insgesamt 10 Injektionen von jeweils 40mg/kg KG BrdU bis zu einer Gesamtdosis von 400mg/kg KG verabreicht. BrdU ist ein unter physiologischen Umständen nicht im Körper vorhandenes Thymidinanalog und wird bei der Replikation während des Zellzyklus in die DNS eingebaut. Dies hat zur Folge, dass beide Tochterzellen markiert werden. Eine BrdU positive Zelle muss also im Zeitraum, in dem BrdU für die Zelle zur Verfügung stand, entstanden sein. Zwei Wochen nach der letzten BrdU-Injektion wurden die Tiere perfundiert und die Gehirne entnommen. Zur Analyse wurden am Schlittenmikrotom Serienschnitte mit einer Schnittdicke von 50µm hergestellt. Hirnschnitte von mit BrdU behandelten Makaken wurden mit einem Antikörper gegen BrdU und einem Antikörper gegen Tyrosin-Hydroxylase (TH) inkubiert. Die primären Antikörper wurden mit einem zweiten fluoreszierenden Antikörper sichtbar gemacht. TH wird in monoaminergen Nerven exprimiert, um die Aminosäure L-Tyrosin zu DOPA zu dehydrieren, welches dann in einem Folgeschritt in zu Dopamin decarboxyliert wird.

Unter dem konfokalen Mikroskop konnten TH positive Fasern in enger räumlicher Nähe zu BrdU positiven Zellen nachgewiesen werden. Diese Fasern sprossen aus dem benachbarten Striatum, welches wesentlich dichter innerviert ist, in die SVZ aus. Einschränkend soll bemerkt werden, dass eine TH positive Faser nicht notgedrungen dopaminerg sein muss, da Dopamin die Vorstufe für Adrenalin und Noradrenalin ist, und deswegen adrenerge Fasern auch TH exprimieren. Um zu überprüfen, dass sich keine adrenergen Fasern in der Nähe der SVZ befinden, wurden einige repräsentative Schnitte mit einem Antikörper gegen Dopamin-β-Hydroxylase angefärbt. Dieses Enzym hydroxyliert Dopamin zu Noradrenalin und wird in adrenergen Fasern

exprimiert. Es fanden sich keine Dopamin- β -Hydroxylase positiven Fasern in der Nähe der SVZ. Damit sind die TH positiven Fasern sehr wahrscheinlich dopaminerge Fasern.

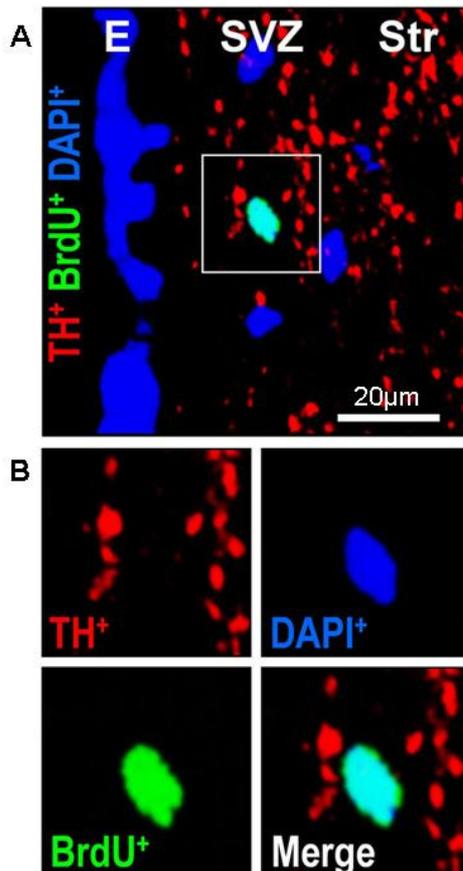


Abb. 6: Dopaminerge Fasern in der Nähe von proliferierenden Zellen

In der SVZ eines alten Primaten liegen TH+ Fasern (rot) in enger räumlicher Nähe zu proliferierenden Zellen, markiert durch BrdU (grün) und DAPI (blau), eine Gegenfärbung für Zellkerne.

A: Übersicht auf die SVZ.
E: Ependym; Str: Striatum.

B: Ausschnitt aus A.
Merge: Übereinanderlagerung der Färbungen gegen TH, DAPI und BrdU.

Alle Photos sind am konfokalen Laserscanmikroskop erzeugt.

3. Fasern aus der *pars compacta* der Substantia nigra projizieren räumlich geordnet in die Subventrikuläre Zone

Nachdem festgestellt wurde, dass die SVZ auch von sehr alten Affen noch proliferierende Zellen enthält und einige dieser in enger räumlicher Nähe zu dopaminergen Fasern liegen, sollte in einem nächsten Schritt der Ursprung dieser Fasern erforscht werden. Dafür wurde der anterograde Tracer Biotin Dextran Amin (BDA) stereotaktisch in unterschiedliche Bereiche des Mesenzephalons injiziert: in einem jungen Affen wurde der anteromediale Teil des *pars compacta* der SN (SNpc), in einem zweiten Affen der posterolaterale Teil des SNpc und in einem dritten Affen das retrorubrale Feld markiert. Diese drei Bereiche stellen zusammen die größte

Gruppe dopaminerger Zellen des Mesenzephalons dar. Nach dem Perfundieren der Tiere wurden 40µm dicken Hirnschnitten am Schlittenmikrotom hergestellt. In repräsentativen Schnitten der SVZ wurden BDA dann mit dem ABC-Kit visualisiert. Dann sichtbare Fasern müssen damit aus dem zuvor injizierten Hirnareal stammen.

Bezüglich der nigralen Innervation des Striatums durch dopaminerge Fasern aus der SN fand sich eine topographische Organisation:

Der anteromediale Teil der SNpc innerviert vor allem den anterioren und ventralen Teil des Nucleus caudatus und des Putamens sowie teilweise den Nucleus accumbens. Weiter posterior gelegene Teile des Striatums sind wesentlich weniger innerviert, wobei vereinzelte Gruppen von Faserendigungen im Nucleus caudatus und sehr wenige Endigungen auch im Putamen nachweisbar sind. Der posterolaterale Teil der SNpc projiziert vor allem auf den posterioren Teil des Putamen und des Nucleus caudatus, mit einer Betonung des Putamens. Vor allem posterodorsale Abschnitte des Nucleus caudatus werden auch von dem posterolaterale Teil des SNpc innerviert. Der Nucleus accumbens erhält keine Projektionen. Fasern aus dem retrorubralen Feld, welches dorsokaudal der SN liegt und dopaminerge Zellen enthält, projizieren in den ventrokaudalen Teil des Putamens und den Nucleus accumbens und damit in relativ großer Entfernung zur SVZ. Die topische Organisation der Innervation der SVZ durch dopaminerge Fasern aus der SN verhält sich sehr ähnlich: Eine sehr reiche Innervation aus dem anteromedialen Teil der SNpc ist in dem anteroventralen Teil der SVZ zu finden. Weiter posterior und dorsal verringert sich die Innervation erheblich, bis im posterodorsalen Teil der SVZ keine Fasern mehr zu finden sind. Genau umgekehrt verhält es sich mit den Fasern aus dem posterolateralen Teil der SNpc: Während die meisten Fasern in dem posterodorsalen Teil der SVZ zu finden sind, ist der anteroventrale Teil der SVZ frei von Fasern aus dem posterolateralen Teil der SNpc. Aus dem retrorubralen Feld erreichen keine Fasern die SVZ.

Zusammengefasst ist die nigro-subventrikuläre Innervation räumlich deutlich differenziert, wobei der anteriomediale Teil der SNpc eher den anteroventralen Teil der SVZ innerviert und der posterolaterale Teil der SNpc eher Fasern in dem posterodorsalen Teil der SVZ besitzt. Einschränkend soll darauf hingewiesen werden, dass dopaminerge Neurone häufig sich weit verzweigende Äste besitzen, die auch in andere Gebiete aussprossen, so dass nicht von einem genau begrenzten Innervationsgebiet gesprochen werden kann.

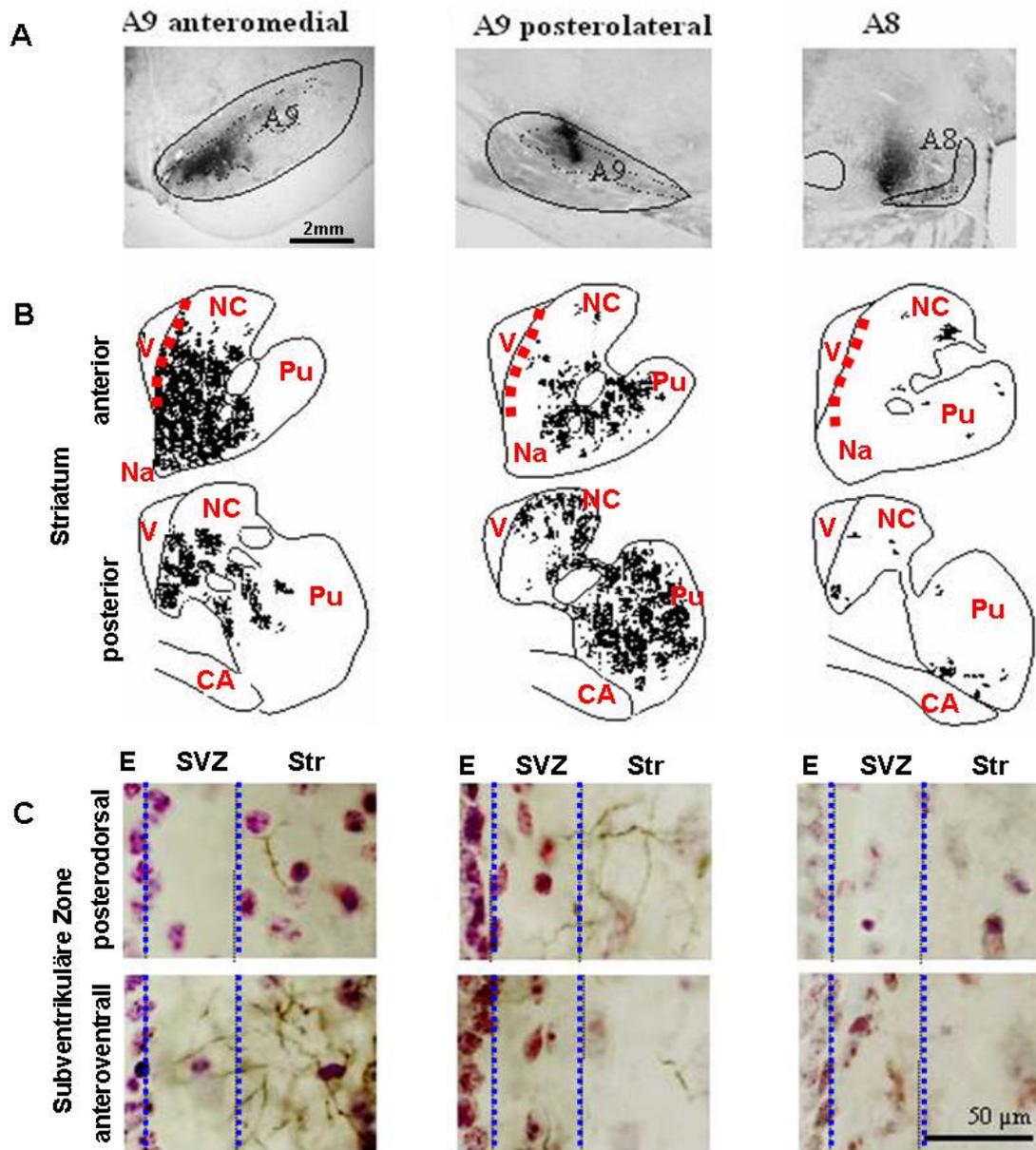


Abb.6: Die räumliche Organisation der dopaminergen nigrosubventrikulären Projektion in adulten Primaten

A: Der anterograde Tracer BDA wurde stereotaktisch in den anteromedialen Teil der SNpc (A9, erste Spalte); in den posterolateralen Teil der SNpc (zweite Spalte) und in das retrorubrale Feld (A8, dritte Spalte) injiziert. Die durchgezogene Linie markiert die gesamte SN, die gestrichelte Linie die dopaminerge SNpc.

