

Aus dem medizinischen Zentrum für Nervenheilkunde,
Aus der Klinik für Neurologie,
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Dr. W. H. Oertel
des Fachbereiches Medizin der Philipps-Universität Marburg

In Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

**Topographie der dopaminergen Innervation adulter
Neurogenese-Zonen:
postmortem Tracing-Studie in Ratten und Mäusen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
Dr. med.
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Bastian Ipach
aus Aachen

Marburg, 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität
Marburg am: 17.01.2012

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. Dr. W. H. Oertel

Koreferent: PD Dr. G. U. Höglinger

meinen Eltern und Georg

Inhaltsverzeichnis

<u>I. Einleitung</u>	1
1.1 Funktionell-anatomische Grundlagen.....	2
1.2 Adulte Neurogenese und Stammzellen.....	3
1.2.1 Entdeckung adulter Neurogenese.....	3
1.2.2 Adulte neuronale Stammzellen.....	5
1.2.3 Nachweismethoden.....	11
1.2.4 Funktion adulter Neurogenese.....	14
1.2.5 Regulation adulter Neurogenese.....	17
1.2.6 Dopaminerge Innervation und Regulation adulter Neurogenese	21
1.3 Dopaminerge Zellgruppen und Systeme.....	24
1.4 Parkinson-Syndrom.....	26
1.4.1 Pathophysiologische Grundlagen des Parkinson-Syndroms.....	27
1.4.2 Klinik des Parkinson-Syndroms.....	27
1.5 Mutmaßlicher funktioneller Zusammenhang zwischen adulter Neurogenese und dem Parkinson-Syndrom.....	31
1.6 Zielsetzung/Fragestellung.....	32
<u>II. Material und Methoden</u>	33
2.1 Material.....	33
2.1.1 Chemikalien.....	33
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	34
2.1.3 Puffer und Lösungen.....	34
2.1.4 Antikörper.....	36
2.1.5 Versuchstiere.....	36
2.1.6 Verwendete Geräte.....	38
2.2 Methoden.....	39
2.2.1 Tracing-Substanzen.....	39
2.2.2 BrdU-Applikation.....	40
2.2.3 Perfusionsfixierung.....	41
2.2.4 Gehirnentnahme, Nachfixierung und Dehydrierung.....	42

2.2.5 Stereotaktische Operation.....	42
2.2.6 Versuchsanordnung der Tracing-Experimente.....	43
2.2.6i Retrogrades <i>postmortem</i> Tracing bei Ratten.....	44
2.2.6ii Anterogrades <i>postmortem</i> Tracing bei Ratten.....	45
2.2.6iii Anterogrades <i>postmortem</i> Tracing bei Nestin-GFP Mäusen.....	46
2.2.7 Gewebeaufarbeitung.....	47
2.2.8 Histologie.....	48
2.2.9 Mikroskopische Auswertung.....	50
III. Ergebnisse	51
3.1 Dopaminerge Faserverbindung zu den Vorläuferzellen der SVZ und SGZ.....	51
3.2 Retrogrades Tracing: Dil-markierte Nervenzellen sind nach Injektion in SVZ und SGZ räumlich geordnet in dopamin- ergen Regionen des Mittelhirns nachzuweisen.....	52
3.2.1 Retrogrades Tracing: Injektion in die SVZ der Ratte.....	52
3.2.2 Retrogrades Tracing: Injektion in die SGZ der Ratte.....	55
3.3 Anterogrades Tracing: Nach Injektion in die dopaminergen Regionen des Mittelhirns terminieren Dil-markierte Fasern räumlich geordnet in SVZ und SGZ.....	57
3.3.1 Anterogrades Tracing: Injektion in die SNc der Ratte.....	57
3.3.2 Anterogrades Tracing: Injektion in die VTA der Ratte.....	61
3.3.3 Anterogrades Tracing: Injektion in das RRF der Ratte.....	63
3.4 Anterogrades Tracing: transgene Nestin-GFP Maus.....	64
IV. Diskussion	68
4.1 Modell der dopaminergen meso-neurogenen Innervation.....	68
4.2 Heterogenität der SVZ.....	81
4.3 Parkinson-Syndrom und mögliche Relevanz der dopaminergen Innervation von SVZ und SGZ.....	83
4.4 Ausblick.....	90

<u>V. Zusammenfassung</u>	92
<u>VI. Abkürzungsverzeichnis</u>	94
<u>VII. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</u>	97
<u>VIII. Literaturverzeichnis</u>	100
<u>IX. Danksagung</u>	124
<u>X. Ehrenwörtliche Erklärung</u>	126

I. Einleitung

Unter dem Begriff „adulte Neurogenese“ nahm in den letzten Jahren die Entdeckung, dass neue Nervenzellen auch im Gehirn von adulten Säugetieren, einschließlich des Menschen, bis ins hohe Alter kontinuierlich generiert werden, einen maßgeblichen Einfluss auf das Konzept von Plastizität und Homöostase des Gehirns. Das beachtliche Entwicklungspotential und die Kapazität zur kontinuierlichen Selbsterneuerung der adulten Stammzellen beinhaltet eine viel versprechende Perspektive für neue, innovative Therapieansätze (Lindvall et al., 2004). Daher ist es notwendig, detaillierte Grundlagenkenntnisse zur physiologischen Relevanz und Regulation adulter Neurogenese zu gewinnen. Eine besondere Bedeutung in der Regulation kommt dabei dem Neurotransmitter Dopamin zu.

Ein Mangel an Dopamin ist indes entscheidend an der Pathophysiologie der Parkinson Krankheit beteiligt. Es wird geschätzt, dass in Deutschland etwa 250.000-400.000 Menschen an der Parkinson Krankheit leiden. Sollten in Zukunft neuroprotektive Therapieverfahren realisierbar sein, gilt es die Erkrankung und Symptome frühzeitig zu erkennen (Wolters et al., 2000; Herting et al., 2008). Ein umfassendes Verständnis der pathophysiologischen Grundlagen von frühen Krankheitsstadien der Parkinson Krankheit ist daher unabdingbar. Einige der Frühsymptome wie Riechstörungen, Depressionen und Gedächtnisstörungen könnten dabei mit einer Minderung der adulten Neurogenese im Gehirn assoziiert sein (Höglinger et al., 2004; Borta & Höglinger, 2007).

In diesem Zusammenhang werden in dieser Arbeit die anatomischen Beziehungen der dopaminergen Zentren und der Bereiche des zentralen Nervensystems (ZNS), in denen adulte Neurogenese stattfindet, demonstriert.

In der Einleitung wird ein Überblick über den derzeitigen Wissensstand der für diese Arbeit relevanten Grundlagen in Bezug auf adulte Neurogenese und die Parkinson Krankheit gegeben. Zu Anfang erfolgt eine Darstellung der aktuellen Erkenntnisse bezüglich adulter Neurogenese, mit besonderem Fokus auf der dopaminergen Regulation. Danach folgt eine Zusammenfassung der entscheidenden anatomischen und physiologischen Eigenheiten der

dopaminerge Zellgruppen bzw. Systeme und ein Überblick zu den für diese Arbeit relevanten Fakten der Parkinson Krankheit. In diesem Zusammenhang wird auch die Verknüpfung zwischen der Parkinson Krankheit und adulter Neurogenese hergestellt. Abschließend wird die genaue Zielsetzung der vorliegenden Arbeit dargestellt.

1.1 Funktionell-anatomische Grundlagen

Das Gehirn lässt sich auf Grund morphologischer, entwicklungsgeschichtlicher und funktioneller Gesichtspunkte von kaudal nach rostral in verlängertes Mark (Medulla oblongata), Brücke (Pons), Kleinhirn (Cerebellum), Mittelhirn (Mesencephalon), Zwischenhirn (Diencephalon) und Großhirn bzw. Endhirn (Telencephalon) unterteilen. Als oberstes Integrationszentrum zentralnervöser Prozesse ist die Großhirnrinde an der zentralen Regulation motorischer Prozesse beteiligt. Daneben sind die sog. Basalganglien, oder auch „Stammganglien“, für die zentralnervöse Regulation der Motorik von großer Bedeutung.

Zu den Basalganglien werden nach funktioneller Betrachtung die subkortikal im Marklager des Großhirns liegenden Kerne Nucleus caudatus (NC) und Putamen (Pu), die größtenteils dem Zwischenhirn zuzuordnenden Kerne Globus pallidus (GP) und Nucleus subthalamicus (NST) sowie die im Mittelhirn lokalisierten Nucleus ruber und Substantia nigra (SN) gezählt. Pu und NC bilden zusammen das Striatum.

Die Substantia nigra besteht aus der Pars compacta (SNc), mit den typischen Neuromelanin-haltigen Neuronen, und der Pars reticularis (SNr). Der Pars compacta ist dem dopaminergen System zugehörig und entscheidend in das Verschaltungsprinzip der die Motorik beeinflussenden Hirnzentren eingebunden (Blandini et al., 2000; Obeso et al., 2008). Dabei werden die übrigen Basalganglien über dopaminerge Fasern aus der SNc moduliert, die je nach Dopaminrezeptorsubtyp inhibierend oder stimulierend auf die nachgeschalteten Kerne wirken (Deng et al., 2006). Innerhalb der SNc wird mitunter ein lateraler Anteil (SNI) von der medialen SNc im engeren Sinne unterschieden (Paxinos & Watson Stereotaxie Atlas, 1997).

Die Anatomie der Basalganglien der Ratte und Maus unterscheidet sich nur geringfügig von der oben beschriebenen menschlichen Anatomie. Lediglich die beim Menschen durch die Capsula interna getrennten NC und GP sind bei Nagern als zusammenhängende Struktur vorhanden und werden als Striatum bezeichnet. Auch die Verschaltung bzw. Verbindungen der genannten Strukturen sind sowohl untereinander als auch in andere Hirnareale beim Menschen und bei der Ratte ebenfalls in ähnlicher Weise ausgeprägt und auch funktionell vergleichbar.

Erkrankungen einer oder multipler Strukturen der Basalganglien können zu hyperkinetischen Syndromen wie der Chorea Huntington oder zu hypokinetischen Syndromen wie der Parkinson Krankheit führen (Albin et al., 1989; De Long, 1990).

1.2 Adulte Neurogenese und Stammzellen

1.2.1 Entdeckung adulter Neurogenese

Adulte Neurogenese beschreibt die Neubildung von Nervenzellen im ausgereiften, erwachsenen Gehirn, im Unterschied zur embryonalen Neurogenese während der Gehirnentwicklung. Der Neuropathologe, Santiago Ramón y Cajal, formulierte 1913 folgendes über Jahrzehnte bestehendes Dogma zum ZNS bei Säugetieren:

„...in adult centres the nerve paths are something fixed, ended, immutable. Everything may die, nothing may be regenerated. It is for science of the future to change, if possible, this harsh decree.” (Ramón y Cajal 1913 Spanische Ausgabe, 1928 Englische Ausgabe)

Auch andere führende Neurowissenschaftler postulierten zur damaligen Zeit das Fehlen jeglicher Neubildung von Nervenzellen in adulten Säugetieren. Sie stützten ihre Beobachtungen auf histologische Studien an Säugetiergehirnen (Koelliker, 1896; His, 1904). Neben der detaillierten Beschreibung der Entwicklung des Nervensystems, also der embryonalen Neurogenese, beschrieben sie die strukturellen Veränderungen des ZNS nach der Geburt als

ausschließlichen Verlust von Nervenzellen, unter anderem wegen des fehlenden Nachweises von mitotischen Teilungsstadien in ihren histologischen Präparaten.

Joseph Altman konnte erstmals in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts mit Hilfe neuer technischer Darstellungsmethoden den Beweis der Existenz von Neurogenese im adulten Säugetiergehirn erbringen. Unter Verwendung der [³H]-Thymidin-Autoradiographie von Präparaten, bei denen zu Lebzeiten [³H]-Thymidin in die DNS sich teilender Zellen eingebaut wurde, konnte er die Zellneubildung im Gyrus dentatus und Bulbus olfactorius der adulten Ratte nachweisen (Altman & Das, 1965; Altman, 1969). Ob es sich bei den neu entstandenen Zellen um Neurone oder Gliazellen handelte, war jedoch autoradiographisch nicht eindeutig zu unterscheiden, so dass Altman's Entdeckung der adulten Neurogenese erst mit Einführung der Elektronenmikroskopie bestätigt werden konnte. Michael Kaplan erbrachte 15 Jahre später elektronenmikroskopisch den definitiven Nachweis adulter Neurogenese, in dem er den autoradiographisch markierten Zellen im Bulbus olfactorius und Gyrus dentatus ultrastrukturelle Charakteristika von Neuronen zuweisen konnte (Kaplan & Hinds, 1977). In einem anderen Zusammenhang wurde adulte Neurogenese auch bei Kanarienvögeln nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen auftretender Neurogenese im dorso-medialen, kaudalen Striatum erwachsener Kanarienvögel und dem Erlernen von neuen Liedgesängen bestand (Goldman & Nottebohm, 1983). Dies war zugleich ein Beweis für die funktionelle Integration der neu entstandenen Zellen.

Mit Einführung neuer Markierungstechniken, vor allem der BrdU-Markierung (5'-Bromo-2'-Deoxyuridin) und immunhistochemischer Nachweismethoden, konnte Ende der 90er Jahre endgültig auch der Nachweis adulter Neurogenese beim Primaten und Menschen erbracht werden (Eriksson et al., 1998; Gould et al., 1999a; Kornack & Rakic, 1999).

Im Weiteren soll in dieser Arbeit der Begriff "neurogen" Nervenzellen charakterisieren, die zur Neurogenese fähig sind.

1.2.2 Adulte neuronale Stammzellen

Stammzellen sind definitionsgemäß Zellen, die sich sowohl selbst erneuern können, als auch Tochterzellen hervorbringen, die sich weiter differenzieren. Unterschieden werden Stammzellen hinsichtlich ihres Entwicklungspotentials (z.B. totipotent, pluripotent, multipotent), hinsichtlich ihres ontogenetischen Entwicklungsstandes (embryonal bzw. adult) und hinsichtlich ihrer Spezifität für bestimmte Organe (z.B. neural, hämatopoetisch).

Zellen des ZNS gehen bei der embryonalen und der adulten Neurogenese aus multipotenten neuronalen Stammzellen hervor. Am Anfang der ontogenetischen Entwicklung steht jedoch die Zygote als totipotente Stammzelle. Sie besitzt die Fähigkeit, einen gesamten Organismus zu bilden, und unterscheidet sich von der pluripotenten Stammzelle, aus der ebenfalls alle Zellen eines Organismus entstehen können, durch die Fähigkeit auch Trophoblasten der Plazenta zu differenzieren. Multipotente Stammzellen sind lediglich in der Lage, bestimmte Zellen eines Organs zu generieren (Gage, 2000). Somit besitzen die neuronalen, adulten multipotenten Stammzellen ein geringeres Differenzierungspotential als die pluripotenten Stammzellen.

Adulte neurale Stammzellen können sich durch sog. symmetrische Teilung selbst erneuern. Durch asymmetrische Teilung gehen aus den neuronalen Stammzellen in einem ersten Differenzierungsschritt Vorläuferzellen, sog. Progenitorzellen hervor. Diese sind hinsichtlich ihrer Differenzierungsmöglichkeiten schon determinierte Zellen, besitzen aber noch Potential zur Proliferation und Diversifizierung. Bei der Neurogenese entstehen dann im letzten Entwicklungsschritt spezialisierte, ausgereifte Zelltypen wie Oligodendrozyten und Astrozyten als gliale Zellen oder ausgereifte postmitotische Nervenzellen von unterschiedlichem Phänotyp. Somit sind die embryonalen sowie adulten neuronalen Stammzellen neben der Selbsterneuerung auch zur Ausreifung sowohl in neuronale als auch in gliale Zelltypen befähigt. Dem hier angeführten klassischen Modell, sog. Oak-Tree Modell, steht neuerdings ein anderes, sog. Pine-tree Modell, der Neurogenese gegenüber (Alvarez-Buylla et al., 2001; siehe Abbildung 1). Dieses besagt, dass aus den neuroepithelialen Stammzellen des Neuralrohrs während der Embryogenese durch Teilung sog. radiale Gliazellen entstehen. Diese Zellen können sich wiederum durch asymmetrische Teilung in Neurone, Gliazellen oder

spezialisierte Astrozyten differenzieren. Für die adulte Neurogenese wird angenommen, dass diese spezialisierten Astrozyten die eigentlichen neuronalen Stammzellen repräsentieren, die die Fähigkeit zur Neubildung von Neuronen und Gliazellen bis in die Adoleszenz beibehalten. Nach dieser Vorstellung besteht ein ontogenetisches Kontinuum von embryonalen Stammzellen (radiale Gliazellen) zu adulten neuronalen Stammzellen (spezialisierte Astrozyten) (Alvarez-Buylla et al., 2001; Merkle et al., 2004; Ventura & Goldman, 2007).

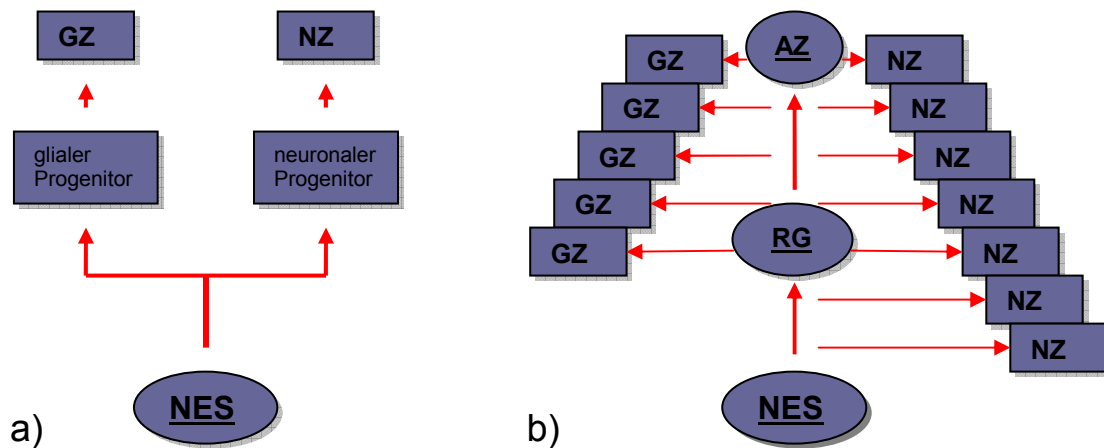


Abb. 1:
Oak-tree Model und Pine-tree Model der embryonalen und adulten Neurogenese

- a) Klassisches Oak-tree Model: Aus den neuroepithelialen Stammzellen (NES) des Neuralrohres entstehen im ersten Differenzierungsschritt entweder gliale oder neuronale Vorläuferzellen (Progenitorzellen). Aus diesen entwickeln sich dann die ausgereiften glialen oder neuronalen Zelltypen (GZ bzw. NZ).
- b) Neueres Pine-tree Model: Während der Ontogenese differenzieren sich NES zuerst zu radialen Gliazellen (RG), welche die Fähigkeit besitzen, sowohl GZ, NZ als auch spezialisierte Astrozyten (AZ) zu generieren. Für die AZ wird postuliert, dass sie im adulten Organismus die eigentlichen multipotenten Stammzellen darstellen und sich sowohl in GZ und NZ differenzieren können. In wie weit dieser letzte Differenzierungsschritt bei den NES, den RG und den AZ auch über intermediäre Entwicklungsstadien geschieht, ist noch unklar (nicht abgebildet).

(modifiziert nach Alvarez-Buylla et al., 2001)

Lokalisation und Organisation adulter Neurogenese Zonen

Nach aktuellem wissenschaftlichem Stand existieren zwei Hauptregionen im adulten Gehirn von Säugetieren, in denen während der gesamten Lebensspanne unter physiologischen Umständen neue Nervenzellen generiert und ausdifferenziert werden.

Zum einen sind dies die subventrikuläre Zone (SVZ) entlang der Seitenventrikel, zum andern die subgranuläre Zone (SGZ) im Gyrus dentatus (GD) des Hippocampus (Altman, 1962; Kaplan & Hinds, 1977; Bayer, 1980; Alvarez-Buylla et al., 2001; Zhao et al., 2008). Das quantitativ weitaus höhere Proliferationspotential wird hierbei der SVZ zugeschrieben.

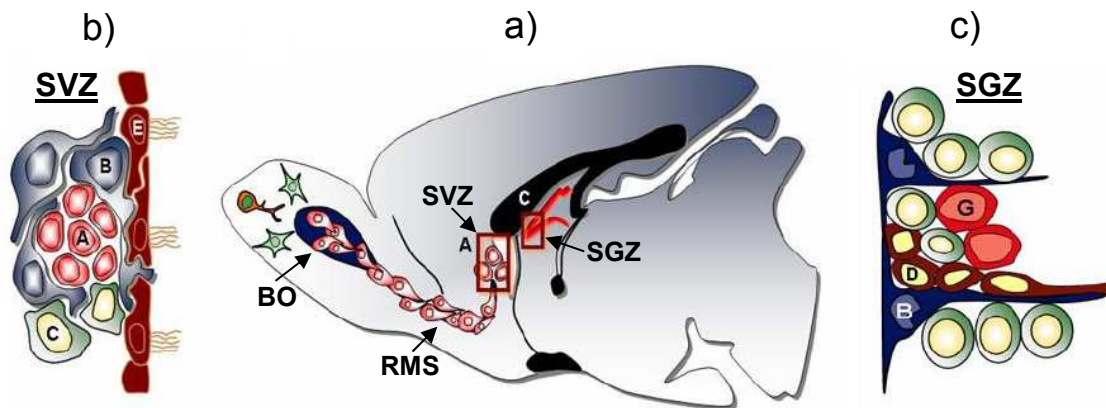


Abb. 2:
Lokalisation und zellulärer Aufbau der neurogenen Zonen im adulten Gehirn

- Sagittalschnitt durch ein adultes Mäusegehirn: Die in der subventrikulären Zone (SVZ-Kasten A) gebildeten Neuroblasten wandern entlang des rostralen Migrations-Stroms (RMS) in den Bulbus olfactorius (BO) und differenzieren sich dort in Interneurone. Die neu gebildeten Neurone aus der subgranulären Zone (SGZ-Kasten C) migrieren nur eine kurze Distanz in die granuläre Zellschicht des Gyrus dentatus (GD) im Hippocampus (siehe Text).
- Zelluläre Komposition der SVZ: Die multipotenten Stammzellen der SVZ, die sog. B-Zellen (B) produzieren die sich häufig teilenden C-Zellen (C) aus denen die Neuroblasten (A-Zellen) hervorgehen. Die Zellen der SVZ werden durch die Zellen des Ependyms (E-Zellen) vom Ventrikelsystem abgegrenzt.
- Zelluläre Komposition der SGZ: Aus den multipotenten Stammzellen der SGZ, den sog. B-Zellen (B) gehen die D-Zellen (D) hervor. Diese durchlaufen mehrere Entwicklungsschritte bevor sie sich zu den Neuronen der granulären Zellschicht (G) ausdifferenzieren.

(modifiziert nach Arias-Carrión et al., 2007)

Subventrikuläre Zone (SVZ)

Neurogenese tritt in der SVZ entlang der gesamten dorso-ventralen Ausdehnung und an der lateralen Wand des Seitenventrikels medial des Striatums auf. Weiterhin findet Neurogenese in einer kleineren Region der SVZ im anterioren, ventro-medialen Anteil des Seitenventrikels statt. Da die Zellen der SVZ direkt dem Ependym des Seitenventrikels angelagert sind, spricht man gelegentlich auch von der subependymalen Zone (SEZ). Diese Zone entspricht einem Residuum der subventrikulären Zone der embryonalen ganglionären

Eminenz entlang der lateralen Wand der Seitenventrikel, welches die Fähigkeit zur Neubildung neuronaler sowie glialer Zellen bis in die Adoleszenz beibehält (Lois & Alvarez-Buylla, 1993; Parnavelas, 2000).

Die in der SVZ durch asymmetrische Teilung entstandenen neuronalen Progenitorzellen migrieren über den rostralen Migrations-Strom (RMS) zum Riechkolben (Bulbus olfactorius, BO) (Lois & Alvarez-Buylla, 1994; Luskin, 1993; Kornack & Rakic, 2001; Curtis et al., 2007; siehe Abb.2, a). Ungefähr die Hälfte der einwandernden Zellen geht in den ersten 2 Monaten nach ihrer Geburt durch programmierten Zelltod unter (Biebl et al., 2000; Winner et al., 2002). Der verbliebene Anteil entwickelt sich dann zu lokalen Interneuronen in der granulären Schicht und ein kleiner Teil zu Interneuronen der periglomerulären Schicht des BO. Die neugebildeten Nervenzellen integrieren sich funktionell, elektrophysiologisch und morphologisch in das olfaktorische System (Altman 1969; Winner et al., 2002; Carlen et al., 2002; Carleton et al., 2003; Belluzzi et al., 2003; Kempermann et al., 2004a; Lledo & Saghatelian, 2005). Insgesamt integrieren sich 95% der neu generierten Neurone in die granuläre Schicht und verwenden GABA (Gamma-Amino-Buttersäure) als Transmitter, während der übrige Anteil in die periglomeruläre Schicht wandert. Die Zellen der periglomerulären Schicht weisen einen kombinierten GABAergen und dopaminergen Phänotyp auf (Winner et al., 2002).

Pro Tag sollen so bei der Maus etwa 30.000 Neuroblasten aus der SVZ über den RMS in den BO migrieren (Lois & Alvarez-Buylla, 1994). Für die Migration (in der Maus ca. 3-8 mm) benötigen die Zellen, je nach Zelltyp, 7-14 Tage. Die endgültige Differenzierung ist dann nach ca. 15-30 Tagen mit der Expression des neuronalen Markers NeuN (Neuronales nukleäres Antigen) abgeschlossen (Winner et al., 2002; Petreanu & Alvarez-Buylla, 2002; Hack et al., 2005). Die neu entstandenen Interneurone überlebten in der Ratte nach BrdU-Markierung mindestens 2 Jahre. Mit zunehmendem Alter kommt es jedoch zu einer über 50% Abnahme der Proliferationsrate in der SVZ (Luo et al., 2006).

Die Gesamtheit dieser Organisationsstruktur bezeichnet man auch als SVZ/RMS/BO-System. Da die drei neurogenen Entwicklungsschritte Proliferation, Migration und Differenzierung räumlich getrennt sind, stellt es ein ideales System zur Untersuchung adulter Neurogenese dar.

Die zelluläre Organisation der SVZ wird folgendermaßen beschrieben (siehe Abb.2, b): Auf Grund ultrastruktureller Hinweise und der Expression des Glial Fibrillary Acid Protein (GFAP), einem Kennzeichen für astrogliale Zellen, werden die multipotenten Stammzellen als spezialisierte Astrozyten innerhalb der SVZ angesehen, sog. B-Zell Typ (Doetsch et al., 1999; Alvarze-Buylla et al., 2001; Doetsch, 2003; Garcia et al., 2004). Aus diesen, als primäre Vorläuferzellen adulter Neurogenese identifizierten Zellen, gehen die sog. C-Zellen als erster Differenzierungsschritt hervor. Diese Zelllinie (sekundäre Vorläuferzellen) besitzt die höchste Teilungsaktivität innerhalb der SVZ und dient als Durchgangsstufe zu den Neuroblasten (sog. A-Zellen). Man spricht auch von "transit-amplifying" C-Zellen. Die C-Zellen sind durch die Expression des Epidermal Growth Factor (EGFR) charakterisiert (Doetsch et al., 2002; Höglinger et al., 2004). Die A-Zellen entsprechen neuronalen Vorläuferzellen, die bereits typische neuronale Merkmale aufweisen. Als Marker für A-Zellen gelten die Expression des Polysialic Neural Cell-Adhesion Molecule (PSA-NCAM) und des Doublecortin-Proteins (DCX), welches zu den Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAP's) gehört. Die in ihrem Differenzierungspotential eingeschränkten Neuroblasten wandern anschließend über den RMS in den BO um sich dort als Interneurone zu integrieren (Doetsch et al., 1997; Doetsch et al., 1999; siehe Abb.2, a). Die Migration erfolgt innerhalb einer Astrozytenscheide, an der sich die A-Zellen durch Adhäsionsmoleküle (PSA-NCAM) kettenförmig verbunden vorwärts bewegen. Man spricht auch von "chain-migration" (Rousselot et al., 1995; Lois et al., 1996; Doetsch et al., 1997). Unter normalen Umständen beträgt die Zellzahl-Relation der Zelltypen A:B:C in der SVZ ungefähr 3:2:1 (Doetsch et al., 1999).

Subgranuläre Zone (SGZ)

Die SGZ im adulten GD des Hippocampus entspricht einer schmalen Lamina zwischen Hilus und Körnerzellschicht (Stratum granulosum) des GD. Im Gegensatz zur SVZ ist sie nicht dem Ventrikelsystem bzw. einer ependymalen Zellschicht angegliedert. Die Herkunft der adulten Stammzellen der SGZ wird wie bei der SVZ auf radiale Gliazellen zurückgeführt, die sich während der hippocampalen Entwicklung aus der Wand des embryonalen Ventrikels ablösen und dann in residente Stammzellen der SGZ transformieren (Conover & Notti, 2008). Aus diesen multipotenten Stammzellen gehen täglich mehrere hunderte

bis tausende neue Zellen hervor, die anschließend über eine kurze Distanz in die granuläre Zellschicht migrieren, um sich dort in hippocampale Körnerzellen zu differenzieren (Altman & Das 1965; Bayer, 1980; Kaplan & Bell, 1984; Kuhn et al., 1996, Palmer et al., 1997; Gage et al., 1998). Dieser Prozess lässt sich in sechs getrennte Phasen unterteilen (Kempermann et al., 2004b). In der ersten Phase entstehen in der SGZ aus den Stammzellen durch asymmetrische Teilung weitere Stammzellen und sekundäre Vorläuferzellen. Die Vorläuferzellen beginnen dann in der zweiten Phase in die benachbarte Körnerzellschicht zu migrieren und durchlaufen dabei weitere neuronale Differenzierungen (Phase 2-4). Nach ca. 4 Wochen sind die neu entstandenen, postmitotischen Neurone in die granuläre Zellschicht integriert und zeigen dann ebenso wie die übrigen Körnerzellen axonale Projektionen zu ihrer natürlichen Zielregion, der hippocampalen CA3 Region (Phase 5) (Stanfield & Trice, 1988; Hastings & Gould, 1999). Nach ca. 4 Monaten erlangen die Neurone dann endgültig auch die elektrophysiologischen und morphologischen Charakteristika der umliegenden reifen granulären Zellen und weisen somit eine vollständige funktionelle Integration auf (Phase 6) (Van Praag et al., 2002; Carlen et al., 2002; Kempermann et al., 2004b). Lediglich in ihren Membraneigenschaften unterscheiden sich die jungen von den alten, reifen granulären Zellen (Schmidt-Hieber & Bischofberger, 2004). Als ausdifferenzierte Nervenzellen exprimieren sie die neuronalen Marker NeuN, NSE (Neuronen spezifische Enolase) und Calbindin, welches einen typischen Marker für reife Körnerzellen darstellt. Während die Überlebensrate und neuronale Differenzierung der neu geborenen Zellen mit zunehmenden Alter konstant bleiben, nimmt die Proliferationsrate ähnlich wie in der SVZ mit zunehmenden Alter ab, bleibt jedoch bis ins hohe Alter (ca. 2 ½ Jahre bei der Ratte) nachweisbar (Kuhn et al., 1996; Gage et al., 1998; Rao et al., 2006).

Die zelluläre Organisation der SGZ ist dabei zum Teil mit der SVZ vergleichbar (siehe Abb.2, c). Auch in der SGZ konnten GFAP-positive Astrozyten mit Ähnlichkeit zu radialen Gliazellen (Typ B-Zellen) als die eigentliche Stammzellpopulation identifiziert werden (Seri et al., 2001; Filippov et al., 2003). Aus diesen gehen sog. D-Zellen hervor, die als sekundäre Vorläuferzellen eine intermediäre, transiente Stufe zu den endgültigen reifen Neuronen darstellen. Im Unterschied zu den Typ C-Zellen der SVZ teilen sich die D-Zellen der SGZ

weitaus seltener und exprimieren zusätzlich PSA-NCAM und DCX. Beides sind Proteine, welche in der SVZ von den Typ A-Zellen, aber nicht den Typ C-Zellen exprimiert werden. Auch in der SGZ spielt die Präsenz des Adhäsionsmoleküls PSA-NCAM für die Differenzierung und Migration der Vorläuferzellen eine außerordentliche Rolle (Bonfanti et al., 1992; Seki & Arai, 1993; Kuhn et al., 1996). Die D-Zellen werden dabei nochmals, je nach Differenzierungsfortschritt, in D1, D2 und D3-Zellen unterteilt, wobei die D2- und D3-Zellen schon postmitotisch sind. Die beschriebenen Nervenzellen sind dabei zusammen mit Astrozyten in Haufen, sog. Clustern angeordnet, die eine fortwährende enge Interaktion zwischen den Zellen begünstigen (Seri et al., 2004). Neuerdings gibt es jedoch Vorschläge, die Organisation und Zelltypen der SGZ in leicht abgeänderter Form unter Verwendung einer neuen Nomenklatur zu beschreiben (Kempermann et al., 2004b; Zhao et al., 2008).

Insgesamt sind nach 4 Wochen noch ca. ein Drittel von den an einem bestimmten Tag in der SGZ neu geborenen Zellen nachzuweisen. Die Abnahme begründet sich vornehmlich durch programmierten Zelltod, da die meisten der neu generierten Zellen auch hier apoptotisch absterben (Biebl et al., 2000; Kempermann et al., 2003). Etwa die Hälfte der nach 4 Wochen noch nachzuweisenden Zellen entwickelt sich in einen neuronalen Phänotyp als Bestandteil der Körnerzellschicht (Gage et al., 1998). Somit werden jeden Tag 1 bis 4 neue Neurone pro 2000 bestehenden Körnerzell-Neuronen gebildet (Kempermann et al., 1997a). Das sind für die Ratte ca. 2000 bis 9000 neu inkorporierte Neurone pro Tag oder ca. 250.000 Neurone pro Monat entsprechend 6% der gesamten Zellzahl des GD (Cameron & McKay, 2001).

Neben der SVZ und SGZ sind in letzter Zeit Studien über Neurogenese in weiteren Arealen des erwachsenen Gehirns veröffentlicht worden. So sollen Stammzellpopulationen in mehreren Bereichen des Neocortex (Gould et al., 1999b), im Striatum (Palmer et al., 1999), in der CA1 Region des Hippocampus (Rietze et al., 2000), im dorsalen Vaguskomplex des Hirnstamms (Bauer et al., 2005), in der Substantia nigra (Lie et al., 2002), im Rückenmark (Yamamoto et al., 2001) und im Bereich der Amygdala (Bernier et al., 2002) existieren. Jedoch ist die Reproduzierbarkeit dieser Befunde unklar (Arias-Carrion et al., 2009).