B: Schemazeichnung der Verteilung BDA+ Axone in coronaren Schnitten des anterioren und posterioren Striatum (+4mm und +0mm von der Commissura anterior). V: Ventrikel; NC: Nucleus caudatus; Pu: Putamen; Na: Nucleus accumbens; CA: Commissura anterior. Die gestrichelte Linie markiert die SVZ.

C: BDA+Fasern (braun) in der posterodorsalen und anteroventralen SVZ. Die Kerne sind mit Nissl-Lösung gegengefärbt. E: Ependym; Str: Striatum

4. Eine Verringerung der dopaminergen Innervation führt zu einer herabgesetzten Neurogenese

Um die physiologische Bedeutung der nigro-subependymalen Projektion zu bestimmen, wurden drei über 20 Jahre alte Makaken mit MPTP intoxikiert, welches selektiv dopaminerge Neurone abtötet und damit die dopaminergen Fasern zur SVZ an ihrem Ursprung in der SN angreift. Zusätzlich erhielten alle drei Affen über einen Zeitraum von 3 Wochen alle zwei bis drei Tage Injektionen von BrdU. Nach Erreichen eines stabilen Parkinsonsyndroms wurden die Tiere geopfert und mit drei nicht mit MPTP intoxikieren Tieren gleichen Alters verglichen, die gleich viele Injektionen von BrdU erhalten haben. Mit diesem Versuchsschema sollte erreicht werden, dass bei allen Tieren die proliferierenden Zellen markiert werden und zusätzlich bei der Hälfte von ihnen eine dopaminerge Denervation hergestellt wird. Durch das Vergleichen der Zahl proliferierender Zellen zwischen beiden Gruppen sollten dann Rückschlüsse über die Auswirkung einer dopaminergen Denervation auf die Zellproliferation möglich sein.

Während und nach der MPTP-Injektionsperiode wurde die Motorik der Tiere alle zwei Tage nach einem standardisierten Verfahren von derselben Person evaluiert. Je 0 bis 3 Punkte konnten für folgende sieben Parameter vergeben werden, so dass eine maximale Punktzahl von 21 Punkten erreichbar waren: Spontane Aktivität im Käfig, Haltung, Gleichgewicht, Ernährung, Bradykinesie und Tremor. Trotz erheblicher, wahrscheinlich altersbedingter Unterschiede in der Vulnerabilität erreichten alle Tiere in der dritten Woche nach Injektionsbeginn einen Punktwert über 10.

Um zusätzlich zu der motorischen Evaluation auch *post mortem* histologische Aussagen zu einer dopaminergen Denervation zu erhalten, wurden die Substantia Nigra und das Striatum mit einem Antikörper gegen TH angefärbt. Im Vergleich zu den Kontrolltieren war eine deutliche Verringerung der dopaminergen Zellkörper in der SN erkennbar, wobei der laterale und anteriore Teil der SNpc am stärksten betroffen war. Der mediale Teil der SNpc in enger räumlicher Nähe zum VTA war weniger stark vom Zellverlust betroffen, wie es auch bei dem IPS der Fall ist. Die verringerte dopaminerge Innervation war mit der Bestimmung der optischen Dichte der mit einem Antikörper gegen TH angefärbten Schnitte objektivierbar. Während bei Schnitten der Kontrollaffen die optische Dichte $19,14 \pm 3,62$ betrug, lagen bei den

MPTP-intoxikierten Affen die Zahlen signifikant niedriger: $4,71 \pm 2,15$ ($p < 0,05$). Eine noch in geringen Maßen vorhandene Innervation des medioventralen Teils des Striatums war sichtbar, konnte aber aufgrund der kleinen Fläche nicht quantifiziert werden. Bei den mit MPTP intoxikierten Tieren war der dorsale Teil der SVZ, innerviert vom lateralen Teil der SNpc, von der Denervation am stärksten betroffen, hingegen fanden sich im ventralen Teil der SVZ noch wenige einzelne Fasern aus der medialen Teil der SN. Der direkt ventral liegende Nucleus accumbens war von der dopaminergen Denervation statistisch nicht signifikant betroffen (MPTP-Gruppe: $14,22 \pm 0,90$; Kontrollgruppe: $16,15 \pm 2,65$).

Der Einfluss der verringerten dopaminergen Innervation auf die Proliferation subventrikulärer Zellen wurde bestimmt, indem die Nummer an PCNA positiver Zellen in koronaren Schnitten gezählt wurde, die in allen Tieren an anatomisch gleichen Stellen über die gesamte rostrokaudale Ausdehnung der SVZ verteilt waren. Innerhalb des definierten Auswertungsareals war die Anzahl für PCNA positiver Zellen der mit MPTP intoxikierten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren um 44% verringert ($44,4 \pm 9,9$ Zellen pro mm SVZ in der MPTP-Gruppe zu $78,8 \pm 6,6$ Zellen pro mm SVZ).

Auch eine verringerte Anzahl neu gebildeter Neuroblasten als Folge der verringerten Proliferation konnte nachgewiesen werden. Während in der Kontrollgruppe die Zahl an PSA-NCAM positiven Zellen $32,2 \pm 5,6$ pro mm SVZ betrug, konnten bei der MPTP-Gruppe nur $13,1 \pm 1,0$ Zellen pro mm SVZ gezählt werden ($p < 0,05$). Damit war die Zahl an PSA-NCAM positiven Zellen bei den mit MPTP intoxikierten Tieren um 59% geringer als bei den Kontrolltieren.

Zusammengefasst führt also beim Primaten eine durch MPTP hervorgerufene Verringerung der dopaminergen Innervation der SVZ zu einer verringerten Zellproliferation und zu einer verminderten Anzahl an migrierenden Neuroblasten.

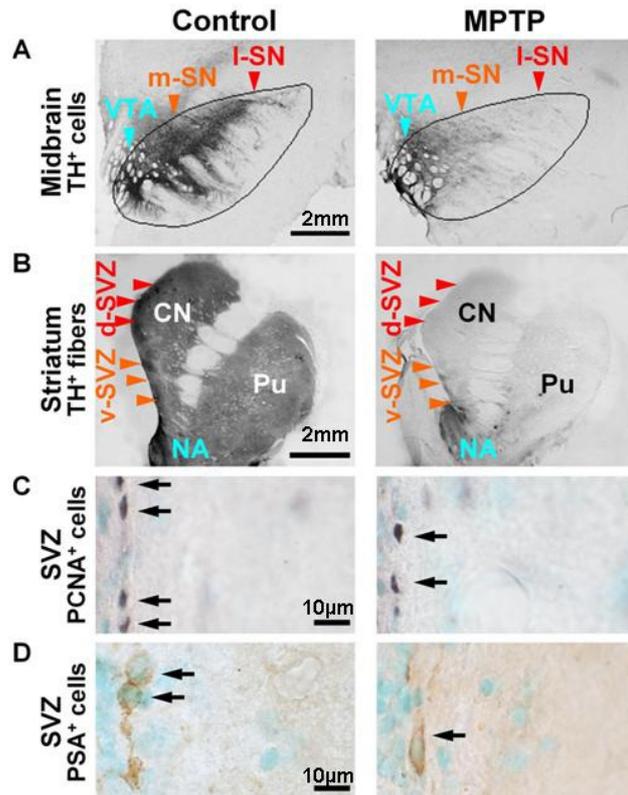


Abb.8: Eine dopaminerge Denervation führt zu einer verringerten Anzahl von proliferierenden Zellen und migrierenden Neuroblasten in alte Makaken (20-25jährig)

A, B: Dopaminerge Zellen und Fasern im Mesenzephalon (A) und im Striatum (B) im Kontrolltier (erste Spalte) und im MPTP-intoxizierten Tier (zweite Spalte) in einer Färbung gegen TH.

VTA: Ventrales Tegmentales Areal; m- SN: mediale Substantia nigra; l-SN: laterale Substantia nigra; v-SVZ: ventrale SVZ; d-SVZ: dorsale SVZ; CN: Nucleus caudatus; Pu: Putamen; NA: Nucleus accumbens.

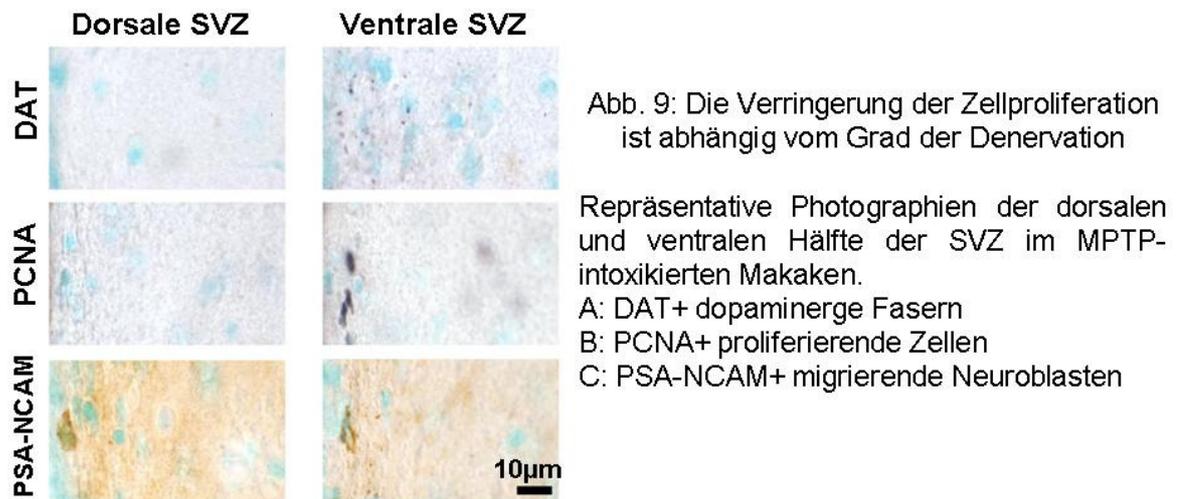
C, D: Repräsentative Photographien von PCNA+ proliferierenden Zellen (C, Pfeile) und PSA-NCAM+ migrierenden Neuroblasten (D, Pfeile). Die Zellkerne sind mit Methylgrün gegengefärbt.

5. Die Verringerung der Neurogenese ist abhängig von dem Grad der dopaminergen Denervation

In der Versuchsgruppe führte eine Intoxikation mit MPTP aufgrund der unterschiedlichen Vulnerabilität mesenzephaler dopaminergener Neurone zu einer räumlich differenzierten Denervation in der SVZ: Während im posterodorsalen Teil, der von dem für MPTP am empfindlichsten lateralen Teil der SNpc innerviert wird, ein totaler Verlust an dopaminergen Fasern vorlag, fanden sich im anteroventralen Teil der SVZ in räumlicher Nähe zu dem Nucleus accumbens noch vereinzelte dopaminerge Fasern, da dieser Teil vom medialen Teil der SNpc innerviert wird, welcher weniger empfänglich für MPTP ist. Um herauszufinden, ob der dorsoventrale Denervationsgradient innerhalb der SVZ der intoxizierten Tiere funktionelle Auswirkungen hat, wurden die ausgezählten Areale beider Versuchsgruppen in eine ventrale und eine dorsale Hälfte geteilt und die Zellzahlen beider Hälften zueinander in Relation gesetzt.

Schon in der Kontrollgruppe waren mehr PCNA positive Zellen in der ventralen Hälfte als in der dorsalen Hälfte zu finden. Das dorsoventrale Verhältnis betrug $0,78 \pm$

0,13 in der Kontrollgruppe und verringerte sich in der Versuchsgruppe bis auf $0,32 \pm 0,05$ ($p > 0,05$). Somit konnten die Auswirkungen einer unterschiedlichen Denervation auf die Zellproliferation auch innerhalb der Versuchsgruppe selbst nachgewiesen werden, da sich die dorsoventrale Verteilung der PCNA positiven Zellen entsprechend der Denervation nach ventral verschob.