1.2.3 Nachweismethoden

In der Mitose (Zellteilung) einer Zelle wird die Desoxyribonucleinsäure (DNS) dupliziert. Während dieser Teilung werden auch chemisch modifizierte Nukleosid-Derivate, die sich in der Zelle befinden, in die DNS integriert und können zu einem späteren Zeitpunkt entweder autoradiographisch oder immunhistochemisch detektiert werden. BrdU ist ein solches synthetisches Thymidin-Analogon, das im Stoffwechsel weitgehend wie Thymidin metabolisiert wird und somit in der S-Phase der Zellteilung kovalent und permanent anstelle von Thymidin in die Zell-DNS eingebaut wird und später mit einem spezifischen Antikörper immunhistochemisch nachgewiesen werden kann (Corotto et al., 1993). Es leitet sich von Uridin ab, welches anstelle des Thymidins der DNS in der RNS vorkommt. Auf Grund der kurzen Bioverfügbarkeit geht man davon aus, dass BrdU nur in die DNS der Zellen eingebaut wird, die sich während der BrdU-Applikation in der S-Phase befinden. Somit kann BrdU als spezifischer Proliferationsmarker verwendet werden. Bei jeder weiteren mitotischen Teilung der BrdU-markierten Zelle wird statistisch 50% der Markierung an die Tochter-Zelle weitergegeben. BrdU bleibt auch nach abgeschlossener Differenzierung der Zelle nachweisbar (Kempermann et al., 2003). Die Markierung sich teilender Zellen mit BrdU und anschließender immunhistochemischer Detektion ist heute eine weit verbreitete Methode zur Darstellung adulter Neurogenese im Gehirn (Vega & Peterson, 2005). Es können qualitative und quantitative Analysen der proliferierenden Progenitorzellen bis hin zu den ausgereiften, differenzierten Nervenzellen durchgeführt werden.

Es liegen jedoch auch potenzielle Fehlerquellen in der BrdU-Markierung. So gibt es Hinweise, dass BrdU auch bei DNS-Reperaturmechanismen oder apoptotischen Vorgängen in die DNS inkorporiert und somit in der Zelle nachgewiesen werden kann (Rakic, 2002; Borta & Höglinger, 2007; Arias-Carrion et al., 2007). In diesem Fall kann die BrdU-Immunreaktion auf einen aberrierenden "re-entry" Versuch der Zelle in den Zellzyklus zurückzuführen sein, der während des Apoptose-Vorganges möglich ist (El-Khodori et al., 2003; Borta & Höglinger, 2007). Da die DNS-Polymerase auch während eines Reperaturvorganges oder einer Endo-Replikation der DNS aktiv ist, ist auch hier eine mögliche Integration von BrdU in die DNS nicht ausgeschlossen

(Nowakowski & Hayes, 2000; Arias-Carrion et al., 2007). Als weitere Ursache einer falsch positiven Detektion von BrdU wird die potenzielle Fusion eines Neurons mit einer BrdU-positiven proliferierenden Gliazelle angenommen (Alvarez-Dolado et al., 2003; Borta & Höglinger, 2007).

Bei der BrdU-Markierung besteht im Vergleich zu älteren Methoden zusätzlich die Möglichkeit, die neu entstehenden Neurone durch neuronenspezifische Proteine doppelt zu markieren. Diese Kombination mit einer unabhängigen Nachweismethode hilft mögliche Falschaussagen der BrdU-Markierung zu umgehen. Antikörper gegen endogen exprimierte Proteine, die entweder mit dem Zellzyklus selber assoziiert sind oder in Zellen eines transienten, noch nicht ausgereiften Stadiums vorkommen, bieten sich als zuverlässige, eigenständige Nachweismethoden für zum Untersuchungszeitpunkt stattfindende Prozesse an:

- ***Proliferating Cell Nuclear Antigene (PCNA)*** beispielsweise ist ein Protein, welches in der S-Phase des Zellzyklus als Hilfsprotein der DNS-Polymerase exprimiert wird und somit sich teilende Zellen markiert (Hall et al., 1990; Curtis et al., 2003). Jedoch wird auch hier eine mögliche Expression bei Reparaturvorgängen diskutiert (Tomasevic et al., 1998; Curtis et al., 2003).

- ***PSA-NCAM*** und ***DCX*** sind hingegen beides Proteine, die von noch unreifen, migrierenden neuronalen Vorläuferzellen exprimiert werden (Doetsch et al., 1997; Couillard-Despres et al., 2005).

- ***NeuN*** repräsentiert im Gegensatz zu den beiden letzt genannten Proliferationsmarkern ein Protein, dass von postmitotischen und postmigrationalen Neuronen exprimiert wird. In Kombination mit BrdU gelingt so die Identifikation neu entstandener, ausgereifter Neurone (Winner et al., 2002).

- ***Nestin*** ist ein intermediäres Filament aus Proteinen, welches transient im Zytoplasma von Stammzellen und unreifen Vorläuferzellen exprimiert wird. In ausgereiften Nervenzellen ist es nicht mehr nachweisbar (Lendahl et al., 1990; Mignone et al., 2004). Koppelt man in transgenen Mäusen die Expression dieses Proteins mit einem grün-fluoreszierenden Protein (GFP), ist es möglich, direkt fluoreszenz-mikroskopisch Nestin-GFP positive Zellen nachzuweisen. Nestin wird in der SVZ transient und spezifisch von allen drei Zelltypen (Typ A, B und C) exprimiert, mit den höchsten Expressionsniveaus in den residenten Typ B-Zellen. Im GD wird Nestin-GFP ebenfalls nur in Stammzellen der

subgranulären Schicht exprimiert und fehlt in ausdifferenzierten Neuronen der granulären Schicht. Somit spiegelt das transgene Nestin-GFP Mäusemodell eine geeignete Repräsentation adulter Stamm- und Vorläuferzellen in SVZ und SGZ wieder (Mignone et al., 2004). Als weiterer Vorteil ist zusätzlich eine *in vivo* Detektion der Stamm- bzw. Vorläuferzellen realisierbar (Zimmerman et al., 1994; Yamaguchi et al., 2000; Mignone et al., 2004). Transgene Nestin-GFP Mäuse wurden auch in den hier durchgeführten Versuchen verwendet (siehe Material und Methoden).

1.2.4 Funktion adulter Neurogenese

Subventrikuläre Zone

Unter Betrachtung der funktionellen Aspekte der Neurogenese im SVZ/RMS/BO-System wurden folgende Beobachtungen gemacht. In knock-out-Mäusen, denen es an den für die Migration entscheidenden Adhäsionsmolekülen fehlte, konnte gezeigt werden, dass eine spezifische Reduktion der neu generierten Interneurone im BO in einer Beeinträchtigung des Unterscheidungsvermögens für Gerüche, also der Geruchsdiskriminierung, resultierte. Das Kurzzeitgedächtnis für Gerüche und die Grenzwerte für allgemeine Geruchserkennung blieben hingegen unbeeinflusst. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine gewisse Anzahl neuer Neurone im BO entscheidend für die Geruchsdiskriminierung, jedoch nicht für die generellen olfaktorischen Funktionen ist (Gheusi et al., 2000). Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch eine zweite Arbeitsgruppe (Enwere et al., 2004). Auf der anderen Seite hat eine geruchsreiche Umgebung mit Erhöhung der sensorischen, afferenten Aktivität eine Steigerung der Überlebensrate neugeborener Neurone im BO zur Folge, bei gleichzeitig verbessertem Geruchsgedächtnis (Rochefort et al., 2002; Petreanu & Alvarez-Buylla 2002). Um sich einer wechselnden olfaktorischen Umgebung optimal anpassen zu können, scheint die Repräsentation von Gerüchen im adulten BO somit auf einen Aktivitäts-abhängigen Mechanismus angewiesen zu sein. Die Neubildung und der Austausch von Interneuronen im BO des Erwachsenen könnte folglich die Notwendigkeit widerspiegeln, sich an permanente Milieuveränderungen zu

adaptieren, um eine maximale olfaktorische Diskriminierung beizubehalten (Lledo & Saghatelian, 2005).

Subgranuläre Zone

Im Hippocampus, dem auch der GD zugehörig ist, werden deklarative Informationen vereinigt, prozessiert und bewertet. In einem zweiten Schritt werden diese Informationen dann in Form des Langzeitgedächtnisses in kortikalen Regionen abgespeichert. Der Hippocampus wird daher als „Tor zum Gedächtnis“ gesehen (Kempermann et al., 2004a; Moscovitch et al., 2005). Stehen Informationen in einem emotionalen Zusammenhang, werden diese bevorzugt abgespeichert. Neben der Funktion für die Gedächtnisbildung scheinen dem Hippocampus als Bestandteil des limbischen Systems Aufgaben für das Zustandekommen von Aggressionen, Affektverhalten, Bewusstsein und Motivation zuzukommen.

Es gibt zahlreiche Hinweise, dass adulte Neurogenese im GD auch für die Funktion des Hippocampus, vor allem in Bezug auf räumliches bzw. episodisches Gedächtnis von außerordentlicher Bedeutung ist (Kempermann, 2002; Leuner et al., 2006). In Ratten wurden vielfältige Bedingungen festgestellt, die eine Abnahme bzw. Zunahme der Neurogenese im GD mit einer Schwäche bzw. Verbesserung für Hippocampus-abhängiges Lernen assoziieren (Leuner et al., 2006). Ist die Neurogenese in der SGZ durch antimitotische Wirkstoffe oder Bestrahlung blockiert, kommt es zu einer Verschlechterung Hippocampus-abhängiger Lern- und Gedächtnisfunktionen (Shors et al., 2001; Snyder et al., 2005; Bruel-Jungerman et al., 2005; Winocur et al., 2006). Snyder und Bruel-Jungerman konnten in ihren Studien den Beweis führen, dass adulte Neurogenese in der SGZ für das Langzeitgedächtnis von räumlichen Erinnerungen von bedeutender Relevanz zu sein scheint (Snyder et al., 2005; Bruel-Jungerman et al., 2005). Gegensätzlich gibt es verschiedene dem Hippocampus zugeordnete Lernaufgaben und Umgebungseinflüsse, die die Proliferations- und/oder Überlebensrate der neu geborenen Zellen positiv beeinflussen (Olariu et al., 2005; Bruel-Jungerman et al., 2005; Leuner et al., 2006). Somit scheint die Neurogenese auch in der SGZ, ähnlich wie in der SVZ, zumindest teilweise Aktivitäts-abhängig. Die Interpretation dieses Aktivitäts-abhängigen Überlebens folgert, dass die Neurone in die Repräsentation von

erlernten Informationen involviert sind und ihr Lebenszyklus der Dauer der jeweiligen Erinnerung gleicht (Gould et al., 1999d; Snyder et al., 2005). Da die neu geborenen Neurone jedoch einige Zeit brauchen um sich funktionell in die bestehenden neuronalen Kreise zu integrieren, stellt die Neurogenese der SGZ wohl eher eine Langzeitadaptierung an ein erhöhtes Niveau an eingehenden Informationen dar (Kempermann, 2002; Kempermann et al., 2004a).

In den letzten Jahren ist eine weitere Theorie entstanden, die eine verminderte adulte hippocampale Neurogenese mit der biologischen und zellulären Grundlage für Depression verknüpft (Jacobs, 2002; Kemperman, 2002). Dafür sprechen folgende Hinweise: Zum einen konnte bei Patienten mit „Major Depression“ ein spezifischer Volumenverlust im Hippocampus festgestellt werden, der auch mit strukturellen Veränderungen einherging. (Sheline et al., 1996; Sheline, 2000). Nach der Neurogenese-Hypothese für Depressionen ist eine Abnahme der Neurogenese-Rate in der SGZ für den beobachteten Volumenverlust mitverantwortlich (Jacobs, 2002). Zum anderen sind biochemische Veränderungen wie erhöhte Glucocorticoid-Level unter Stress und Änderungen im serotonergen Transmitter-System mit Depressionen assoziiert und regulieren gleichzeitig auch die adulte, hippocampale Neurogenese (Jacobs, 2002; Kempermann, 2002; Kempermann et al., 2003; Sapolsky, 2004). Als drittes Argument konnte gezeigt werden, dass alle Therapieansätze für Depressionen - Antidepressiva verschiedener Substanzklassen, Elektrokrampftherapie und physische Aktivität - die Proliferationsrate der Stammzellen in der SGZ stimulieren (Malberg et al., 2000; Santarelli et al., 2003; Sapolsky, 2004; Pereira et al., 2007). Gleichzeitig verlieren die Antidepressiva ihre klinische Wirksamkeit, wenn die Neurogenese in der SGZ gehemmt wird (Santarelli et al., 2003). Dass die allgemeine klinische Wirksamkeit von Antidepressiva erst mit einer Latenz von 2-4 Wochen einsetzt, ließe sich in diesem Zusammenhang mit der Zeit für Reifung und Integration neu entstandenen Neurone erklären (Kempermann et al., 2003). Schließlich haben Patienten mit einer „Major Depression“ häufig zusätzlich Defizite in deklarativen Lern- und Gedächtnisfunktionen (Austin et al., 2001). Verminderte hippocampale Neurogenese könnte folglich, wie oben gezeigt, auch eine Erklärung für die kognitiven Defizite der Erkrankung liefern. Es sei darauf hingewiesen, dass es sich bei der Neurogenese-Theorie für Depressionen lediglich um eine Hypothese handelt. Fasst man die Komplexität der

Erkrankung und die Anzahl der betroffenen Hirnstrukturen zusammen, ist es unwahrscheinlich, dass eine Reduzierung der adulten hippocampalen Neurogenese alleine die Ätiologie der Depression erklären kann. Es bleibt daher offen, ob eine Änderung der Neurogenese in der SGZ den Grund, die Konsequenz oder einfach ein Korrelat für Depressionen darstellt (Kempermann, 2002; Kempermann et al., 2003; Sapolsky, 2004).

1.2.5 Regulation adulter Neurogenese

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde eine Reihe von Faktoren identifiziert, die einen regulativen Einfluss auf die adulte Neurogenese zeigen.

Die intraventrikuläre Infusion verschiedener rekombinanter Wachstumsfaktoren zeigte neben einem stark proliferationssteigernden Effekt auch eine Verschiebung des Differenzierungsverhaltens und der Überlebensrate innerhalb der neurogenen Areale (Craig et al., 1996; Kuhn et al., 1997; Lenington et al., 2003; Alvarez-Buylla & Lim, 2004). Die Wirkung von Epidermal Growth Factor (EGF) resultierte in einer deutlichen Zunahme der Proliferationsrate in der SVZ, mit Bevorzugung der „transit-amplifying“ C-Zellen, nicht jedoch in der SGZ (Doetsch et al., 2002). In der SGZ beeinflusste EGF hingegen das Differenzierungsverhalten mit einer Verschiebung zwischen neuronalem und glialem Phänotyp zugunsten glialer Differenzierung. Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) stimulierte nach intraventrikulärer Infusion sowohl Proliferation und Überleben als auch neuronale Differenzierung im SVZ/RMS/BO-System. Im Hippocampus ist dieser Effekt nach intraventrikulärer Gabe nicht beobachtet worden (Kuhn et al., 1997). Daneben ist eine Aktivitätssteigerung der Neurogenese im SVZ/RMS/BO-System bzw. in der SGZ für vielfache weitere Wachstumsfaktoren, wie Transforming Growth Factor-alpha (TGF-alpha) (Tropepe et al., 1997), Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) (Zigova et al., 1998), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Jin et al., 2002; Cao et al., 2004) und Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) (Aberg et al., 2000) dokumentiert (Übersicht siehe Conover & Notti, 2008).

Daneben zeigen auch endokrine Faktoren wie Hormone und Neurotransmitter regulative Effekte auf die Neurogenese-Rate (Cameron et al., 1998; Hagg, 2005; Conover & Notti, 2008). So wird Glucokortikoiden eine inhibitorische Rolle in der SGZ zugewiesen. Es konnte eine Adrenektomie-induzierte

Proliferationszunahme und antagonistisch dazu, bei systemischer Applikation von Glucokortikoiden, eine Proliferationsabnahme in der SGZ demonstriert werden (Gould et al., 1992; Cameron & Gould, 1994). Einen ähnlichen Effekt hat der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat auf das Neurogenesepotential der SGZ. Glutamaterge Denervierung führt zu einer Zunahme an Proliferation in der SGZ, während die Aktivierung des NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptors, ein Subtyp des Glutamat-Rezeptors, zu einer deutlichen Proliferationshemmung führt (Cameron et al., 1995; Gould et al., 1997). Da sowohl die Konzentration an Glucokortikoiden als auch der glutamaterge, exzitatorische Input im Hippocampus unter Stress ansteigt, können stressvolle Erfahrungen und Situationen die Produktion granulärer Zellen im GD modulieren (Gould et al., 1999c; Karten et al., 2005). Unter Stress ist die Proliferation in der SGZ somit deutlich supprimiert (Gould et al., 1997).

Mit zunehmendem Alter kommt es sowohl in der SVZ, als auch in der SGZ zu einer signifikanten Proliferationsabnahme (Kuhn et al., 1996; Rao et al., 2006; Luo et al., 2006). Altern repräsentiert dabei einen der bedeutsamsten negativ-Faktoren für Neurogenese. Der Prozess des Alterns ist unter anderem durch eine generelle Zunahme der basalen Glucokortikoid-Level sowie durch eine Veränderung der Glucokortikoid-/Mineralkortikoid-Rezeptor Expression bei den SGZ-Vorläuferzellen charakterisiert (Sapolsky, 1992; Garcia et al., 2004). Beide Faktoren werden somit für eine hippocampale Schädigung mit konsekutiver, altersabhängiger Verminderung der Gedächtnisleistung verantwortlich gemacht (Lupien et al., 1998; Cameron & McKay, 1999; Garcia et al., 2004). Bestätigend führte eine Adrenektomie-induzierte Abnahme der Kortikoidsteroid-Level zu einer Steigerung der hippocampalen Neurogenese-Rate mit einer erhöhten Anzahl an neuen granulären Neuronen bei gealterten Ratten (Cameron & McKay, 1999).

Eine gesteigerte Aktivität in einer reizreichen Umgebung (Kempermann et al., 1997b; Kempermann et al., 1998; Van Praag et al., 1999; Nilsson et al., 1999; Bruel-Jungerman et al., 2005) und die Möglichkeit der permanenten physischen Aktivität (Laufrad) (Van Praag et al., 1999; Van Praag et al., 2005) steigern die Überlebensrate neugeborener Vorläuferzellen im GD und führen zu einer erhöhten Anzahl an granulären Neuronen. Im Falle der physischen Aktivität war auch die Proliferationsrate erhöht (Van Praag et al., 1999). Zudem korreliert die gesteigerte Überlebensrate bzw. Proliferationsrate bei den untersuchten

Mäusen und Ratten mit einem verbesserten Abschneiden bei Hippocampus-abhängigen Aufgaben und Gedächtnisfunktionen, was auf die gleichzeitige Funktionalität der erhöhten Neuronenzahl im GD hinweist (Kempermann et al., 1997b, Kemermann et al., 1998; Nilsson et al., 1999; Bruel-Jungerman et al., 2005). Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass auch Hippocampus-abhängiges, assoziatives Lernen die neurogene Aktivität im GD erhöht (Gould et al., 1999d).

Ähnlich zu den Beobachtungen im GD führt eine geruchsreiche Umgebung zu einer erhöhten Anzahl an neugeborenen Neuronen im SVZ/RMS/BO-System, bei gleichzeitig verbessertem Geruchsgedächtnis. Im Vergleich zu den Kontrolltieren war die Anzahl neugeborener Neurone im BO etwa doppelt so hoch (Rochefort et al., 2002). Ein Verlust des Riechvermögens führte hingegen zu einer signifikanten Abnahme der Neurogeneserate (Corotto et al., 1994). In beiden Fällen ist auch hier die Überlebensrate und weniger die Proliferationsrate der neu entstandenen Zellen gesteigert bzw. verringert.

Interessanterweise scheint eine deutliche Beeinflussung der Neurogenese ebenfalls unter pathologische Bedingungen zu bestehen (Übersicht siehe Gould, 2007). Modelle für Epilepsie (Parent et al., 1997; Park et al., 2006), Schlaganfälle (Liu et al., 1998; Parent et al., 2002; Koketsu et al., 2006) und multiple Sklerose (MS) (Nait-Oumesmar et al., 2007) zeigen erhöhte Teilungsraten in den Neurogenese Arealen (Parent, 2003). Im Falle des Epilepsie-Modells wurde eine erhöhte Neurogenese-Rate sowohl in der SGZ, als auch in der SVZ beobachtet (Park et al., 2006). Gleiches gilt für die Schlaganfall-Modelle. Zudem migrierten Neuroblasten aus der SVZ zum Ort der Läsion um sich dort in striatale Neurone zu differenzieren und in die neuronalen Netzwerke zu integrieren (Parent et al., 2002). Im Gegensatz dazu demonstrierte die Arbeitsgruppe um Nait-Oumesmar im MS-Modell eine Erhöhung der Gliogenese und nicht der Neurogenese. Die Vorläuferzellen der SVZ mobilisieren möglicherweise zu den typischen periventrikulären Läsionen bei der MS und differenzieren dort zu glialen Oligodendrozyten (Nait-Oumesmar et al., 2007). Es ist ersichtlich, dass diese Modelle und ihre Ergebnisse ein spannendes und potentiell Ziel für therapeutische, reparative Strategien im adulten ZNS darstellen.

Es gibt vielzählige weitere Faktoren (Moleküle, Proteine, Morphogene, Vaskularisation, Ernährung, Genetik), die in komplexer Weise die Integrität der

beiden Stammzell-Nischen beeinflussen und koordinieren (Lenington et al., 2003; Alvarez-Buylla & Lim, 2004; Hagg, 2005; Conover & Notti, 2008).

Tabelle 1: Überblick über die regulativen Einflüsse der multiplen Faktoren (ohne Anspruch auf Vollständigkeit)

Regulator	Effekt	System	Referenz
<u>Wachstumsfaktoren/Proteine/Moleküle/Transkriptionsfaktoren:</u>			
FGF-2 (Fibroblast-Growth-Factor)	Proliferation +, Überleben +, Differenzierung +	SVZ	Kuhn et al., 1997
EGF (Epidermal-Growth-Factor)	Proliferation +, Gliogenese +	SVZ SGZ	Kuhn et al., 1997; Doetsch et al., 2002
BDNF (Brain-Derived-Neurotrophic-Factor)	Überleben +, Differenzierung +	SVZ	Zigova et al., 1998
IGF-1 (Insulin-like-Growth-Factor)	Proliferation +, Differenzierung +	SGZ	Aberg et al., 2000
VEGF (Vascular-Endothelial-Growth-Factor)	Proliferation +	SVZ, SGZ	Jin et al., 2002; Cao et al., 2004
TGF- α (Transforming Growth Factor-Alpha)	Proliferation +	SVZ	Tropepe et al., 1997
Eph/ephrin	Proliferation +	SVZ	Holmberg et al., 2005
Noggin	Proliferation +, Gliogenese -	SVZ	Lim et al., 2000
BMP (Bone Morphogenic Proteins)	Proliferation -, Gliogenese +	SVZ	Lim et al., 2000
Notch1	Proliferation -, Differenzierung -, Migration -, Gliogenese +	SVZ	Chambers et al., 2001; Alvarez-Buylla & Lim, 2004
Numb/Numblie	Überleben +	SVZ	Kuo et al., 2006
Shh (Sonic hedgehog)	Proliferation +, Differenzierung +	SVZ	Palma 2005
Pax-6	Differenzierung + (dopaminerger-Phänotyp im OB), Migration +	SVZ	Hack et al., 2005
Olig-2	Gliogenese +	SVZ	Hack et al., 2005
<u>Hormone:</u>			
Östrogen	Proliferation +	SGZ	Perez-Martin et al., 2003
Prolactin	Proliferation +	SVZ	Shingo et al., 2003
Schilddrüsenhormon	Proliferation +	SVZ	Lemkine, 2005
Glucokortikoide/Kortikosteroide	Proliferation -	SGZ	Gould et al., 1992; Cameron & Gould, 1994
<u>Neurotransmitter:</u>			
Dopamine			
- D ₂ L-Rezeptor	Proliferation +	SVZ, SGZ?	Höglinger et al., 2004
Glutamat			
- NMDA-Aonisten	Proliferation -	SGZ	Cameron et al., 1995
- NMDA-Antagonisten	Proliferation +	SGZ	Nacher et al., 2001; Gould et al., 1997
5-HT (5-Hydroxytryptamin, Serotonin)	Proliferation +, Differenzierung +	SVZ, SGZ	Banasr et al., 2004
Noradrenalin	Proliferation + (nur SGZ), Überleben +	SVZ, SGZ	Kulkarni et al., 2002; Bauer et al., 2003; Rizk et al., 2006
Acetylcholin	Proliferation + (nur SGZ), Überleben +	SGZ, SVZ	Mohapel et al., 2005; Cooper-Kuhn et al., 2004
GABA	Feedback-Schleife, synaptische Integration	SVZ, SGZ	Liu et al., 2005
Nitrate (Stickstoffmonoxid)	Proliferation -, Überleben -	SVZ, SGZ	Ge et al., 2006 Zhu et al., 2006; Packer et al., 2003
<u>Andere:</u>			
Reizreiche Umgebung	Überleben +	SGZ	Kempermann et al., 1997a, Nilsson et al., 1999
Geruchsreiche Umgebung	Überleben +	SVZ	Rocheft et al., 2002
Körperliche Aktivität	Proliferation +, Überleben +	SGZ	Van Praag et al., 1999
hippocampus-abhängiges Lernen	Überleben +	SGZ	Gould & Tanapat, 1999c
Vaskularisation	Proliferation +, Differenzierung +	SVZ, SGZ	Palmer et al., 2000, Shen et al., 2004
Ernährung (Diät)	Überleben +	SGZ	Lee et al., 2002
Alter	Proliferation -	SVZ, SGZ	Kuhn et al., 1996; Rao et al., 2006; Luo et al., 2006
Schlaganfall (Ischämie)	Proliferation +, Migration +	SVZ, SGZ	Koketsu et al., 2006; Parent et al., 2002; Liu et al., 1998
Epilepsie	Proliferation +	SVZ, SGZ	Parent et al., 1997; Park et al., 2006
Multiple Sklerose	Proliferation +, Migration +	SVZ, SGZ	Nait-Oumesmar et al., 2007
Stress	Proliferation -	SVZ	Gould & Tapanat, 1999c
genetische Prädispositionen	Prolifertaion +/-, Differenzierung +/-, Überleben +/-	SGZ	Kempermann et al., 1997a

Auf die Besonderheiten der dopaminergen Regulation adulter Neurogenese soll im nächsten Abschnitt gesondert eingegangen werden.

1.2.6 Dopaminerge Innervation und Regulation adulter Neurogenese

Die Rezeptoren für den Neurotransmitter Dopamin werden in D₁-like (D₁L; D₁- und D₅-Rezeptor) und D₂-like (D₂L; D₂-, D₃- und D₄-Rezeptor) unterteilt. Somit gibt es 5 verschiedene Rezeptor-Typen, die nach strukturellen Homologien und gemeinsamen Rezeptor-Kaskaden in zwei Hauptgruppen unterteilt werden. Die Aktivierung der verschiedenen Rezeptoren kann dabei eine unterschiedliche bis entgegengesetzte Wirkung zur Folge haben.

Die regulative Funktion, die Dopamin in der adulten Neurogenese zugeordnet wird, reflektiert vermutlich eine entsprechende Funktion, die Dopamin bereits während der embryonalen Neurogenese innehat. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass ein entwicklungsgeschichtlicher Übergang von der embryonalen zur adulten Neurogenese besteht (Alvarez-Buylla et al., 2001), ist eine fortwährende Persistenz dopaminerge Kontrolle auch bei den adulten, neuralen Stammzellen wahrscheinlich.

Dopamin und seine Rezeptoren sind schon früh während der ontogenetischen Entwicklung in den hoch-proliferativen Keimzonen des Gehirns nachzuweisen und tragen entscheidend zur Proliferation neuronaler Vorläuferzellen bei (Lidow & Rakic, 1995; Diaz et al., 1997; Ohtani et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass Dopamin über den D₁L- und D₂L-Rezeptor die Neubildung von Vorläuferzellen der lateralen ganglionären Eminenz, aus der später das Striatum und die SVZ hervorgehen, und des kortikalen Neuroepitheliums, aus dem der dorso-mediale Anteil des präfrontalen Kortex hervorgeht, entweder inhibiert (D₁L) oder aktiviert (D₂L) (Diaz et al., 1997; Ohtani et al., 2003; Popolo et al., 2004). Die sich entwickelnden dopaminergen Fasern entspringen der Substantia nigra und gelangen über die nigro-striatale Faserbahn in die laterale ganglionäre Eminenz (Ohtani et al., 2003).

Es ist in Studien mehrfach belegt worden, dass Dopamin einen potenten Stimulus für die Stammzellproliferation der SVZ auch bei adulten Mäusen und Ratten darstellt (Höglinger et al., 2004; Baker et al., 2004; Coronas et al., 2004;

Van Kampen et al., 2004; Winner et al., 2006). Dopaminerge Afferenzen infiltrieren die SVZ und bilden Synapsen-ähnliche Strukturen mit den Typ C-Zellen der SVZ (Höglinger et al., 2004). Experimentelle dopaminerge Denervierung des Großhirns bei Mäusen und Ratten durch Applikation des Neurotoxins MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin) und 6-OHDA (6-Hydroxydopamin) führte wiederholt zu einer globalen Reduzierung der Stammzellproliferation in der SVZ um 30-45% (Höglinger et al., 2004; Baker et al., 2004; Winner et al., 2006). MPTP und 6-OHDA-Tiermodelle stellen durch Ablation der mesencephalen, dopaminergen Fasern ein geeignetes Mittel dar, die Parkinson Krankheit zu simulieren. Die beschriebene Proliferationsabnahme durch MPTP konnte auch beim Primaten repliziert werden (Freundlieb et al., 2006). Wie sich detaillierter herausstellte, ist die globale Proliferationsabnahme in der SVZ ein Resultat selektiver Reduktion der Proliferation der "transit-amplifying" C-Zellen in der SVZ mit konsekutiver Abnahme auch der ebenso teilungsaktiven A-Zellen (Höglinger et al., 2004). In der Konsequenz kommt es im MPTP-Modell zu einer Abnahme von rund 30% an neu geborenen Zellen in der SVZ und an integrierten Neuronen im BO (Höglinger et al., 2004).

Analysen dopaminergere Rezeptor-Expression unter den Zellen der SVZ deuten darauf hin, dass Typ C-Zellen erhebliche Mengen an D₂L-Rezeptoren aufweisen, wohingegen migrierende Typ A-Zellen sowohl D₁L-, als auch D₂L-Rezeptoren exprimieren (Höglinger et al., 2004). Jedoch stehen die A-Zellen in der SVZ in keinem ultrastrukturell nachweisbarem Kontakt zu den dopaminergen Fasern (Höglinger et al., 2004). An den Typ B-Zellen wurden weder D₁L- noch D₂L-Rezeptoren beobachtet (Höglinger et al., 2004). Unter den D₂-like Rezeptoren scheint vor allem der D₃-Rezeptor Subtyp für die Proliferationszunahme und eventuell auch neuronale Differenzierung verantwortlich zu sein. Dies konnte bei der Ratte sowohl *in vivo* (Van Kampen et al., 2004) als auch *in vitro* (Zellkulturen) (Coronas et al., 2004) durch Administration eines selektiven D₃-Rezeptor-Agonisten (7-OH-DPAT) nachgewiesen werden. Auch Höglinger konnte nach einseitiger 6-OHDA Läsion im Ratten-Modell eine Wiederherstellung der Proliferationsrate nach Behandlung mit Levodopa (D₁L- und D₂L-Rezeptor) und dem präferentiellen D₂L-Rezeptor-Agonisten Ropinirol zeigen (Höglinger et al., 2004). In Zellkulturen führte der präferentielle D₂L-Rezeptor-Agonist Bromocriptin konzentrationsabhängig zu einem Anstieg der Zellproliferation. Bei

gleichzeitiger Behandlung mit dem selektiven D₂L-Rezeptor-Antagonisten Sulpirid konnte dieser Effekt im Zellkultur-Modell der Maus wieder aufgehoben werden (Höglinger et al., 2004). Der dopaminerge D₃-Rezeptor wird schon früh während der pränatalen Ontogenese in der embryonalen proliferativen Zone exprimiert und bleibt, wie beschrieben, regional begrenzt bis in die Adoleszenz in der SVZ existent (Diaz 1997). Zusammenfassend bilden somit die C-Zellen und der dopaminerge D₃-Rezeptor die anatomische und funktionelle Zielstruktur der dopaminergen Innervation der SVZ (Übersicht siehe Borta & Höglinger, 2007).

Die Datenlage bei Mäusen scheint kontrovers: Zum einen führte die Behandlung von unlädierten Mäusen mit dem selektiven D₃-Rezeptor-Agonisten 7-OH-DPAT zu keinem signifikanten Proliferationsanstieg in der SVZ, im Gegensatz zu Ratten. Zum anderen zeigte auch ein spezifischer D₃-Rezeptor-Antagonist keinerlei Wirkung auf die Proliferationsstärke (Baker et al., 2005). Bestätigend wurde in knock-out-Mäusen, denen der D₃-Rezeptor fehlt, im Vergleich zu Kontrolltieren kein Unterschied in der Zellzahl innerhalb der SVZ gefunden (Baker et al., 2005). Somit scheint bei Mäusen nicht der D₃-Rezeptor, sondern eventuell ein anderer Rezeptor der D₂-like Rezeptorgruppe die entscheidende Rolle zu spielen.

In der SGZ ließen sich ebenfalls dopaminerge Fasern und dopaminerge Nervenendigungen in unmittelbarer Nähe zu den Stammzellen nachweisen (Höglinger et al., 2004). Zusätzlich folgte auf die vollständige dopaminerge Denervation der SGZ im MPTP-Modell der Maus eine deutliche Proliferationsabnahme der PCNA-positiven Stammzellen. Diese Abnahme war nach dopaminergem Reinnervation rückläufig und resultierte in einer Wiederherstellung der Proliferationsrate (Höglinger et al., 2004). Im Vergleich zur SVZ, ist die Datenlage zur dopaminergen Innervation und Regulation der SGZ jedoch noch spärlich und bisher wenig aussagekräftig. Auch Studien, die eine direkte Beeinflussung der hippocampalen Neurogenese auf Grund einer Degeneration dopaminergem Neurone im Mittelhirn nachweisen, stehen weitestgehend aus.

Da die experimentellen Daten der Parkinson-Modelle bei Ratte, Maus und Primaten auf eine verminderte Neurogeneserate nach dopaminergem Verarmung schließen lassen, stellt sich die Frage, ob eine Degeneration dopaminergem Neurone bei Menschen mit Parkinson Krankheit eine ähnliche Konsequenz hat. Bestätigend konnte *postmortem* in Gehirnen von Parkinson-Patienten, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, eine Reduktion an Vorläuferzellen in der SVZ um beinahe 30% festgestellt werden (Höglinger et al., 2004). Ferner wurden dopaminergem Fasern in unmittelbarem Kontakt zu EGRF-positiven Zellen gefunden. Auch im GD von Parkinson-Patienten wurde eine verringerte Anzahl an Vorläuferzellen nachgewiesen (Höglinger et al., 2004).

Der unmittelbare Ursprung und die genaue topographische Anatomie der dopaminergem Fasern, die in die SVZ und SGZ terminieren, bedürfen noch einer präzisen Beschreibung und sind der wesentliche Bestandteil dieser Arbeit.

1.3 Dopaminergem Zellgruppen und Systeme

Katecholaminergem, insbesondere dopaminergem Neurone sind im Hirnstamm, im Mesencephalon, Diencephalon und Telencephalon zu finden und werden nach anatomischen Gesichtspunkten in 17 Zellgruppen A1-A17 unterteilt (Dahlström & Fuxe, 1964; Björklund & Dunnet, 2007). Im ventralen Mesencephalon liegen drei anatomisch abgrenzbare und nach der Nomenklatur von Dahlström und Fuxe benannte dopaminergem Ursprungsgebiete (German & Manaye, 1993):

- das **Retrorubrale Feld (RRF; A8)**
- die **Substantia nigra, pars compacta (SNc; A9)** und
- die **Area tegmentalis ventralis** (englisch: ventral tegmental area; **VTA; A10**)

Die Anzahl dopaminergem Neurone in den Arealen A8, A9 und A10 wird auf etwa 40.000-45.000 bei der Ratte und etwa 400.000-600.000 beim Menschen geschätzt, wobei etwa 75% der dopaminergem Neurone der SNc, also A9 zugesprochen werden (German & Manaye, 1993; Björklund & Dunnet, 2007).

Die Zellen aus A8 liegen im lateralen Tegmentum und verschmelzen ventro-medial mit der A9-Gruppe. Medial der SNc wiederum liegt die VTA. Die dopaminergen Zellgruppen sind Ausgangspunkt für ascendierende und descendierende Bahnen. Nachfolgend werden drei dieser dopaminergen Projektionssysteme beschrieben:

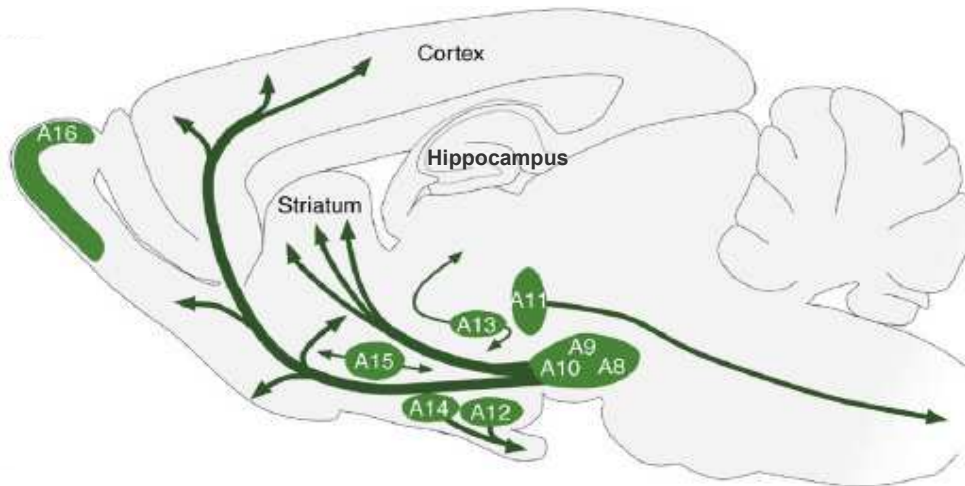


Abb. 3:
Dopaminerge Zellgruppen und ihre Projektionen

Die dopaminergen Neurone sind rostral des Hirnstamms in neun verschiedenen Zellgruppen vom Mesencephalon bis zum BO lokalisiert, wie hier in einer schematischen sagittalen Darstellung des Gehirns bei Nagetieren illustriert. Diese Zellgruppen projizieren mit ihren Fasern in verschiedene Gehirnanteile (grüne Pfeile). Zu den dopaminergen Zellgruppen im Mesencephalon werden u.a. das RRF (A8), die SNc (A9) und die VTA (A10) gezählt.

(aus Björklund & Dunnet, 2007)

Nigro-striatales System

Das nigro-striatale System entspringt im Wesentlichen der Zellgruppe A9, der SNc. Außerdem sind Anteile aus der SN, pars reticularis (SNr) und dem ventralen Teil der VTA beschrieben. Daher spricht man auch vom meso-striatalen System (Abb. 3). Die dopaminergen Neurone der SNc projizieren über das mediale Vorderhirnbündel (englisch: medial forebrain bundle; MFB) in das Striatum. Vom Striatum wiederum gibt es rückkoppelnde Projektionen zur SNc. Das nigro-striatale System ist fundamental in die Pathophysiologie der Parkinson Krankheit involviert.

Meso-kortikales System

Das meso-kortikale System entspringt der VTA des Mesencephalons. Es sind zudem Anteile aus der medialen SNc und dem RRF beschrieben. Die Fasern ziehen entlang des MFB zum präfrontalen Cortex, corticalen Anteilen des limbischen Systems mit Gyrus cinguli, und den entorhinalen Cortices (Abb. 3).

Meso-limbisches System

Das meso-limbische System hat seinen Ursprung vor allem in der VTA, aber auch Neurone aus dem RRF und dorsalen Anteilen der SNc sind daran beteiligt. Die Projektionsfasern ziehen in ausgedehnte subcorticale Areale des limbischen Systems, wie dem Hippocampus, dem Corpus amygdaloideum, dem Nucleus accumbens und dem Tuberculum olfactorium (Abb. 3).

In dieser Arbeit sollte u.a. untersucht werden in wie weit die SVZ und die SGZ dopaminerg innerviert sind und sich diese Innervation in die bekannten dopaminergen Systeme einordnen lässt. Dabei ist von Bedeutung das die SVZ unmittelbar an das Striatum angrenzt. Das Striatum ist wie oben beschreiben reichlich an dopaminergen Fasern primär aus der SNc, aber teilweise auch der VTA und dem RRF innerviert. Der Gyrus dentatus mit der angrenzenden SGZ seinerseits erhält dopaminerge Afferenzen vornehmlich aus der VTA (Björklund & Dunnet, 2007). Somit wurden als potentielle Ursprungsgebiete der dopaminergen Fasern in SVZ und SGZ die dopaminergen Regionen des Mittelhirns (A8-A10) ausgemacht und detailliert untersucht.

Die übrigen dopaminergen Regionen A11-A15 projizieren allesamt in andere die SVZ bzw. SGZ nicht angrenzende ZNS-Regionen und konnten somit als potentielle Ursprungsgebiete *a priori* ausgeschlossen werden.

1.4 Parkinson-Syndrom

Das Parkinson Syndrom ist klinisch definiert als eine Kombination des Kardinalsymptoms Bradykinese und mindestens einem der Symptome Rigor, Tremor oder Haltungsinstabilität. Unter dem Begriff Parkinson-Syndrom werden das primäre idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS), hereditäre Parkinson-

Syndrome, symptomatische Parkinson-Syndrome und atypische Parkinson-Syndrome zusammengefasst.

Das IPS ist eine neurodegenerative Erkrankung mit progressivem, irreversiblen Verlauf. Erstmals wurde diese Krankheit von dem englischen Arzt James Parkinson 1817 unter dem Namen „Shaking Palsy“ (Schüttellähmung) bzw. Paralysis agitans als klinisch definiertes Krankheitsbild beschrieben (Parkinson, 1817).

1.4.1 Pathophysiologische Grundlagen des Parkinson-Syndroms

Pathophysiologisch verantwortlich für die wichtigsten motorischen Symptome des IPS ist eine Degeneration dopaminerger, Neuromelanin-haltiger Neurone in der SNc, welches in der Konsequenz zu einem Dopaminmangel im Striatum führt. Der fortschreitende Prozess verursacht eine Veränderung der Funktion und Signalverarbeitung innerhalb der kortiko-basalen Regelkreise des motorischen Systems (Blandini et al., 2000; Obeso et al., 2008).

Es wird davon ausgegangen, dass nigrales Dopamin physiologischerweise einen regulierenden, die Motorik fördernden Einfluss ausübt. Durch die Degeneration der dopaminerger Neurone kommt es zu einer generellen Hemmung motorischer Abläufe, die sich klinisch in Form des motorischen Kardinalsymptoms Bradykinese (Verlangsamung von Bewegungsabläufen) äußert (Albin et al., 1989; Blandini et al., 2000; Obeso et al., 2008).

Als pathoanatomisches Korrelat müssen 60-80% der melaninhaltigen Nervenzellen in der SNc zugrunde gegangen sein bzw. ein Verlust von ca. 70% des striatalen Dopamingehaltes bestehen, ehe die ersten motorischen Symptome in Erscheinung treten (Bernheimer et al., 1973; McGeer et al., 1977; Hirsch et al., 1988; Fearnley & Lees, 1991). Hierbei ist der Zelluntergang vor allem auf den ventro-lateralen und posterioren Anteil der SNc konzentriert (Hirsch et al., 1988; Fearnley & Lees, 1991). Auch die Neurone der VTA zeigen eine Degeneration um bis zu 55%, sind aber insgesamt weniger betroffen als die Neurone der SNc (Hirsch et al., 1988; Uhl et al., 1985).

1.4.2 Klinik des Parkinson-Syndroms

Das IPS wird klinisch als hypokinetisch-hypertones Syndrom beschrieben. Die klassische Trias der klinischen Kardinalsymptome setzt sich aus Bradykinese,

bis hin zur Akinese, muskulärem Rigor (gesteigerter Muskeltonus) und Tremor zusammen. Des Weiteren werden von einigen Autoren Gang- und Haltungsabnormalitäten insbesondere die posturale Instabilität zu den Kardinalsymptomen gezählt. Somit ist vor allem die Beweglichkeit der Patienten beeinträchtigt. Die Diagnose des Parkinson-Syndroms wird nach wie vor in erster Linie klinisch anhand der genannten Kardinalsymptome gestellt.

Bradykinese/Akinese

Die Bradykinese ist das zentrale Charakteristikum des IPS. Sie beschreibt die Verlangsamung von Willkürbewegungen in Hinblick auf Initiation und Exekution bei genereller Minderung von spontanen willkürlichen Bewegungen und physiologischen unwillkürlichen Begleitbewegungen. Durch die allgemein verlängerte motorische Reaktionszeit und die mögliche Haltungsinstabilität durch Verlust der posturalen Reflexe (posturale Instabilität) kommt es im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung häufig zur Fallneigung.

Rigor

Rigor beschreibt die Zunahme des Muskeltonus, was sich in einem zähen, wächsernen Widerstand bei passiven Bewegungen äußert, der typischerweise bei Agonisten und Antagonisten eines Gelenkes gleichmäßig ausgeprägt ist und unabhängig von der Geschwindigkeit der passiven Bewegung ist.

Tremor

Etwa 75% der Patienten entwickeln im Krankheitsverlauf einen Tremor. Typisch ist ein grobschlägiger, distal-betonter, antagonistischer Ruhetremor mit einer langsamen Frequenz von 4-6 Herz.

Die motorischen Symptome sind zu Beginn charakteristischerweise einseitig vorhanden und bleiben auch im Verlauf in ihrer Intensität asymmetrisch ausgeprägt. Das IPS wird bezogen auf die Kardinalsymptome in verschiedene klinische Verlaufsformen unterteilt: Den akinetisch-rigiden Typ, den Tremordominanz-Typ und den Äquivalenz-Typ (Leitlinien Parkinson-Syndrome, 2009). Die Intensität der Kardinalsymptome schreitet langsam progredient fort.

Nicht-motorische Symptome

Neben der motorischen Symptomatik kann das Parkinson-Syndrom in vielen Fällen von einer nicht-motorischen, vegetativen, sensorischen und psychisch-kognitiven Symptomatik begleitet sein, die dann das Vollbild der Erkrankung kennzeichnet (Poewe, 2008).

Als Beispiele der vegetativen Symptome seien Seborrhoe, vermehrter Speichelfluss durch Schluckstörungen, Schwitzanfälle, chronische Obstipation und Blasenstörungen (imperativer Harndrang) genannt. Tendenzen zur orthostatischen Hypotonie und männlichen erektilen Dysfunktion gehören eher zu den vegetativen Spätsymptomen (Meco et al., 1991).

Als sensorisches Symptom ist die Störung des Riechsinnes (olfaktorische Dysfunktion, Hyposmie bis hin zur Anosmie) von wesentlicher Relevanz (Doty et al., 1992; Hawkes et al., 1997; Tissingh et al., 2001). Die olfaktorische Dysfunktion äußert sich in einer Minderung für Geruchsdetektion, Identifikation und Diskriminierung (Tissingh et al., 2001). Sie tritt im Laufe der Erkrankung bei mehr als 80% der Parkinson-Patienten auf und stellt typischerweise ein Frühsymptom der Erkrankung dar (Berendse et al., 2001; Haehner et al., 2007). Die Beeinträchtigung für Geruchsdiskriminierung scheint dabei sogar positiv mit dem Schweregrad des IPS zu korrelieren (Tissingh et al., 2001). Bis zum heutigen Zeitpunkt ist die Ätiologie dieser Störung unbekannt.

Zu den charakteristischen neuropsychologischen Begleitsymptomen werden Antriebsverlust, Gedächtnisstörungen (Pillon et al., 1997; Stocchi & Brusa, 2000), Affektstörungen, Depressionen (Oertel et al., 2001; Lemke, 2008) und Schlafstörungen (Bronnick et al., 2005) gezählt. Von einer Depression sind bis zu 40% der Patienten im Laufe der Erkrankung betroffen. Kognitive Defekte in Form verlangsamter Denkabläufe (Bradyphrenie), Verminderung des abstrakten Denkvermögens und mnestischen Dysfunktionen zeigen sich bei der Mehrzahl der Patienten (bis 90%) (Pirozollo et al., 1982; Dubois & Pillon, 1997; Bosboom et al., 2004). Schwerwiegende kognitive Störungen wie zum Beispiel eine manifeste Demenz entwickeln sich allerdings nur in 20-30% der Fälle (Mayeux et al., 1990; Bosboom et al., 2004). Die Ätiologie der kognitiv-psychischen Begleitsymptome ist weitgehend ungeklärt (Stocchi & Brusa, 2000).

Kennzeichnend für die nicht-motorischen Symptome ist, dass sie oft vor dem Einsetzen der motorischen Symptome auftreten und sich daher mitunter zur Frühdiagnostik eignen (Cooper et al., 1991; Schneider & Pope-Coleman, 1995; Pillon et al., 1997; Lemke, 2008).

Es wird geschätzt, dass die dopaminerge Degeneration typischerweise bereits 4-8 Jahre vor der klinischen Diagnosestellung einsetzt (Fearnley & Lees, 1991; Morrish et al., 1998; Hilker et al., 2005). Dieser Zeitraum wird daher als präklinische Phase angesehen. Die Identifizierung von Patienten in diesem präklinischen Stadium, zwischen dem vermuteten Beginn des dopaminergen Zellverlustes und dem Einsetzen der Kardinalsymptome, könnte für die Entwicklung von effektiven, neuroprotektiven Behandlungsstrategien von entscheidender Bedeutung sein (Berendse et al., 2001; Herting et al., 2008). Therapien die den Progress der Krankheit verlangsamen bzw. den Erkrankungsbeginn verzögern, sollten somit - wenn möglich - bereits in der präklinischen Phase eingesetzt werden.

Eine präklinische Detektion Parkinson-Erkrankter scheint durch eine Kombination von präklinischen Vorhersageparametern und bildgebenden Darstellungsmethoden zur subklinischen Dopamin-Verarmung (Transkranielle Sonographie, PET- bzw. SPECT-Untersuchungen) möglich. Die präklinischen Vorhersageparameter setzen sich idealerweise aus einem Symptomenkomplex zusammen, der den motorischen Kardinalsymptomen vorausgeht. Hierzu gehören in erster Linie eine Kombination aus den olfaktorischen Funktionsstörungen, den kognitiven Dysfunktionen und den depressiven Affektstörungen, wobei der olfaktorischen Symptomatik die größte Bedeutung zukommt (Wolters et al., 2000; Becker, 2003; Ponsen et al., 2004). Übereinstimmend konnte in mehreren Studien eine subklinische Verarmung an striatalem Dopamin im Zusammenhang mit olfaktorischen Dysfunktionen und weiteren präklinischen Vorhersageparametern bei asymptomatischen Verwandten (ersten Grades) Parkinson-Erkrankter aufgezeigt werden (Wolters et al., 2000; Berendse et al., 2001; Ponsen et al., 2004). Mindestens 10% dieser Verwandten entwickelten in der Folge eine manifeste Parkinson Krankheit (Ponsen et al., 2004). Ferner wurde in einer erst kürzlich veröffentlichten Studie bei 7% von Individuen mit idiopathischer Hyposmie nach 4 Jahren eine Parkinson Krankheit diagnostiziert (Haehner et al., 2007). Diese Ergebnisse bieten möglicherweise einen Ansatz zur frühzeitigen

Diagnosestellung bei Risikogruppen noch in präklinischen Stadien der Erkrankung mit Hilfe einfacher und kostengünstiger Riechtests, eventuell in Kombination mit bildgebenden Verfahren in Form von Screening-Untersuchungen (Herting et al., 2008).

Die hier vorliegende Arbeit soll die anatomischen Grundlagen für eine mögliche Ursache der genannten Frühsymptome (Riechstörung, Depression und Gedächtnisstörung) untersuchen.

1.5 Mutmaßlicher funktioneller Zusammenhang zwischen adulter Neurogenese und dem Parkinson-Syndrom

SVZ

Die dopaminerge Degeneration beim IPS führt nachgewiesenermaßen zu einer Abnahme der Proliferation von Vorläuferzellen innerhalb der SVZ, die wiederum zu einer Abnahme neu integrierter Neurone im BO führt. In der Konsequenz könnte die Funktion der neu entstandenen Neurone im BO negativ beeinflusst sein und dies ursächlich mit dem Auftreten einer olfaktorischen Dysfunktion beim IPS in Verbindung stehen (Borta & Höglinger, 2007; Freundlieb et al., 2007).

SGZ

Auch in der SGZ könnte die Proliferationsrate der Stammzellen durch eine dopaminerge Verarmung beim IPS negativ beeinflusst sein. Dies wiederum könnte die physiologische Funktion der neu entstehenden Neurone in der SGZ herabsetzen und in der Folge mit den neuropsychologischen Frühsymptomen einer Gedächtnisstörung und depressiven Affektstörung beim IPS assoziiert sein (Höglinger et al., 2004; Borta & Höglinger 2007).

1.6 Zielsetzung/Fragestellung

Eine präzise Beschreibung des Ursprungs und der Organisation der dopaminergen Innervation von SVZ und SGZ steht noch aus (Höglinger et al., 2004). Ziel dieser Arbeit ist es eine detaillierte Analyse der topographischen Organisation der dopaminergen Innervation von SVZ und SGZ in Nagetieren darzustellen. Dabei soll mit Hilfe von anterograden und retrograden *postmortem* Tracing-Methoden (siehe Material und Methoden) der genaue Ursprung bzw. Zielort der dopaminergen Zellen und Fasern aufgezeigt werden. Um dieser Beschreibung umfassend nachzukommen, sollen im Rahmen dieser Arbeit folgende Einzel-Fragestellungen beantwortet werden.

- Existiert eine dopaminerge Faserverbindung zu den Stammzellen der SVZ und SGZ?
- Wo hat die dopaminerge Innervation von SVZ und SGZ ihren Ursprung?
- Gibt es eine räumlich-topographische Organisation der dopaminergen Innervation von SVZ und SGZ?
- Wenn ja, entspricht die Topographie der dopaminergen Innervation von SVZ und SGZ dabei der bekannten klassischen meso-striatalen bzw. meso-hippocampalen topographischen Organisation?
- Existieren Unterschiede in der räumlich-topographischen dopaminergen Innervation von SVZ und SGZ bei Ratten und Mäusen?
- Besteht eine Binnenheterogenität der dopaminergen Innervation der Neurogenese-Zonen, d.h. sind verschiedene Regionen innerhalb von SVZ und SGZ in unterschiedlichem Maße und von unterschiedlichen Ursprungsgebieten innerviert?

Eine Klärung dieser Fragen würde helfen neue, grundlegende Erkenntnisse zur Regulation adulter Stammzellenregionen im Gehirn zu gewinnen, und könnte einen Beitrag zur Ursachenbestimmung von klinisch bedeutsamen Frühsymptomen bei der Parkinson Krankheit leisten. Um in Zukunft das beachtliche Potential der adulten Stammzellen auch therapeutisch nutzen zu können, ist es von wesentlicher Bedeutung, regulative Mechanismen grundlegend zu verstehen und umfassend darzustellen.

II. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
2-Methylbutan 99.5%	Sigma-Aldrich - Steinheim, Germany
2 N HCL-Lösung	Carl-Roth GmbH - Karlsruhe, Germany
BRDU (5-bromo-2'-deoxyuridine)	Sigma-Aldrich - Steinheim, Germany
Chromalaun	Sigma-Aldrich - Steinheim, Germany
Dil (Ditadecyl-Tetramethylrhodamin-Indocarbocyanin)	Molecular Probes™ - Eugene, USA
DMSO 99.5% (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich - Steinheim, Germany
Ethanol 70%	Otto Fischar GmbH - Saarbrücken, Germany
Ethylenglycol	Sigma-Aldrich - Steinheim, Germany
Gelatine	Sigma-Aldrich - Steinheim, Germany
Glycerin	Sigma-Aldrich - Steinheim, Germany
H ₂ O ₂ 30% (Wasserstoffperoxid)	Acros Organics - Geel, Belgium
H ₂ O dest.	BMFZ- Marburg, Germany
Isofluran (Inhalationsnarkotikum)	Baxter - Unterschleißheim, Germany
Kemin (Ketaminhydrochlorid)	Alvetra GmbH - Neumünster, Germany
Na ₂ HPO ₄ (Di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat)	Merck KGaA - Darmstadt, Germany
NaCl (Natriumchlorid)	Merck KGaA - Darmstadt, Germany
NaH ₂ PO ₄ (Natriumdihydrogenphosphat)	Merck KGaA - Darmstadt, Germany
NaOH 30% (Natriumhydroxid)	Merck KGaA - Darmstadt, Germany
PFA (Paraformaldehyd)	Merck KGaA - Darmstadt, Germany
Pferdeserum	Vector Laboratories Inc. - Burlingame, USA
PVA/DABCO (Eindeckmedium für Fluoreszenz)	Fluka Biochemika - Buchs, Switzerland
Rompun (Xylazinhydrochlorid)	Bayer - Leverkusen, Germany
Saccharose	Sigma-Aldrich - Steinheim, Germany
Timerozal	Sigma-Aldrich - Steinheim, Germany
Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	Sigma-Aldrich - Steinheim, Germany
Triton-X-100	Sigma-Aldrich - Steinheim, Germany
Xylol	Sigma-Aldrich - Steinheim, Germany

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Material	Bezugsquelle
Bepanthen-Salbe (Dexapanthenol)	Bayer - Leverkusen, Germany
Betasisodona-Salbe (Poridon-Iod)	Mundi-Pharma GmbH - Limburg, Germany
Deckgläser, 24*50 mm	Menzel-Gläser GmbH - Braunschweig, Germany
Einbettmedium für Gefrierschnitte (Tissue freezing medium)	Leica Instruments GmbH - Nussloch, Germany
Microtome-Klingen, Typ S35	Feather - Köln, Germany
Objektträger, 25*75*1.0 mm	Menzel-Gläser GmbH - Braunschweig, Germany
Pipetten, 10-100 ul/ 100-1000 ul/ 1000 ul	Eppendorf AG - Hamburg, Germany
Pipettenspitzen	Eppendorf AG - Hamburg, Germany
Stereotaxie Atlas-Ratte	The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates 3 rd edition; Paxinos & Watson, 1997
Stereotaxie Atlas-Maus	The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates 2 nd edition; Paxinos & Franklin, 2001
Terralin-Liquid (Desinfektionsmittel)	Schülke & Mayr – Norderstedt, Germany
Trockeneis	Apotheke Philipps-Universität Marburg

2.1.3 Puffer und Lösungen

0,2 M Phosphat-Puffer (PB):	Na ₂ HPO ₄	230 g
Stammlösung	NaH ₂ PO ₄	52,44 g
	H ₂ O dest.	ad 10 L
0,1 M PB-Salz-Lösung (PBS):	0,2 M PB	500 ml
Gebrauchslösung	H ₂ O dest.	ad 1000 ml
	NaCl	9 g
Tris/NaCl, pH 9,5:	NaCl	83,6 g
Stammlösung	Tris	12,1 g
	H ₂ O dest.	ad 1000 ml

Gefrierschutzlösung für Hirnschnitte:	NaH ₂ PO ₄	1,57 g
Antifreeze	Na ₂ HPO ₄	5,18 g
	Ethylenglycol	300 ml
	Glycerin	300 ml
	H ₂ O dest. ad	1000 ml
30% Saccharose:	Saccharose	150 g
	0,1 M PBS	400 ml

Lösung für primären Antikörper:

- 0,1 M PBS
- 2,5% Pferdeserum
- 0,15% Triton-X-100
- 0,02% Timerozal

Lösung für sekundären Antikörper:

- 0,1 M PBS
- 2,5% Pferdeserum
- 0,15% Triton-X-100

8% Paraformaldehyd-Stammlösung:

20 g Paraformaldehyd (PFA) wurden in 241,66 ml H₂O dest. und Zugabe von einigen Tropfen 30% NaOH unter ständigem Rühren und Erwärmen auf 60°C gelöst. Für die Perfusionslösung von 4% Paraformaldehyd wurde zu den 8% PFA im Verhältnis 1:1 0,2 M PB-Puffer gemischt.

Gelatine-Lösung: Zum Gelatinieren von Objektträgern

7 g Gelatine wurden zum Quellen 1 Stunde lang in 300 ml H₂O gegeben. Dann wurden 0,18 g Chromalaun zu der gelösten Gelatine gegeben und zum Lösen auf 40°C erwärmt. Danach wurde die Lösung filtriert. Zum Gelatinieren der Objektträger wurde die Lösung in ein Wasserbad gestellt. Die beschichteten Objektträger wurden über Nacht unter dem Abzug getrocknet.

2.1.4 Antikörper

Tabelle 4: Liste der verwendeten Antikörper
 Angegeben sind die verwendeten Antikörper, die immunisierte Spezies, die verwendeten Verdünnungen und die Bezugsquelle

Primärantikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-Dopamin-Transporter monoclonal Kaninchen	1/200	Chemicon International - Schwalbach Germany
Anti-Tyrosin-Hydroxylase polyclonal Kaninchen	1/200	ABR-Affinity Bio Reagents - Golden, USA
Anti-BrdU monoclonal Maus	1/200	Oxford Biotechnolgy Ltd. - Oxfordshire, England
Sekundärantikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
Ziege-anti-Kaninchen IgG, Ziege-anti-Maus IgG: Alexa-488-gekoppelt	1/500	Molecular Probes™ - Eugene, Oregon USA
Ziege-anti-Kaninchen IgG, Ziege-anti-Maus IgG: Cy-5-gekoppelt	1/500	Jackson/Immuno Research - West Grove, USA
Ziege-anti-Kaninchen IgG, Ziege-anti-Maus IgG: FITC-gekoppelt	1/500	Jackson/Immuno Research - West Grove, USA

2.1.5 Versuchstiere

Die Tierversuche wurden entsprechend der European Council Direktive (86/609/EEC) in den Räumen des Biomedizinischen Forschungszentrum (BMFZ) in Marburg, Deutschland durchgeführt und von der zuständigen Tierschutzbehörde genehmigt (Regierungspräsidium Giessen, Ordnungsnummer 34 / 2007).

Wistar-Unilever Ratten

Im experimentellen Teil dieser Arbeit wurden adulte Wistar-Unilever Ratten mit einem Gewicht zwischen 225-250 g zu Anfang der Experimente verwendet. Bezogen wurden diese aus der Zucht von Harlan-Winkelmann (Borchen, Germany). Es wurden insgesamt 39 Ratten in den hier durchgeführten Experimenten verwendet.

Transgene Nestin-GFP Mäuse

Für das Mäusemodell wurden transgene Nestin-GFP Mäuse (Filippov et al. 2003) mit einem Gewicht zwischen 30-35 g zu Anfang der Experimente verwendet. Bezugsquelle war die Zucht des Max-Delbrück Center für Molecular Medicine (MDC) (Berlin, Germany). Insgesamt wurden 8 Tiere dieser Spezies für die Experimente verwendet.

Allgemeine Haltungsbedingungen

Die Haltung aller Tiere erfolgte unter kontrolliert pathogenfreien Bedingungen. Der Licht-/Dunkel-Zyklus war auf 12/12 Stunden eingestellt, mit der Hellphase zwischen 7 und 19 Uhr und der Dunkelphase zwischen 19 und 7 Uhr. Temperatur und Luftfeuchtigkeit im Tierstall wurden kontrolliert und lagen im Rahmen der gesetzlichen Zulassungsgrenzen für die Haltung von Nagetieren. Die Wistar-Unilever Ratten wurden zu maximal 2 Tieren in Macrolonkäfigen Typ 3 mit hohen Deckeln (Firma Ehret GmbH; Emmendingen, Germany) gehalten. Die transgenen Nestin-GFP Mäuse wurden zu maximal 5 Tieren in Macrolonkäfigen Typ 2 (Firma Ehret GmbH; Emmendingen, Germany) gehalten. Alle Tiere hatten ad libitum Zugang zu Futter und Wasser. Die Versorgung der Versuchstiere erfolgte durch die Tierpfleger des Tierstalls. Alle Käfige wurden nach Bedarf gereinigt und neu eingestreut. Wasser und Futter wurden nach Bedarf gewechselt. Das Gewicht der Tiere wurde jeweils zu Anfang der Versuche und vor der transkardialen Perfusion der Tiere gemessen und protokolliert.

2.1.6 Verwendete Geräte

Table 5: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Fluoreszenz-Mikroskop - Leitz DMRB	Leica - Solms, Germany
Konfokal-Laser-Scan Mikroskop - LSM 510	Zeiss - Jena, Germany
Kaltlichtlampe - intralux 6000LL	Volpi - Schlieren, Switzerland
Kryostat - CM 30505	Leica - Solms, Germany
Laborwaage - Kern 770	Kern & Sohn GmbH - Balingen, Germany
Magnetrührer - IKA-Combimag RCO	Janke & Kunkel KG - Staufen, Germany
Micro-Injektions-Pumpe	World Precision Instruments (WPI) - Sarasota, USA
Mikroskop-Digital-Kamera - ORCA-ER	Hamamatsu - Herrsching am Ammersee, Germany
NanoFil (Micro-Injektions-Spritzen)	World Precision Instruments (WPI) - Sarasota, USA
Operationsmikroskop - Nikon SMZ-2T	Nikon - Nikkei, Japan
Pump-Controller (Peristaltik-Rollpumpe)	Masterflex - Gelsenkirchen, Germany
Schüttler - Polymax 2040	Heidolph - Kelheim, Germany
Wasserbad	Huber GmbH - Geretsried, Germany

Micro-Injektions-Pumpe und Nano-Fil System

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten mit stereotaktischer Tracer-Injektion wurde mit Injektionsvolumina zwischen 20 und 100 nano-Liter (nL) gearbeitet. Die verwendete Micro-Injektions-Pumpe in Kombination mit dem Nano-Fil System (siehe Abb. 4) ermöglichte eine präzise Injektion dieser geringen Tracervolumina in die jeweilig gewünschte Zielregion. Die Pumpe zusammen mit der Nano-Fil Spritze erlaubt die Injektion von Volumina zwischen 5 nL bis hin zu 10 mycro-Liter (μL) und ist den anderen Methoden, wie der einfachen Druckapplikation mit Hamilton Spritzen überlegen. Der Injektionsfluss ist beliebig einstellbar, wodurch eine zu rasche Injektion und damit verbundene Gewebsschädigung vermieden werden kann. Die verwendeten Injektionskanülen haben einen Innendurchmesser zwischen 33-36 Gauge. Diese feinen Kanülen verursachen insgesamt weniger Gewebeschädigung als andere übliche Kanülengrößen, deren Innendurchmesser gewöhnlich zwischen 18-26 Gauge beträgt.

2.2 Methoden

2.2.1 Tracing-Substanzen

Ein "Tracer" ist ein Markierungsmolekül, mit dessen Hilfe axonale oder dendritische Verbindungen innerhalb des Nervensystems dargestellt werden können. Tracer werden typischerweise eingesetzt um die Ursprungsneurone von Faserverbindungen zu bestimmten Hirnstrukturen zu ermitteln oder die Zielregionen axonaler Projektionen einer bestimmten Neuronenpopulation nachzuweisen. Man spricht daher von retrograder und anterograder Ausbreitung des Tracers. Retrograd bedeutet in diesem Falle, dass der Tracer nach Injektion von der Nervenfaserverendigung aufgenommen und rückwärts entlang der Axone zum Zellkörper transportiert wird. Anterograd beschreibt dabei den Transport vorwärts, zentrifugal vom Zellkörper zu den Nervenfaserverendigungen hin. Dieser Transport kann passiv oder aktiv erfolgen.

1,1'-Dicadecyl-3,3',3'-Tetramethylrhodamin-Indocarbocyanin-Perchlorat (Dil)

Dil ist ein Farbstoff der Carbocyanin-Familie. Die Farbstoffe dieser Familie sind Lipidanaloga und somit hoch lipophil. Die Carbocyanine sind für lebende Zellen ungiftig und werden in der Zelle nicht abgebaut. Dil wird in die äußere Schicht der Phospholipid-Doppelschicht der Zellmembran inkorporiert und breitet sich daraufhin durch laterale Diffusion innerhalb dieser Lipid-Membran sowohl retrograd als auch anterograd aus. Die gefärbten Membranfragmente werden in Vesikel verpackt und nehmen somit am Lipid-Turnover der Zelle teil. Hierdurch wird eine sehr klare Färbung mit Darstellung auch kleinste Zellausläufer ermöglicht (Honig & Hume, 1989). Die Ausbreitungsgeschwindigkeit ist von der Membranfluidität abhängig, welche wiederum von der Zusammensetzung der Membran und der Raumtemperatur abhängig ist. Insgesamt ist die Ausbreitungsgeschwindigkeit jedoch sehr gering (ca. 100-400 µm pro Tag) (Köbbert et al., 2000). Die Inkorporation der Lipidanaloga in die Membran ist so effizient, dass schon geringe Mengen ausreichen und die Carbocyanine somit meist in 1 bis 5% Konzentration in organischen Lösungsmitteln, wie Ethanol oder DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst, verabreicht werden (Köbbert et al., 2000). Dil ist ein selbst-fluoreszierender Farbstoff, der ohne weitere

histologische Färbemethoden unter dem Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar ist. Der große Vorteil dieser selbst-fluoreszierenden Farbstoffe besteht darin, weitere Untersuchungen an dem Gewebe durchzuführen und Beobachtungen der gefärbten Zellen sowohl *in vivo*, als auch *in vitro bzw. postmortem* zu ermöglichen. Das Emmissionsmaximum liegt bei 571 nano-meter (nm) (entspricht roter Fluoreszenz). Eine Abschwächung der Fluoreszenz kann durch Membranrecycling innerhalb der Zelle oder durch Ausbleichen geschehen.

Postmortem Färbetechnik

Dil war der erste und ist zurzeit mit Lucifer Yellow der einzige Farbstoff, der bei der so genannten *postmortem* Färbetechnik angewandt werden kann. Ein Vorteil dieser Technik besteht darin, dass ein Einsatz auch an totem und fixiertem Material *ex vivo* erfolgen kann, da die Ausbreitung des Farbstoffes durch passive Diffusion erfolgt und nicht an aktive Transportprozesse gebunden ist (Honig & Hume, 1989; Köbbert et al., 2000). Die Diffusionsgeschwindigkeit ist durch die Fixierung des Gewebes verringert, weshalb für eine angemessene Ausbreitung des Tracers eine längere Zeit nach der Injektion bis zur immunhistochemischen Weiterverarbeitung abgewartet werden muss. Dil ist dabei bis zu 2 Jahre nach der Markierung nachweisbar (Swift et al., 2005).