Dieser Unterschied konnte bei den PSA-NCAM positiven Zellen nicht nachgewiesen werden. Das dorsoventrale Verhältnis an PSA-NCAM positiven Zellen betrug $1,40 \pm 0,67$ in der Kontrollgruppe und $1,32 \pm 0,13$ in der Versuchsgruppe.

IV. Diskussion

In dieser Arbeit konnte erstmals bei Primaten eine direkte, topographisch organisierte Innervation der SVZ durch die SN und deren bis ins hohe Alter konservierte funktionelle Rolle im Sinne einer Stimulation der Stammzellproliferation nachgewiesen werden. Im Folgenden sollen im ersten Abschnitt zuerst die Erkenntnisse der Anatomie der nigrostriatalen Projektion dieser Arbeit mit schon publiziertem Wissen verglichen werden. Daran anschließend soll im zweiten Abschnitt auf die Funktion dieser Projektion eingegangen werden. Im dritten Abschnitt soll kurz der Frage nachgegangen werden, ob eine räumlich unterschiedliche Innervation auf eine unterschiedliche Funktion innerhalb der SVZ hinweisen könnte. Der vierte Abschnitt befasst sich mit der Funktion der humanen NG innerhalb der SVZ. Die Diskussion wird dann durch einen kurzen Ausblick beendet.

1. Anatomie der nigrostriatalen Innervation

In vorliegender Arbeit sollte der dopaminerge Einfluss auf die Zellproliferation der SVZ beim nichtmenschlichen Primaten erforscht werden. Dafür musste festgestellt werden, ob eine dopaminerge Innervation der proliferierenden Zellen existiert und auf welcher anatomischen Grundlage sie aufbaut. Es sollten in einem ersten Schritt die proliferierenden Zellen dargestellt und überprüft werden, ob dopaminerge Fasern in enger räumlicher Nähe vorliegen. In einem zweiten Schritt sollte dann die Herkunft und die topographische Verteilung der dopaminergen Fasern erforscht werden.

Um die proliferierenden Zellen der SVZ darstellen zu können, wurde BrdU über einen Zeitraum von drei Wochen in sechs adulte Makaken injiziert. BrdU ist ein Thymidinanalogon, das sich während der DNS-Replikation bei der Mitose in die DNS der Tochterzellen einlagert. Somit werden die Tochterzellen von sich während der Injektionsperiode teilenden Zellen markiert. In der SVZ erzeugen die adulten Stammzellen, die sog. B-Zellen, sich häufig teilende C-Zellen, die wiederum durch asymmetrische Zellteilung Neuroblasten erzeugen, die A-Zellen (Doetsch et al., 1997;

Quinones-Hinojosa et al., 2006). Diese wandern entlang eines vorgegebenen Pfades, der RMS, in den Riechkolben aus (Curtis et al., 2007). Durch das Wählen eines Perfusionszeitpunktes zwei Wochen nach der letzten BrdU-Injektion sollte gewährleistet werden, dass die mobilen A-Zellen aus der SVZ ausgewandert und somit nur noch die ortsständigen proliferierenden B- und C- Zellen in der SVZ markiert werden. Am Schlittenmikrotom erzeugte Hirnschnitte der Primaten wurden mit einem Antikörper gegen BrdU und einem Antikörper gegen TH angefärbt. TH ist ein Enzym, das in katecholaminergen Nervenzellen exprimiert wird. Anschließend wurden die Schnitte unter einem konfokalen Laserscannmikroskop betrachtet. Hierbei konnten TH positive Fasern in enger räumlicher Nähe zu BrdU positiven Zellkernen dargestellt werden. Dies weist darauf hin, dass dopaminerge Zellen bei Primaten Zellfortsätze in enger räumlicher Nachbarschaft von proliferierenden Zellen der SVZ besitzen, was mit Daten bei Nagern übereinstimmt (Höglinger et al., 2004).

Eine enge räumliche Nähe ist eine notwendige, aber keine hinreichende Voraussetzung für eine dopaminerge Beeinflussung der Neurogenese. Deswegen sollten in einem Folgeschritt die Auswirkungen dieser Innervierung untersucht werden, indem in einer Gruppe von Versuchstieren die dopaminergen Fasern unterbrochen und anschließend die Zellproliferation dieser Gruppe mit der einer Kontrollgruppe verglichen werden. Voraussetzung für dieses Experiment war eine eingehende Bestimmung des Ursprungs der dopaminergen Innervation der SVZ. Dafür wurde das anterograde Markierungsmolekül BDA in Subregionen der größten dopaminergen Zellgruppen des Mesenzephalons injiziert, die für einen Großteil der dopaminergen Innervation der weiter kranial liegenden Hirnteile verantwortlich sind. BDA wird von den Nervenzellen aufgenommen und zentrifugal in die Faserausläufer transportiert, aber nicht an benachbarte Zellen abgegeben (Reiner et al., 2000). BDA positive Fasern in der SVZ müssen damit ihren Ursprung in zuvor markierten Gebieten haben. Mit dieser Versuchsanordnung konnte in dieser Arbeit eine direkte Verbindung zwischen der SN und der SVZ bei adulten Primaten nachgewiesen werden. Weiterhin konnte eine spezifische räumliche Organisation dieser Projektion aufgezeigt werden, nach der der anteromediale Teil der SN den anteroventralen Teil der SVZ, und der posterolaterale Teil der SN eher den posterodorsalen Teil der SVZ innerviert. Hierbei sprossen Fasern aus dem dicht innervierten Striatum in die benachbarte SVZ.

Die hier nachgewiesene nigro-subventrikuläre Projektion weist strukturelle Ähnlichkeiten zu der nigrostriatalen Innervation auf. Das nigrostriatale Faserwerk ist Bestandteil der sog. „mesotelencephalischen dopaminergen Projektion“. Diese setzt sich größtenteils aus den aus der VTA und der SN entspringenden Fasern zusammen. Ihre topographische Organisation wurde 1978 detailliert im Nagetier von Fallon & Moore untersucht (Fallon & Moore, 1978). Die Autoren konnten eine Organisation in drei Ebenen, medial-lateral, rostral-kaudal und dorsal-ventral, nachweisen. Dabei projizieren mediale Anteile des Bereiches der SN und der VTA eher medial, und laterale Anteile eher lateral auf das Telencephalon. Ähnlich projizieren rostral lokalisierte mesenzephalische Neurone eher rostral und kaudale Zellen eher kaudal auf das Telencephalon. Die dorso-ventrale Organisation wird als umgekehrt dargestellt: Ventrale mesenzephalische Zellen projizieren eher auf dorsale Strukturen wie das Septum, der Nucleus accumbens und das Neostriatum, wohingegen dorsale mesenzephalische Zellen eher ventral auf den BO und die Amygdala projizieren. Auf regionale Unterschiede innerhalb der Innervation des Neostriatums wurde nicht eingegangen. Während bei Ratten in etwa 40.000 bis 45.000 dopaminerge Zellen im Mesenzephalon nachweisbar sind, finden sich beim Primaten 160.000 bis 320.000 dopaminerge Zellen (Bjorklund & Dunnett, 2007). Dementsprechend scheint bei Primaten die mesenzephalische dopaminerge Innervation des Striatums komplexer organisiert zu sein: Lynd-Balta & Haber fanden 1994 in retrograden Studien weder eine mediolateral noch eine rostrokaudal organisierte mesenzephalische Projektion in das ventrale Striatum (Lynd-Balta & Haber 1994a,b). Sie konnten jedoch nachweisen, dass der Nucleus accumbens nahezu ausschließlich von der VTA innerviert wird. Aktuelle Studien unterscheiden zwischen einer ventralen und einer dorsalen mesenzephalischen dopaminergen Zellschicht (Bjorklund & Dunnett, 2007). Die dorsale Zellschicht, bestehend vor allem aus dem dorsalen Anteil der VTA und medialer Anteile der SN, innervieren das ventrale Striatum und limbische und corticale Areale. Die ventrale Zellschicht besteht aus Zellen in ventralen Anteilen der SN und teilweise auch der ventralen VTA und innervieren dorsale Anteile des Striatums und damit auch den größten Teil der Grenzzone zur SVZ. Es ist anzunehmen, dass Axone der SN zu einem noch unbekanntem Zeitpunkt der Entwicklung in gleicher räumlicher Anordnung wie im Striatum aus diesem in die SVZ aussprossen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die SVZ von Primaten wie das angrenzende Striatum dopaminerg hauptsächlich von der SN innerviert wird.

Einschränkend muss darauf hingewiesen werden, dass keine retrograden Färbeversuche unternommen wurden. Somit ist nicht auszuschließen, dass auch andere Hirnteile an der dopaminergen Innervation mitbeteiligt sind. Die nigro-subventrikuläre Projektion ist ähnlich der nigrostriatalen Innervation räumlich differenziert: der anteromediale Teil der SNpc innerviert die anteroventrale SVZ und der posterolateralen Teil der SNpc innerviert die posterodorsale SVZ. Damit sind die anatomischen Voraussetzungen nachgewiesen für eine mögliche dopaminerge Beeinflussung der subventrikulären Zellproliferation. Dieser soll in den folgenden Absätzen nachgegangen werden.

2. Die Funktion der nigrostriatalen Projektion prä- und postnatal

Um einen Zusammenhang mit Symptomen des IPS und der Zellproliferation nachzuweisen, sollte in der vorliegenden Arbeit nicht nur die anatomische Grundlage einer dopaminergen Innervation der SVZ nachgewiesen, sondern auch deren funktionelle Bedeutung überprüft werden. Wie in diesem Absatz dargelegt werden soll, weisen Voruntersuchungen auf eine kontinuierliche dopaminerge Beeinflussung der Zellproliferation von der Embryogenese bis ins hohe Lebensalter bei Nagern hin. Vor dieser Arbeit war unbekannt, ob ein solcher Mechanismus auch bei Primaten im hohen Lebensalter vorhanden ist.

Um einen Einfluss der dopaminergen Innervation auf die Proliferation innerhalb der SVZ nachzuweisen, wurden drei der sechs alten Makaken zusätzlich zu den BrdU-Injektionen auch mit MPTP intoxikiert. MPTP ist ein Zellgift, welches nahezu ausschließlich dopaminerge Neurone abtötet und ein Parkinson-Syndrom auslöst (Burns et al., 1983). Nach der Herstellung von histologischen Schnitten wurden diese mit Antikörpern gegen PCNA und PSA-NCAM gefärbt. PCNA ist ein Enzym, das während der Zellteilung exprimiert wird (Hall et al., 1990), PSA-NCAM exprimierende Zellen sind hingegen junge, migrierende Neurone (Seki et al., 2002). Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass die dopaminerge Denervation, die durch die MPTP-Injektionen erzeugt wurden, zu einer verringerten Zahl an PCNA positiven und PSA-NCAM positiven Zellen führt. Daraus lässt sich schließen, dass eine verringerte dopaminerge Innervation die Proliferation einschränkt und die Zahl

migrierender Neuroblasten vermindert. Dies entspricht den Daten bei Nagetieren und beim Menschen (Höglinger et al., 2004, Baker et al., 2004).

Da die mit MPTP intoxikierten Tiere auch BrdU-Injektionen erhalten hatten, wurde auch überprüft, ob eine dopaminerge Denervation Einfluss auf die Zahl BrdU positiven Zellen hatte. Es war jedoch nicht möglich, eindeutige Aussagen über einen möglichen Unterschied der Anzahl BrdU positiven Zellen zwischen den mit MPTP intoxikierten Tieren und den Kontrolltieren zu treffen, da nur eine sehr geringe Anzahl an BrdU positiven Zellen in den Tieren beider Versuchsgruppen gefunden wurde. Dies lässt sich durch das Versuchsparadigma erklären: durch einen relativ langen Zeitraum zwischen letzter BrdU-Injektion und Perfusion der Tiere wurde gewährleistet, dass ein Großteil der neu produzierten A-Tochterzellen aus der SVZ auswanderten. Nur die ortsständigen Stammzellen wurden durch eine Markierung gegen BrdU nachgewiesen. Durch das hohe Alter der Tiere waren diese BrdU positiven Stammzellen nur noch in sehr geringer Anzahl vorhanden. Die Anzahl dieser Zellen sollte sich erwartungsgemäß durch die MPTP-Intoxikation nicht wesentlich verändern. Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die MPTP-Intoxikation nicht die Anzahl der Stammzellen verändert, jedoch deren Teilungsrate und damit auch die Anzahl neu gebildeter Zellen verringert.