2.2.2 BrdU-Applikation

Die Markierung sich teilender Zellen mit dem Thymidin-Analogon BrdU und anschließender immunhistochemischer Detektion stellt heutzutage den Goldstandard zur Visualisierung adulter Stammzellen im Gehirn dar (Vega & Peterson, 2005). Als Standarddosierung für Neurogenese-Studien in Nagetieren gilt eine Menge zwischen 50-100 mg BrdU pro kg Körpergewicht. Obwohl es widersprüchliche Empfehlungen zu diesen Dosierungen gibt, scheint die Höhe der Dosierung ausreichend, um den Großteil (90%) der sich teilenden Zellen zu detektieren (Cameron & McKay, 2001; Burns & Kuan, 2005). Zum Studium von entweder Proliferation, Migration, Differenzierung oder Überleben ergeben sich unterschiedliche Paradigmen der BrdU-Applikation und Markierung (Malberg et al., 2000; Palmer et al., 2000). In den hier durchgeführten Experimenten sollten möglichst komplett alle proliferierenden Zellen zu einem vorgeschriebenen Zeitpunkt dargestellt werden. Auf diese

Weise sollten ausschließlich die residenten Stamm- und Progenitorzellen innerhalb der SVZ und SGZ, zu denen auch die Typ C-Zellen der SVZ gehören, markiert werden. Zu diesem Zwecke wurde allen Tiere genau 2 Stunden vor ihrer Tötung 100 mg BrdU pro kg Körpergewicht einmalig intraperitoneal injiziert, um alle Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Injektion in der S-Phase des Zellzyklus befinden, zu markieren (Malberg et al., 2000; Palmer et al., 2000). BrdU wurde hierbei in einer Lösung zu 10 mg/ml in 0,9% NaCl mit 7 mM NaOH verwendet.

2.2.3 Perfusionsfixierung

Um standardisierte Ergebnisse bei der Immunhistochemie und der Fluoreszenzmikroskopie zu erreichen, musste das zu untersuchende Gewebe fixiert werden. Als Methode der Wahl wird die Spülung des großen Blutkreislaufs in Form der transkardialen Perfusion mit frisch hergestellten 4% PFA in 0,1 M PB durchgeführt.

Vor Beginn der Perfusionsfixierung wurden die Tiere durch das kurzwirksame Inhalationsnarkotikum Isofluran narkotisiert, um die Stressreaktion mit konsekutiver Stresshormon-Ausschüttung zu reduzieren und die Handhabung der Tiere während der intraperitonealen Injektion des Anästhetikums zu erleichtern.

Anschließend wurden die Tiere durch ein Gemisch des Narkosemittels Kemin (Ketaminhydrochlorid) (100 mg/kg Körpergewicht) und des Muskelrelaxans Rompun (Xylazinhydrochlorid) (5 mg/kg Körpergewicht) durch intraperitoneale Injektion narkotisiert. Die Narkosetiefe, Schmerzfreiheit und Relaxierung der Tiere wurden durch Ausbleiben des Zwischenzehen- und Liedreflexes überprüft. Die tief narkotisierten Tiere wurden sodann sternotomiert. Anschließend wurde eine Perfusionsnadel in die linke Herzkammer des noch schlagenden Herzens eingeführt. Danach wurde durch einen gezielten Schnitt der rechte Herzvorhof eröffnet, um ein Abfließen des venösen Blutes zu ermöglichen. Gleichzeitig wurde mittels einer Peristaltik-Rollpumpe 0,1 M PBS-Lösung über die Perfusionsnadel in das Tier gepumpt. Um eine ausreichende Ausschwemmung des Blutes zu garantieren, wurde das ca. 4-5 fache des Blutvolumens der Tiere ausgetauscht. Um die Gehirne zu fixieren wurde anschließend auf Perfusion mit eiskaltem 4% PFA umgeschaltet. Nach ca. 15-20 Minuten Perfusionsdauer

wurden die Tiere dann durch eine Guillotine dekaptiert und die Gehirne entnommen.

2.2.4 Gehirnentnahme, Nachfixierung und Dehydrierung

Der Schädelknochen wurde entlang der Sutura sagittalis durchschnitten, um das komplette Gehirn mit Hilfe eines Führungsöffels aus der Schädelhöhle heben zu können. Die perfusionsfixierten Gehirne wurden sofort nach der Entnahme nachfixiert. Hierzu wurden sie in 4% PFA-Lösung bei 4°C eingelegt. Die Nachfixierung wurde mit dem Absinken des Gehirns auf den Gefäßboden beendet (ca. 24-30 h).

Der physiologische intrazelluläre Wassergehalt führt beim Einfrieren des Gewebes durch Expansion zu einer irreversiblen Schädigung der Zellen. Um den intrazellulären Wasseranteil osmotisch zu reduzieren, wurden die Gehirne anschließend in 30% Saccharose-Lösung für 72 Stunden bei 4°C dehydriert. Bis zur stereotaktischen *postmortem* Injektion des Tracers erfolgte daraufhin die erneute Lagerung in 4% PFA Lösung für einige Tage, wobei nach jeweils 24 Stunden das PFA erneuert wurde.

2.2.5 Stereotaktische Operation

Die stereotaktische Hirnoperation an Ratten und Mäusen ist eine gezielte, über eine kleine Trepanationsöffnung im Schädelknochen ausführbare Injektionsmethode unter Einsatz eines speziellen Koordinatensystems, welches aus einem anatomischen Tieratlas für Stereotaxie entnommen werden kann (siehe Abb. 4).

Im Gegensatz zur stereotaktischen *in vivo* Injektion wurde der Tracer Dil in den hier durchgeführten Experimenten direkt nach der *postmortem* Injektions- und Färbetechnik in das fixierte Gehirn injiziert. Dies ermöglicht eine präzisere Injektionslokalisation, da der Tracer im Gegensatz zu einer *in vivo* Injektion direkt ohne Trepanationsöffnung unter Ansicht durch ein Operationsmikroskop anhand anatomischer Landmarken in die jeweilige Region appliziert werden kann. Das fixierte Gehirn wurde hierzu mit Hilfe der beiden Fixierstäbe (siehe Abb. 4) in den stereotaktischen Rahmen eingespannt und der Tracer dann unter mikroskopischer Sicht, in die jeweils gewünschte Region injiziert. Dil wurde hierbei in gelöster Form per Pumpinjektion appliziert.

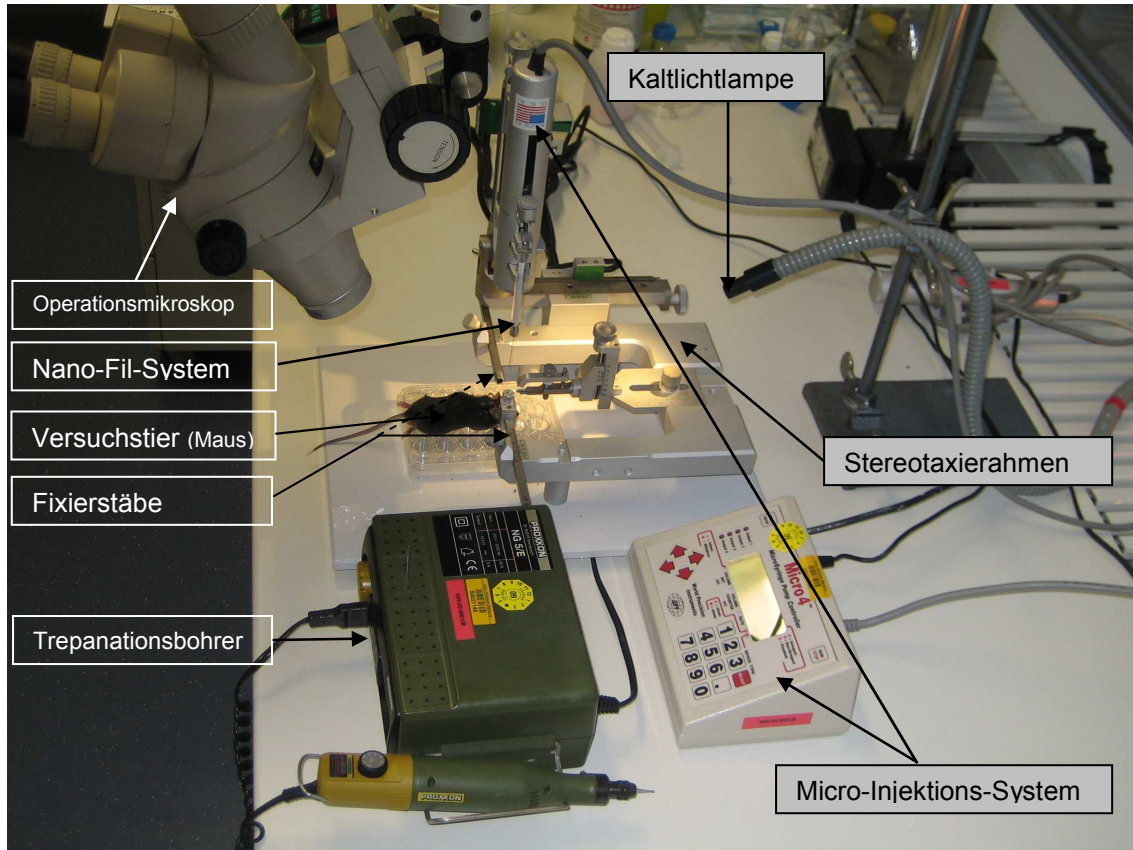


Abb. 4:
Versuchsaufbau zur stereotaktischen *in vivo* Operation an Ratten und Mäusen

Im Gegensatz zu der abgebildeten stereotaktischen *in vivo* Operation wurde der Tracer Dil in den hier durchgeführten Experimenten nach der *postmortem* Technik direkt in die jeweils gewünschte Zielregion im fixierten Gehirn injiziert. Dazu wurde das Gehirn nach Perfusion, Entnahme und Fixierung zunächst mit Hilfe einer Microtom-Klinge unter Berücksichtigung der morphologisch-sichtbaren Strukturen und des Stereotaxie-Atlas in die jeweilige Zielregion frei präpariert. Anschließend wurde das präparierte Gehirn mit den beiden Fixierstäben in den stereotaktischen Rahmen eingespannt und der Tracer unter mikroskopischer Sicht mit Hilfe des Nano-Fil Systems injiziert.

2.2.6 Versuchsanordnung der Tracing-Experimente

Um eine detaillierte anatomisch-topographische Darstellung der Nervenfaserverbindungen zwischen den dopaminergen Zentren im Mittelhirn (A8-A10) und den Zonen der Neurogenese mit SVZ und SGZ nachzuweisen, wurden in den hier durchgeführten Experimenten retrograde und anterograde *postmortem* Tracing-Methoden angewandt. Nach Injektion und anschließender Aufnahme des Tracers innerhalb der SVZ und SGZ bzw. der dopaminergen Neurone A8-A10 im Mittelhirn wird Dil entlang der dopaminergen Fasern retrograd bzw. anterograd zu den jeweiligen Zellkörpern bzw. Axonausläufern transportiert. Für die retrograden Experimente gilt somit, dass Dil-positive

Zellkörper von Neuronen innerhalb der dopaminergen Regionen A8-A10 des Mittelhirns eine Faserverbindung zu den zuvor markierten Arealen der SVZ und SGZ beweisen. Umgekehrt sind Dil-positive Faserendigungen dopaminergere Zellen innerhalb der SVZ bzw. SGZ nach Injektion in die dopaminergen Regionen A8-A10 des Mittelhirns beweisend für eine Faserverbindung entsprechend den anterograden Experimenten.

Für die retrograde Injektion des Tracers wurde das fixierte Gehirn, unter Zuhilfenahme des Stereotaxie Atlas, von anterior in den Bereich der SVZ in der Koronarebene oder von lateral in den Bereich der SGZ in der Sagittalebene vorgeschritten. Für die anterograde Injektion wurde das Gehirn ebenfalls von posterior bzw. von lateral in den Bereich der dopaminergen Regionen des Mittelhirns als Koronar- und Sagittalschnitt vorgeschritten.

Vor und nach Injektion des Tracers verweilte die Kanüle für 10 Minuten in dem Gewebe. Es wurden unilaterale und bilaterale Injektionen mit verschiedenen Injektionsvolumina durchgeführt. In den Experimenten wurde Dil in einer Konzentration von 5% injiziert, wobei DMSO als Lösungsmittel verwendet wurde. Um eine ausreichende Ausbreitung des Tracers zu gewährleisten wurden die Gehirne vor der Gewebeaufarbeitung nach der Injektion 4-5 Wochen in 4% PFA-Lösung bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert.

2.2.6.i Retrogrades *postmortem* Tracing bei Ratten

Die direkte Injektion in die SVZ bzw. SGZ erlaubt es, zum einen in verschiedenen lokalisierte Anteile innerhalb der SVZ und SGZ zu injizieren, und zum anderen differenzierte Volumina (20 nl/ 40 nl/ 50 nl/ 100 nl/ 120nl) zu verwenden.

Als Injektionsziele wurden folgende Regionen in SVZ und SGZ gewählt:

SVZ

1. **anteriore** Anteile (**Sagittalebene**, Bregma ca. +0,70 mm)
2. **intermediäre** Anteile (**Sagittalebene**, Bregma ca. +0,20 mm)
3. **posteriore** Anteile (**Sagittalebene**, Bregma ca. -0,30 mm)

Dabei wurde die SVZ in der **Koronarebene** nochmals in ein **dorsales**, **intermediäres** und **ventrales** Drittel unterteilt.

Im Weiteren wird bei Verwendung des Ausdrucks intermediär immer durch Angabe der Schnittebene (Sagittal- oder Koronarebene) präzisiert, ob es sich auf die antero-posteriore oder dorso-ventrale Achse bezieht.

SGZ

1. **anteriore** Anteile (**Sagittalebene**, Bregma ca. -2,12 mm)
2. **intermediäre** Anteile (**Sagittalebene**, Bregma ca. -3,60 mm)
3. **posteriore** Anteil (**Sagittalebene**, Bregma ca. -5,20 mm)

Table 6: Übersicht der Tieranzahl, Region und Injektionsvolumina bei den retrograden Tracing-Experimenten bei Ratten

Anzahl Tiere (Ratte)	Injektionsregion (anterio-posteriore Ausdehnung, sagittal)	unilateral/ bilateral	Injektionsvolumen	Injektionsfluss
4	anteriore SVZ	bilateral	20 nl/ 40nl/ 100 nl	Für alle Injektionen: 20 nl: 5 nl/min 40 nl: 10nl/min 50 nl: 10 nl/min 100 nl: 20 nl/min
4	posteriore SVZ	bilateral	40 nl/ 100 nl	
4	intermediäre SVZ	bilateral	50 nl/ 100 nl	
2	anteriore SGZ	unilateral	50 nl	
2	intermediäre SGZ	unilateral	50 nl	
2	posteriore SGZ	unilateral	50 nl	

2.2.6.ii Anterogrades *postmortem* Tracing bei Ratten

Für die anterograden *postmortem* Experimente wurde der Tracer Dil in die folgenden dopaminergen Zielregionen im Mittelhirn injiziert:

1. **SNc**
2. SNc, lateraler Anteil (**SNl**)
3. **VTA**
4. **RRF**

Dabei wurden die Regionen (ausgenommen das RRF, Bregma ca. -6,72 mm) in der **Sagittalebene** zusätzlich in einen **anterioren** (Bregma ca. -4,80 mm), **intermediären** (Bregma ca. -5,30) und **posterioren** (Bregma ca. -6,04 mm) Anteil unterteilt.

Tabelle 7: Übersicht der Tieranzahl, Region und Injektionsvolumina bei den anterograden Tracing-Experimenten bei Ratten

Anzahl Tiere (Ratte)	Injektionsregion	unilateral/ bilateral	Injektionsvolumen	Injektionsfluss
3	SNC	unilateral	40 nl/ 100 nl/ 200 nl	Für alle Injektionen: 40 nl: 10 nl/min
4	SNC	bilateral	50 nl/ 100 nl	50 nl: 10 nl/min
2	SNC pars lateralis (SNI)	bilateral	50 nl/ 100 nl	75 nl: 10 nl/min
1	SNC pars lateralis (SNI)	unilateral	40nl	100 nl: 20 nl/min
3	VTA	unilateral	40 nl/ 75 nl/ 100 nl	200 nl: 20 nl/min
1	RRF	unilateral	75 nl	

2.2.6.iii Anterogrades *postmortem* Tracing bei Nestin-GFP Mäusen

Als weiteren Ansatz, die anterograden, dopaminergen Verbindungen zur SVZ und SGZ nachzuweisen, wurde ein transgenes Mäusemodell verwendet (Mignone et al., 2004). Durch ein zweites Tiermodell sollte der Frage nachgegangen werden, ob ein möglicher Unterschied zwischen den zwei Spezies besteht. Durch die gemeinsame Kopplung von Nestin und GFP sind die Vorläuferzellen direkt unter dem Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar. Eine Vorbehandlung mit BrdU zur Detektion der Vorläuferzellen war somit bei den Experimenten mit transgenen Nestin-GFP Mäusen nicht nötig (siehe unten). Bei den Experimenten wurde analog den anterograden *postmortem* Experimenten beim Rattenmodell Dil in die folgenden dopaminergen Zielregionen im Mittelhirn von acht transgenen Nestin-GFP Mäusen injiziert:

1. **SNC**
2. SNC, lateraler Anteil (**SNI**)
3. **VTA**

Dabei wurden die Regionen in der **Sagittalebene** zusätzlich in einen **anterioren** (Bregma ca. -2,92 mm), **intermediären** (Bregma ca. -3,16 mm) und **posterioren** (Bregma ca. -3,64 mm) Anteil unterteilt.

Table 8: Übersicht der Tierzahl, Region und Injektionsvolumina bei den anterograden Tracing-Experimenten bei transgenen Nestin-GFP Mäuse

Anzahl Tiere (Maus)	Injektionsregion	unilateral/bilateral	Injektionsvolumen	Injektionsfluss
4	SNc	unilateral	50 nl	10 nl/min
2	SNc pars lateralis (SNI)	unilateral	50 nl	10 nl/min
2	VTA	unilateral	50 nl	10 nl/min

2.2.7 Gewebeaufarbeitung

Herstellung von Gewebeschnitten

Nach Injektion des Tracers Dil und Lagerung der Gehirne für 4-5 Wochen in 4% PFA-Lösung wurden die Gehirne einzeln in Methylbutan bei einer Temperatur zwischen -25°C und -35°C gefroren, um anschließend mit Tissue Freezing Medium auf einem Objekthalter festgefroren zu werden. Von diesen Hirnen wurden dann im Kryostaten bei einer Kammer- und Objektträgertemperatur von -20°C bis -25°C koronare- bzw. sagittale Schnittserien mit einer Schnittdicke von 30µm für Rattenhirne und 25µm für Mäusehirne erstellt. Die Schnitte wurden dabei nach der „free-floating“-Methode gewonnen, das heißt die Schnitte wurden nicht direkt auf einem Objektträger fixiert sondern bis zur immunhistochemischen Weiterverarbeitung des Gewebes frei schwimmend bei -20°C in einer Gefrierschutzlösung (Antifreeze) gelagert. Es wurden Serienschnitte der Gehirne angefertigt, so dass jeder 8. Schnitt gefärbt und ausgewertet wurde.

2.2.8 Histologie

Immunhistochemie

Das Prinzip der immunhistochemischen Detektion beruht auf der Bindung eines spezifischen primären Antikörpers an sein Epitop, typischerweise eine Sequenz von 8-10 Aminosäuren des darzustellenden Proteins. Im Falle monoklonaler Antikörper handelt es sich um ein einziges Epitop, bei polyklonalen Antikörpern hingegen um mehrere Epitope desselben Proteins. Nach Bindung eines fluoreszent markierten sekundären Antikörpers, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist, kann die Lokalisation des Epitops visualisiert werden. Die spezifische Markierung von Antigenen gliedert sich in folgende Schritte: (i) Blockierung von unspezifischen Bindestellen, (ii) Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper und (iii) Detektion durch einen Sekundärantikörper.

Die Färbung der Gewebsschnitte erfolgte unter ständigem Schütteln in Zellkulturschalen mit Netzeinsätzen. Zu Anfang wurden die Schnitte 3 mal 10 Minuten in PBS 0,1 M gewaschen. Da nur fluoreszent markierte Sekundärantikörper verwendet wurden und keine Peroxidase-basierten Färbungen durchgeführt wurden, war eine Inkubation in 0,3% H₂O₂/PBS 0,1 M Lösung zur Blockierung der endogenen Peroxidase nicht nötig.

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren und somit ein unspezifisches Hintergrundsignal zu reduzieren und um gleichzeitig die Zellmembranen zur Verbesserung der Antikörperpenetration zu permeabilisieren, wurden die Schnitte als nächstes für 30 Minuten in 2,5% Pferdeserum und 0,2% Triton X-100 in PBS inkubiert. Der Primärantikörper wurde in der gleichen Lösung verdünnt und mit den Schnitten für die Dauer von ein bis zwei Nächten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten von je 10 Minuten wurde der in Blockierlösung verdünnte Sekundärantikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit den Schnitten inkubiert. Die fluoreszent gefärbten Schnitte wurden erneut 3 mal 10 Minuten gewaschen, auf mit Gelatine beschichtete Objektträger gezogen und mit PVA-DABCO eingedeckelt.

Zur Darstellung der dopaminergen Zellen und Fasern in den Zellgruppen des Mittelhirns, im Striatum sowie SVZ und SGZ wurden die Hirnschnitte mittels TH-

oder DAT-Färbung gefärbt. Beide Färbungen gelten als sensible Marker für dopaminerge Neurone mit der Einschränkung, dass das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH) auch in noradrenergen und teilweise serotonergen Neuronen exprimiert wird, da Dopamin eine Vorstufe zu Adrenalin und Noradrenalin ist. Höglinger et al. konnten in ihren Versuchen jedoch den Beweis führen, dass die TH-positiven Fasern in der SVZ in der Tat dopaminerge und nicht noradrenerge bzw. serotonerge Herkunft sind (Höglinger et al., 2004). Im Falle der SGZ wurde in den hier durchgeführten Experimenten, um eine noradrenerge bzw. serotonerge Herkunft der Fasern auszuschließen, stets der DAT-Antikörper zur Darstellung der dopaminergen Fasern und Neurone verwendet.

TH-Färbung

TH ist das Enzym, das die Aminosäure Tyrosin zu Dihydroxyphenylalanin (Dopa) hydroxyliert, aus dem dann nachfolgend durch Decarboxylierung Dopamin entsteht. Somit ist dieses Enzym spezifisch für monoaminerge Zellen. Als Primärantikörper wurden Kaninchen-anti-TH Antikörper in einer Konzentration 1/200 verwendet. Als Sekundärantikörper wurden verschiedene anti-Kaninchen fluoreszent markierte Antikörper in einer Konzentration von 1/500 verwendet: Alexa 488-gekoppelt, Cy-5-gekoppelt und FITC-gekoppelt.

DAT-Färbung

Freigesetztes Dopamin wird durch den Dopamintransporter (DAT) in die präsynaptische Terminale und über den vesikulären Monoamintransporter (VMAT2) in synaptische Vesikel zurückaufgenommen. Somit ist der Dopamintransporter (DAT) für die Dopaminwiederaufnahme in präsynaptische Nervenendigungen verantwortlich und gilt als sensibler Marker für dopaminerge Neurone. Als Primärantikörper wurden Kaninchen-anti-DAT Antikörper in einer Konzentration von 1/200 verwendet. Als Sekundärantikörper wurden verschiedene anti-Kaninchen fluoreszent markierte Antikörper in einer Konzentration von 1/500 verwendet: Alexa 488-gekoppelt und Cy-5-gekoppelt.

BrdU-Färbung

Zur Begutachtung der Stammzellpopulationen in SVZ und SGZ wurde jeder Ratte zwei Stunden vor der Tötung der Proliferationsmarker BrdU verabreicht. Für die Durchführung einer BrdU-Färbung ist eine Vorbehandlung nötig, um die DNA zu denaturieren und so die Freilegung des darin eingebauten Antigen-Epitops (BrdU) zu ermöglichen, an das folgend der anti-BrdU Antikörper bindet. Hierzu wurden die Schnitte für 20 Minuten bei 37°C im Dunkeln in 2 N HCl inkubiert und anschließend mindestens viermal 5 x 5 Minuten in PBS gewaschen. Als Primärantikörper wurden Maus-anti-BrdU Antikörper in einer Konzentration von 1/200 verwendet. Als Sekundärantikörper wurden wiederum verschiedene anti-Maus fluoreszent markierte Antikörper in einer Konzentration von 1/500 verwendet: Alexa 488-gekoppelt, Cy-5-gekoppelt und FITC-gekoppelt.

2.2.9 Mikroskopische Auswertung

Fluoreszenz Mikroskopie

Die Auswertung und Bildgebung der mehrfachmarkierten fluoreszierenden Hirnschnitte erfolgte mit einem Fluoreszenz-Mikroskopsystem (Leitz DMRB, Leica), unter Verwendung eines Öl-Objektivs (10x-100x). Die mit einer an das Mikroskop installierten Digital-Kamera (Hamamatsu ORCA-ER) erzeugten Bilder wurden mit der Simple PCI-6 Software digital aufgenommen.

Konfokale Mikroskopie

Zusätzlich erfolgte die Auswertung an einem konfokalen Laserscanmikroskop (Zeiss, LSM 510). Die konfokale Mikroskopie bietet den Vorteil, dass jeweils nur eine Schichtaufnahme angefertigt wird und Signalanteile, die in anderen Ebenen außerhalb der Fokusebene liegen, ausgeblendet werden. Dies ergibt eine optimale Tiefenschärfe. Am Computer kann anschließend durch Schichtung verschiedener Fokusebenen ein dreidimensionales Bild des jeweiligen Objektes rekonstruiert werden.

III. Ergebnisse

3.1 Dopaminerge Faserverbindung zu den Vorläuferzellen der SVZ und SGZ

Sowohl unter dem konventionellen Fluoreszenz-Mikroskop als auch unter dem konfokalen Laserscan-Mikroskop wurden TH- bzw. DAT-positive Fasern in unmittelbarer Nachbarschaft zu den BrdU-positiven Vorläuferzellen nachgewiesen. Unter der Prämisse, dass keine noradrenergen Fasern im Bereich der SVZ existieren (Höglinger et al., 2004), bestätigt dies die Erkenntnis, dass dopaminerge Fasern in engem Kontakt zu den Stammzellen der SVZ und SGZ stehen.

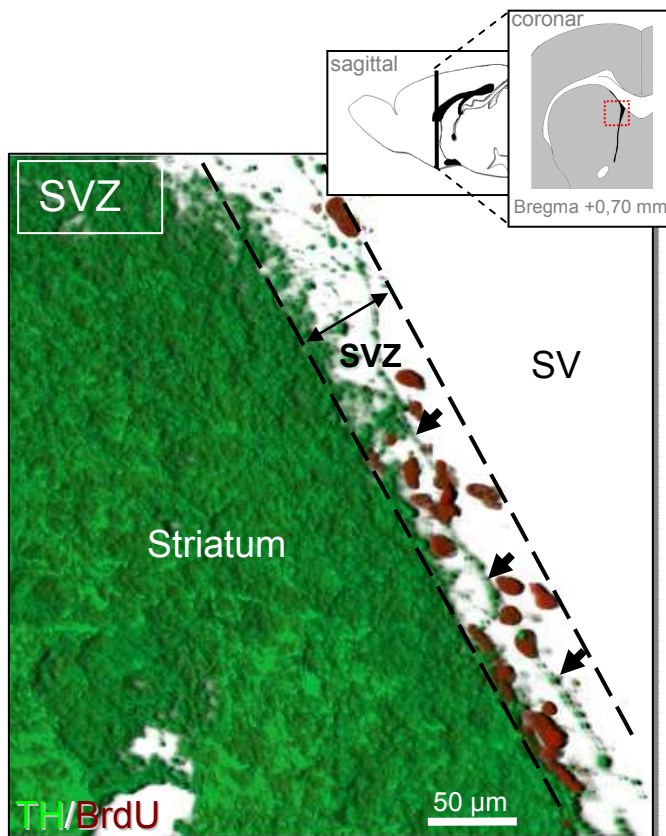


Abb. 5: Dopaminerge Fasern in direkter Nachbarschaft zu den Vorläuferzell-Populationen der SVZ

Ausschnitt aus der anterioren und intermediären (Sagittalebene) SVZ der Ratte bei koronarer Schnittführung (Lokalisation siehe Schemazeichnung rechts oben).

Die Zone zwischen den gestrichelten schwarzen Linien markiert die SVZ. Rechts der SVZ liegt der Seitenventrikel (SV). Links der SVZ liegt das Striatum. Dopaminerge TH+ Fasern (grün, schwarze Pfeile) liegen in unmittelbarer Nähe zu den BrdU+ Vorläuferzellen (rot) innerhalb der SVZ der Ratte.

Die Aufnahme wurde an einem konfokalen Laserscan-Mikroskop angefertigt und 3-dimensional rekonstruiert.

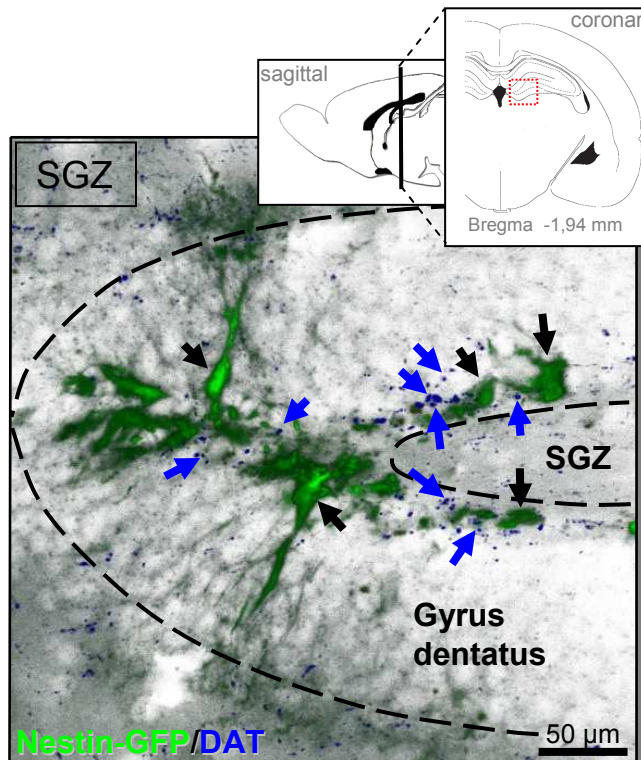


Abb. 6:
Dopaminerge Fasern in direkter Nachbarschaft zu den Vorläuferzell-Populationen der SGZ

Ausschnitt aus den intermediären (Sagittalebene) Anteilen der SGZ der Maus in koronarer Schnitfführung (Lokalisation siehe Schema-zeichnung).

Die Zone zwischen den gestrichelten schwarzen Linien markiert den Gyrus dentatus, die innere Linie die SGZ. Dopaminerge DAT+ Fasern (blau, blaue Pfeile) liegen in unmittelbarer Nähe zu den Nestin-GFP+ Vorläuferzellen (grün, schwarze Pfeile) in der SGZ der Maus.

Die Aufnahme wurde an einem konfokalen Laserscan-Mikroskop angefertigt und 3-dimensional rekonstruiert.

3.2 Retrogrades Tracing: Dil-markierte Nervenzellen sind nach Injektion in SVZ und SGZ räumlich geordnet in dopaminergen Regionen des Mittelhirns nachzuweisen

Als nächster Schritt sollte detailliert gezeigt werden, aus welchen dopaminergen Zellgruppen die dopaminergen Fasern entspringen, die in der SVZ und SGZ terminieren. Hierzu erfolgte die Tracer Injektion in die verschiedenen Teilbereiche der SVZ und SGZ.

3.2.1 Retrogrades Tracing: Injektion in die SVZ der Ratte

Insgesamt 12 Ratten wurde Dil mit Injektionsvolumina zwischen 20-100nl in die verschiedenen Teilbereiche der SVZ (Unterteilung in der Sagittal- und Koronarebene) injiziert. Bezüglich der Dil-markierten Fasern im Bereich des Mittelhirns ergab sich aus den retrograden Tracing-Experimenten nach Injektion in die SVZ folgendes Muster:

Injektion in *anteriore* SVZ

Nach Injektion in die anterioren Anteile der SVZ wurden Dil-markierte Zellen vornehmlich in den anterioren und intermediären (Sagittalebene) Bereichen der SNc und teilweise Anteilen der anterioren VTA gefunden. Dabei konnten nach Injektion in die ventralen Anteile der anterioren SVZ und den subventrikulären Bereich in der Nachbarschaft zum Nucleus accumbens, zu dem auch die kleine Region medial (ventro-medial) des Seitenventrikels gehört, markierte Zellen vorwiegend in der medialen und anterioren SNc und Anteilen der anterioren VTA lokalisiert werden. Nach Injektion in die intermediären (Koronarebene) und dorsalen Anteile der anterioren SVZ wurden Dil-markierte Neurone ebenfalls in den anterioren und intermediären (Sagittalebene) SNc-Anteilen nachgewiesen. Markierte Zellen im Bereich der VTA wurden jedoch nur nach Injektion in die ventralen Anteile der anterioren SVZ gefunden, bei einer Injektion weiter dorsal konnten keine markierten Zellen in der VTA beobachtet werden. Jedoch waren nach Injektion in die dorsalen Anteile der anterioren SVZ deutlich Dil-markierte Zellen in der anterioren SNI nachzuweisen.

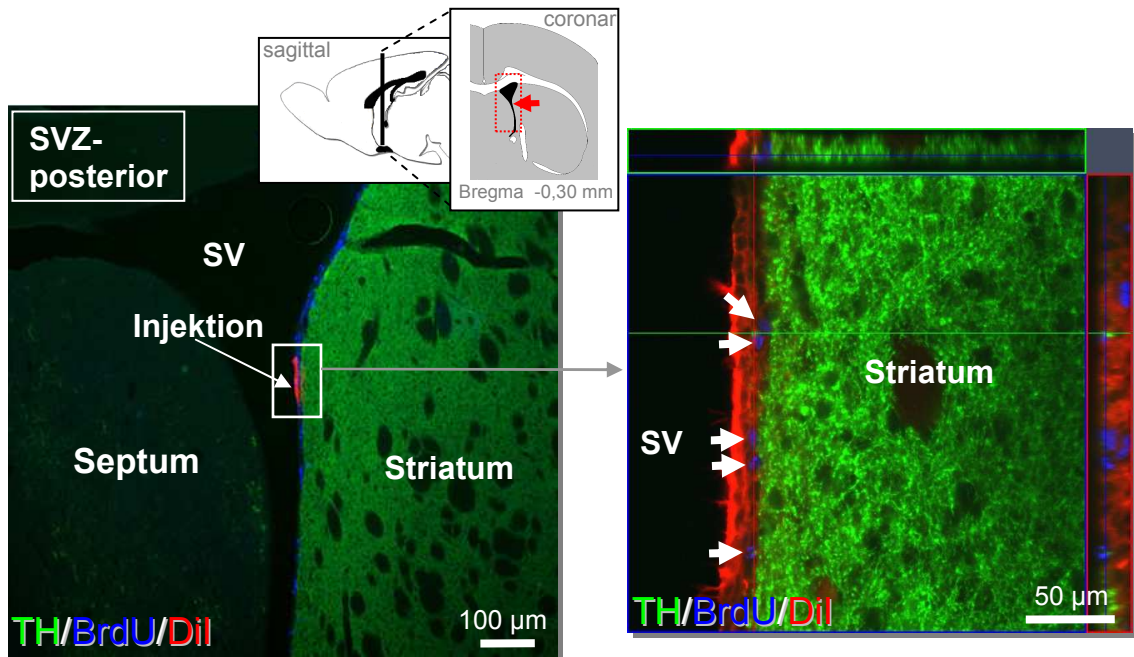
Injektion in *intermediäre* SVZ

Nach Injektion in die intermediären (Sagittalebene) Anteile der SVZ konnten Dil-markierte Zellen auch in den intermediären (Sagittalebene) Anteilen der SNc mit Beteiligung auch weiter anterior und posterior lokalisierten Anteilen der SNc gefunden werden. Dabei wurden die markierten Zellen aus den ventralen Bereichen der intermediären (Sagittalebene) SVZ vornehmlich in den medialen Anteilen der SNc und teilweise noch der VTA nachgewiesen. Nach Injektion in die dorsalen Bereiche der SVZ wurden Dil-markierte Zellen vermehrt in der SNI nachgewiesen.

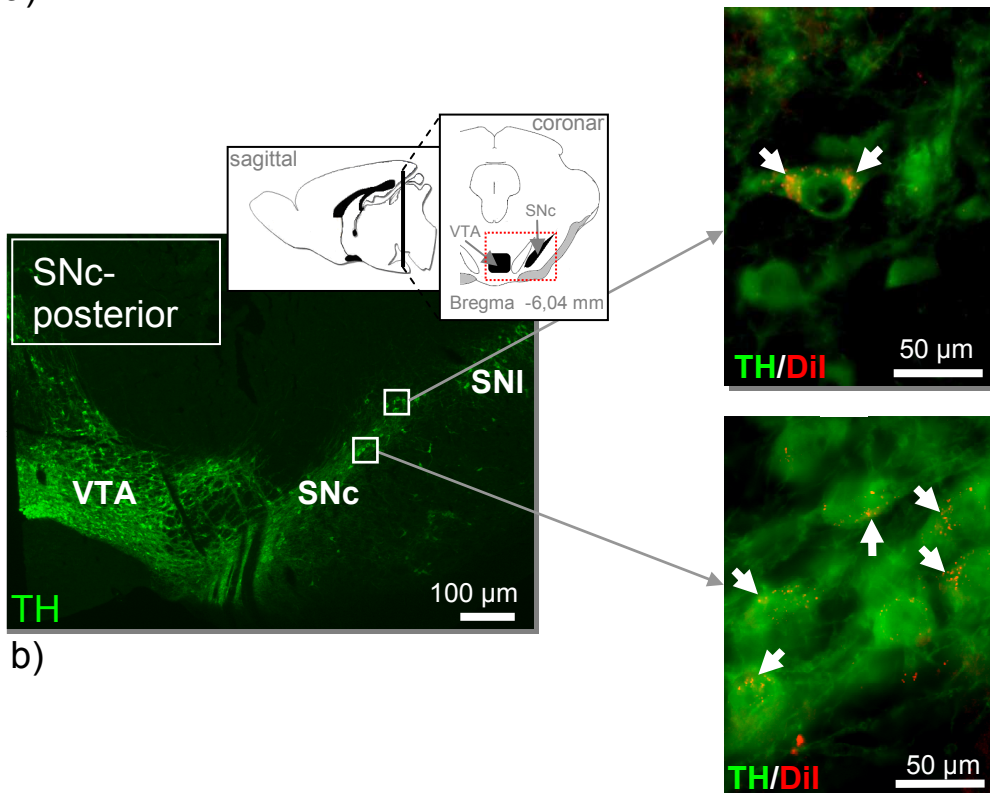
Injektion in *posteriore* SVZ

Nach Injektion in die posterioren Anteile der SVZ konnten Dil-markierte Zellen auch überwiegend in den posterioren Anteilen der SNc lokalisiert werden (siehe Abb. 7). Hierbei konnte nach Injektion in die postero-dorsale Region der SVZ im besonderen Maße markierte Zellpopulationen in der SNI nachgewiesen werden. Injektionen in die intermediären (Koronarebene) und ventralen Anteile der posterioren SVZ zeigten markierte Zellen im Bereich der posterioren, medialen

SNc nach lateral hin abnehmend. In der VTA wurden keine Dil-markierten Zellen beobachtet.



a)



b)

Abb. 7:

- a) Unilaterale Injektion von Dil (rot) in die posteriore und intermediäre (Koronarebene) SVZ der Ratte (links: Übersicht; rechts: Vergrößerung der Injektionsstelle). Der Tracer Dil zeigt sich in der Vergrößerung in unmittelbarer Nähe zu den BrdU+ Vorläuferzellen (blau, weiße Pfeile) der SVZ lateral des Striatums mit reichlich TH+ Fasern (grün).
- b) Nach Ausbreitung des Tracers Dil (rot) zeigen sich markierte TH+ Zellen (grün) vornehmlich im Bereich der posterioren und intermediären (Koronarebene) SNc (linkes Bild). In der Vergrößerung (rechts oben und unten) sind deutlich die Dil-Partikel in den TH+ Zellen (grün) der SNc nachzuweisen (siehe weiße Pfeile).

Alle Bilder sind auf einem konfokalen Laserscan-Mikroskop aufgenommen.

Abkürzungen: SVZ: Subventrikuläre Zone; SV: Seitenventrikel; VTA: Ventrale tegmentale Area; SNc: Substantia nigra, pars compacta; SNI: SNc, pars lateralis

Im Bereich des RRF konnten nach Injektion in die verschiedenen Regionen der SVZ keine Dil-markierte Zellkörper nachgewiesen werden. Eine Innervation aus den übrigen dopaminergen, diencephalen Zellgruppen A11-A15 konnte in den retrograden Tracing-Experimenten ebenfalls erwartungsgemäß ausgeschlossen werden, da der Tracer nach seiner Ausbreitung hier nicht nachzuweisen war.

3.2.2 Retrogrades Tracing: Injektion in die SGZ der Ratte

Bei 6 Ratten wurde Dil mit einem Injektionsvolumen von 50 nl in die verschiedenen Teilbereiche der SGZ (Unterteilung in der Sagittalebene) injiziert. Bezüglich der Dil-markierten Zellen im Bereich des Mittelhirns ergab sich aus den retrograden Tracing-Experimenten nach Injektion in die SGZ folgendes Muster:

Injektion in *anteriore* SGZ

Nach Injektion in die anteriore SGZ konnten Dil-markierte Zellen bevorzugt in der anterioren VTA gefunden werden (siehe Abb. 8). Weiter posterior konnten keine markierten Zellen in der VTA gefunden werden. Ebenso wurden keine markierten Neurone in der SNc, SNI oder dem RRF beobachtet.

Injektion in *intermediäre* SGZ

Nach Injektion in die intermediären (Sagittalebene) Anteile der SGZ wurden Dil-markierte Zellen in der gesamten VTA nachgewiesen, wobei in den intermediären (Sagittalebene) Anteilen der VTA die deutlichste Ansammlung

markierter Nervenzellen zu beobachten war. Zellgruppen aus SNc, SNI und RRF zeigten keine eindeutige Dil-Markierung nach Injektion.

Injektion in *posteriore* SGZ

Nach Injektion in die posteriore SGZ konnten markierte Zellen auch in der posterioren VTA nachgewiesen werden. Ferner wurden Zellen in den posterioren Anteilen der SNc gefunden. Im gesamten RRF wurden keine Dil-markierten Zellen nachgewiesen.

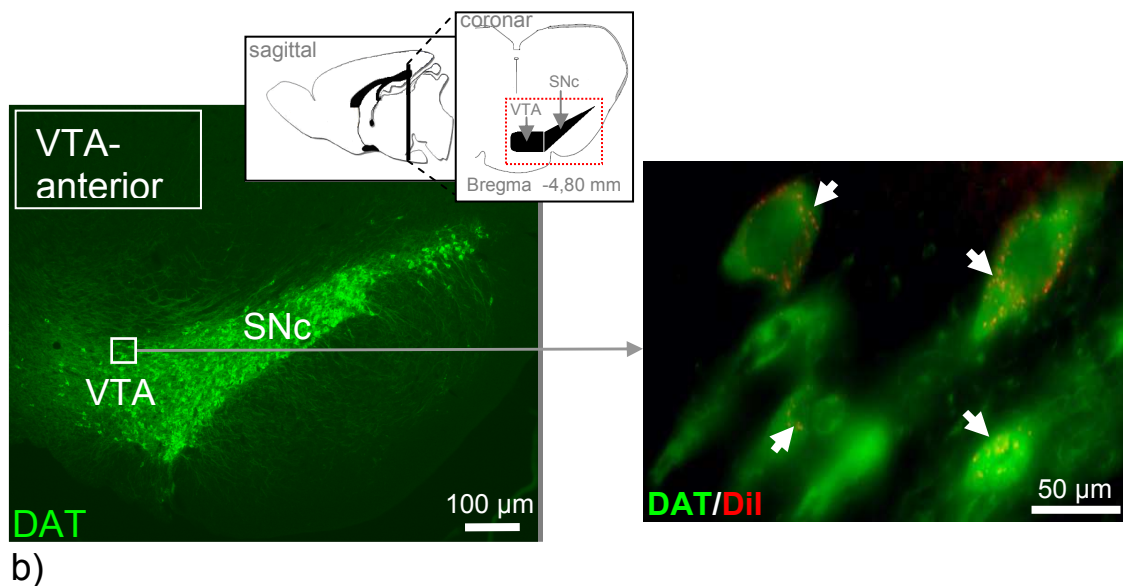
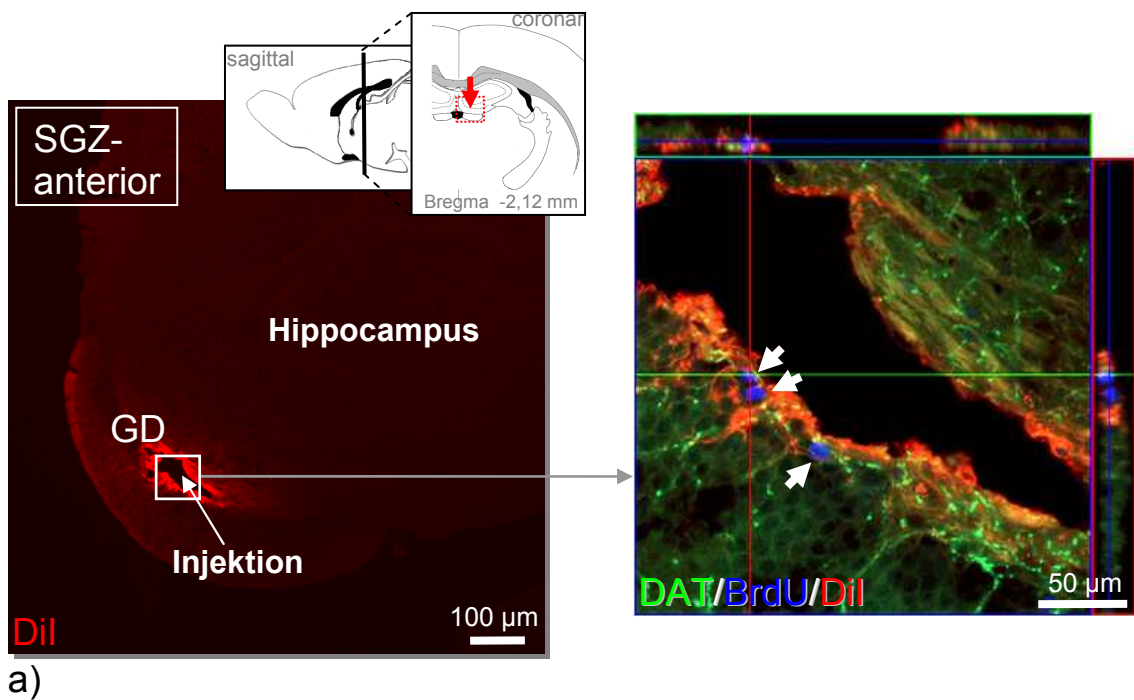


Abb. 8:

- a) Unilaterale Injektion von Dil (rot) in anteriore Anteile der SGZ der Ratte mit Vergrößerung der Injektionsstelle (rechts). Der Tracer Dil zeigt sich in der Vergrößerung in unmittelbarer Nähe zu den BrdU+ Vorläuferzellen (blau, weiße Pfeile) und DAT+ Fasern (grün) der SGZ.
- b) Nach Ausbreitung des Tracers Dil zeigen sich markierte DAT+ Zellen (grün) vornehmlich im Bereich der anterioren VTA (linkes Bild). In der Vergrößerung (rechts) sind deutlich die Dil-Partikel (rot) in den DAT+ Zellen (grün) der VTA nachzuweisen (siehe weiße Pfeile).

Alle Bilder sind auf einem konfokalen Laserscan-Mikroskop aufgenommen.

Abkürzungen: SGZ: Subgranuläre Zone; GD: Gyrus denatus; VTA: Ventrale tegmentale Area; SNC: Substantia nigra, pars compacta

3.3 Anterogrades Tracing: Nach Injektion in die dopaminergen Regionen des Mittelhirns terminieren Dil-markierte Fasern räumlich geordnet in SVZ und SGZ

Um eine vollständige und repräsentative Aussage zu der räumlich-topographischen Innervation treffen zu können, sollte in einem zweiten Schritt durch anterograde Tracing-Versuche in entgegengesetzter Richtung die Verbindung vom Mittelhirn zu den Regionen der Neurogenese bestätigt werden.

3.3.1 Anterogrades Tracing: Injektion in die SNC der Ratte

Insgesamt 10 Ratten wurde Dil mit Injektionsvolumina zwischen 40-200 nl in die verschiedenen Teilbereiche der SNC (Unterteilung in der Sagittal- und Koronarebene) injiziert (7 Ratten SNC; 3 Ratten SNI). Bezüglich der Dil-markierten Fasern im Bereich der SVZ und SGZ ergab sich aus den anterograden Tracing-Experimenten nach Injektion in die SN folgende Aufteilung.

Injektion in *anteriore* SNC

Nach Injektion in die anteriore SNC konnten deutlich Dil-markierte Fasern in der gesamten ventro-dorsalen Ausdehnung der anterioren SVZ nachgewiesen werden (siehe Abb. 9). Besonders prägnant waren nach Injektion in die antero-medialen Anteile der SNC markierte Fasern in der antero-ventralen SVZ und im RMS nachweisbar. Nach posterior verringerte sich die Dichte der Dil-markierten Fasern im Bereich der SVZ zunehmend. In der gesamten SGZ ließen sich nach

Injektion in die anteriore SNc keine eindeutigen Dil-markierten Nervenfasern bestätigen.

Injektion in *intermediäre* SNc

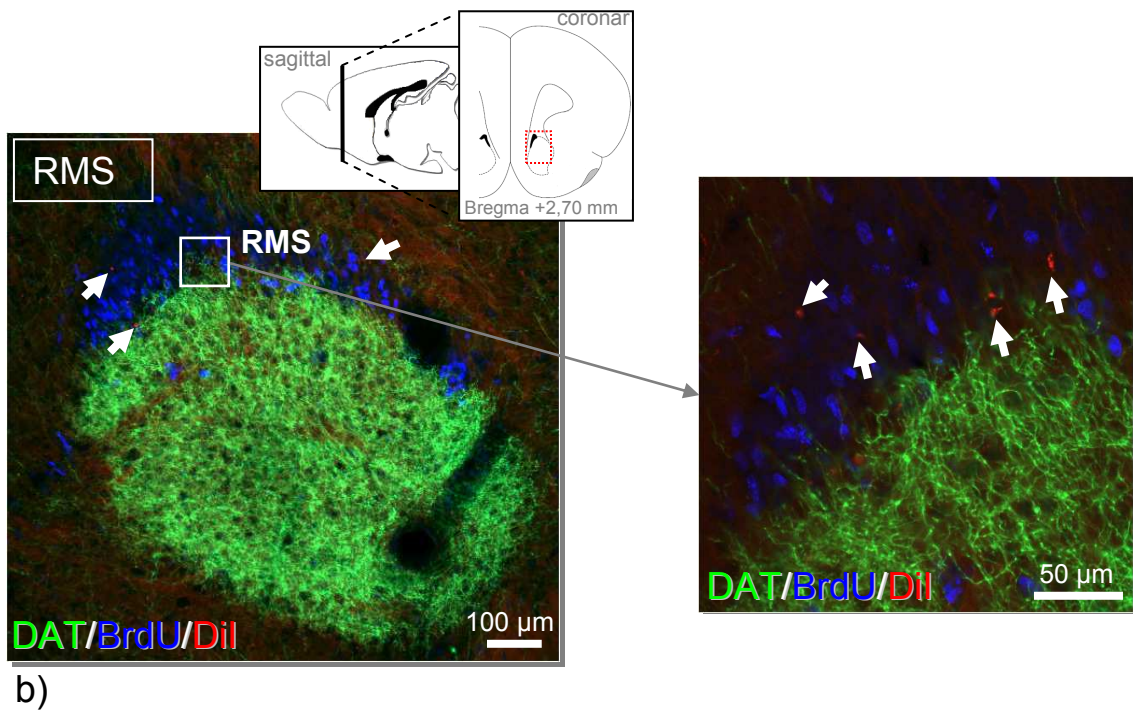
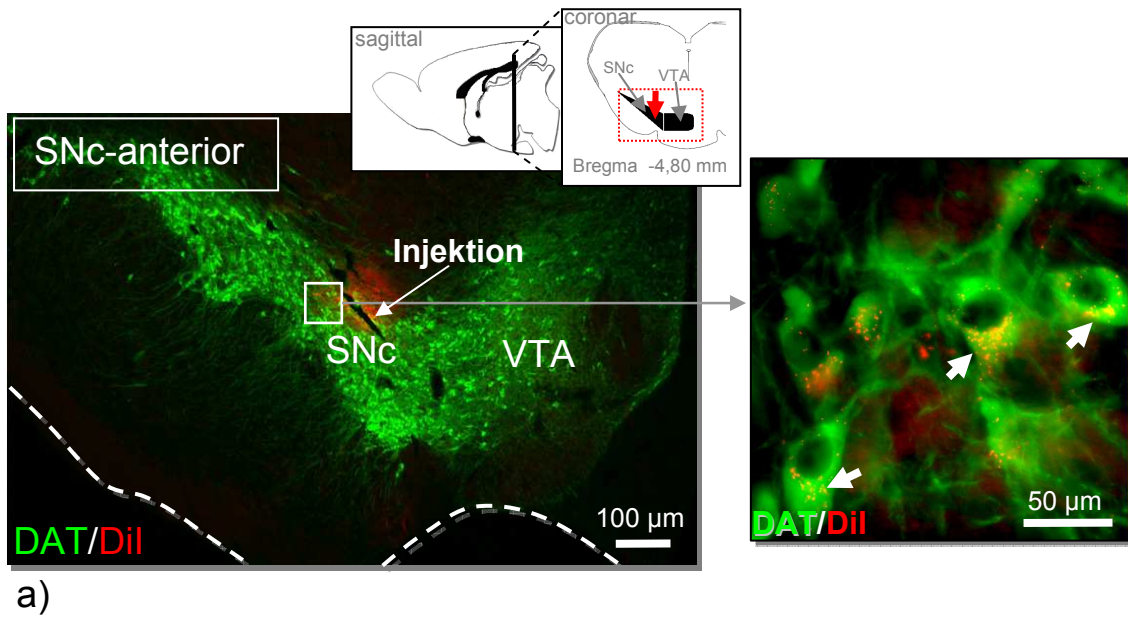
Nach Injektion in die intermediären (Sagittalebene) Bereiche der SNc im Mittelhirn konnten Dil-markierte Fasern ubiquitär in den verschiedenen Anteilen der SVZ nachgewiesen werden. Hierbei war die höchste Dichte an markierten Fasern in den intermediären (Sagittalebene) Anteilen der SVZ in der gesamten ventro-dorsalen Ausdehnung zu beobachten. Für die SGZ konnte wiederum kein Nachweis Dil-markierter Fasern erbracht werden.

Injektion in *posteriore* SNc

Nach Injektion in die posteriore SNc wurden markierte Fasern vornehmlich in den posterioren Anteilen der SVZ gesehen. Nach anterior nahm die Dichte der markierten Fasern stetig ab, so dass in den anterioren Anteilen der SVZ kein Nachweis markierter Fasern gelang. Im Bereich des Hippocampus konnten Dil-markierte Fasern nach Injektion in die posteriore SNc auch in den posterioren Anteilen der SGZ nachgewiesen werden.

Injektion in die *SNl*

siehe anterograde Tracing-Experimente an Nestin-GFP Mäusen und Abb. 12.



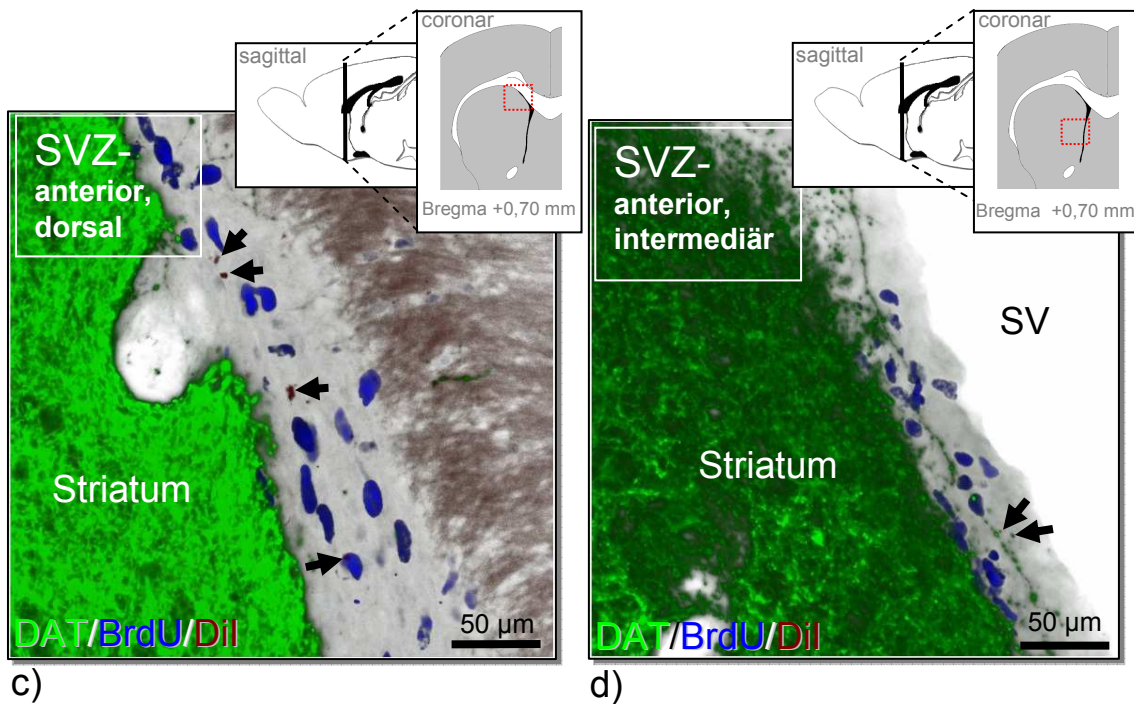


Abb. 9:

- a) Unilaterale Injektion von Dil (rot) in anteriore und intermediäre (Koronarebene) Anteile der SNc der Ratte mit Vergrößerung der Injektionsstelle (rechts). In der Vergrößerung rechts ist deutlich die Inkorporation des Tracers Dil (rote Partikel) in die DAT+ Zellen (grün) der SNc in unmittelbarer Nähe der Injektionsstelle (siehe weiße Pfeile) zu erkennen.
- b-d) Nach Ausbreitung des Tracers Dil zeigen sich Dil+ Fasern (rote Partikel in b) vornehmlich im Bereich der anterioren SVZ und im RMS (linkes Bild in b). In der Vergrößerung von b (rechts) sind deutlich die Dil-Partikel (rot) innerhalb des RMS in unmittelbarer Nähe zu den BrdU+ Vorläuferzellen (blau) zu erkennen (siehe weiße Pfeile).
Im Bereich der anterioren SVZ sind die Dil-Partikel (rot) in der Koronarebene über die gesamte Ausdehnung von den dorsalen Anteilen (siehe c), über die intermediären Anteile (siehe d) bis zu den ventralen Anteilen der SVZ nachweisbar. Auch hier zeigen sich die Dil-Partikel (rot) in unmittelbarer Nachbarschaft zu den BrdU+ Vorläuferzellen (blau) innerhalb der SVZ (siehe schwarze Pfeile in c und d).

Alle Bilder sind auf einem konfokalen Laserscan-Mikroskop aufgenommen.

c-d: 3-D Rekonstruktion

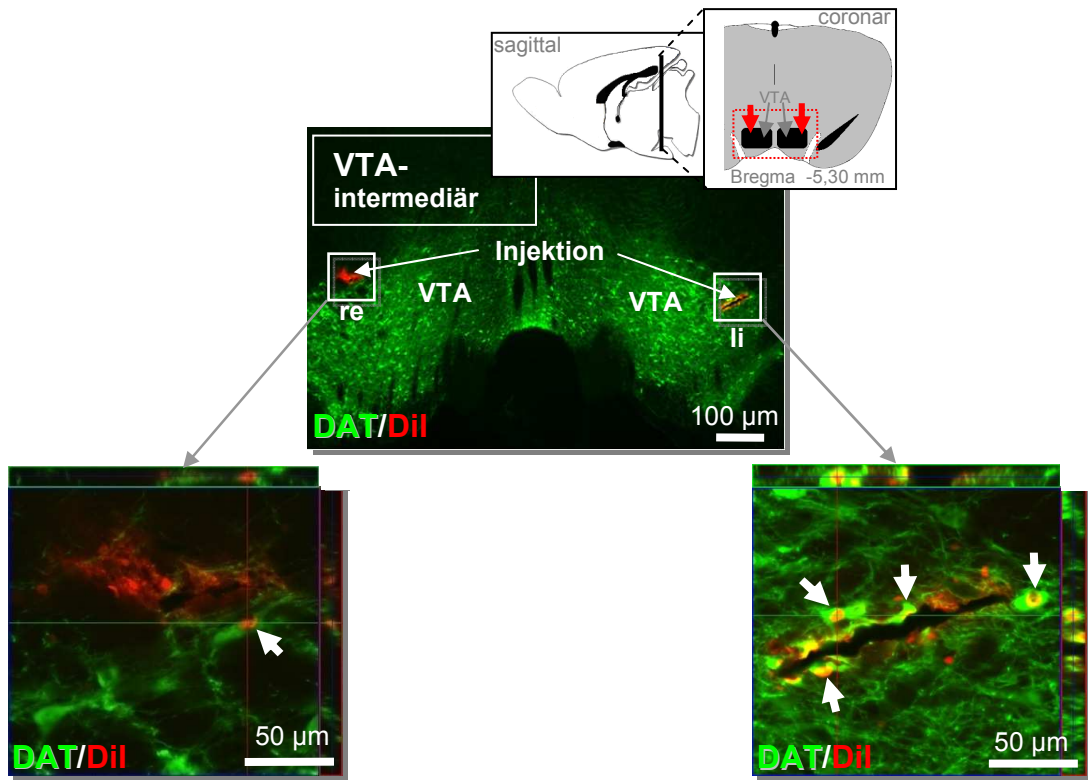
Abkürzungen: VTA: Ventrale tegmentale Area; SNc: Substantia nigra, pars compacta; SVZ: Subventrikuläre Zone; RMS: rostral migratorischer Strom

3.3.2 Anterogrades Tracing: Injektion in die VTA der Ratte

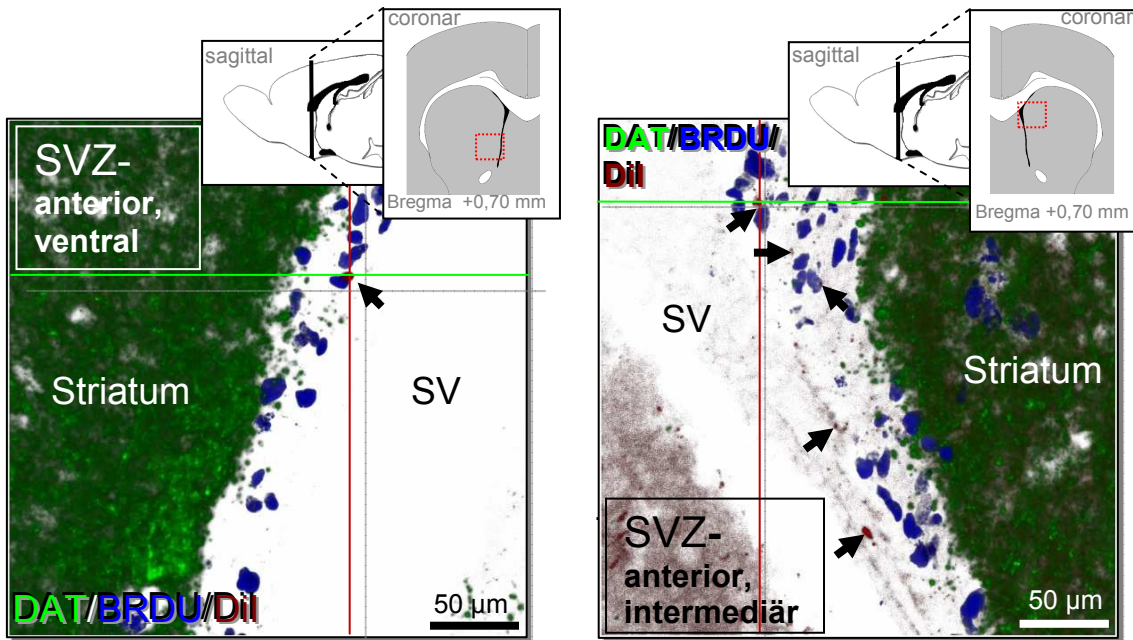
Insgesamt 3 Ratten wurde Dil mit Injektionsvolumina zwischen 40-100 nl in die verschiedenen Teilbereiche der VTA (Unterteilung in der Sagittalebene) injiziert. Bezüglich der Dil-markierten Fasern im Bereich der SVZ und SGZ ergab sich aus den anterograden Tracing-Experimenten nach Injektion in die VTA folgendes Muster:

Nach Injektion in die **anterioren**, **intermediären** (Sagittalebene) und **posterioren** Anteile der VTA konnten Dil-markierte Fasern jeweils in der gesamten SGZ nachgewiesen werden (siehe Abb. 10). Dabei wurde eine hohe Dichte an markierten Fasern in den anterioren Anteilen der SGZ nach Injektion in die anteriore VTA gefunden. Nach Injektion in die intermediären Anteile der VTA wurden markierte Fasern vor allem in den intermediären Anteilen der SGZ nachgewiesen, und nach Injektion in die posterioren Anteile der VTA wurde eine hohe Dichte markierter Fasern in der posterioren SGZ beobachtet.

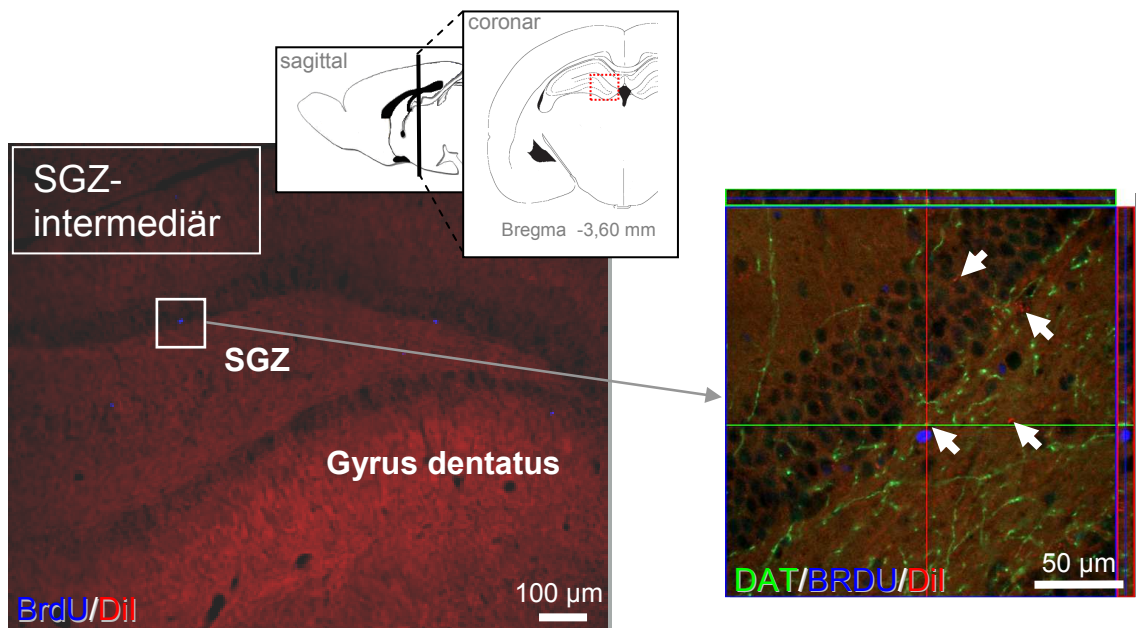
In der SVZ konnten Dil-markierte Fasern lediglich in den anterioren und ventralen Anteilen belegt werden, wobei diese Fasern nur nach Injektion in die anterioren und teilweise noch intermediären (Sagittalebene) Teilbereiche der VTA nachgewiesen werden konnten. In den intermediären (Sagittalebene) Anteilen der SVZ waren markierte Fasern nach Injektion in die VTA kaum nachweisbar und in den posterioren Anteilen der SVZ dann nicht mehr nachweisbar.



a)



b)



c)

Abb. 10:

- a) Bilaterale Injektion von Dil (rot) in intermediäre (Sagittalebene) Anteile der VTA der Ratte mit Vergrößerung der Injektionsstellen (unten links und rechts). Nach Injektion zeigt sich die Inkorporation des Tracers Dil (rot) in die DAT+ Zellen (grün, weiße Pfeile) der VTA im Bereich der Injektionsstellen.
- b) Nach Ausbreitung des Tracers Dil zeigen sich Dil+ Fasern (rote Partikel) vornehmlich im Bereich der anterioren SVZ. In der dorso-ventralen Ausdehnung sind die Dil-Partikel (rot) bevorzugt im ventralen (linkes Bild) und intermediären (Koronarebene, rechtes Bild) Bereich der SVZ in unmittelbarer Nachbarschaft zu den BrdU+ Vorläuferzellen (blau, schwarze Pfeile) nachzuweisen.
- c) Im Bereich des Gyrus dentatus sind die Dil-Partikel (rot) nach Ausbreitung des Tracers, vor allem in der intermediären (Sagittalebene) SGZ nachweisbar. Das linke Bild zeigt die Übersicht der intermediären (Sagittalebene) SGZ. Im rechten Bild sind deutlich die Dil-Partikel (rot) in unmittelbarer Nähe zu den BrdU+ Stammzellen der SGZ nachweisbar (siehe weiße Pfeile).

Alle Bilder sind auf einem konfokalen Laserscan-Mikroskop aufgenommen.

b: 3-D Rekonstruktion

Abkürzungen: VTA: Ventrale tegmentale Area; re: rechte Injektion; li: linke Injektion; SVZ: Subventrikuläre Zone; SV: Seitenventrikel; SGZ: Subgranuläre Zone

3.3.3 Anterogrades Tracing: Injektion in das RRF der Ratte

Einer Ratte wurde Dil mit einem Injektionsvolumen von 75 nl in das RRF injiziert. Trotz deutlicher Inkorporation von Dil in die dopaminergen Zellen innerhalb des RRF konnten keine Dil-markierten Nervenfasern in den unterschiedlichen Teilgebieten der SVZ oder SGZ nachgewiesen werden (siehe Abb. 11).