In dieser Arbeit konnte somit erstmals ein direkter Einfluss von Dopamin auf die Zellproliferation und die Anzahl an neu gebildeten, migrierenden Nervenzellen im Makaken nachgewiesen werden. Mehrere Ergebnisse weisen darauf hin, dass diese dopaminerge Beeinflussung ein Kontinuum darstellt, welches schon in der Embryogenese beginnt und bis ins hohe Alter anhält.

Das Gehirn entwickelt sich entlang der primordialen Ventrikel aus einer Schicht neuroepithelialer Zellen, der ventrikulären Zone, welche wiederum eine darunter liegende Schicht proliferativer Zellen, die SVZ, erzeugt. Während erstere im Verlauf der Embryogenese immer weiter schrumpft und zum Zeitpunkt der Geburt nicht mehr nachweisbar ist, verdickt sich die SVZ und bleibt für den Rest des Lebens erhalten. Eine dopaminerge Beeinflussung der pränatalen SVZ erscheint möglich, seitdem die Präsenz von mehreren Dopamin-Rezeptoren auf subventrikulären Zellen schon ab einem relativ frühen Stadium der Embryogenese nachgewiesen werden konnte (Fishburn et al., 1994; Diaz 1997).

Bezüglich der embryonalen Expression der Dopamin-Rezeptoren beim Primaten sind noch keine Daten vorhanden. Im Nagetier konnte jedoch nachgewiesen werden, dass der D3-Rezeptor zeitlich vor allen anderen Dopamin-Rezeptoren exprimiert wird. Die Expression der D3 Rezeptor mRNA konnte in Mäusen 9.5 Tage *post conceptionem* nachgewiesen werden. D2 Rezeptor mRNA fand sich erst nach dem 13.5 Tag *post conceptionem* (Fishburn et al., 1994). Die genaue Lokalisation der D3 Rezeptoren mRNA konnte in Ratten ab Tag E14 in den proliferativen Zonen des striatalem Neuroepithel nachgewiesen werden (Diaz et al., 1997). Sowohl die Breite des Areal proliferierender Zellen wie auch die nachgewiesene D3-Rezeptor mRNA nimmt postnatal deutlich ab, ohne jedoch vollständig zu verschwinden.

Entsprechend der Expression von Dopamin-Rezeptoren wurde eine dopaminerge Innervation des Striatums und der angrenzenden SVZ beginnend in der Embryogenese nachgewiesen (Ohtani et al., 2003; Popolo et al., 2004). Die Stimulation von D1L-Rezeptoren erniedrigt die Proliferation der Vorläuferzellen in der embryonalen SVZ von Nagern (Ohtani et al., 2003; Popolo et al., 2004; Zhang et al., 2005) und in der SVZ von adulten Nagern (Coronas et al., 2004; Höglinger et al., 2004). Hingegen scheint eine Stimulation der D2L- Rezeptoren in der adulten SVZ die Proliferation der Vorläuferzellen zu verstärken (Coronas et al., 2004; Höglinger et al., 2004). Somit scheint der Nettoeffekt von Dopamin von der unterschiedlichen Expression der Dopamin-Rezeptoren in der embryonalen und adulten SVZ abzuhängen. Jedoch weisen diese Daten auf eine lebenslang kontinuierliche dopaminerge Kontrolle einer Zellproliferation in der SVZ hin. Übereinstimmend konnte in dieser Arbeit jetzt erstmals eine direkte dopaminerge Beeinflussung auch beim Primaten im hohen Lebensalter nachgewiesen werden.

Dass eine dopaminerge Denervation statistisch relevant die Neurogenese auch im hohen Alter verändert, ist nicht selbstverständlich. Obwohl eine Zellproliferation in der SVZ auch beim Menschen bis ins hohe Alter erhalten bleibt (Eriksson et al., 1998; Höglinger et al., 2004, Quinones-Hinojosa et al., 2006), beeinflusst der Faktor „Alter“ selbst die Neurogenese erheblich und führt nicht nur zu einer verringerten Proliferation, sondern auch zu einer unterschiedlichen Morphologie der SVZ. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass im Vergleich zu jungen Tieren sich im hohen Lebensalter die Gesamtzahl proliferierender Zellen verringert, eine bei jungen Tieren bestehende Lücke zwischen der ependymalen Schicht und der SVZ sich

verkleinert und auch die Zellen selbst kleiner erscheinen. Trotz dieser Unterschiede scheint der dopaminerge Regulationsmechanismus bis ins hohe Alter erhalten geblieben zu sein. Dies stimmt mit Ergebnissen von Höglinger et al. überein, die bei Parkinson Patienten mit einem Durchschnittsalter von 68 Jahren eine verringerte Zellproliferation in der SVZ im Vergleich zu einer Kontrollgruppe nachweisen konnten (Höglinger et al., 2004).

Somit lässt sich zusammenfassen, dass die Voraussetzungen für eine dopaminerge Stimulation der Neurogenese schon während der Embryogenese gelegt werden. Dopamin erhöht auch bei Primaten bis ins hohe Lebensalter die Proliferation neuraler Vorläuferzellen.

3. Räumliche Unterschiede innerhalb der SVZ

Wie in den vorigen Abschnitten dargelegt, stimuliert die dopaminerge nigro-subventrikuläre Innervation die Zellproliferation innerhalb der SVZ. Zusätzlich wurde auch geschildert, dass die Intoxikation durch MTPT die dopaminergen Zellen in unterschiedlichen Subregionen des Mesenzephalons unterschiedlich stark dezimiert. Ob eine daraus resultierende unterschiedlich starke Denervation der SVZ auch zu einer unterschiedlich starken Verringerung der Zellteilungsrate führt, sollte in einem weiteren Schritt bestimmt werden. In diesem Abschnitt soll weiterhin darauf eingegangen werden, ob eine quantitativ unterschiedliche Neurogenese innerhalb der SVZ auch auf qualitative Unterschiede weisen könnte.

Durch die unterschiedlichen Suszeptibilität der mesenzephalen dopaminergen Zellen auf das Neurotoxin MPTP wurde in Rahmen dieser Arbeit bei den intoxikierten Tieren eine unterschiedliche striatale Denervierung erreicht. Während in der lateralen SN durch MPTP nahezu alle dopaminergen Neurone abgetötet wurden, blieben in der medialen SN sowie der angrenzenden VTA einige dopaminerge Neurone erhalten. Dies führte zu einer totalen dopaminergen Denervation der dorsalen SVZ, wogegen die ventrale SVZ, der anteroventral liegenden Nucleus accumbens und damit auch der RMS noch von einigen dopaminergen Fasern erreicht wurde. Um die Auswirkungen dieser unterschiedlichen Denervation auf die Proliferation zu überprüfen, wurde die SVZ in eine dorsale und eine ventrale Hälfte geteilt und das dorso-ventrale Verhältnis

der Anzahl PCNA bzw. PSA-NCAM positiven Zellen innerhalb der einzelnen Tiere bestimmt. Somit konnten im Vergleich zu einer Angabe der totalen dorsalen Zellzahl eine Verzerrung der Ergebnisse durch interindividuelle Unterschiede in der Proliferationsrate sowie der Denervationsrate ausgeschlossen werden. Während das Verhältnis der PCNA positiven Zellen schon bei den Kontrolltieren eine stärkere Proliferation ventral als dorsal anzeigten, verstärkte sich diese Diskrepanz erheblich bei den mit MPTP-intoxikierten Tieren, die ja einen deutlichen Gradienten in der Denervierung der SVZ besaßen. Somit konnte nachgewiesen werden, dass das räumlich differenzierte Absterben der nigralen Zellen eine räumlich differenzierte Verringerung der Zellproliferation in der SVZ zur Folge hat. Diese Daten entsprechen den Ergebnissen von Baker et al., 2004, die eine geringer ausgeprägte Verringerung der Zellproliferation im ventromedialen Bereich der SVZ im Vergleich zur restlichen SVZ parallel zur dort geringer ausgeprägten dopaminergen Denervation in einem 6-OHD-Läsionsmodell bei Mäusen bemerkten (Baker et al., 2004).

Ein Gradient der Anzahl neugeborener, migrierender Neuroblasten parallel zu dem Denervierungsgradienten konnte bei der Analyse der räumlichen Verteilung der PSA-NCAM positiven Zellen nicht aufgezeigt werden. Beide Ergebnisse zusammen genommen weisen darauf hin, dass zwar eine räumlich differenzierte dopaminerge Denervierung auch zu einer räumlich differenzierten Proliferation führt, dies aber nicht durch räumlich differenzierte Anzahl der neugeborenen PSA-NCAM positiven Zellen reflektiert wird. Vermutlich ist dies dadurch zu erklären, dass die PSA-NCAM positiven Zellen, einmal gebildet, sich auf noch nicht näher bestimmten, sich verzweigenden Pfaden (Doetsch et al., 1997) innerhalb der antero-posterioren Ausdehnung der SVZ in Richtung RMS bewegen und damit jegliche räumliche Unterschiede bezüglich der Herkunft verwischen.

Weist eine räumlich differenzierte dopaminerge Innervation auch auf eine qualitativ unterschiedliche Proliferation innerhalb der SVZ? Einige Studien zeigen, dass in unterschiedlichen Bereichen der SVZ unterschiedliche Zellen erzeugt werden. So unterscheiden Luskin et al. eine anteriore SVZ, „aSVZ“, als Quelle der in den RMS migrierenden neuronalen Vorläuferzellen im Gegensatz zum dorsolateralen Bereich als Hauptquelle für neu gebildete Gliazellen (Luskin et al., 1997). Winner et al. schildern 2006 eine räumlich sehr differenzierte Verteilung Pax6 positiven Zellen innerhalb der SVZ, die sich hauptsächlich in einem dünnen Band des rostralen Anteils

der anterioren SVZ befänden (Winner et al., 2006). Pax6 ist ein intrinsisches Signal in Richtung eines dopaminergen Phänotyps der neu generierten Neuroblasten.

So scheinen gewisse räumliche Unterschiede dorso-ventral und eventuell antero-posterior zumindest innerhalb des SVZ von Nagetieren vorzuherrschen, was auch aus embryologischer Sicht nachvollziehbar ist:

Die embryonale SVZ kann in zwei Regionen eingeteilt werden: die neokortikale SVZ und die Ganglionischen Vorwölbungen (GE: *ganglionic eminences*). Die neokortikale SVZ als Teil des dorsalen Vorderhirns, charakterisiert durch die Transkriptionsfaktoren Pax6, Ngn oder Emx, erzeugt unter anderem Zellen des Neokortex und die granulären Zellen des HC. Die GE, charakterisiert durch die Transkriptionsfaktoren Nkx2.1, Dlx1 und Dlx2, produzieren Interneurone, Astrozyten und Oligodendrozyten in vielen Hirnteilen und können in eine kaudale, eine laterale und eine mediale Vorwölbung eingeteilt werden. Der anteriore Teil der lateralen GE erzeugt die Interneurone im BO. Brazel et al. postulieren, dass die adulte SVZ Überbleibsel der GE, der „ventralen pränatalen SVZ“ sei, und somit das Dach der lateralen Ventrikel aus der neokortikalen SVZ, der „dorsalen“ pränatalen SVZ, entstände (Brazel et al., 2003). Das Vorhandensein von „dorsalen“ Faktoren wie Pax6 auch in ventralen Anteilen widerspricht dem Konzept einer strengen Trennung und lässt eher auf eine gemischte Herkunft der adulten SVZ schließen.