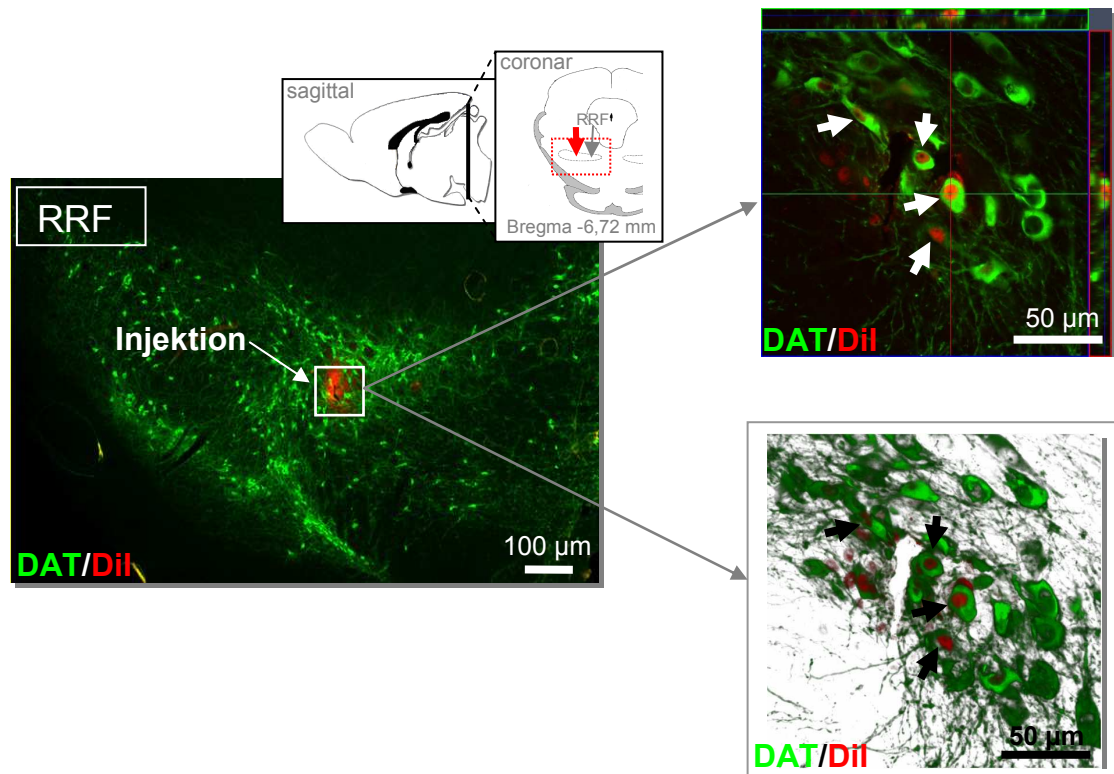


Abb. 11:

Unilaterale Injektion von Dil (rot) in das RRF der Ratte mit Vergrößerung der Injektionsstelle (rechts oben und unten). Nach Injektion zeigt sich in der Vergrößerung die Inkorporation des Tracers Dil (rote Partikel) in die DAT+ Zellen (grün) des RRF in unmittelbarer Nähe der Injektionsstelle (siehe weiße bzw. schwarze Pfeile).

Alle Bilder sind auf einem konfokalen Laserscan-Mikroskop aufgenommen.

rechts unten: 3-D Rekonstruktion

Abkürzungen: RRF: Retrorubrale Feld

3.4 Anterogrades Tracing: transgene Nestin-GFP Maus

Im zweiten Tiermodell, den transgenen Nestin-GFP Mäusen, wurde insgesamt 8 Mäusen der Tracer Dil mit einem Injektionsvolumen von 50nl in die verschiedenen Teilbereiche der **SNC** und **VTA** (Unterteilung in der Sagittal- und Koronarebene) entsprechend den anterograden Experimenten an Ratten injiziert (4 Mäuse SNC; 2 Mäuse SNI und 2 Mäuse VTA). Einschränkend muss gesagt werden, dass bei der Maus lediglich anterograde Tracing-Experimente durchgeführt wurden und keine vergleichbare Injektion in das RRF der Maus

gelingen ist. Die Ergebnisse der anterograden Tracing-Experimente des Rattenmodells konnten im Wesentlichen reproduziert werden. Es ergab sich auch im Mausmodell ein vergleichbarer Nachweis Dil-markierter Fasern in den verschiedenen Teilgebieten der SVZ und SGZ.

Ergänzend für beide Tiermodelle soll noch der Nachweis Dil-markierter Fasern nach Injektion in die SNI beschrieben werden (siehe Abb.12). Nach Injektion in die SNI sind insgesamt weniger Dil-markierte Fasern in SVZ und SGZ nachzuweisen als nach Injektion in die weiter medialen Anteile der SNc. Jedoch konnten Dil-markierte Fasern in den dorsalen Abschnitten der SVZ sowohl nach Injektion in die anterioren und intermediären (Sagittalebene) als auch nach Injektion in die posterioren Anteile der SNI nachgewiesen werden. Die höchste Dichte Dil-markierter Fasern konnte nach Injektion in die posteriore SNI in den postero-dorsalen Anteilen der SVZ beobachtet werden. In der SGZ konnten Dil-markierte Fasern lediglich nach Injektion in die posteriore SNI nachgewiesen werden.

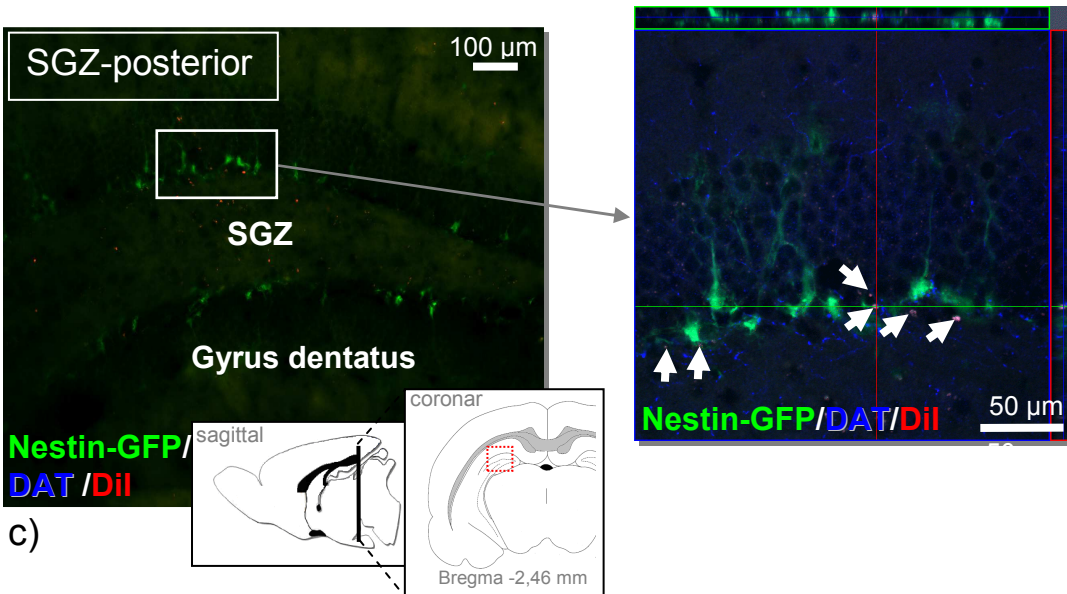
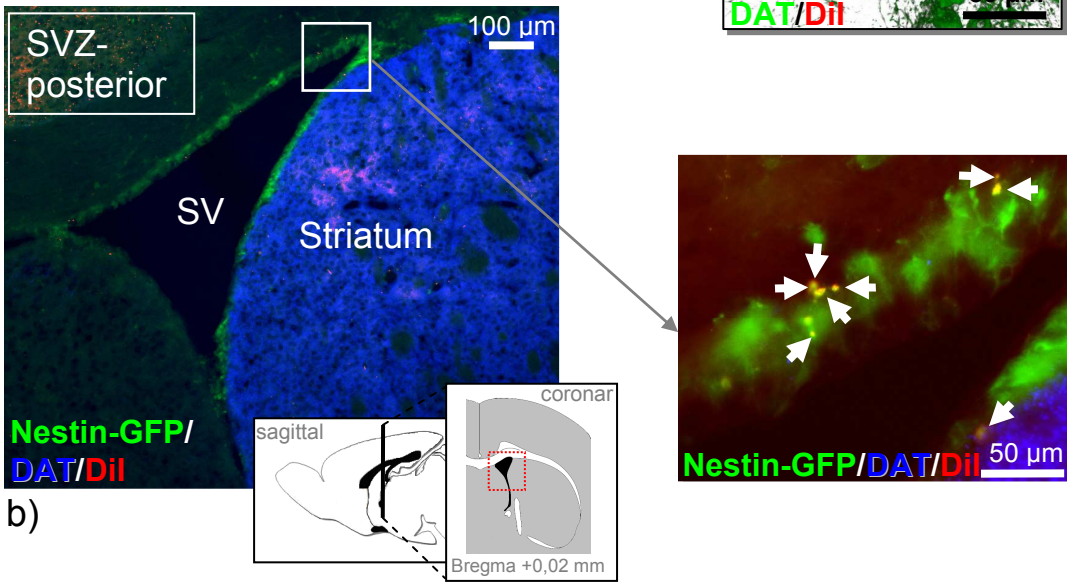
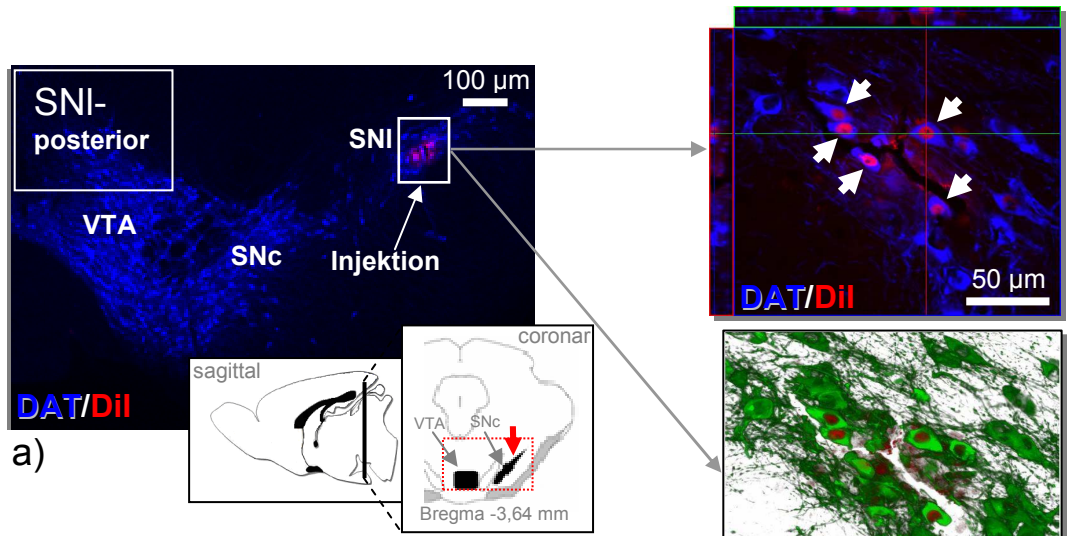


Abb. 12:

- a) Unilaterale Injektion von Dil (rot) in die posterioren Anteile der SNI bei einer transgenen Nestin-GFP Maus mit Vergrößerung und 3-D Rekonstruktion der Injektionsstelle (rechts oben und unten). In der Vergrößerungen rechts die Inkorporation des Tracers Dil (rot) in die DAT+ Zellen (grün) der SNI im Bereich der Injektionsstelle (siehe weiße bzw. schwarze Pfeile).
- b) Nach Ausbreitung des Tracers Dil zeigen sich Dil+ Fasern (rote Partikel) vornehmlich im Bereich der posterioren und dorsalen Anteile der SVZ. In der Vergrößerung (rechts) sind deutlich die Dil-Partikel (rot) innerhalb der dorsalen SVZ in unmittelbarer Nähe zu den Nestin-GFP+ Vorläuferzellen (grün) zu erkennen (siehe weiße Pfeile).
- c) Im Bereich des Gyrus dentatus sind nach Ausbreitung des Tracers ebenfalls Dil-Partikel (rot) vornehmlich in der posterioren SGZ nachweisbar. Das linke Bild zeigt die Übersicht der posterioren SGZ. Im rechten Bild sind deutlich die Dil-Partikel (rot) in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Nestin-GFP+ Vorläuferzellen (grün) der SGZ zu erkennen (siehe weiße Pfeile).

Alle Bilder sind auf einem konfokalen Laserscan-Mikroskop aufgenommen.

a: rechts unten: 3-D Rekonstruktion

Abkürzungen: VTA: Ventrale tegmentale Area; SNc: Substantia nigra, pars compacta; SNI: Substantia nigra, pars lateralis; SVZ: Subventrikuläre Zone; SV: Seitenventrikel; SGZ: Subgranuläre Zone

Ergänzend soll gesagt sein, dass in den anterograden Tracing-Experimenten keine die Mittellinie des Gehirns kreuzenden Fasern nachgewiesen werden konnten. In den jeweiligen Zielregionen der SVZ und SGZ waren die Dil-markierten Fasern nach Injektion in die SNc bzw. VTA ausschließlich ipsilateral nachweisbar. Die retrograden Experimente wurden entweder bilateral oder unilateral nach sagittaler Durchtrennung des Gehirns durchgeführt, so dass hier keine Aussage zu kreuzenden bzw. nicht-kreuzenden Fasern gemacht werden kann.

IV. Diskussion

Die Präsenz dopaminergere Fasern in unmittelbarer Nähe zu den Vorläuferzellen der SVZ und SGZ wurde 2004 erstmals beschrieben und wirft die Frage nach ihrem exakten Ursprung auf: „***The origin of the dopamine fibers terminating in the subependymal zone remains to be precisely determined...***“ (Höglinger et al., 2004). Die vorliegende Arbeit konnte erstmals den präzisen Ursprung der dopaminergere Fasern und eine topographisch-organisierte Innervation von SVZ und SGZ durch die dopaminergere Zellgruppen des Mittelhirns bei Nagetieren nachweisen.

4.1 Modell der dopaminergere meso-neurogenen Innervation

Ausgangspunkt für die Durchführung der vorliegenden Arbeit war die Beobachtung, dass der Neurotransmitter Dopamin einen regulativen Einfluss auf die Vorläuferzellpopulationen in den Zonen der adulten Neurogenese ausübt. Dopaminergere Fasern durchsetzen die SVZ und SGZ. Dabei bilden die Fasern Synapsen-ähnliche Strukturen mit den Typ C-Zellen innerhalb der SVZ, während im GD dopaminergere Nervenendigungen mit den subgranulären Vorläuferzellen in Verbindung stehen (Höglinger et al., 2004). Die Ergebnisse konnten für die SVZ auch im nicht menschlichen Primaten und im Menschen repliziert werden (Höglinger et al., 2004; Freundlieb et al., 2006). Die SGZ wurde in diesen Spezies nicht untersucht. Die Typ C-Zellen der SVZ exprimieren den dopaminergere D3-Rezeptor und bilden die primäre Zielstruktur für die dopaminergere Innervation innerhalb der SVZ (Coronas et al., 2004; Höglinger et al., 2004; van Kampen et al., 2004).

Als grundlegende Voraussetzung für eine anatomische Kartierung der dopaminergere Innervation von SVZ und SGZ sollte in der vorliegenden Arbeit

zu aller erst die **Existenz dopaminerges Fasern innerhalb der beiden neurogenen Zonen** bestätigend nachgewiesen werden. Als Resultat dieses ersten Versuchsteils konnten im Rahmen der hier beschriebenen Untersuchungen, äquivalent zu den publizierten Ergebnissen bei Primaten und bei Nagern (Höglinger et al., 2004; Freundlieb et al., 2006), Fasern von dopaminergen Zellen in unmittelbarer räumlicher Nähe zu den Vorläuferzellpopulationen der SVZ und SGZ nachgewiesen werden.

In einem zweiten Schritt sollte die präzise **Herkunft der dopaminergen Fasern** ermittelt werden. Im Falle der SVZ liegen die Vorläuferzellen in unmittelbarer Nachbarschaft zu dem angrenzenden Striatum. Das Striatum ist bekanntermaßen reichlich an dopaminergen Fasern primär aus der SNc und teilweise der VTA sowie dem RRF innerviert (Björklund & Dunnet, 2007). Der GD seinerseits erhält dopaminerge Afferenzen vornehmlich aus der VTA (Gasbarri et al., 1997). Aus den zunächst durchgeführten retrograden Tracing-Experimenten ergaben sich als Ursprungsgebiete der dopaminergen Fasern in SVZ und SGZ die dopaminergen Regionen des Mittelhirns SNc (A9) und VTA (A10). In dieser ersten Versuchsanordnung konnte eine direkte Faserverbindung zur SVZ und SGZ nachgewiesen und des Weiteren eine räumliche Organisation dieser Faserverbindung demonstriert werden. In repräsentativen Hirnschnitten der übrigen dopaminergen Zellgruppen des Diencephalons (A8, A11-A15) konnten im Rahmen der retrograden Tracing-Experimente entsprechend unserer Vorannahmen keine Faserverbindungen zu SVZ und SGZ gefunden werden.

In der dritten Versuchsreihe sollten nun die identifizierten Verbindungen von den Zellgruppen A9 und A10 zu den Zonen der Neurogenese durch anterograde Tracing-Experimente bei Ratten erneut nachgewiesen werden. Zum ersten sollten hierdurch die Ergebnisse der retrograden Versuche zur axonalen Konnektion der Neurogenese Zonen bestätigt werden, zum zweiten sollte auf diese Weise die Projektion in unmittelbare Nachbarschaft der Vorläuferzellen nachgewiesen werden, und zum dritten sollte hiermit eine umfassendere Aussage zur Dichte und Verteilung der Faserprojektionen gemacht werden. Mit Hilfe der anterograden Tracing-Versuche konnten die Ergebnisse der retrograden Experimente in der Tat bewahrheitet werden. Die

dopaminergen Zellgruppen im Mittelhirn zeigen eine direkte, räumlich-organisierte Faserverbindung zu den Vorläuferzellen in SVZ und SGZ.

Abschließend sollten analoge anterograde Tracing-Experimente bei transgenen Mäusen durchgeführt werden. Durch dieses zweite Tiermodell sollten die Ergebnisse des Rattenmodells auch in einer weiteren Spezies reproduziert werden. Die Expression von Nestin-GFP in den transgenen Mäusen bietet dabei ein korrespondierendes Modell zur Analyse der Proliferationsrate zu einem bestimmten Zeitpunkt, wie bei den Ratten durch die BrdU-Injektion verwirklicht. Die Experimente wurden analog den anterograden Tracing-Experimenten im Rattenmodell durchgeführt und ausgewertet. Die Versuche im Mäusemodell lieferten übereinstimmende Ergebnisse zu den anterograden Versuchen bei Ratten. Es zeigte sich eine entsprechende räumlich-organisierte anterograde Faserverbindung zur SVZ und SGZ.

Für die anterograde Innervation der SVZ konnten Freundlieb et al. auch vergleichbare Resultate beim Primaten vorlegen (Freundlieb et al., 2006). Sie konnten eine topographisch-organisierte Projektion von der SNc zur SVZ nachweisen. Dabei wurde Hypothesen-basiert drei Affen der anterograde Tracer BDA (Biotin Dextran Amin) in die antero-mediale und postero-laterale SNc und in das RRF injiziert. Es zeigte sich eine räumliche Organisation mit Faserverbindungen von der antero-medialen SNc zur antero-ventralen SVZ und der postero-lateralen SNc zur postero-dorsalen SVZ. Vom RRF entspringend, konnte keine Innervation der SVZ nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen der hier durchgeführten anterograden Tracing-Experimente für die SNc und das RRF sowohl bei Ratten als auch bei Mäusen. Einschränkend wurden in den Versuchen beim Primaten keine retrograden Untersuchungen der Faserverbindungen zur SVZ realisiert, so dass eine eventuell zusätzliche Innervation aus anderen dopaminergen Zellgruppen nicht beurteilt werden konnte. Auch wurden die Verbindungen der VTA zur SVZ von Freundlieb et al. nicht untersucht und es erfolgten keine Untersuchungen zu den dopaminergen Verbindungen zur SGZ. Abgesehen davon zeigen sich aber bei Freundlieb et al. in Bezug auf die Topographie der anterograden Innervation von der SNc zur SVZ analoge Ergebnisse im Primatenmodell, wie

hier durch ausführlichere und systematischere Untersuchungen im Nagermodell beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit über die Ergebnisse von Freundlieb et al. hinausgehend zusätzlich:

1. eine Verbindung der VTA in Teile der SVZ aufgezeigt werden,
2. eine detaillierte Kartographie der Verbindungen von VTA und SNc in die SGZ erstellt werden und
3. Verbindungen von A8 sowie A11-A15 in die SVZ und SGZ ausgeschlossen werden.

Aus den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten anterograden und retrograden Tracing-Experimenten kann somit ein räumlich-topographisches Modell zur dopaminergen meso-neurogenen Verbindung abgeleitet werden, welches im Folgenden zusammengefasst wird. Dabei ist zu beachten, dass die Faserverbindungen zwar weitgehend, aber nicht absolut streng der unten aufgeführten anatomischen Einteilung und Begrenzung folgen, da verzweigende Faseräste vereinzelt auch benachbarte Gebiete infiltrieren und sich somit an deren Innervation beteiligen können:

Die dopaminerge Innervation der SVZ

Die dopaminerge Innervation der SVZ lässt sich grundsätzlich in 2 Ebenen darstellen, in der Sagittalebene mit anterior-posteriorer Ausdehnung und in der Koronarebene mit ventro-dorsaler Ausdehnung.

Der **SNc** kommt bei der Innervation der SVZ die größte Bedeutung zu:

- In der **Sagittalebene** zeigt sich eine parallele Projektion von der anterioren SNc zur anterioren SVZ und dem RMS, von der intermediären SNc zur intermediären SVZ und von der posterioren SNc zur posterioren SVZ. Dabei reichen die Fasern aus der anterioren SNc auch noch teilweise in die intermediäre SVZ und nehmen dann nach posterior stetig ab. Umgekehrt zeigt sich für die posteriore SNc eine reiche Innervation der posterioren SVZ-Anteile mit deutlicher Abnahme nach anterior.

- in der **Koronarebene** zeigt sich ein ähnliches topographisches Muster. Die medialen Anteile der SNc innervieren bevorzugt die ventralen Anteile der SVZ und den RMS, die laterale SNc (SNI) innerviert akzentuiert die dorsalen Anteile der SVZ. Auch hier reichen Fasern der medialen SNc in den intermediären (Koronarebene) Bereich der SVZ und fehlen dann zunehmend im dorsalen Bereich. Spiegelbildliches gilt für die SNI.

Im antero-ventralen Anteil der SVZ, in dem Vorläuferzellen sowohl im lateralen als auch medialen Abschnitt der Seitenventrikel lokalisiert sind, zeigt sich eine zusätzliche Innervation durch anteriore und teilweise auch noch intermediäre (Sagittalebene) Bereiche der **VTA**. Nach weiter posterior nimmt dann die Innervation der ventralen Anteile der SVZ durch die VTA beständig ab. Der postero-dorsale Anteil der SVZ ist dann, übereinstimmend mit den Ergebnissen beim Primaten (Freundlieb et al., 2006), nahezu ausschließlich von der posterioren SNI innerviert. Für das RRF konnte keine Faser Verbindung zur SVZ nachgewiesen werden.

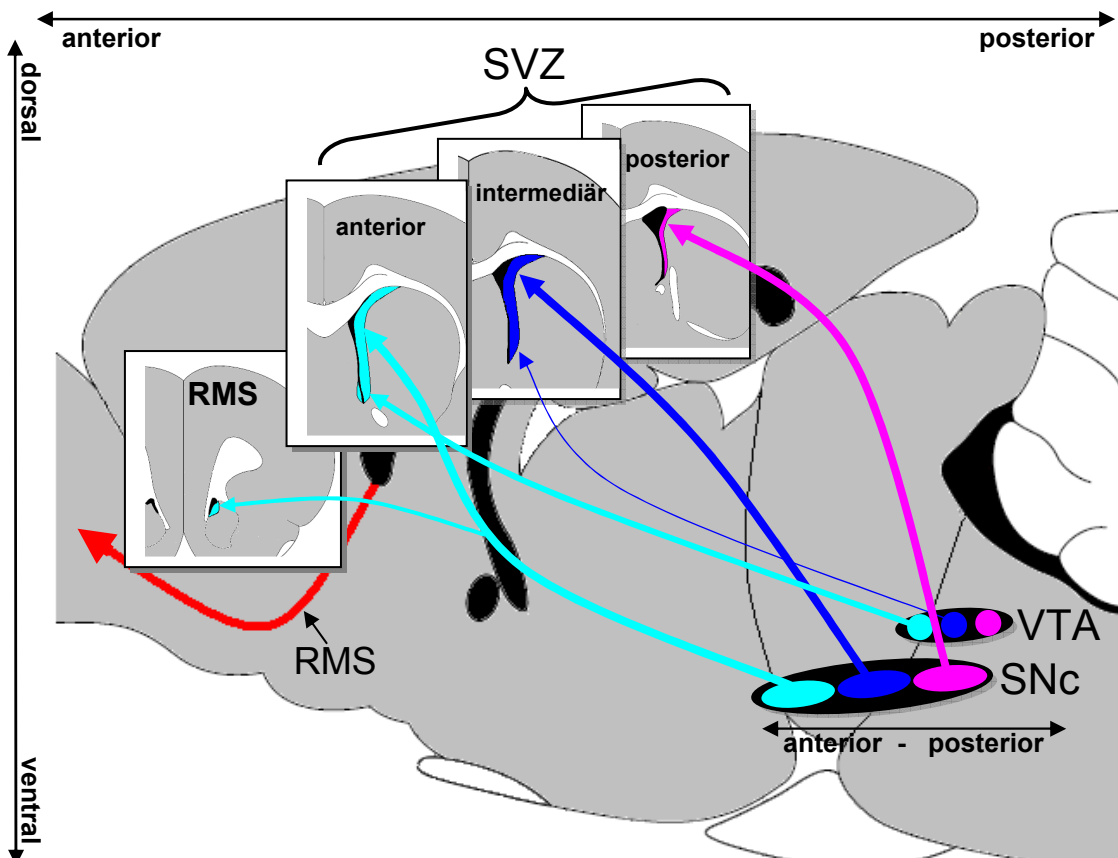


Abb. 13:

Schema der topographischen Organisation der dopaminergen meso-subventrikulären Innervation im Sagittalschnitt

Die anterioren Anteile der SNc projizieren vornehmlich zu den anterioren Anteilen der SVZ und zum RMS (türkis), die intermediären Anteile der SNc zu den intermediären Anteilen der SVZ (blau) und die posterioren Anteil in erster Linie zu den posterioren Anteilen der SVZ (rosa).

Für die VTA konnte eine Beteiligung an der Innervation der SVZ für die anterioren und intermediären Anteile, aber jeweils nur zu den ventralen Anteilen der SVZ belegt werden. Der anteriore Anteil der VTA innerviert hierbei bevorzugt auch den anterioren Anteil der SVZ. Gleiches gilt für den intermediären Anteil der VTA.

Dickere Pfeile im Schema repräsentieren quantitativ bedeutsamere axonale Verbindungen als dünnere Linien.

Abkürzungen: RMS: rostral migratorischer Strom; SNc: Substantia nigra, pars compacta; SVZ: Subventrikuläre Zone; VTA: Ventrale tegmentale Area

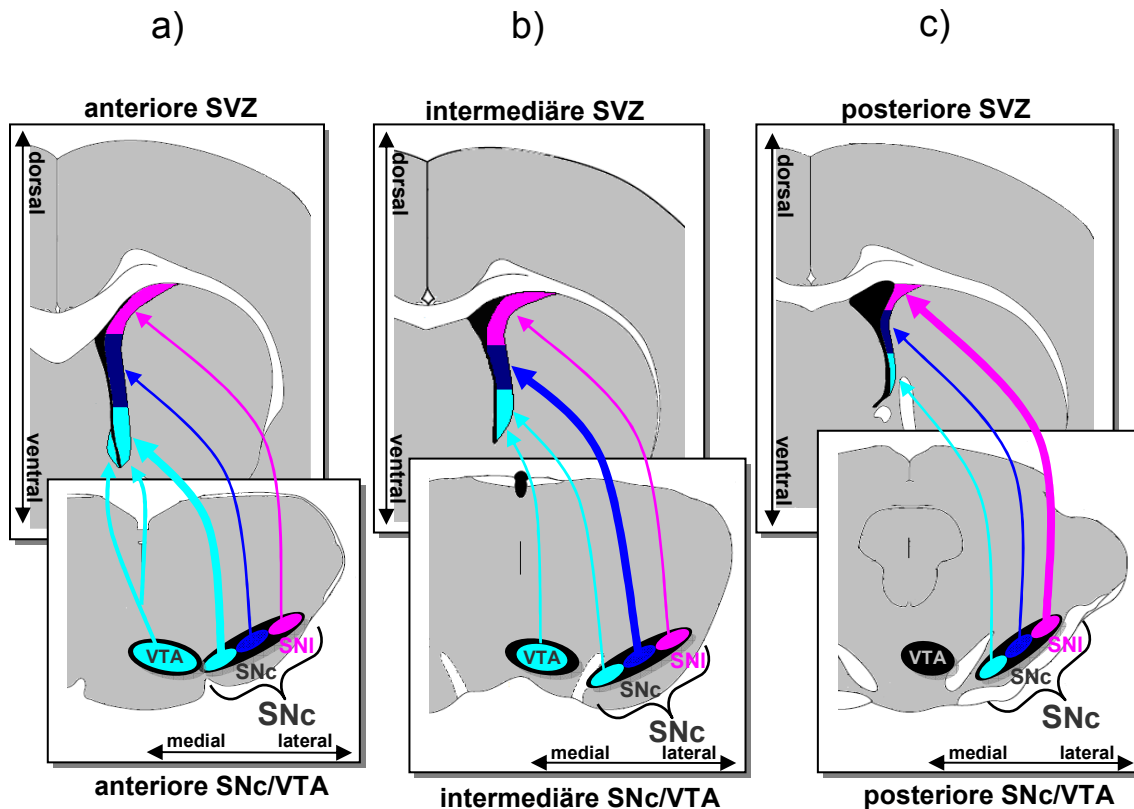


Abb. 14:

Schema der topographischen Organisation der dopaminergen meso-subventrikulären Innervation der SVZ im Koronarschnitt

a) In den anterioren Anteilen der SNc projizieren die medial gelegenen Zellen zu den ventralen Anteilen der anterioren SVZ (türkis) und zum RMS (nicht abgebildet), die intermediär gelegenen Zellen zu den intermediären Anteilen der anterioren SVZ (blau) und die lateralen gelegenen Zellen der anterioren SNc (SNI) vornehmlich zu den dorsalen Anteilen der anterioren SVZ (rosa). Der anteriore Anteil der VTA projiziert bevorzugt zu den ventralen Anteil der anterioren SVZ, wobei hier auch die Vorläuferzellen im Bereich der medialen Wand des Seitenventrikels nahe des Ncl. accumbens erreicht werden.

- b) Für die intermediären (Sagittalebene) Anteile der SNc und VTA konnte eine analoge Innervation aufgezeigt werden. Die medialen Anteile der SNc projizieren bevorzugt zu den ventralen Anteilen der SVZ (türkis), die intermediären Anteile der SNc zu den intermediären Anteilen der SVZ (blau) und die lateralen Anteile der SNc (SNI) zu den dorsalen Anteilen der SVZ (rosa). Die VTA zeigt im Bereich der intermediären Anteile des Mittelhirns lediglich eine geringe Innervation der ventralen Anteile der SVZ. Der RMS wird von der intermediären (Sagittalebene) SNc nicht mehr erreicht.
- c) Im Bereich der posterioren Anteile der SNc zeigt sich eine ähnliche Topographie im Vergleich zu den anterioren und intermediären (Sagittalebene) Anteilen der SNc, wobei die dorsalen Anteile der SVZ nahezu ausschließlich von der SNI innerviert werden. Für die posterioren Anteile der VTA konnte keine Innervation der SVZ nachgewiesen werden.

Dickere Pfeile im Schema repräsentieren quantitativ bedeutsamere axonale Verbindungen als dünnere Linien.

Abkürzungen: SNc: Substantia nigra, pars compacta; SNI: SNc, pars lateralis; SVZ: Subventrikuläre Zone; VTA: Ventrale tegmentale Area

Die dopaminerge Innervation der SGZ

Die dopaminerge Innervation der SGZ entspringt maßgeblich aus der **VTA**. Anatomisch sind die anterioren und intermediären (Sagittalebene) Anteile der SGZ im septalen Hippocampus lokalisiert, während die posteriore SGZ dem temporalen Hippocampus zugeordnet wird. Unsere Untersuchungen zeigen, dass die anteriore VTA auf die anteriore SGZ projiziert, die intermediäre VTA auf die intermediäre (Sagittalebene) SGZ und die posteriore VTA auf die posterioren (Sagittalebene) Anteile der SGZ. Ähnlich wie bei der SVZ ist diese Unterteilung anatomisch nicht absolut stringent, so dass Fasern der anterioren VTA auch in den intermediären (Sagittalebene) Bereich der SGZ projizieren, nach posterior aber deutlich weniger werden. Umgekehrt innervieren Teile der posterioren VTA teilweise auch weiter anterior liegende Anteile der SGZ. Der posteriore Teil der SGZ im temporalen Hippocampus erhält ebenfalls eine Anzahl von dopaminergen Fasern aus der posterioren **SNc** einschließlich lateraler Anteile (**SNI**).