Inwieweit diese räumliche Differenzen auch im adulten Primaten unterschiedliche Innervationen und/oder unterschiedliche Funktionen widerspiegeln, ist noch nicht bekannt und für ein genaueres Verständnis der Neurogenese sicherlich ein interessantes Forschungsfeld.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit abzuleiten sind jedoch folgende zwei Anmerkungen: Verschiedene Artikel weisen auf eine Proliferation innerhalb des RMS bei Primaten und beim Menschen hin (Kornack & Rakic, 2001; Pencea et al., 2001; Bedard & Parent, 2004; Quinones-Hinojosa et al., 2006; Curtis et al., 2007). Sollte dort eine Proliferation stattfinden, die ähnlichen Prinzipien wie der innerhalb der SVZ unterliegt, ist auf folgenden Umstand hinzuweisen: Da bei dem IPS wie bei einer MPTP-Intoxikation zuerst die lateral lokalisierten nigralen Neurone vor den medialen absterben (Braak et al., 2003), ist nicht auszuschließen, dass sich eine verringerte Proliferationsrate innerhalb der SVZ von Parkinson Patienten von posterokranial nach

anterokaudal hin ausbreitet und die Proliferation innerhalb der RMS in frühen Krankheitsstadien relativ unverändert bleibt. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht weiter untersucht.

Bei Tiermodellen ist weiterhin darauf zu achten, dass eine dopaminerge Denervation durch eine Intoxikation mit MPTP in wesentlich geringeren Maße zu einer Verringerung der Proliferation innerhalb der RMS führen könnte als eine solche durch z.B. eine Intoxikation mit 6-OHDA, welches zu einem gleichmäßigeren und vollständigeren dopaminergen Denervation führt.

4. Funktion der dopaminergen Stimulation der Neurogenese innerhalb der SVZ

In dieser Arbeit konnte erstmals am Primatenmodell gezeigt werden, dass eine verringerte dopaminerge Innervation, wie sie auch bei dem IPS besteht, auch im hohen Alter zu einer verringerten Zellproliferation in der SVZ führt. Dies steht im Einklang mit der Arbeit von Höglinger et al., die 2004 nachweisen konnten, dass die Anzahl proliferierender Zellen, charakterisiert durch eine Markierung durch den Antikörper für PCNA, in der SVZ in *post mortem* Gehirn von Patienten mit IPS im Vergleich zu gleichaltrigen Menschen ohne IPS reduziert ist (Höglinger et al., 2004). Somit scheint der regulierende Einfluss von Dopamin auf die Neurogenese in Laufe der Entwicklung von Maus zu Mensch erhalten geblieben zu sein. In diesem Abschnitt soll der Frage nachgegangen werden, welche Funktion die nigro-subventrikuläre Projektion unter physiologischen Bedingungen besitzt. Weiterhin soll hier der Frage nachgegangen werden, ob die verringerte dopaminerge Innervation der humanen SVZ bei IPS Patienten Ursache des Frühsymptoms Riechstörung sein könnte.

Um die Funktion der nigro-subventrikulären Projektion beurteilen zu können, muss zunächst der Funktion der durch ihren Stimulus erzeugten Neuroblasten in der SVZ nachgegangen werden. Die „Funktion“ einer Nervenzelle *in vivo* differenziert nachweisen zu können, birgt einige Schwierigkeiten. So schlagen Kempermann et al., 2004 vor, „Funktion“ innerhalb von mindestens drei verschiedenen Ebenen zu beurteilen: einem zellulären Niveau, das die physiologischen Eigenschaften der neugeborenen Zelle beschreibt; einem Netzwerkniveau, das die Integration in (schon existierende) neuronale Netzwerke beurteilt und einem Systemniveau, das den

Einfluss neuer Nervenzellen auf regionalspezifische Aufgaben wie z.B. die Geruchserkennung für der BO darstellt. Eine vierte Ebene, die das Verhalten des einzelnen Individuums im psychologischen und sozialen Kontext, mit einschließt, sei denk-, aber nur schwer experimentell nachweisbar (Kempermann et al., 2004). Möglich sind hingegen experimentell aufgezeigte Zusammenhänge zwischen Verhaltensänderungen und Änderungen der Proliferationsrate, wobei eine Verzerrung durch interferierende Faktoren kaum sicher ausgeschlossen werden kann. Nachweise einer „Funktion“ neu gebildeter Nervenzellen konnten im Tiermodell für die ersten drei Ebenen und teilweise sogar für die vierte Ebene erbracht werden: So wurden nicht nur eine Integration von neu gebildeten Nervenzellen in schon bestehende Netzwerke inklusive der Aneignung elektrophysiologischer Eigenschaften einer maturen Zelle aufgezeigt (Belluzzi et al., 2003), es konnten auch wechselseitige Zusammenhänge zwischen Verhaltensänderungen und unterschiedlichen Proliferationsraten nachgewiesen werden (van Praag et al., 2005). Somit konnten im Tiermodell auf unterschiedlicher Ebene eine funktionelle Bedeutung der neu gebildeten Nervenzellen nachgewiesen werden.

Angesichts der viel versprechenden Ergebnisse im Tierexperiment erscheint es nicht verwunderlich, dass eine Änderung der Neurogenese auch beim Menschen mit Symptomen, der Entstehung oder Heilung einer Vielzahl von neurodegenerativer Erkrankungen in Verbindung gebracht wird. So wird eine verringerte hippocampale Neurogenese mit der Entstehung von Depression verantwortlich gemacht und umgekehrt die Wirkung von Antidepressiva auf der Beeinflussung der Neurogenese zurückgerufen (Sheline et al., 1996; Malberg et al., 2000; Santarelli et al., 2003), ein Zusammenhang zwischen der Huntington Krankheit und einer veränderten Proliferationsrate aufgezeigt (Curtis et al., 2005), und in dieser und anderen Arbeiten (Höglinger et al., 2004; Baker et al., 2004) eine Verbindung von einer verringerten Zellproliferation und (nicht-motorischen Symptomen, z.B. einer Riechstörung) des IPS geknüpft.

Im Folgenden soll der Frage nachgegangen werden, ob eine durch die dopaminerge Denervation verursachte veränderte Neurogeneserate Ursache des Frühsymptoms Riechstörung bei dem IPS sein kann. Dies würde voraussetzen, dass für ein Aufrechterhalten des Riechvermögens bis ins hohe Alter ein kontinuierlicher Strom von Neuroblasten in den Riechkolben einwandert und sich dort funktionell integriert.

Dafür spricht, dass ein Regulationsmechanismus der Proliferation durch Dopamin im Laufe der Evolution bis zum Menschen konserviert worden ist. So führt eine dopaminerge Denervierung bei Nagern, Primaten und beim Menschen zu einer verringerten Proliferationsrate (Höglinger et al., 2004; Baker et al., 2004, Freundlieb et al., 2006). Weiterhin konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass eine verringerte subventrikuläre Neurogenese zu einer verringerten Leistung des Riechgedächtnisses führt (Scotto-Lomassese et al., 2003). Auch bei 75% bis 90 % der Parkinson Patienten, bei denen auch ein verringertes dopaminerges Niveau im Striatum vorliegt, leiden unter Hyposmie (Doty et al., 1992). Der Schluss liegt nahe, dass die Hyposmie bei dem IPS durch eine pathologisch veränderte Neurogeneserate verursacht wird, die wiederum in der dopaminergen Denervierung ihre Ursache hat. Die Riechstörung ist ein Frühsymptom des IPS, das vor klinischen Anzeichen einer Verringerung des striatalen Dopaminniveaus auftritt (Ponsen et al., 2004). Motorische Symptome treten bei einem um 60%-70% verringerten Dopamnniveau im Striatum auf (Bernheimer et al., 1973). Möglich wäre, dass die Neurogenese schon bei einem leicht verminderten Dopaminmangel, der noch keine motorischen Symptome erzeugt, negativ beeinflusst wird.

Scheinbar dagegen sprechen anatomische Erkenntnisse der menschlichen SVZ: Beim Menschen beschreibt der bisher ausführlichste Artikel zur Topographie der SVZ nur eine sehr spärliche Proliferation und schließt eine „*chain migration*“, also ein Auswandern neugeborener Zellen in großen Gruppen, wie sie bei Nagern und Primaten in den BO beschrieben wurde, aus (Quinones-Hinojosa et al., 2006). Die Migration einzelner Zellen in noch nicht bestimmte Areale sei jedoch möglich. Auch eine Proliferation innerhalb des RMS und des BO ist denkbar (Curtis et al., 2007). Die schiere Größe des humanen Gehirns ließe -wenn überhaupt- die Auswirkungen einer reduzierten Neurogeneserate erst sehr viel später erscheinen: Während im Nagetier neu gebildete Zellen aus der SVZ über den RMS mit ungefähr 30µm/h etwa 3-5 mm in den OB wandern und dafür mindestens 15 Tage benötigen, sind im Makaken erst zwischen 75 und 97 Tagen nach BrdU-Injektion neu eingewanderte Zellen im BO nachzuweisen (Kornack & Rakic, 2001). Auch wenn der BO des Makaken in etwa 20mm lang und damit länger als ein ganzes Mäusehirn ist, scheint dies auf eine erheblich verringerte Rate an Proliferation und Migration im Vergleich zum Nager hinzuweisen. Bei dem Menschen ist der Riechkolben ein Vielfaches länger. Sollten neu gebildeten Zellen aus der SVZ auch beim adulten Menschen solche großen

Entfernungen in ausreichender Zahl zurücklegen können, würden sie weit länger für die Strecke SVZ-BO benötigen, selbst wenn man die gleiche Proliferationsrate und Wanderungsgeschwindigkeit wie beim Makaken voraussetzt.

Bei Patienten, die unter dem IPS leiden, beginnt das Absterben der dopaminergen Neurone in der posterolateralen Bereich der SN, um sich erst später nach anteromedial auszubreiten (Braak et al., 2004). Vorausgesetzt, die räumliche Innervation der humanen SVZ ähnelt der des Makaken, so würde eine dopaminerge Denervation in der SVZ sich von posterodorsal nach anteroventral ausbreiten. Ein Großteil der proliferierenden Zellen der menschlichen SVZ liegt im anteroventralen Bereich (Quinones-Hinojosa et al., 2006) und ist damit für relativ lange Zeit von der dopaminergen Denervation ausgeschlossen. Gleiches gilt für eine Zellproliferation im RMS oder dem BO selbst, die auch beim Menschen vorhanden sein soll (Liu & Martin, 2003; Bedard & Parent, 2004, Höglinger et al., 2004; Curtis et al., 2007).

Somit erscheint möglich, dass auch beim Menschen eine verringerte dopaminerge Innervation (wie sie bei dem IPS auftritt) die Neurogeneserate in der SVZ und im RMS reduziert, welches wiederum Ursache für eine verminderte Riechleistung sein könnte. Dies wäre jedoch ein sehr langfristiger Prozess. Da eine Verringerung des Dopaminniveaus im Striatum (und damit wahrscheinlich auch in der SVZ) jedoch schon viele Jahre vor Auftreten von motorischen Symptomen nachzuweisen ist (Hilker et al., 2005), kann das Frühsymptom Riechstörung durch eine anfänglich nur geringe Veränderung des Dopaminniveaus verursacht sein.

Zusätzlich zu der dopaminergen Denervation gibt es Hinweise auf einen weiteren, die Neurogenese negativ beeinflussender Faktor bei dem IPS: Es konnte im Nagermodell nachgewiesen werden, dass die Expression von mutiertem α -Synuklein, ein weiteres Merkmal des IPS, zu einer verringerten Neurogenese und Überleben der neu gebildeten Zellen führt (Winner et al., 2004; Winner et al., 2007).

Bei Parkinson Patienten wird ein Anstieg der Zahl dopaminergere Zellen im BO beobachtet (Huisman et al., 2004). Analog dazu konnte in einem 6-OHDA- Tiermodell eine verstärkte Bildung von dopaminergen Vorläuferzellen aufgezeigt werden, die dann in den BO auswandern (Winner et al., 2006). Höglinger et al. fanden jedoch eine verminderte Anzahl an PCNA positiven Zellen im BO von Parkinson Patienten (Höglinger et al., 2001). Somit scheint bei Parkinson Patienten nicht nur eine nicht

quantitativ, sondern auch qualitativ veränderte Neurogenese vorzuherrschen. Auch beim Nager führt eine dopaminerge Degeneration nicht nur zu einer generalisierten Herabregulierung der Neurogenese, sondern zusätzlich zu einer relativen Hochregulierung der Produktion von Vorläuferzellen dopaminerger Interneuronen (Winner et al., 2006).