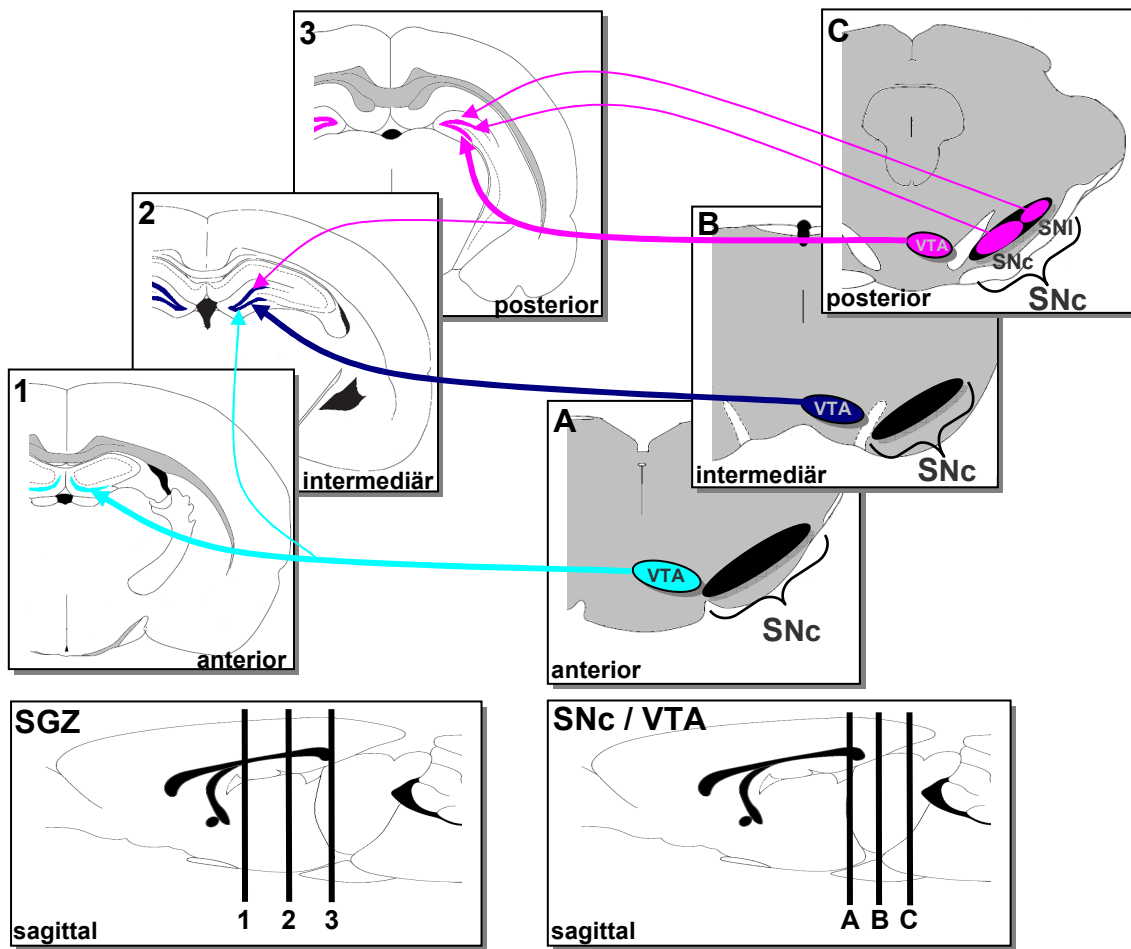


Abb. 15:
Schema der topographischen Organisation der dopaminergen meso-subgranulären Innervation der SGZ im Sagittalschnitt und Koronarschnitt

Die Sagittalschnitte unten im Bild zeigen die Lokalisation der darüber dargestellten Koronarschnitte durch den Hippocampus (1-3) bzw. durch das Mittelhirn (A-C).

Die anterioren Anteile der SGZ (Bild 1) werden vornehmlich aus den anterioren Anteilen der VTA (Bild A) innerviert (türkis); die intermediären (Sagittalebene) Anteile der SGZ (Bild 2) von den intermediären (Sagittalebene) Anteilen der VTA (Bild B) (blau); die posteriore Anteil der SGZ (Bild 3) in erster Linie durch die posteriore Anteilen der VTA (Bild C) (rosa). Zusätzlich wurde in der posteriore SGZ auch eine moderate Innervation aus der posteriore SNc einschließlich lateraler Anteile (SNI) (Bild C) nachgewiesen.

Dickere Pfeile im Schema repräsentieren quantitativ bedeutsamere axonale Verbindungen als dünnere Linien.

Abkürzungen: SGZ: Subgranuläre Zone; SNc: Substantia nigra, pars compacta; SNI: SNc, pars lateralis; VTA: Ventrale tegmentale Area;

Vergleich meso-neurogenes und meso-telencephales Modell

In einem nächsten Schritt wurde der Frage nachgegangen, ob die in dieser Arbeit aufgezeigte Topographie der meso-neurogenen Innervation auch mit der bekannten dopaminergen meso-striatalen bzw. meso-hippocampalen Innervation übereinstimmt oder sich von ihr unterscheidet. Zu diesem Zwecke soll vorangehend eine ausführlichere Beschreibung der dopaminergen meso-telencephalen Projektionen erläutert werden. Das in der Einleitung vorgestellte Modell mit meso-striatalem, meso- limbischem und meso-kortikalem System stellt eine Vereinfachung dar und bedarf hier einer genaueren Darstellung:

Fallon und Moore untersuchten 1978, unter Verwendung von anterograden und retrograden Tracing-Methoden, detailliert die topographische Organisation der meso-telencephalen Projektionen in Nagetieren (Fallon & Moore, 1978). Sie wiesen eine Unterteilung in 3 Ebenen (medial-lateral, anterior-posterior, ventral-dorsal) nach. Für die erste und zweite Ebene konnten sie eine analoge Projektion aufzeigen. So innervieren die medialen Anteile der SNc und VTA entsprechend die medialen Anteile des Telencephalons und damit auch des Striatums, wohingegen die laterale VTA und SNc das laterale und dorsale Striatum innervieren. Übereinstimmend stellt sich eine bevorzugte Projektion der anterioren VTA und SNc Anteile auf die anterioren Bereiche des Großhirns, bei analogen Projektionen der posterioren VTA und SNc Anteile auf die posterioren Bereiche dar. Die dritte Ebene mit dorso-ventraler Organisation projiziert jedoch entgegengesetzt: Die dorsale Lage wird durch das RRF und Neurone, die im dorsalem Aspekt (Koronarebene) der VTA und SNc lokalisiert sind repräsentiert und projiziert bevorzugt in die ventralen striatalen, limbischen und kortikalen Areale (Francois et al., 1999; Bentivoglio & Morelli, 2005; Björklund & Dunnet, 2007). Die ventrale Lage hingegen besteht aus dem ventralen Aspekt der SNc und teilweise ventralen VTA mit Verbindungen, wahrscheinlich ausschließlich, zum dorsalen, senso-motorischen Striatum. Dieser Teil des Striatums repräsentiert den größten Teil der Grenzzone zwischen Striatum und SVZ. Durch die Unterteilung in eine ventrale und eine dorsale Ebene kann gleichsinnig eine Unterscheidung zwischen meso-striataler und meso-kortikaler Projektion getroffen werden, wobei die meso-striatale Projektion eine deutlichere medial-laterale und anterior-posteriore Ausrichtung zeigt (Fallon, 1988).

Eine Studie im Primaten, die sich ausschließlich mit der Innervation der ventralen Anteile des Striatums beschäftigte, konnte nachweisen, dass VTA und SNc gemeinsam an der Innervation beteiligt sind (Lynd-Balta & Haber, 1994). Eine Ausnahme stellte der ventro-mediale Bereich mit dem Nucleus accumbens dar, der primär von der VTA und in geringerem Maß auch von Anteilen der medialen SNc innerviert ist. Der Ncl. accumbens wird als Teil des limbischen Systems bzw. der meso-limbischen Projektionen gesehen und stellt ein Belohnungssystem dar, in dem Affekt und Antrieb reguliert werden. Dieser Bereich umgibt sowohl medial als auch lateral den antero-ventralen Anteil der Seitenventrikel und grenzt hier an die SVZ. Die **bevorzugte Innervation des ventro-medialen Striatums durch die VTA** konnte auch für die Ratte nachgewiesen werden (Fallon & Moore, 1978; Swanson, 1982; Phillipson & Griffiths, 1985).

Betrachtet man die dopaminergen Zellgruppen im Einzelnen, bedeutet dies, dass die SNc neben den ins Striatum projizierenden Neuronen ebenfalls Nervenzellen, die kortikale und limbische Areale innervieren, beinhaltet. Die VTA projiziert bei Ratten zusätzlich in Anteile des ventralen Striatums unter Einbeziehung der antero-medialen Anteile mit dem Ncl. accumbens. Die Zellgruppe A8 des RRF projiziert sowohl in striatale (ventro-medial), limbische und kortikale Areale. Hierbei ist von Bedeutung, dass die drei oben genannten Systeme (meso-striatales, meso-kortikales und meso-limbisches System) sowohl anatomisch als auch funktionell noch zu unterscheiden sind, jedoch ihr Ursprung vor allem in dem VTA-SNc-Komplex vermischt ist. Zusammenfassend ist also festzustellen, dass auf der einen Seite die striatale, dopaminerge Innervation nicht ausschließlich aus der SNc entspringt, sondern auch Anteile der VTA und des RRF aufweist. Zum anderen sind die Neurone, die in limbische und kortikale Areale projizieren, nicht ausschließlich der VTA zugehörig, sondern zusätzlich in der dorsalen Zelllage der SNc und wiederum Zellen des RRF zu finden. Das nigro-striatale System setzt sich somit aus Neuronen vor allem der ventralen, teilweise auch dorsalen Lage der SNc zusammen und bildet damit in erster Linie den Ursprung für die Innervation des senso-motorischen Striatums. Hingegen erhalten die antero-medialen und ventralen Anteile des Striatums, also die "limbischen" Areale des Striatums, mit dem anterior gelegenen Ncl. accumbens und dem zentralen Nucleus der

Amygdala ihre Innervation aus einem größeren Gebiet, mit Anteilen der VTA und dem RRF (Björklund & Dunnet, 2007).

Der Hippocampus kann in einen septalen, anterioren Anteil und einen temporalen, weiter posterioren Anteil gegliedert werden. Dabei sind die anterioren und mittleren Anteile der SGZ im GD eher im septalen Hippocampus lokalisiert, während die posteriore SGZ eher dem temporalen Hippocampus zugeordnet werden kann. Der dopaminergen Innervation des Hippocampus wird dabei auch eine topographische Organisation zugewiesen. So sind die dopaminergen Afferenzen der VTA vorrangig im ventralen Aspekt des temporalen Hippocampus, also Subiculum und CA1-Region, aber auch im GD zu finden. Die septalen Anteile des Hippocampus mit GD sind ebenfalls aus der VTA innerviert. Dopaminerge Afferenzen aus der medialen SNc und dem RRF projizieren vornehmlich in den ventralen, temporalen Anteil des Hippocampus, mäßig auch in den GD des temporalen Hippocampus und nur gering in den septalen Hippocampus (Gasbarri et al., 1996; Gasbarri et al., 1997). Es soll darauf hingewiesen sein, dass die VTA auch noch andere monoaminerge Zellgruppen enthält (Fields et al., 2007). Dabei wird der Anteil der dopaminergen Projektionen aus VTA und SNc auf 10-18% des Gesamtanteils der meso-hippocampalen Projektionen geschätzt (Gasbarri et al., 1994).

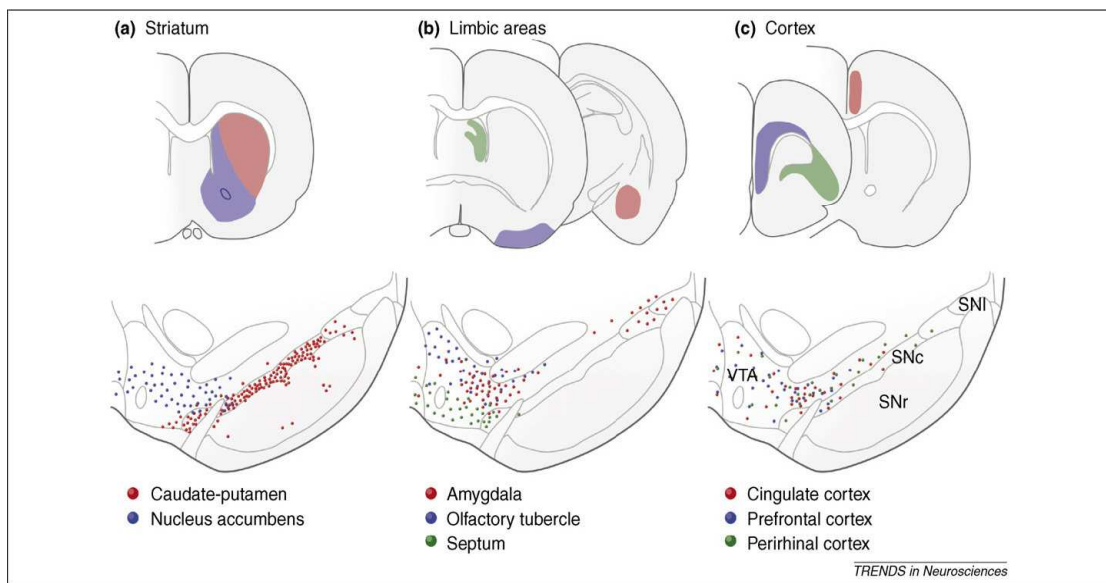


Abb. 16 :**Ursprung der meso-striatal, meso-limbischen and meso-kortikalen Projektionen in der Ratte**

Die dopaminergen Neurone mit Verbindungen zu den (a) striatalen, (b) limbischen and (c) kortikalen Arealen sind teilweise gemischt. Die Zellen der ventralen Zelllage der SNc (rote Punkte in a) projizieren vermutlich ausschließlich in den senso-motorischen Anteil des Striatums angrenzend an die SVZ (roter Bereich oberhalb), wohingegen die dorsale Zelllage aus Neuronen besteht, die in ein größeres Gebiet mit limbischen und kortikalen Anteilen projiziert. Die Zellen der VTA (blaue Punkte in a) projizieren u.a. in den Ncl. accumbens und in den ventro-medialen Bereich des Striatums, ebenfalls angrenzend an die SVZ.

Abkürzungen: SNc: substantia nigra, pars compacta; SNI: Snc, pars lateralis; SNr: substantia nigra, pars reticulata; VTA: ventral tegmental area

(aus Björklund & Dunnet, 2007)

In der vorliegenden Arbeit weisen die dopaminergen Projektionen in SVZ und SGZ strukturelle Ähnlichkeiten zu der dopaminergen Innervation der unmittelbar benachbarten Gebiete auf. **Für die SVZ konnte entsprechend der Innervation des Striatums eine analoge Innervation in zwei Ebenen nachgewiesen werden.** Die ventrale Zelllage der SNc und teilweise auch VTA innerviert den Großteil der die SVZ direkt angrenzenden Bereiche des Striatums. Zwar wurde in den vorliegenden Experimenten nicht zusätzlich zwischen einer ventralen und dorsalen Zelllage der SNc oder auch VTA unterschieden, jedoch konnte auch hier eine primäre Innervation der SVZ durch die SNc, mit geringeren Anteilen durch die VTA, nachgewiesen werden. **Eine Ausnahme bildete der anteriore, ventrale und zum Teil mediale (ventro-mediale) Teil der SVZ.** Korrespondierend zu den Faserverbindungen zum benachbartem ventralen Striatum und dem Ncl. accumbens konnte in diesem Bereich der SVZ eine intensive dopaminerge Innervation durch die VTA aufgezeigt werden.

Im Falle des Hippocampus sind die septalen Anteile mit anteriorem und intermediärem GD primär dopaminerg durch die VTA innerviert. Erst weiter posterior im temporalen Hippocampus, entsprechend dem posterioren GD, nehmen an der Innervation auch Fasern aus der medialen SNc und dem RRF teil. **Eine überwiegend analoge Innervation konnte in dieser Arbeit auch im Speziellen für die SGZ belegt werden.** Jedoch wurden zudem dopaminerge Fasern aus den lateralen Anteilen der SNc, entsprechend der SNI in der posterioren SGZ und somit im temporalen Hippocampus beobachtet. Für das

RRF konnte hingegen keine Innervation der gesamten SGZ nachgewiesen werden.

Es ist vorstellbar, dass die Axone, die in der SNc und teilweise auch VTA entspringen und im Striatum bzw. in den übrigen die SVZ begrenzenden Gebiete terminieren, zu einem unbestimmten Zeitpunkt der ontogenetischen Entwicklung in gleicher topographischer Gliederung aus dem Striatum und den übrigen Gebieten in die SVZ aussprossen. Gleiches mag für die SGZ gelten, wenn auch die dopaminerge Innervation des Hippocampus bei weitem nicht so dicht ist wie die des Striatums. Auch hier ist anzunehmen, dass die Nervenfasern aus VTA und den anderen dopaminergen, mesencephalen Gebieten, die regulär in den GD projizieren, während der Entwicklung bis zu den subgranulären Vorläuferzellen aussprossen.

Die dopaminergen Axone aus SNc und VTA wachsen bei der Ratte während der embryonalen Entwicklung über das mediale Vorderhirnbündel nach ventrolateral und erreichen das Striatum am 17. Tag *post conceptionem* (Van der Heuvel & Pasterkamp, 2008). Am 19. Tag *post conceptionem* ist dann das gesamte Striatum reich durch dopaminerge Fasern innerviert, wobei die lateralen Anteile bevorzugt sind. Ab dem 20. Tag erreichen die Fasern dann auch die weiter medial liegenden Anteile des Striatums nahe der Seitenventrikel und somit auch die subventrikuläre Zone der lateralen ganglionären Eminenz. Während der ersten postnatalen Woche nimmt die Innervation dieser striatalen Region, die dem Seitenventrikel anliegt, nochmals zu. Dabei scheint die topographisch organisierte Innervation der meso-striatalen und meso- limbischen Projektionen in einen ventralen und dorsalen Anteil, wie beim Erwachsenen nachgewiesen, erst in der späten embryonalen bzw. frühen postnatalen Entwicklung ausgebildet zu werden. Dies geschieht vermutlich durch eine selektive Eliminierung von Axonkollateralen aus VTA oder SNc, die in ventrale bzw. dorsale Anteile terminieren (Hu et al., 2004; Van der Heuvel & Pasterkamp, 2008). Für die Maus konnten dopaminerge Fasern bereits am 13. Tag *post conceptionem* im Bereich der lateralen ganglionären Eminenz nahe sich teilender Zellen nachgewiesen werden (Ohtani et al., 2003). Aus dem subventrikulären Bereich der lateralen ganglionären Eminenz entlang der Seitenventrikel geht später die SVZ hervor. Obwohl einige Studien die Präsenz

dopaminerg, mesencephaler Fasern während der embryonalen Entwicklung auch im Hippocampus erwähnen, ist bisher wenig über ihre genaue Ontogenese bekannt (Jaumotte & Zigmond, 2005; Van der Heuvel & Pasterkamp, 2008).

Neben den dopaminergen Fasern sind auch Dopaminrezeptoren schon früh in der embryonalen Entwicklung (D₃-Rezeptor ab dem 14 Tag *post conceptionem*) in der hoch-proliferativen lateralen ganglionären Eminenz nachzuweisen und zeigen einen regulativen Einfluß auf die Proliferation der Stammzellen (Diaz et al., 1997; Ohtani et al., 2003). Die Grundlagen für eine dopaminerge Regulation der Neurogenese scheinen somit bereits während der embryonalen Entwicklung geschaffen zu werden (Ohtani et al., 2003) und bilden die Voraussetzung für eine fortwährende Persistenz der dopaminergen Kontrolle auch für die adulte Neurogenese (Höglinger et al., 2004).

4.2 Heterogenität der SVZ

Wie in der Einleitung beschrieben wurde, konnte eine Reihe von Studien einen proliferationssteigernden Effekt von Dopamin auf die Stammzellen der SVZ und SGZ nachweisen (Borta & Höglinger, 2007). Dabei wurden regionale Unterschiede innerhalb der SVZ beobachtet. In dem folgenden Abschnitt sollen nun die beobachteten Unterschiede innerhalb der SVZ mit der hier dargestellten räumlich-topographischen dopaminergen Innervation in Beziehung gesetzt werden.

Experimentelle dopaminerge Denervierung durch MPTP- oder 6-OHDA-Intoxikationsmodelle führte wiederholt zu einer wesentlichen Reduzierung der Vorläuferzellproliferation um 30-45% bei Mäusen, Ratten und Primaten (Borta & Höglinger, 2007). Diese Modelle zeigen jedoch auf Grund der unterschiedlichen Vulnerabilität der mesencephalen, dopaminergen Neurone eine heterogene striatale Denervierung. Während in dem MPTP-Modell der Zellverlust in der lateralen SNc (SNI) nahezu vollständig ist, weisen die mediale SNc moderate und die VTA lediglich milde Zellverluste auf, außerdem ist die posteriore SNc stärker als die anteriore SNc betroffen (Freundlieb et al., 2006). Die 6-OHDA-

Modelle führen zwar zu einer gleichmäßigeren und vollständigeren Denervierung, jedoch ist der Zelltod in der VTA, verglichen mit der SNc, auch hier geringer (Baker et al., 2004). Als Folge ergibt sich für die SVZ eine heterogene Denervierung und in der Konsequenz eine ebenso heterogene Proliferationsabnahme: Die dorsalen Anteile der SVZ zeigen im MPTP-Modell beim Primaten eine nahezu vollständige Denervierung, während die weiter ventral liegenden Bereiche, inklusive des ventro-medialen Bereiches in Nachbarschaft zum Ncl. accumbens, wesentlich geringer betroffen sind. Dementsprechend waren auch die Vorläuferzellen in den dorsalen Anteilen signifikant stärker reduziert, als in den ventralen Anteilen (Freundlieb et al., 2006). Baker et al. untersuchten in ihren 6-OHDA-Intoxikationsmodellen bei der Maus den ventro-medialen Bereich der SVZ nahe dem Ncl. accumbens gesondert. Sie konnten in diesem Anteil der SVZ eine im Vergleich zu den übrigen SVZ-Anteilen, um mehr als 10% geringere Proliferationsabnahme nachweisen (Baker et al., 2004). In einer weiteren Studie wurde bei transgenen aphakia Mäusen mit einem Pitx3-Mangel eine Abnahme der Proliferation im dorsalen, aber nicht ventralen Anteil der SVZ demonstriert (Lennington et al., 2007). Durch den Pitx3-Mangel kommt es schon während der Entwicklung zu einem selektiven Verlust von SNc Neuronen, die VTA ist jedoch nicht betroffen. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass der räumlich differenzierte Zelltod in den dopaminergen, mesencephalen Zellgruppen eine heterogene striatale Denervierung und in der Folge eine ebenfalls heterogene Denervierung der SVZ mit heterogener Proliferationsabnahme innerhalb der SVZ verursacht.

Diese Heterogenität innerhalb der SVZ deckt sich plausibel mit den Ergebnissen der hier nachgewiesenen topographischen dopaminergen Innervation. Die dorsalen Anteile des Striatums und der angrenzenden SVZ sind vorrangig durch die lateralen Anteile der SNc (SNI) innerviert, welche in den Tiermodellen primär betroffen sind. Im Gegensatz dazu, erhält das ventrale Striatum mit Ncl. accumbens und somit auch der ventrale und ventro-mediale Anteil der SVZ seine Projektionen vornehmlich aus der VTA und teilweise der medialen SNc, die in den Tiermodellen einen geringeren Zellverlust aufweisen.

Welche funktionelle Bedeutung zieht die heterogene Proliferationsabnahme innerhalb der SVZ möglicherweise nach sich? Die SVZ scheint in verschiedene

Kompartimente für Differenzierung, Migration und Entwicklung unterteilt zu sein. Den anterioren Anteilen der SVZ (SVZa) wird in diesem Zusammenhang eine spezialisierte Rolle für die Generierung von neuen Neuronen für den BO zugeschrieben, während die posterioren Anteile bevorzugt große Mengen an neuen Gliazellen produzieren sollen (Luskin et al., 1997). Eine weitere Studie in Mäusen konnte zudem zeigen, dass ein großer Teil der periglomerulären Zellen im BO wohl eher direkt im RMS als in der SVZ selber generiert wird (Hack et al., 2005). Im Primaten wurde ein Großteil der proliferierenden Zellen ebenfalls in der SVZa und dem Beginn des RMS nachgewiesen (Kornack & Rakic, 2001). Zwei umfassende Studien konnten ferner eine bevorzugte Proliferation der Stammzellen in der ventralen SVZa und innerhalb des RMS auch beim Menschen bestätigen (Curtis et al., 2007; Quiñones-Hinojosa & Chaichana, 2007). Die Arbeitsgruppe um Luo und Conover konnte zeigen, dass die physiologische, altersabhängige Proliferationsabnahme der Stammzellen innerhalb der SVZ mit einer regionalen Restriktion auf die ausschließlich dorsalen Anteile der SVZ einhergeht (Luo et al., 2006). ***Somit scheinen vom Nagetier bis hin zum Menschen räumlich-funktionelle Unterschiede innerhalb der SVZ in der anterior-posterioren und ventro-dorsalen Ausdehnung zu existieren: Die funktionellen Veränderungen nach dopaminergem Denervierung scheinen in allen bislang untersuchten Modellen mit der hier beschriebenen Topographie der meso-neurogenen Innervation zu korrelieren.***

4.3 Parkinson-Syndrom und mögliche Relevanz der dopaminergen Innervation von SVZ und SGZ

Die dopaminerge Kontrolle innerhalb der SVZ und SGZ scheint vom niederen Säugetier bis hin zum Menschen konserviert zu sein (Borta & Höglinger, 2007). Im folgenden Abschnitt soll die funktionelle Bedeutung der dopaminergen Innervation und Kontrolle der Neurogenese mit klinisch-pathologischen Merkmalen des IPS beim Menschen in Relation gesetzt werden.

Heute wird angenommen, dass die Neubildung von Neuronen im adulten Gehirn funktionell zu einem großen Repertoire an neuroadaptiven Antworten gehört. Der kontinuierliche Ersatz alter Neurone durch neu entstehende Neurone hilft dem neuronalen Netzwerk einen gewissen Grad an Adaptionsvermögen aufrechtzuerhalten und scheint dabei, wie in der Einleitung beschrieben, von der neuronalen Aktivität abhängig. In diesem Zusammenhang spricht man auch von neuronaler Plastizität (Lledo & Saghatelian, 2005). Funktionale Neurogenese stellt dabei einen hochkomplexen Vorgang dar, der die Integration der neu entstandenen Nervenzellen auf verschiedenen konzeptionellen Ebenen voraussetzt. Kempermann et al. sprechen in diesem Zusammenhang von der Integration auf erstens zellulärer-, zweitens Netzwerk-, drittens System- und viertens psychosozialer Ebene (Kempermann et al., 2004a). Die funktionelle Integration der neuen Neurone konnte im Tiermodell für die verschiedenen Ebenen nachgewiesen werden und scheint eher Teil eines Langzeitadaptionsprozesses als von kurzfristigem, akutem Vorteil zu sein (Kempermann et al., 2004a).

Für das SVZ/RMS/BO-System scheint die Bedeutung der neu integrierten Neurone vor allem in einer entscheidenden Funktion für die Geruchsdiskriminierung zu liegen (Enwere et al., 2004). Die Entstehung und Aufrechterhaltung eines ausgeprägten olfaktorischen Unterscheidungsvermögens scheint essentiell von dem gezielten Überleben neu entstandener Neurone abhängig und spiegelt vermutlich, unter Berücksichtigung des Aktivitätsniveaus, einen Adaptionsvorgang an sich wechselnde Milieuveränderungen wider (Lledo & Saghatelian, 2005).

Die Funktion der neu integrierten Neurone aus der SGZ im GD scheint maßgeblich für Hippocampus-abhängige Gedächtnisfunktionen, wie dem Langzeitgedächtnis von räumlichen Erinnerungen, relevant zu sein (Snyder et al., 2005; Bruel-Jungerman et al., 2005). Der Ersatz von alten, granulären Neuronen durch neu entstehende Nervenzellen sorgt somit möglicherweise für die notwendige Plastizität, um Informationen zu verarbeiten und zu speichern. Im Einklang mit dieser Vorstellung kann das Überleben der jungen Neurone durch erhöhte Aktivität in Form von Lern- und Umgebungseinflüssen verbessert werden (Bruel-Jungerman et al., 2005).

In der Neurogenese-Theorie zur Pathogenese von Depressionen wird, wie beschrieben, angenommen, dass die neu entstanden Zellen im GD eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Depressionen innehaben (Jacobs, 2002; Kemperman, 2002). Der Bezug zwischen verminderter adulter Neurogenese und Depressionen kann demzufolge in einer reduzierten Fähigkeit des Hippocampus im Umgang mit neuen und komplexen Einflüssen liegen. Dies resultiert in einer inadäquaten Informationsverarbeitung an der Schnittstelle zwischen Lern- und Affekt Regulation. Mit der Verbindung zum limbischen System könnte diese Fehlregulation zu den affektiven Symptomen von Depression beitragen (Kemperman, 2002).

Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit stellen sich folgende zwei Fragen: Welche Folge könnte in diesem Zusammenhang eine durch dopaminerge Denervation verminderte Neurogenese-Rate auf die funktionelle Bedeutung der neu integrierten Neurone haben? Und könnte dies in der Konsequenz mit nicht-motorischen Frühsymptomen beim idiopathischen Parkinson-Syndrom assoziiert sein? Die in dieser Arbeit charakterisierten dopaminergen, meso-neurogenen Projektionen zur SVZ und SGZ führen nach experimenteller Denervierung sowohl bei der Maus und der Ratte als auch beim Primaten zur Abnahme der Proliferationsrate in den Zonen der Neurogenese (Borta & Höglinger, 2007). Die experimentelle Hemmung adulter Neurogenese in der SVZ und SGZ wiederum geht nachgewiesenermaßen mit einer Beeinträchtigung erstens, olfaktorischer Funktionen (Enwere et al., 2004), zweitens einer Minderung von Gedächtnisfunktionen insbesondere für räumliches Erinnerungsvermögen (Snyder et al., 2005; Winocur et al., 2006) und drittens Depressionen (Jacobs, 2002; Santarelli et al., 2003) einher. Auch für den Menschen werden diese Symptome mit einer Abnahme der Neurogeneserate korreliert.

Das IPS ist durch die Degeneration dopaminergere Fasern, die ihren Ursprung in der SNc und der VTA haben, gekennzeichnet. Von der Degeneration sind ebenfalls diejenigen dopaminergen Fasern betroffen, die in die Zonen der Neurogenese aussprossen. Wie in der Einleitung beschrieben, gibt es eine charakteristische Anzahl von nicht-motorischen Symptomen, die den motorischen Symptomen vorausgehen. Dazu gehören olfaktorische Dysfunktion

(Berendse et al., 2001; Tissingh et al., 2001), mnestiche Dysfunktion insbesondere mit Beeinträchtigungen des räumlichen Gedächtnis (Pillon et al., 1997; Bosboom et al., 2004) und Depressionen (Oertel et al., 2001; Lemke, 2008). Von diesen nicht-motorischen Symptomen ist im Laufe der Erkrankung der Großteil der Patienten betroffen. Die genannten Symptome lassen sich durch die gewöhnlichen Medikamente, die in der Parkinson-Therapie eingesetzt werden, nicht unmittelbar beeinflussen. Dies deutet darauf hin, dass die Ursache außerhalb der direkten nigro-striatalen, dopaminergen Fehlfunktion liegt und es allenfalls ein indirektes pathologisches Korrelat gibt. Einige Erkenntnisse deuten jedoch darauf hin, dass es durch die dopaminerge Degeneration beim IPS zu einer Proliferationsabnahme der Stammzellen innerhalb von SVZ und SGZ kommt, was wiederum mögliche Ursache für die genannten Frühsymptome sein kann. Bestätigend ist die Neurogenese-Rate in *postmortem* Gehirnen von Parkinson-Patienten sowohl in der SVZ als auch in der SGZ im Vergleich zu Kontrollgruppen signifikant reduziert (Höglinger et al., 2004). Unabhängig davon ob bei Parkinson-Patienten zusätzlich eine Demenz diagnostiziert wurde oder nicht, konnte eine Abnahme an neuronalen Vorläuferzellen in der SGZ festgestellt werden (Höglinger et al., 2004). Korrelierend wurde eine zunehmende Atrophie des Hippocampus mit den mnestiche Dysfunktionen bei Parkinson-Patienten in Verbindung gebracht (Camicioli et al., 2003). Vielleicht prädisponiert eine verringerte Neurogenese in der SGZ Parkinson-Erkrankte, im Laufe ihrer Erkrankung kognitive Dysfunktionen zu entwickeln. Ohne den möglichen Bezug zur Neurogenese in der SGZ herzustellen, wurde bei Ratten nach meso-hippocampaler, dopaminergener Denervation eine Beeinträchtigung räumlicher Gedächtnisfunktionen nachgewiesen (Gasbarri et al., 1996).

Die Voraussetzungen beim Menschen ergeben nochmals ein differenzierteres Bild: Die Erkenntnisse aus den Tiermodellen können nicht streng mit den anatomisch-physiologischen Verhältnissen beim Menschen gleichgesetzt werden. In einer ausführlichen Studie, in der die vollständige anterior-posteriore Ausdehnung der Seitenventrikel miterfasst wurde, konnte eine genaue zytoarchitektonische Darstellung der humanen SVZ in vier Schichten nachgewiesen werden (Quiñones-Hinojosa et al., 2006). Die generelle Anzahl

an proliferierenden Zellen in der humanen SVZ ist dabei weitaus niedriger als bei anderen Säugetierarten und unterschreitet sogar, in Anbetracht der größeren Dimension und Ausdehnung beim Menschen, die Anzahl der Stammzellen in der SVZ von Nagetieren (Quiñones-Hinojosa et al., 2006). Nach Aussage dieser Arbeitsgruppe entsprechen die Unterschiede möglicherweise auch funktionellen Differenzen und lassen das Nagetiermodell suboptimal für das Studium der humanen Neurogenese erscheinen (Quiñones-Hinojosa & Chaichana, 2007). Gegenteilig hierzu beschreibt eine erst kürzlich veröffentlichte Studie eine außergewöhnliche Ähnlichkeit zwischen dem SVZ/RMS/BO-System von Menschen und Nagetieren (Curtis et al., 2007). Die Arbeitsgruppe konnte erstmals einen relativ robusten RMS mit migrierenden Eigenschaften der Vorläuferzellen beim Menschen nachweisen. Daher mag die Präsenz und Funktion adulter Neurogenese vom niederen Säugetier bis hin zum Menschen konserviert bleiben (Curtis et al., 2007). Sollte die Addition von neuen Neuronen, die aus der SVZ in den BO migrieren, auch beim Menschen zur erhöhten Plastizität in diesem System beitragen, würde dies auf Grund der Größe und Ausdehnung des menschlichen Gehirns einem langfristigeren Adaptionsprozess gleichkommen, setzt man ähnliche Wanderungsgeschwindigkeiten voraus.

Eine heterogene Degeneration dopaminerger Neurone in SNc und VTA, wie für das idiopathische Parkinson-Syndrom typisch, könnte somit eine räumlich und zeitlich unterschiedliche Minderung der Proliferationsrate innerhalb der SVZ provozieren. Ähnlich zu den MPTP- und 6-OHDA-Intoxikationsmodellen bei Tieren degenerieren beim IPS die lateralen und posterioren Anteile der SNc vor den antero-medialen Anteilen (Fearnley & Lees, 1991; Braak et al., 2003). Die VTA ist deutlich geringer betroffen. ***Aus den Ergebnissen dieser Arbeit und den oben aufgeführten Erkenntnissen lässt sich folgern, dass sich die Minderung der Proliferationsrate innerhalb der SVZ bei Parkinson Kranken von anfänglich postero-dorsal nach antero-ventral entwickeln könnte und somit die Proliferation in der anterioren SVZ und ggf. im RMS erst zu einem späteren Krankheitszeitpunkt beeinflusst würde.*** Es konnte gezeigt werden, dass der Hauptteil der proliferierenden Zellen beim Menschen in der anterioren SVZ nahe dem Beginn des RMS lokalisiert zu sein scheint

(Curtis et al., 2007; Quiñones-Hinojosa & Chaichana, 2007). Vorausgesetzt die räumliche Innervation beim Nagetier und Menschen stimmt überein, würde somit dieser Anteil der SVZ erst zu einem späteren Zeitpunkt betroffen sein.

Die Frühsymptome werden häufig Jahre vor den motorischen Symptomen in der so genannten prämotorischen bzw. präklinischen Phase beobachtet. Diese Phase ist durch eine subklinische dopaminerge Verarmung gekennzeichnet. Es ist also denkbar, dass bereits jene subklinische dopaminerge Verarmung noch vor dem Einsetzen motorischer Symptome negativ auf die Neurogeneserate innerhalb der SVZ und SGZ einwirkt und sich in der Folge die beschriebenen Frühsymptome manifestieren. Auch wenn der anteriore Anteil der SVZ über längere Zeit von der Dopaminverarmung verschont bliebe, lässt die lange Zeitspanne bis zum Auftreten der motorischen Symptome diese Schlussfolgerung zu.