Zusammenfassend scheint eine dopaminerge Denervation der SVZ auch bei Primaten zu einer quantitativ und qualitativ veränderten Neurogenese zu führen. Eine veränderte Anzahl an dopaminerger Zellen im BO könnte Auswirkung einer der verringerten dopaminergen Innervation der SVZ bei Parkinson Patienten sein und gleichzeitig Ursache des Frühsymptoms Riechstörung.

5. Ausblick

Die Neurogeneseforschung wird von zwei teilweise sehr unterschiedlichen Impetus angetrieben: zum einen die Suche nach der physiologischen Funktion der Neurogenese und zum anderen des Versuches der Nutzbarmachung der Neurogenese für therapeutische Zwecke.

Die Neurogenese im SVZ-BO-System wird im Tiermodell für das Speichern von Riecheindrücken (mit)verantwortlich gemacht (Rocheffort et al., 2002; Scotto-Lomassese, 2003). Im HC soll eine adulte Neurogenese für ein fortlaufendes Gedächtnis sorgen (Aimone et al., 2006; Shors et al., 2001). Die hier vorgelegte Arbeit bekräftigt die Hypothese, dass bei Primaten ein verringertes Dopaminniveau verantwortlich ist für eine verringerte Neurogenese. Diese könnte bei Parkinson Patienten Ursache des Frühsymptoms Riechstörung sein. Um dies sicher zu überprüfen, könnte mithilfe der im der Einleitung erläuterten C14-Methode das Alter der neuronalen Zellen innerhalb des BO mit dem Alter von Zellen in Regionen, in denen keine neurale Proliferation stattfindet, verglichen werden. In einem zweiten Schritt könnten dann das Alter von Nerven des BO bei Parkinson-Patienten und bei einer Kontrollgruppe verglichen werden. Eine verringerte Neurogenese sollte bei den Parkinson-Patienten zu einer im Durchschnitt älteren Zellpopulation führen als bei der Kontrollgruppe, bei der die Zellpopulation kontinuierlich durch neu gebildete Nervenzellen ergänzt werden sollten.

Sollte sich die Hypothese als falsch herausstellen, drängte sich die Frage auf, ob die subventrikuläre Neurogenese beim Menschen nicht nur ein phylogenetisches Überbleibsel ist, welches in makrosomatischen Tieren wie der Maus und sogar bei nicht-menschlichen Primaten noch funktionelle Einflüsse haben mag, diese aber beim Menschen verloren hat. Möglich erscheint, dass die subventrikuläre Neurogenese unter pathophysiologischen Bedingungen als Schutzmechanismus funktioniert, dass also zwar keine Auswanderung in den BO, sondern in andere, vorgeschädigte Bereiche des Gehirns vonstatten geht. Hier konnte bei Ratten gezeigt werden, dass Stammzellen für mehrere Monate nach einem künstlich herbeigeführten ischämischen Ereignis striatale Neurone produzieren, die in den geschädigten Bereich einwandern (Thored et al., 2006). Beim Primaten führt ein ähnlicher Stimulus auch zu einer verstärkten Proliferation innerhalb der SVZ, jedoch scheinen keine Zellen aus dem eng begrenzten Bereich der SVZ und des RMS auszuwandern (Tonchev et al., 2005). Auch beim Menschen erscheint es möglich, dass ein ischämischer Infarkt zur Neubildung von Nervenzellen in der Penumbra führen kann (Jin et al., 2006), jedoch bleibt ungeklärt, ob diese Zellen aus der SVZ auswandern oder lokal gebildet werden. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist unklar, ob das Fehlen eines eindeutigen Nachweises auswandernder Zellen in geschädigte Areale bei Primaten durch unzureichende technische und histochemische Prozeduren verursacht wird oder ob grundsätzlich bei Primaten das Vorhandensein von verhindernden Faktoren oder die Abwesenheit von die Migration fördernden Faktoren eine solche Auswanderung verhindert.

Der zweite Antrieb der Neurogeneseforschung besteht in der Hoffnung auf eine Nutzbarmachung der Neurogenese als therapeutisches Utensil. Hier könnte die endogene Zellproliferation Ansätze für einen eleganten Reparaturmechanismus für neurodegenerative Erkrankungen oder ischämische Läsionen bieten (Lindvall et al., 2004; Haas et al., 2005). So können ins Striatum von IPS Patienten transplantierte fetale postmitotische dopaminerge Nervenzellen für über 10 Jahre überleben und dieses reinnervieren (Piccini et al., 1999). Da die Transplantation von fetalen Zellen immunologische, sicherheitstechnische, logistische und ökonomische Probleme aufwirft, bietet sich als Quelle von Zelltransplantaten die SVZ aufgrund ihrer relativ einfachen Erreichbarkeit an. Erkenntnisse über Stimulierungsmechanismen unter physiologischen Bedingungen können sich hier vielleicht als übertrag- und nutzbar erweisen.

Diese Arbeit bewegt sich auf dem Grenzgebiet beider Antriebe: Sie bietet einerseits Erkenntnisse über pathophysiologische Ereignisse, die wahrscheinlich in sehr ähnlicher Form auch beim Menschen auftreten und andererseits Hinweise für eine eventuelle Benutzung von endogenen Stammzellen zu Reparaturzwecken.

Bezüglich der weiteren Forschung über Stammzellen darf aus anthropozentrischer Sicht gefordert werden, dass bessere Versuchsmodelle zum Erforschen der Funktion humaner Neurogenese entwickelt werden müssen. Hierfür müssen unschädliche Methoden zum *in-vivo*-Monitoring der neu gebildeten Nervenzellen möglich gemacht werden. Dafür bieten sich bildgebenden Verfahren wie MRT, SPECT oder PET an. Weiterhin muss das Wissen über die Transplantation oder Stimulation der endogenen Stammzellen vergrößert werden. Wenn bei der Transplantation von fetalen Stammzellen die Tumorentwicklung ein Problem darstellt, wäre es interessant, die DNS-Reparaturmechanismen der endogenen Stammzellen zu untersuchen, die nach jetzigem Wissensstand trotz einer lebenslangen Undifferenziertheit eine Tumorentstehung verhindern oder zumindest sehr selten macht.

Zusammenfassend bietet das Vorhandensein von bis ins hohe Lebensalter proliferierender Zellen innerhalb des humanen Gehirns faszinierende Möglichkeiten zur Heilung von bisher nahezu unheilbaren Krankheitszuständen.

V. Abkürzungsverzeichnis

6-OHDA	6-Hydroxydopamin
ATP	Adenosintriphosphat
BDA	Biotin Dextran Amin
BO	<i>bulbus olfactorius</i> , Riechkolben
BrdU	5-Bromo-2'-Deoxyuridin
CA	Commissura anterior
COMT	Catechol-O-Methyl-Transferase
GE	<i>Ganglionic eminence</i> , Ganglionische Vorwölbung
h	Stunde
HC	Hippocampus
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
l	Liter
LB	Lewy Bodies
LN	Lewy Neurites
MAO-B	Monoaminoxidase B
min	Minute
MPDP ⁺	1-Methyl-4-phenyl-1,2-dihydropyridiniumion
MPP ⁺	1-Methyl-4phenyl-pyridiniumion
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mRNS	messenger-Ribonukleinsäure
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyd
PSA-NCAM	polysialic acid-neural cell adhesion molecule
RMS	Rostraler Migratorischer Strom
s	Sekunde
SGZ	Subgranuläre Zone
SNpc	Substantia Nigra, pars compacta
SVZ	Subventrikuläre Zone
VTA	ventrales tegmentales Areal

VI. Zusammenfassung

Auch im Gehirn adulter Säugetiere findet bis ins hohe Lebensalter die Bildung neuer Nervenzelle statt. Dieser Vorgang wird als adulte Neurogenese bezeichnet und beschränkt sich auf zwei Regionen, der Subventrikulären Zone (SVZ) und der Subgranulären Zone (SGZ) im Hippocampus. Um die jungen Zellen zukünftig eventuell für Reparaturvorgänge im pathologisch veränderten Gehirn nutzen zu können, müssen die physiologischen und pathophysiologischen endogenen Regulationsmechanismen bekannt sein. In dieser Arbeit sollte der Einfluss des Neurotransmitters Dopamin auf die subventrikuläre Neurogenese erforscht werden, indem Ursprung und Funktion der dopaminergen Innervation der SVZ bei nicht-menschlichen Primaten untersucht wurden. Durch Tracing Studien in drei Makaken konnte eine topographisch organisierte Innervation aus dem *pars compacta* der Substantia nigra, aber nicht aus dem angrenzenden retrorubralen Feld, in die SVZ dargestellt werden. Immunfärbungen gegen Tyrosin-Hydroxylase und 5-Bromo-2'-Deoxyuridin zeigten eine enge räumliche Nähe zwischen dopaminergen Fasern und proliferierenden subventrikulären Zellen. Im Folgenden sollten die pathophysiologischen Vorgänge bei der Parkinson Krankheit, die hauptsächlich bei über 60-Jährigen auftritt und durch eine Degeneration der dopaminergen nigralen Neurone gekennzeichnet ist, möglichst exakt simuliert werden. Die nigrale dopaminerge Innervation wurde bei drei mindestens 20 Jahren alten Makaken durch eine Behandlung mit 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin zu einem großen Teil zerstört. Im Vergleich zu drei gleichaltrigen Kontrolltieren zeigte sich eine Abnahme von PCNA (proliferating cell nuclear antigen)-positiven proliferierenden Zellen um 44% sowie von PSA-NCAM (polysialylated neural cell adhesion molecule)-positiven Neuroblasten um 59% in der denervierten SVZ. Weiterhin konnten intraindividuell Unterschiede zwischen stark und schwach denervierten Teilen der SVZ nachgewiesen werden. Beide Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine intakte nigro-subventrikuläre Innervation für das Aufrechterhalten der subventrikulären Neurogenese beim alten Individuum unerlässlich ist. Der hier erfolgte Nachweis der Existenz einer dopaminerg kontrollierten Neurogenese in der SVZ adulter Primaten eröffnet die Perspektive, dieses System eventuell für die endogene Reparatur des zentralen Nervensystems bei neurodegenerativen Krankheiten nutzbar zu machen.

VII. Literaturverzeichnis

Viel Hintergrundwissen und einige Literaturangaben wurden folgenden **Büchern** entnommen:

Nieuwenhuys "Chemoarchitecture of the Brain", Springer 1985
Kempermann "Adult Neurogenesis", Oxford University Press 2006
Gerlach, Reichmann, Riederer "Die Parkinson-Krankheit", Springer 2001
Eggert et al. „Leitlinie Parkinson-Syndrome“, Thieme 2005
Brandt, Dichganz, Diener „Therapie und Verlauf neurologischer Erkrankungen“, Kohlhammer 2003

Artikel:

- Aimone JB, Wiles J, Gage Fh (2006) Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nat Neurosci.* 9:723-7
- Alexander GE, DeLong MR, Strick PL (1986) Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci.* 9:357-81
- Altar CA, Cai N, Blicen T, Juhasz M, Conner JM, Acheson AL, Lindsay RM, Wiegand SJ (1997) Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature* 389:856-860
- Altman J (1962) Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135:1128-1129
- Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A (2003) Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425(6961):968-73.
- Ambrogini P, Lattanzi D, Ciuffoli S, Agostini D, Bertini L, Socchi V, Santi S, Cuppini R (2004) Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus. *Brain Res* 1017:21-31
- Arsenault MY, Parent A, Seguela P, Descarries L (1988) Distribution and morphological characteristics of dopamine-immunoreactive neurons in the midbrain of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *J Comp Neurol.* 267(4):489-506
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O (2002) Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8(9):963-70.
- Assal F, Spahr L, Hadengue A, Rubbia-Brandt L, Burkhard PR (1998) Tolcapone and fulminant hepatitis. *Lancet* 352(9132):958
- Baker SA, Baker KA, Hagg T (2004) Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone. *Eur J Neurosci* 20:575-9
- Baker SA, Baker KA, Hagg T (2005) D3 dopamine receptors do not regulate neurogenesis in the subventricular zone of adult mice. *Neurobiol Dis* 18:512-7

- Baldereschi M, Di Carlo A, Rocca WA, Vanni P, Maggi S, Perissinotto E, Grigoletto F, Amaducci L, Inzitari D (2000) Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: two-fold higher incidence in men. ILSA Working Group. Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurology* 55(9):1358-63.
- Bedard A, Parent A (2004) Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb. *Dev Brain Res* 151:159-168
- Belluzzi O, Benedusi M, Ackman J, LoTurco JJ (2003) Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 23:10411-10418
- Berger K, Breteler MM, Helmer C, Inzitari D, Fratiglioni L, Trenkwalder C, Hofman A, Launer LJ (2000) Prognosis with Parkinson's disease in europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology*. 54(11 Suppl 5):S24-7.
- Bernabeu R, Sharp FR (2000) NMDA and AMPA/kainate glutamate receptors modulate dentate neurogenesis and CA3 synapsin-I in normal and ischemic hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:1669-1680
- Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F (1973) Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci* 20(4):415-55
- Bhardwaj RD, Curtis MA, Spalding KL, Buchholz BA, Fink D, Bjork-Eriksson T, Nordborg C, Gage FH, Druid H, Eriksson PS, Frisen J (2006) Neocortical neurogenesis in humans is restricted to development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12564-8
- 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
- Biousse V, Skibell BC, Watts RL, Loupe DN, Drews-Botsch C, Newman NJ (2004) Ophthalmologic features of Parkinson's disease. *Neurology*. 62(2):177-80
- Bjorklund A, Dunnett SB (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 30:194-202
- Borta A, Höglinger GU (2007) Dopamine and adult neurogenesis. *J Neurochem* 100(3):587-95.
- Braak H, Del Tredici K, Bratzke H, Hamm-Clement J, Sandmann-Keil D, Rub U (2002) Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *J Neurol* 249 Suppl 3:III/1-5
- Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24:197-211
- Braak H, Ghebremedhin E, Rub U, Bratzke H, Del Tredici K (2004) Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 318:121-34
- Brazel CY, Romanko MJ, Rothstein RP, Levison SW (2003) Roles of the mammalian subventricular zone in brain development. *Prog Neurobiol* 69:49-69
- Brezun JM, Daszuta A (1999) Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neurosci* 89:999-1002

- Bronnick K, Aarsland D, Larsen JP (2005) Neuropsychiatric disturbances in Parkinson's disease clusters in five groups with different prevalence of dementia. *Acta Psychiatr Scand* 112(3):2001-2007
- Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM, Kopin IJ (1983) A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(14):4546-50
- Carlen M, Cassidy RM, Brismar H, Smith GA, Enquist LW, Frisen J (2002) Functional integration of adult-born neurons. *Curr Biol* 12:606-608
- Chase R, Tolloczko B (1987) Evidence for differential DNA endoreplication during the development of a molluscan brain. *J Neurobiol* 18(5):395-406.
- Cheng A, Wang S, Cai J, Rao MS, Mattson MP (2003) Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. *Dev Biol.* 258:319-333
- Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Kuhn HG (2004) Decreased neurogenesis after cholinergic forebrain lesion in the adult rat. *J Neurosci Res* 77:155-165
- Coronas V, Bantubungi K, Fombonne J, Krantic S, Schiffmann SN, Roger M (2004) Dopamine D3 receptor stimulation promotes the proliferation of cells derived from the post-natal subventricular zone. *J Neurochem* 91:1292-301
- Corotto FS, Henegar JA, Maruniak JA (1993) Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain. *Neurosci Lett* 149:111-114
- 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
- Curtis MA, Kam M, Nannmark U et al. (2007) Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science* 315(5816):1243-9.
- Curtis MA, Penney EB, Pearson J, Dragunow M, Connor B, Faull RL (2005) The distribution of progenitor cells in the subependymal layer of the lateral ventricle in the normal and Huntington's disease human brain. *Neurosci* 132:777-88.
- Dahlström A, Fuxe K (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20(7):398-9.
- Dauer W, Przedborski S (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889-909
- Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM, Kopin IJ (1979) Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res* 1(3):249-54
- DeKosky ST, Marek K (2003) Looking backward to move forward: early detection of neurodegenerative disorders. *Science* 302(5646):830-4.

- De Rijk MC, Launer LJ, Berger K et al. (2000) Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* 54:S21-23
- Deuschl G, Schade-Brittinger C, Krack P et al., (2006) A randomized trial of deep-brain stimulation for Parkinson's disease. *N Engl J Med* 355(9):896-908.
- Diaz J, Ridray S, Migon V, Griffon N, Schwartz JC, Sokoloff P (1997) Selective expression of dopamine D3 receptor mRNA in proliferative zones during embryonic development of the rat brain. *J Neurosci* 17:4282-92
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17:5046-5061
- Doty RL, Stern MB, Pfeiffer C, Gollomp SM, Hurtig HI (1992) Bilateral olfactory dysfunction in early stage treated and untreated idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55:138-142
- Elizan TS, Yahr MD, Moros DA, Mendoza MR, Pang S, Bodian CA (1989) Selegiline as an adjunct to conventional levodopa therapy in Parkinson's disease. Experience with this type B monoamine oxidase inhibitor in 200 patients. *Arch Neurol* 46(12):1280-3
- El-Khodori BF, Oo TF, Kholodilov N, Burke RE (2003) Ectopic expression of cell cycle markers in models of induced programmed cell death in dopamine neurons of the rat substantia nigra pars compacta. *Exp Neurol* 179(1):17-27.
- Elsworth JD, Deutch AY, Redmond DE Jr, Sladek JR Jr, Roth RH (1987) Differential responsiveness to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity in sub-regions of the primate substantia nigra and striatum. *Life Sci* 40:193-202
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg V, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313-1317
- Fahn S (1999) Parkinson disease, the effect of levodopa, and the ELLDOPA trial. Earlier vs Later L-DOPA. *Arch Neurol* 56(5):529-35
- Fallon JH, Moore RY (1978) Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J Comp Neurol* 180:545-80.
- Filippov C, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, Yamaguchi M, Kettenmann H, Kempermann G (2003) Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci*. 23:373-382
- Findley L, Aujla M, Bain PG, et al. (2003) Direct economic impact of Parkinson's disease : a research survey in the United Kingdom. *Mov Disord* 18:1139-1145
- Fishburn CS; Bedford M, Lonai P, Fuchs S (1994) Early expression of D3 dopamine receptors in murine embryonic development. *FEBS Lett* 381:257-61
- Francois C, Percheron G, Yelnik J, Heyner S. (1985) A histological atlas of the macaque (*Macaca mulatta*) substantia nigra in ventricular coordinates. *Brain Res Bull.* 14(4):349-67

- Francois C, Yelnik J, Tande D, Agid Y, Hirsch EC (1999) Dopaminergic cell group A8 in the monkey: anatomical organization and projections to the striatum. *J Comp Neurol* 414(3):334-47
- Freundlieb N, Francois C, Tande D, Oertel WH, Hirsch EC & Höglinger GU (2006) Dopaminergic Substantia Nigra Neurons Project Topographically Organized to the Subventricular Zone and Stimulate Precursor Cell Proliferation in Aged Primates. *J Neurosci* 26:2321-5
- Gall CM, Hendry SH, Seroogy KB, Jones EG, Haycock JW (1987) Evidence for coexistence of GABA and dopamine in neurons of the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 266: 307-318
- 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. *PNAS USA* 97:1823-1828
- Gould E, McEwan BS; Tanapat P, Galea LAM, Fuchs E (1997) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci* 17:2492-2498
- Haas S, Weidner N, Winkler J (2005) Adult stem cell therapy in stroke. *Curr Opin Neurol* 18:59-64
- Hagell P, Nordling S, Reimer J, et al. (2002) Resource use and costs in a Swedish cohort of patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* 17:1213-1220
- Hall PA, Levison DA, Woods AI, Yu CC, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Camplejohn R, Dover R, et al. (1990) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 162:285-294
- Hilker R, Schweitzer K, Coburger S, Ghaemi M, Weisenbach S, Jacobs AH, Rudolf J, Herholz K, Heiss WD (2005) Nonlinear progression of Parkinson disease as determined by serial positron emission tomographic imaging of striatal fluorodopa F 18 activity. *Arch Neurol* 62(3):378-82
- Höglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duychaerts C, Oertel WH, Caille I, Hirsch EC (2004) Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci* 7:726-735
- Höglinger GU, Breunig JJ, Depboylu C, Rouaux C, Michel PP, Alvarez-Fischer D, Boutillier AL, Degregori J, Oertel WH, Rakic P, Hirsch EC, Hunot S (2007) The pRb/E2F cell-cycle pathway mediates cell death in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:3585-90
- Hornykiewicz (1963) Die topische Lokalisation und das Verhalten von Noradrenalin und Dopamine in der Substantia nigra des normalen und parkinsonkranken Menschen. *Wien. Klin. Wochenschrift* 75:309-312
- Huddleston D, Sosunov A, Kelm M, Hammerstone J, McKhann G, Gage FH, Small SA (2005) An MRI Correlate of dentate gyrus neurogenesis in mice. Program No 454.7 *Abstract*. Washington DC: Society for Neuroscience, 2005. Online
- Huisman E, Uylings HB, Hoogland PV (2004) A 100% increase of dopaminergic cells in the olfactory bulb may explain hyposmia in Parkinson's disease. *Mov Disord* 19:687-92

- Hunot S, Vila M, Teismann P, Davis RJ, Hirsch EC, Przedborski S, Rakic P, Flavell RA (2004) JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 11:665-70
- Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH (1985) Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(7):2173-7
- Javoy-Agid F, Agid Y (1980) Is the mesocortical dopaminergic system involved in Parkinson disease? *Neurology* 30(12):1326-30
- Jellinger KA (1991) Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Mol Chem Neuropathol* 14:153-197
- Jiang O, Zhang ZG, Ding GL, Zhang L, Ewing JR, Wang L, Zhang R, Li L, Lu M, Meng H; Arbab AS, Hu J, Li RJ, Nejad SP, Athiraman H, Chopp M (2005) Investigation of neural progenitor cell induced angiogenesis after embolic stroke in rat using MRI. *NeuroImage* 28:698-707
- Jin K, Wang X, Xie L, Mao XO, Zhu W, Wang Y, Shen J, Mao Y, Banwait S, Greenberg DA (2006) Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13198-202
- Junghanns S, Fuhrmann JT, Simonis G, Oelwein C, Koch R, Strasser RH, Reichmann J, Storch A (2007) Valvular heart disease in Parkinson's disease patients treated with dopamine agonists: a reader-blind monocenter echocardiography study. *Mov Disord* 22:234-8
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493-495
- Kempermann G, Wiskott L, Gage FH (2004) Functional significance of adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 14:186-91
- Kilpatrick TJ, Bartlett PF (1993) Cloning and growth of multipotential neural precursors: requirements for proliferation and differentiation. *Neuron* 10:255-265
- Kippin TE, Kapur S, van der Kooy D (2005) Dopamine specifically inhibits forebrain neural stem cell proliferation, suggesting a novel effect of antipsychotic drugs. *J Neurosci* 25:5815-23
- Kornack DR, Rakic P (2001) The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:4752-4757
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219(4587):979-80
- Langston JW, Ballard PA Jr (1983) Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N Engl J Med* 309(5):310
- Lennington JB, Yang Z, Conover JV (2003) Neural stem cells and the regulation of adult Neurogenesis. *Reprod Biol Endocrinol* 1:99
- LeWitt PA (2004) Clinical trials of neuroprotection for Parkinson's disease. *Neurology* 63(7 Suppl 2):S23-31

- Limousin P, Pollak P, Benazzouz A, Hoffmann D, Le Bas JF, Broussolle E, Perret JE, Benabid AL (1995) Effect of parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation. *Lancet* 345(8942):91-5
- Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A (2004) Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders – how to make it work. *Nat Med* 10 Suppl:S42-50
- Liu Z, Martin LJ (2003) Olfactory bulb core is a rich source of neural progenitor and stem cells in adult rodent and human. *J Comp Neurol* 459:368-391
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:978-981
- Luskin MB, Zigova T, Soteres BJ, Stewart RR (1997) Neuronal progenitor cells derived from the anterior subventricular zone of the neonatal rat forebrain continue to proliferate in vitro and express a neuronal phenotype. *Mol Cell Neurosci* 8:351-366
- Lynd-Balta E, Haber SN (1994a) The organization of midbrain projections to the ventral striatum in the primate. *Neuroscience* 59:609-623
- Lynd-Balta E, Haber SN (1994b) The organization of midbrain projections to the striatum in the primate: sensorimotor-related striatum versus ventral striatum. *Neuroscience* 59:625-640
- Maier-Hoehn MM (1983) Parkinsonism treated with levodopa: progression and mortality. *J Neural Transm Suppl.* 19:253-64.
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ & Duman RS (2000) Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20:9104-9110
- Martin RF, Bowden DM (1996) A stereotaxic template atlas of the macaque brain for digital imaging and quantitative neuroanatomy. *NeuroImage* 4:119-150
- Mattson MP, Maudsley S, Martin B (2004) BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 27, 589-594
- Messier B, Leblond CP, Smart I (1958) Presence of DNA synthesis and mitosis in the brain of young adult mice. *Exp Cell Res* 14:224-226
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78:189-225
- Mutch WJ, Strudwick A, Roy SK, Downie AW (1986) Parkinson's disease: disability, review, and management. *Br Med J* 293:675-677
- Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE (1985) Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci* 36(26):2503-8
- Nowakowski RS, Hayes NL (2001) Stem cells: the promises and pitfalls. *Neuropsychopharmacology* 25(6):799-804.
- Odelberg SJ (2004) Unraveling the molecular basis for regenerative cellular plasticity. *PLoS Biol* 2(8):E232.

- Oertel WH, Wolters E, Sampaio C, Gimenez-Roldan S, Bergamasco B, Dujardin M, Grosset DG, Arnold G, Leenders KI, Hundemer HP, Lledo A, Wood A, Frewer P, Schwarz J (2006) Pergolide versus levodopa monotherapy in early Parkinson's disease patients: The PELMOPET study. *Mov Disord* 21(3):343-53
- Ohtani N, Goto T, Waeber C, Bhide PG (2003) Dopamine modulates cell cycle in the lateral ganglionic eminence. *J Neurosci* 23:2840-50
- Oumesmar BN, Vignais L, Duhamel-Clerin E, Avellana-Adalid V, Rougon G, Baron-Van Evercooren A (1995) Expression of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule during postnatal myelination and following chemically induced demyelination of the adult mouse spinal cord. *Eur J Neurosci*. 1995 Mar 1;7(3):480-91
- Parkinson Study Group (2000) Pramipexole vs levodopa as initial treatment for Parkinson disease: A randomized controlled trial. *Jama* 284:1931-1938
- Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB (2001) Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci* 21:6706-6717
- Percheron G, Francois C, Yelnik J (1986) Instruments and techniques for the stereotactic surgery based on the CA-CP ventricular system of coordinates in monkeys. *J Neurosci Methods* 17:89-99
- Petreaun L, Alvarez-Buylla A (2002) Maturation and death of adult-born olfactory granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci* 22:6106-6113
- Piccini P, Books DJ, Bjorklund A, Gunn RN, Grasby PM, Rimoldi O, Brundin P, Haggel P, Rehncrona S, Widner H, Lindvall O (1999) Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nat Neurosci* 2:1137-40
- Ponsen MM, Stoffers D, Booij J, van Eck-Smit BLF, Wolters EC, Berendse HW (2004) Idiopathic Hyposmia As a Preclinical Sign of Parkinson's Disease. *Ann Neurol* 56:173-181
- Popolo M, McCarthy DM, Bhide PG (2004) Influence of dopamine on precursor cell proliferation and differentiation in the embryonic mouse telencephalon. *Dev Neurosci* 26:229-44
- Przedborski S (2005) Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders* 11:S3-S7
- Quinones-Hinojosa A, Sanai N, Soriano-Navarro M, Gonzalez-Perez O, Mirzadeh Z, Gil-Perotin S, Romero-Rodriguez R, Berger MS, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2006) Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J Comp Neurol* 494:415-34
- Rajput AH, Offord KP, Beard CM, Kurland LT (1984) Epidemiology of parkinsonism: incidence, classification, and mortality. *Ann Neurol*. 16(3):278-82.
- Rakic P (2002) Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis. *J Neurosci* 22:614-618
- Ramon y Cajal S (1928) *Degeneration and Regeneration of the Nervous System*. New York: Hafner

- Reiner A, Veenman CL, Medina L, Jiao Y, Del Mar N, Honig MG (2000) Pathway tracing using biotinylated dextran amines. *J Neurosci Methods* 103(1):23-37.
- Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-1710
- Rizk P, Salazar J, Raisman-Vozari R, Marien M, Ruberg M, Colpaert F, Debeir T (2006) The alpha2-adrenoceptor antagonist dexefaroxan enhances hippocampal neurogenesis by increasing the survival and differentiation of new granule cells. *Neuropsychopharmacology* 31:1146-57.
- Rocheffort C, Gheusi G, Vincent JD & Lledo PM (2002) Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *J Neurosci.* 22:2679-2689
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weissstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 30:805-809
- Schneider JS, Koveloski CJ (1990) Chronic exposure to low doses of MTPT. I. Cognitive deficits in motor asymptomatic monkeys. *Brain Res* 519:122-128
- Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182:311-322
- Schrag A, Ben-Shlomo Y, Quinn N P (1999) Prevalence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy: a cross-sectional study. *Lancet* 354: 1771-75
- Scotto-Lomassese S, Stambi C, Strambi A, Aouane A, Augier R, Rougon G, Cayre M (2003) Suppression of adult neurogenesis impairs olfactory learning and memory in an adult insect. *J Neurosci* 23:9289-9296
- Seki T (2002) Hippocampal adult neurogenesis occurs in a microenvironment provided by PSA-NCAM-expressing immature neurons. *J Neurosci Res* 69(6):772-83.
- Seki T, Arai Y (1995) Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus. *Neuroreport* 6:2479-2482
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2004) Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol* 478:359
- Sheline YI, Wang PW, Gado MG, Csernansky JG, Vannier MW (1996) Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:3908-3913
- Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E (2001) Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410:372-376
- Singer TP, Castagnoli N Jr, Ramsay RR, Trevor AJ (1987) Biochemical events in the development of parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J Neurochem* 49(1):1-8
- Smith PD, Corcker SJ, Jackson-Lewis V, Jordan-Sciutto KL, Hayley S, Mount MP et al. (2003) Cyclin-dependent kinase 5 is a mediator of dopaminergic neuron loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13650-13655

- Spalding KL, Bhardwaj RD, Buchholz BA, Druid H, Frisen J (2005) Retrospective birth dating of cells in humans. *Cell* 122:133-43
- Storch A, Trenkwalder C, Oehlwein C, Winkelmann J, Polzer U, Hundemer HP, Schwarz J (2005) High-dose treatment with pergolide in Parkinson's disease patient with motor fluctuations and dyskinesias. *Parkinsonism Relat Disord* 11:393-8
- Tabakman R, Lecht S, Lazarovici P (2004) Neuroprotection by monoamine oxidase B inhibitors: a therapeutic strategy for Parkinson's disease? *Bioessays* 26(1):80-90
- Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E (1999) Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci* 19:5792-801
- Tande D, Höglinger GU, Debeir T, Freundlieb N, Hirsch EC, Francois C (2006) New striatal dopamine neurons in MPTP-treated macaques result from a phenotypic shift not neurogenesis. *Brain* 129(Pt 5):1194-200
- Thored P, Arvidsson A, Cacci E, Ahlenius H, Kallur T, Darsalia V, Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O (2006) Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells* 24:739-47
- Tissingh G, Berendse HW, Bergmans P, DeWaard R, Drukarch B, Stoof JC, Wolters EC (2001) Loss of olfaction in de novo and treated Parkinson's disease: possible implications for early diagnosis. *Mov Disord* 16(1):41-6.
- Tonchev AB, Yamashima T, Sawamoto K, Okano H (2005) Enhanced proliferation of progenitor cells in the subventricular zone and limited neuronal production in the striatum and neocortex of adult macaque monkeys after global cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 81:776-88
- Van Camp G, Flamez A, Cosyns B, Weytjens C, Muyltermans L, Van Zandijcke M, De Sutter J, Santens P, Decoodt P, Moerman C, Schoors D (2004) Treatment of Parkinson's disease with pergolide and relation to restrictive valvular heart disease. *Lancet* 363:1179-83
- Van Kampen JM, Hagg T, Robertson HA (2004) Induction of neurogenesis in the adult rat subventricular zone and neostriatum following dopamine D receptor stimulation. *Eur J Neurosci* 19:2377-87
- van Praag H, Schinder AG, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030-1034
- van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH (2005) Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci*. 25:8680-5
- Vila M, Jackson-Lewis V, Vukosavic S., Djaldetti R, Liberatore G, Offen D et al., (2001) Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:2837-2842
- Vila M, Przedborski S. (2004) Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Nat Med* 10(suppl):S58-S62
- Whitworth AJ, Wes PD, Pallanck LJ (2006) *Drosophila* models pioneer a new approach to drug discovery for Parkinson's disease. *Drug Discov Today*. Feb;11(3-4):119-26

- Whone AL, Watts RL, Stoessl AJ, Davis M, Reske S, Nahmias C, Lang AE, Rascol O, Ribeiro MJ, Remy P, Poewe WH, Hauser RA, Brooks DJ; REAL-PET Study Group (2003) Slower progression of Parkinson's disease with ropinirole versus levodopa: The REAL-PET study. *Ann Neurol* 54(1):93-101.
- 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* 63:1155-66
- Winner B, Geyer M, Couillard-Despres S, Aigner R, Bogdahn U, Aigner L et al. (2006) Striatal deafferentation increases dopaminergic neurogenesis in the adult olfactory bulb. *Exp Neurol* 197:113-121
- 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*, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2006.12.016
- Wooten GF (2003) Agonists vs levodopa in PD: the thrill of witha. *Neurology* 60:360-2.
- Zigova T, Pencea V, Wiegand SJ, Luskin MB (1998) Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci* 11:234-245

VIII. Danksagung

Meiner Familie, die mir trotz teilweiser großer Entfernung gefühlt immer in nächster Nähe war und mich in schweren Zeiten bedingungslos unterstützt und in guten Zeiten an den richtigen Stellen die richtigen Kritikpunkte gesetzt hat.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Oertel, der mich in die wunderbare Lage brachte, meine Doktorarbeit in Kooperation mit den Kollegen am INSERM U679 am Hôpital Pitié-Salpêtrière in Paris durchführen zu dürfen.

Meinem Betreuer PD Dr. Günter Höglinger, der mich weit außerhalb des üblichen Maßes gefördert und mir die Faszination und Freude am Forschen nahe gelegt hat. Möge die Zusammenarbeit noch lange anhalten.

Herrn E. Hirsch, PhD, dem Leiter des INSERM U679, der es mir ermöglichte, von bürokratischen Hindernissen nahezu unbehelligt in einer wirklich angenehmen und gut ausgestatteten Umgebung mich ganz auf mein Forschungsprojekt konzentrieren zu können.

Chantal François, PhD, und Dominique Tandé, mit deren Unterstützung ich die histologischen Arbeiten durchgeführt habe, die meine wissenschaftlichen und sprachlichen Unkenntnisse mit Behutsamkeit auffingen und selbst meine abstrusesten und häufig zeitlich unpassenden Fragen mit Geduld und Fachwissen jederzeit beantworteten.

Meiner alten WG, die mich nie vergessen haben lassen, dass das „Leben daneben“ das eigentliche Leben darstellt.

Myriam, Pamela und Alex, die für das nötige „enriched environment“ in Paris sorgten.

Meinem Patenkind Benedikt Fink, der mich die Welt mit völlig neuen Augen betrachten lässt.

Katha, Lu, Basti, Robert (ohne Pullover), Franki, Ky, Frieder und Melanie....

Meinen Korrektoren, ohne die diese Arbeit wahrscheinlich noch immer nicht beendet wäre.

Und Franziska, ohne die ich nicht so wäre, wie ich bin