Für die Ätiologie der olfaktorischen Dysfunktionen beim IPS gibt es jedoch eine weitere Theorie, die an dieser Stelle erwähnt sein soll. In einer noch unveröffentlichten ausführlichen Studie zur olfaktorischen Dysfunktion in einem 6-OHDA Parkinson-Modell bei Ratten wurde nämlich nicht primär die Abnahme der Neurogeneserate innerhalb der SVZ für die beobachtete Hyposmie verantwortlich gemacht. Die Arbeitsgruppe um Höglinger et al. konnte durch Tracing-Experimente zeigen, dass eine direkte dopaminerge axonale Projektion von der SNc in die granuläre Zellschicht des BO besteht. Gleichzeitig führte die Blockade der Neuroblastenmigration aus der SVZ in den BO durch eine physische Barriere im Bereich des RMS zu keiner messbaren Hyposmie bei den untersuchten Ratten. Nach Behandlung mit dem Dopamin-Agonisten Rotigotine (D3-, D2-, D1-Rezeptor) war die nachgewiesene Hyposmie in den 6-OHDA intoxikierten Ratten rückläufig. Außerdem konnte durch die kontinuierliche Gabe von Rotigotine die 6-OHDA bedingte Verminderung der Neurogenese-Rate innerhalb der SVZ wieder auf normale Werte angehoben werden. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die olfaktorische Dysfunktion als Frühsymptom beim IPS möglicherweise primär als Störung in einer direkten dopaminergen Verbindung zwischen SNc und BO zu sehen ist und der verminderte Stammzellstrom aus der SVZ über den RMS ggf. nur verstärkend oder erst zu einem späteren Krankheitszeitpunkt hierzu

beiträgt. Jedoch ist es möglich, durch die Gabe dopamimetischer Substanzen, die Neurogenese-Rate innerhalb der SVZ wieder zu steigern und die olfaktorischen Symptome zu verbessern. Ob die Verbesserung ggf. auf einer zunehmenden Migration von Neuroblasten aus der SVZ in den BO begründet ist, wurde nicht genauer untersucht, scheint jedoch möglich. Eine dritte potentielle Ursache für die olfaktorische Dysfunktion als Frühsymptom beim IPS wird in einer lokalen Schädigung im Bereich des BO unabhängig von einer nigro-neurogenen oder nigro-olfaktorischen dopaminergen Denervation gesehen. Braak teilt den Krankheitsprogress beim IPS in insgesamt 6 neuropathologische Stadien ein (Braak et al., 2003). Diese sind abhängig von dem zeitlich und räumlich unterschiedlichen Auftreten pathognomischer, histologischer Korrelate, in Form von Lewy-Körperchen mit der typischen α -Synuclein Pathologie. Im Bereich der SNc treten diese histologischen Krankheitskorrelate erst zu einem späteren Zeitpunkt (Stadium 3) auf. Im Bereich des BO sind die Korrelate hingegen bereits im ersten Stadium, zu Beginn der Krankheit, nachzuweisen. Braak geht daher davon aus, dass die beobachteten frühen olfaktorischen Dysfunktionen beim IPS im Zusammenhang mit dem Auftreten lokaler Läsionen im BO in Form der genannten Lewy-Körperchen zu sehen sind und da die SNc erst zu einem späteren Krankheitszeitpunkt betroffen ist, unabhängig vom nigro-striatalen, nigro-neurogenen oder nigro-olfaktorischen dopaminergen Systems sind. Zusammenfassend gibt es also mindestens 3 mögliche Faktoren die mit dem Auftreten der olfaktorischen Frühsymptome in Verbindung stehen können:

1. reduzierte Immigration von Neuroblasten aus der SVZ in den BO,
2. Denervierung dopaminergere Afferenzen aus der SNc in den BO,
3. lokale α -Synuclein Pathologie im BO.

Es soll darauf hingewiesen werden, dass bis zum heutigen Zeitpunkt keine vergleichende Heterogenität in der Differenzierung, Migration, oder Entwicklung der SGZ nachgewiesen werden konnte. Ebenso stehen Studien, die eine direkte Beeinflussung der hippocampalen Neurogenese auf Grund einer Degeneration dopaminergere Neurone im Mittelhirn nachweisen, noch

weitestgehend aus. Die vorliegende Arbeit konnte jedoch erste anatomische Grundlagen hierfür bereitstellen, und somit ist ähnlich zur SVZ auch in der SGZ eine räumlich und zeitlich unterschiedliche Proliferationsabnahme im Zusammenhang mit dem IPS vorstellbar. Da die Degeneration dopaminergere Zellen innerhalb der VTA beim IPS deutlich geringer betroffen ist, die VTA aber gleichzeitig die wesentliche dopaminerge Innervation der SGZ übernimmt, **ist eine mögliche Minderung der Proliferationsrate innerhalb der SGZ bei Parkinson Kranken erst zu einem späteren Krankheitszeitpunkt zu erwarten und könnte sich von anfänglich posterior nach anterior entwickeln.**

4.4 Ausblick

Vor 5 Jahrzehnten wurden erste Hinweise auf eine adulte Neurogenese bei Nagetieren veröffentlicht, vor ca. 40 Jahren gelang der Nachweis, dass es sich dabei tatsächlich um im erwachsenen Gehirn gebildete Neurone handelt. Erst Mitte der neunziger Jahre konnten mit den entsprechenden Methoden genauere quantitative Analysen und Phänotypisierungen der neuen Neurone realisiert werden. Vor 8 Jahren gelang der definitive Beweis, dass die während der adulten Neurogenese generierten Neurone tatsächlich funktionell in das bestehende Netzwerk integriert werden (Van Praag et al., 2002). Innerhalb der letzten Jahre wuchs das wissenschaftliche Interesse an dem Phänomen der adulten Neurogenese sowohl in der Grundlagen- als auch in der klinischen Forschung. Viele Fragestellungen hinsichtlich funktioneller Zusammenhänge und vor allem möglicher klinischer Anwendungen bleiben jedoch noch unbeantwortet.

Die hier vorgelegte Arbeit ist als Beitrag zur Grundlagenforschung der adulten Neurogenese zu sehen. Sie soll einen Teil der Hintergründe beleuchten, auf welcher anatomischen Grundlage der funktionelle und regulative Einfluss von Dopamin auf die adulte Neurogenese basiert. Um ein detailliertes Wissen in

Bezug auf die strukturelle Plastizität des Gehirns zu gewinnen, ist es entscheidend, endogene Mechanismen, die zur Regulation adulter Neurogenese beitragen, zu verstehen. Nur so ist es möglich potentielle Wege zu identifizieren, adulte Neurogenese vom Labor in die Klinik für therapeutische Zwecke anwendbar zu machen.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit die erste umfassende Kartographie der dopaminergen Innervation der Neurogenese Areale erstellt. Es konnte gezeigt werden, dass der SNc/VTA-Komplex, nicht aber andere dopaminerge Kerngebiete den dopaminergen Input zur SVZ und SGZ bereitstellen, wobei die SNc den Schwerpunkt zur Innervation der SVZ bildet und die VTA den Schwerpunkt zur Innervation der SGZ. Die Topographie dieser Bahnverbindungen folgt dabei im Wesentlichen den vorbekannten Gesetzmäßigkeiten der meso-striatalen, meso-limbischen und meso-hippocampalen Verbindungen. Diese Bahnverbindung erweitert das Aufgabenspektrum des SNc/VTA-Komplexes über die bekannten Funktionen in Motorik, Stimmungsregulation und Kognition um eine neue Funktion in der Regulation struktureller Plastizität im erwachsenen Gehirn. Das Wissen um die Existenz und Topographie dieser Bahnverbindungen kann möglicherweise helfen, nicht-motorische Symptome bei Erkrankungen der mesenzephalen dopaminergen Neurone wie dem IPS zu verstehen. Weiterhin kann in Zukunft das Wissen um diese Verbindung möglicherweise zu einer gezielten Stimulation der adulten Neurogenese in SVZ oder SGZ oder sogar in Subdivisionen dieser Strukturen nutzbar gemacht werden.

V. Zusammenfassung

Der Begriff adulte Neurogenese beschreibt die Neubildung von Nervenzellen im adulten Gehirn. Dieser Vorgang ist für zwei gesonderte Regionen, die subventrikuläre Zone (SVZ) entlang der Seitenventrikel und die subgranuläre Zone (SGZ) im Hippocampus nachgewiesen und findet bis ins hohe Lebensalter auch beim Menschen statt. Um das Potential, welches dem Phänomen der adulten Neurogenese zugeschrieben wird, in Zukunft ggf. klinisch-therapeutisch anwenden zu können, bedarf es einer umfassenden, grundlegenden Erforschung der regulativen Einflussgrößen auf die adulte Neurogenese. In diesem Zusammenhang konnte für den Neurotransmitter Dopamin eine Proliferations-stimulierende Funktion nachgewiesen werden. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die präzise topographische Beschreibung der dopaminergen Innervation von SVZ und SGZ mit Hilfe von Tracing-Experimenten bei Nagetieren. Mittels Tyrosin-Hydroxylase- bzw. Dopamin-Transporter- und 5-Bromo-2'-Deoxyuridin-Immunfärbung konnten zunächst die dopaminergen Fasern in unmittelbarer räumlicher Nähe zu den proliferierenden Vorläuferzellen innerhalb der SVZ und SGZ nachgewiesen werden. Retrograde *postmortem* Tracing-Experimente mit Injektion des bidirektionalen Tracers 1,1'-Di(4,4'-Dicyanodiphenyl)-3,3',3',3'-Tetramethylrhodamin-Indocarbocyanin-Perchlorat (Dil) in unterschiedliche Areale von SVZ und SGZ konnten eine räumliche Organisation der dopaminergen Ursprungsgebiete der dopaminergen Innervation von SVZ und SGZ im Mittelhirn der Ratte identifizieren. Die topographische Innervation konnte anschließend durch Injektion von Dil in die dopaminergen Zellgruppen des Mittelhirns in anterograden Tracing-Experimente bestätigt werden. Zusätzlich wurden diese topographisch organisierten Bahnen in einem zweiten Tiermodell, in transgenen Nestin-GFP Mäusen, nachgewiesen.

Für die räumlich organisierte Innervation konnte folgendes festgestellt werden: Die SVZ ist vornehmlich aus der Substantia nigra, pars compacta (SNc) innerviert. Eine Ausnahme stellt der anteriore und ventrale Anteil der SVZ dar, der zusätzlich Fasern aus der Area tegmentalis ventralis (VTA) erhält. Für die SGZ konnte eine bevorzugte dopaminerge Innervation aus der VTA nachgewiesen werden, wobei die posterioren Anteile der SGZ auch

Projektionen aus der SNc erhalten. Dabei folgt die Binnen-Organisation der Innervation im Wesentlichen der vorbekannten Topographie der meso-striatalen, meso-limbischen und meso-hippocampalen Verbindungen.

Im Vergleich zu einer vorangegangenen anterograden Tracing-Studie beim Primaten konnte in der hier durchgeführten Arbeit zusätzlich eine Verbindung der VTA in Teile der SVZ aufgezeigt werden, eine detaillierte Kartographie der Verbindungen von VTA und SNc in die SGZ erstellt werden und eine Verbindung aus anderen dopaminergen Zellgruppen in die SVZ oder SGZ ausgeschlossen werden. Die beschriebenen Bahnverbindungen erweitern damit das Aufgabenspektrum des SNc/VTA-Komplexes über die bekannten Funktionen in Motorik, Stimmungsregulation und Kognition um eine neue Funktion in der Regulation adulter Neurogenese und struktureller Plastizität im erwachsenen Gehirn.

Die aufgezeigte topographische Innervation bildet die anatomische Grundlage für einen möglichen Erklärungsansatz für bedeutsame Frühsymptome beim idiopathischen Parkinson-Syndrom, bei dem es zu einer progredienten Degeneration dopaminergener Neurone im Mittelhirn kommt. Sollte das System der dopaminergen meso-neurogenen Innervation und Regulation in Zukunft für therapeutische Zwecke im Sinne einer gezielten Stimulation der adulten Neurogenese in SVZ und SGZ oder sogar in Subdivisionen dieser Strukturen von Interesse sein, hat die vorgelegten Promotionsarbeit hiermit die anatomische Grundlage geschaffen.

VI. Abkürzungsverzeichnis

6-OHDA	6-Hydroxydopamin
5-HT	5-Hydroxytryptamin/Serotonin
µL	Mikro-Liter
AZ	Spezialisierte Astrozyten
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BDA	Biotin Dextran Amin
BMP	Bone morphogenic proteins
BO	Bulbus olfactorius
BRDU	5'-Bromo-2'-Deoxyuridin
bzw.	Beziehungsweise
D ₁ L	D ₁ -like Dopamin-Rezeptor
D ₂ L	D ₂ -like Dopamin-Rezeptor
DCX	Doublecortin-Protein
Dil	1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylrhodamin-Indocarbocyanin-Perchlorat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	Epidermal growth factor
et. al.	Et altera
FGF-2	Fibroblast growth factor-2
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GD	Gyrus dentatus
GFAP	Glial fibrillary acid protein
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
ggf.	Gegebenenfalls

GP	Globus pallidus
GZ	Gliale Zelltyp
Hz	Hertz
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IPS	Idiopathisches Parkinson-Syndrom
kg	Kilogramm
M	Mol
MAP	Mikrotubuli assoziiertes Protein
MFB	Mediales Vorderhirnbündel
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimol
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
MS	Multiple Sklerose
NC	Nucleus caudatus
Ncl.	Nucleus
NeuN	Neuronales nukleäres Antigen
nl	Nano-Liter
nm	Nano-Meter
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NES	neuroepitheliale Stammzellen
NSE	Neuronen spezifische Enolase
NST	Nucleus subthalamicus
NZ	Neuronaler Zelltyp
PCNA	Proliferating cell nuclear antigene
PET	Positronen-Emissions-Tomographie

PSA-NCAM	Polysialic acid-neural cell adhesion molecule
Pu	Putamen
RG	Radiale Gliazellen
RMS	Rostraler Migratorischer Strom
RRF	Retrorubrale Feld
SEZ	Subependymale Zone
SGZ	Subgranuläre Zone
SN	Substantia nigra
SNc	Substantia nigra, pars compacta
SNI	SNc, pars lateralis
SNr	Substantia nigra, pars reticularis
sog.	Sogenannte(n)
SPECT	Single-Photon-Emission-Computed-Tomography
S-Phase	Synthese-Phase
SV	Seitenventrikel
SVZ	Subventrikuläre Zone
TGF-Alpha	Transforming growth factor-Alpha
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VTA	Area tegmentalis ventralis
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

VII. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1:	Oak-tree Model und Pine-tree Model der embryonalen und adulten Neurogenese.....	6
Abbildung 2:	Lokalisation und zellulärer Aufbau der neurogenen Zonen im adulten Gehirn.....	7
Abbildung 3:	Dopaminerge Zellgruppen und ihre Projektionen.....	25
Abbildung 4:	Versuchsaufbau zur stereotaktischen <i>in vivo</i> Operation an Ratten und Mäusen.....	43
Abbildung 5:	Dopaminerge Fasern in direkter Nachbarschaft zu den Vorläuferzell-Populationen der SVZ.....	51
Abbildung 6:	Dopaminerge Fasern in direkter Nachbarschaft zu den Vorläuferzell-Populationen der SGZ.....	52
Abbildung 7:	Unilaterale Injektion von Dil in posteriore und intermediäre SVZ-Anteile der Ratte.....	54
Abbildung 8:	Unilaterale Injektion von Dil in anteriore SGZ-Anteile der Ratte.....	56
Abbildung 9:	Unilaterale Injektion von Dil in anteriore und intermediäre SNc-Anteile der Ratte.....	59/60
Abbildung 10:	Bilaterale Injektion von Dil in intermediäre VTA-Anteile der Ratte.....	62/63
Abbildung 11:	Unilaterale Injektion von Dil das RRF der Ratte.....	64

Abbildung 12:	Unilaterale Injektion von Dil in posteriore SNI-Anteile der transgenen Nestin-GFP Maus.....	66
Abbildung 13:	Schema der topographischen Organisation der dopaminergen meso-subventrikulären Innervation der SVZ im Sagittalschnitt.....	72
Abbildung 14:	Schema der topographischen Organisation der dopaminergen meso-subventrikulären Innervation der SVZ im Koronarschnitt.....	73
Abbildung 15:	Schema der topographischen Organisation der dopaminergen meso-subgranulären Innervation der SGZ im Sagittalschnitt und Koronarschnitt.....	75
Abbildung 16:	Ursprung der meso-striatal, meso- limbischen und meso-kortikalen Projektionen in der Ratte.....	78
Tabelle 1:	Regulation adulter Neurogenese.....	20
Tabelle 2:	Liste der verwendeten Chemikalien.....	33
Tabelle 3:	Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	34
Tabelle 4:	Liste der verwendeten Antikörper.....	36
Tabelle 5:	Liste der verwendeten Geräte.....	38
Tabelle 6:	Tiere/Region/Injektionsvolumen retrogrades <i>postmortem</i> Tracing bei Ratten.....	45

Tabelle 7:	Tiere/Region/Injektionsvolumen anterogrades <i>postmortem</i> Tracing bei Ratten.....	46
Tabelle 8:	Tiere/Region/Injektionsvolumen anterogrades <i>postmortem</i> Tracing bei Nestin-GFP Mäusen.....	47

VIII. Literaturverzeichnis

Internet:

Leitlinien Parkinson-Syndrome (2009)

Herausgegeben von der Expertengruppe des Kompetenznetz Parkinson:
Eggert KM, Deuschl G, Gasser T, Gerlach M, Höglinger G, Jost W, Oertel
WH, Arnold G, Baas H, Berg D, Braune S, Dodel R, Mehdorn HM,
Müngersdorf M, Przuntek H, Reuther P, Reichmann H, Riederer H, Schulz
J, Spieker S, Storch A, Tatsch K, Trenkwalder C, unter Federführung von
Oertel WH

<http://www.kompetenznetz-parkinson.de/Parkinson/leitlinien.html>

Stereotaxie Atlas:

Paxinos G, Watson C (1997)

The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates
Academic Press: Compact third edition

Paxinos G, Franklin K (2001)

The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates
Academic Press: Compact second edition

Artikel:

Åberg MA, Åberg ND, Hedbacker H, Oscarsson J, Eriksson PS (2000)

Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat
hippocampus
Journal of Neuroscience 20:2896-2903

Albin RL, Young AB, Penney JB (1989)

The functional anatomy of basal ganglia disorders
Trends in Neuroscience; 12:366-375

Altman J (1962)

Are new neurons formed in the brains of adult mammals?
Science; 135:1128-1129

Altman J, Das GD (1965)

Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal
neurogenesis in rats
Journal of Comparative Neurology; 124:319-335

Altman J (1969)

Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb
Journal of Comparative Neurology; 137:433-458

Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Tramontin AD (2001)

A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells
Nature Review Neuroscience; 2:287-293

Alvarez-Buylla A, Lim DA (2004)

For the Long Run: Maintaining Germinal Niches in the adult brain
Neuron; 41:683-686

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; 425:968-973

Arias-Carrión O, Freundlieb N, Oertel WH, Höglinger GU (2007)

Neurogenesis and Parkinson's Disease
CNS & Neurological Disorders - Drug Targets; 6:1-10

Arias-Carrión O, Yamada E, Freundlieb N, Djufri M, Maurer L, Hermanns G, Ipach B, Chiu WH, Steiner C, Oertel WH, Höglinger GU (2009)

Neurogenesis in substantia nigra of parkinsonian brains?
Journal of Neural Transmission; (Suppl 73):279-285

Austin M, Mitchell P, Goodwin G (2001)

Cognitive deficits in depression
The British Journal of Psychiatry; 178:200-211

Baker SA, Baker KA, Hagg T (2004)

Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone
European Journal of Neuroscience; 20:575-579

Baker SA, Baker KA, Hagg T (2005)

D3 dopamine receptors do not regulate neurogenesis in the subventricular zone of adult mice
Neurobiology of Disease; 18:523-527

Banasr M, Hery M, Printemps R, Daszuta A (2004)

Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone
Neuropsychopharmacology; 29:450-460

- Bauer S, Moyse E, Jourdan F, Colpaert F, Martel JC Marien M (2003)**
Effects of the α_2 -adrenoreceptor antagonist Dexefaroxan on neurogenesis in the olfactory bulb of the adult rat *in vivo*: selective protection against neuronal death
Neuroscience; 117:281-291
- Bauer S, Hay M, Amilhon B, Jean A, Moyse E (2005)**
In vivo Neurogenesis in the dorsal vagal complex of the adult rat brainstem
Neuroscience;130:75-90
- Bayer SA (1980)**
Changes in the total number of dentate granule cells in juvenile and adult rats: a correlated volumetric and 3H-thymidine autoradiographic study
Experimental Brain Research; 46:315-323
- Becker G (2003)**
Methoden zur Frühdiagnose des Morbus Parkinson
Der Nervenarzt; 74 (Suppl 1): 7-11
- Belluzzi O, Benedusi M, Ackman J, LoTurco JJ (2003)**
Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb
Journal of Neuroscience; 23:10411-10418
- Bentivoglio M, Morelli M (2005)**
The organisation and circuits of mesencephalic dopaminergic neurons and the distribution of dopamine receptors in the brain
Handbook of chemical neuroanatomy; (Dopamine) (Vol.21) (Dunnet SB, Bentivoglio M, Björklund A, Hökfelt T, eds) pp.1-107, Elsevier
- Berendse H, Booij J, Francot C, Bergmans P, Hijman R, Stoof J, Wolters E (2001)**
Subclinical dopaminergic dysfunction in asymptomatic Parkinson's disease patients' relatives with a decreased sense of smell
Annals of Neurology; 50:34-41
- 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
Journal of the Neurological Sciences; 20:415-455
- Bernier PJ, Bedard A, Vinet J, Levesque M, Parent A (2002)**
Newly generated neurons in the amygdale and adjoining cortex of adult primates
Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) USA; 99:11464-11469
- 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
Neuroscience Letters; 291:17-20

Björklund A, Dunnett SB (2007)

Dopamine neuron systems in the brain: an update
Trends in Neurosciences; 30:194-202

Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, Martignoni E (2000)

Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease
Progress in Neurobiology; 62:63-88

Bonfanti L, Olive S, Poulain DA, Theodosis DT (1992)

Mapping of the distribution of polysialylated neural cell adhesion molecule throughout the central nervous system of the adult rat: an immunohistochemical study
Neuroscience; 49:419-436

Borta A, Höglinger GU (2007)

Dopamine and adult neurogenesis
Journal of Neurochemistry; 100:587-595

Bosboom JLW, Stoffers D, Wolters ECH (2004)

Cognitive dysfunction and dementia in Parkinson's disease
Journal of Neural Transmission; 11:1303-1315

Braak H, Del Tredici K, Rüb U, De Vos R, Jansen Steur E, Braak E (2003)

Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease
Neurobiology of Aging; 24:197-211

Bronnick K, Aarsland D, Larsen JP (2005)

Neuropsychiatric disturbances in Parkinson's disease clusters in five groups with different prevalence of dementia
Acta Psychiatrica Scandinavica; 112:2001-2007

Bruel-Jungerman E, Laroche S, Rampon C (2005)

New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced longterm memory following environmental enrichment
European Journal of Neuroscience; 21:513-521

Burns KA, Kuan CY (2005)

Low doses of bromo- and iododeoxyuridine produce near-saturation labeling of adult proliferative populations in the dentate gyrus
European Journal of Neuroscience; 21:803-807

Cameron HA, Gould E (1994)

Adult Neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus
Neuroscience; 61:203-209

Cameron HA, McEwen BS, Gould E (1995)

Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus
Journal of Neuroscience; 15:4687-4692

Cameron HA, Tanapat P, Gould E (1998)

Adrenal steroids and N-methyl-D-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway
Neuroscience; 82:349-354

Cameron HA, McKay RD (1999)

Restoring production of hippocampal neurons in old age
Nature Neuroscience; 2:894-897

Cameron HA, McKay RD (2001)

Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus
Journal Comparative Neurology; 435:406-417

Camicioli R, Moore MM, Kinney A, Corbridge E, Glassberg K, Kaye JA (2003)

Parkinson's disease is associated with hippocampal atrophy
Movement Disorders; 18:784-790

Cao L, Jiao X, Zuzga DS, Liu Y, Fong DM, Young D, During MJ (2004)

VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory
Nature Genetics; 36:827-835

Carlen M, Cassidy RM, Brismar H, Smith GA, Enquist LW, Frisen J (2002)

Functional integration of adult-born neurons
Current Biology; 12:606-608

Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo PM (2003)

Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb
Nature Neuroscience; 6:507-518

Chambers CB, Peng Y, Nguyen H, Gaiano N, Fishell G, Nye JS (2001)

Spatiotemporal selectivity of response to Notch1 signals in mammalian forebrain precursors
Development; 128:689-702

Conover JC, Notti RQ (2008)

The neural stem cell niche
Cell Tissue Research; 331:211-224

Cooper JA, Sagar HJ, Jordan N, Harvey NS, Sullivan EV (1991)

Cognitive impairment in early, untreated Parkinson's disease and its relationship to motor disability
Brain; 114:2095-2122

Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Kuhn HG (2004)

Decreased neurogenesis after cholinergic forebrain lesion in the adult rat
Journal of Neuroscience Research; 77:155-165

- Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG, Aigner L (2005)**
Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis
European Journal of Neuroscience; 21:1-14
- 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
Journal of Neurochemistry; 91:1292-1301
- Corotto FS, Henegar JA, Maruniak JA (1993)**
Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain
Neuroscience Letters; 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
- Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, Reynolds BA, Weiss S, van der Kooy D (1996)**
In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain
Journal of Neuroscience; 16:2649-2658
- Curtis MA, Penney EB, Pearson AG, van Roon-Mom WM, Butterworth NJ, Dragunow M, Connor B, Faull RL (2003)**
Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain
Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) USA; 100:9023-9027
- Curtis MA, Kam M, Nannmark U, Anderson MF, Zetterstrom Axell M, Wikkelso C, Holtås S, Van Roon-Mom W, Björk-Eriksson T, Nordborg C, Frisen J, Dragunow M, Faull R, Eriksson PS (2007)**
Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension
Science; 315:1243-1249
- Dahlström A, Fuxe K (1964)**
Localization of monoamines in the lower brain stem
Experientia; 20:398-399
- De Long MR (1990)**
Primate models of movement disorders of basal ganglia origin
Trends in Neuroscience; 13:281-285

Deng YP, Lei WL, Reiner A (2006)

Differential perikaryal localization in rats of D1 and D2 dopamine receptors on striatal projection neuron types identified by retrograde labelling
Journal of Chemical Neuroanatomy; 32:101-106

Diaz J, Ridray S, Mignon 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.
Journal of Neuroscience; 17:4282-4292

Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997)

Cellular composition and threedimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain
Journal of Neuroscience; 17:5046-5061

Doetsch F, Caille I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999)

Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain
Cell; 97:1-20

Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2002)

EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells
Neuron; 36:1021-1034

Doetsch F (2003)

The glial identity of neural stem cells
Nature Neuroscience; 6:1127-1134

Doty RL, Stern MB, Pfeiffer C, Gollomp SM, Hurtig HI (1992)

Bilateral olfactory dysfunction in early stage treated and untreated idiopathic Parkinson's disease
Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry; 55:138-142

Dubois B, Pillon B (1997)

Cognitive deficits in Parkinson's disease
Journal of Neurology; 244:2-8

EI-Khodori BF, Oo T, Kholodilov, Burke (2003)

Ectopic Expression of Cell Cycle Markers in Models of Induced Programmed Cell Death in Dopamine Neurons of the Rat Substantia Nigra Pars Compacta
Experimental Neurology; 179:17-27

Enwere E, Shingo T, Gregg C, Fujikawa H, Ohta S, Weiss S (2004)

Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination
Journal of Neuroscience; 24:8354-8365

- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998)**
Neurogenesis in the adult human hippocampus
Nature Medicine; 11:1313-1317
- Fallon JH, Moore RY (1978)**
Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum
Journal of Comparative Neurology; 180:545-580
- Fallon JH (1988)**
Topographic organization of ascending dopaminergic projections
Annals of the New York Academy of Sciences; 537:1-9
- Fearnley JM, Lees AJ (1991)**
Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity
Brain; 114:2283-2301
- Fields HL, Hjelmstad GO, Margolis EB, Nicola SM (2007)
Ventral Tegmental Area Neurons in Learned Appetitive Behavior and Positive Reinforcement
Annual Review of Neuroscience; 30:289-316
- Filippov V, 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
Molecular and Cellular Neuroscience; 23:373-382
- 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
Journal of Comparative Neurology; 414:334-347
- 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
Journal of Neuroscience; 26:2321-2325
- Gage FH, Kempermann G, Palmer TD, Peterson DA, Ray J (1998)**
Multipotent Progenitor Cells in the Adult Dentate Gyrus
Journal of Neurobiology; 36:249-266
- Gage FH (2000)**
Mammalian neural stem cells
Science; 287:1433-1438

- Garcia A, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV (2004)**
GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain
Nature Neuroscience; 7:1233-1241
- Gasbarri A, Verney C, Innocenzi R, Campana E, Pacitti C (1994)**
Mesolimbic dopaminergic neurons innervating the hippocampal formation in the rat: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study
Brain Research; 668:71-79
- Gasbarri A, Packard MG, Sulli A, Pacitti C, Innocenzi R, Perciavalle V (1996)**
The projections of the retrorubral field A8 to the hippocampal formation in the rat
Experimental Brain Research; 122:244-252
- Gasbarri A, Sulli A, Packard MG (1997)**
The dopaminergic mesencephalic projections to the hippocampal formation in the rat
Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry; 21:1-22
- Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL, Song H (2006)**
GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain
Nature; 439:589-593
- German DC, Manaye KF (1993)**
Midbrain Dopaminergic Neurons (Nuclei A8, A9, and A10): Three Dimensional Reconstruction in the Rat
The Journal of Comparative Neurology; 331:297-309
- 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
Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) USA; 97:1823-1828
- Goldman SA, Nottebohm F (1983)**
Neuronal Production, Migration, and Differentiation in a Vocal Control Nucleus of the Adult Female Canary Brain
Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) USA; 80:2390-2394
- Gould E, Cameron HA, Daniels DC, Woolley CS, McEwen BS (1992)**
Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus
Journal of Neuroscience; 12:3642-3650
- Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E (1997)**
Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation
Journal of Neuroscience; 17:2492-2498

- Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, Fuchs E (1999a)**
Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates
Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) USA; 96:5263-5267
- Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG (1999b)**
Neurogenesis in the neocortex of adult primates
Science; 286:548-552
- Gould E, Tanapat P (1999c)**
Stress and Hippocampal Neurogenesis
Biological Psychiatry; 46:1472-1479
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ (1999d)**
Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation
Nature Neuroscience; 2:260-265
- Gould E (2007)**
How widespread is adult neurogenesis in mammals?
Nature Neuroscience; 8:481-488
- Hack MA, Saghatelian A, de Chevigny A, Pfeifer A, Ashery-Padan R, Lledo PM, Götz M (2005)**
Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis
Nature Neuroscience; 8:865-872
- Haehner A, Hummel T, Hummel C, Sommer U, Junghanns S, Reichmann H (2007)**
Olfactory loss may be a first sign of idiopathic Parkinson's disease
Movement Disorders; 22:839-842
- Hagg T (2005)**
Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view
Trends in Neuroscience; 28:589-595
- Hall PA, Levison DA, Woods AI, Yu CC, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Camplejohn R, Dover R (1990)**
Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms
Journal of Pathology; 162:285-294
- Hastings NB, Gould E (1999)**
Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells
Journal of Comparative Neurology; 413:146-154
- Hawkes CH, Shephard BC, Daniel SE (1997)**
Olfactory dysfunction in Parkinson's disease
Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry; 62:436-446

Herting B, Bietenbeck S, Scholz K, Haehner A, Hummel T, Reichmann H (2008)

Riechstörungen bei Morbus Parkinson
Der Nervenarzt; 79:175-184

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
Archives of Neurology; 62:378-382

Hirsch EC, Graybiel AM, Agid YA (1988)

Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease
Nature; 334:345-348

His W (1904)

Die Entwicklung des menschlichen Gehirns
Hirzel; Leipzig

Höglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duychaerts C, Oertel WH, Caille I, Hirsch EC (2004)

Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease
Nature Neuroscience; 7:726-735

Holmberg J, Armulik A, Senti KA, Edoff K, Spalding K, Momma S, Cassidy R, Flanagan JG, Frisén J (2005)

Ephrin-A2 reverse signaling negatively regulates neural progenitor proliferation and neurogenesis
Genes & Development; 19:462-471

Honig MG, Hume RI (1989)

Dil and DiO: versatile fluorescent dyes for neuronal labeling and pathway tracing
Trends in Neuroscience; 12:333-41

Hu Z, Cooper M, Crockett DP, Zhou R (2004)

Differentiation of the midbrain dopaminergic pathways during mouse development
Journal of Comparative Neurology; 476:301-311

Jacobs BL (2002)

Adult brain neurogenesis and depression
Brain, Behavior, and Immunity; 16:602-609

Jaumotte JD, Zigmond MJ (2005)

Dopaminergic innervation of forebrain by ventral mesencephalon in organotypic slice co-cultures: effects of GDNF
Molecular Brain Research; 134:139-146

Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao Xo, Xie L Greenberg DA (2002)

Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo
Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) USA; 99:11946-11950

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.
Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) USA; 103:13198-13202

Kaplan MS, Hinds JW (1977)

Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs
Science; 197:1092-2004

Kaplan MS, Bell DH (1984)

Mitotic Neuroblasts in the 9-day-old and 11-month old rodent Hippocampus
Journal of Neuroscience; 4:1429-1441

Karten YJ, Olariu A, Cameron HA (2005)

Stress in early life inhibits neurogenesis in adulthood
Trends in Neuroscience; 28:171-172

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997a)

Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice
Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) USA; 94: 10409-10414

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997b)

More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment
Nature; 386:493-495

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1998)

Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus
Journal of Neuroscience; 18:3206-3212

Kempermann G (2002)

Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis
Journal of Neuroscience; 22:635-638

Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH (2003)

Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice
Development; 130:391-399

Kempermann G, Wiskott L, Gage FH (2004a)

Functional significance of adult neurogenesis
Current Opinion in Neurobiology; 14:186-191

- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G (2004b)**
Milestones of neuronal development in the adult hippocampus
Trends in Neuroscience; 27:447-452
- Köbber C, Apps R, Bechmann I, Lanciego JL, Mey J, Thanos S (2000)**
Current concepts in neuroanatomical tracing
Progress in Neurobiology; 62:327-351
- Koelliker A (1896)**
Handbuch der Gewebelehre des Menschen
Engelmann; Leipzig
- Koketsu D, Furuichi Y, Maeda M, Matsuoka N, Miyamoto Y, Hisatsune T (2006)**
Increased number of new neurons in the olfactory bulb and hippocampus of adult nonhuman primates after focal ischemia
Experimental Neurology; 199:92-102
- Kornack DR, Rakic P (1999)**
Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey
Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) USA; 96:5768-5773
- Kornack DR, Rakic P (2001)**
The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain
Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) USA; 98:4752-4757
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996)**
Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation.
Journal of Neuroscience; 16:2027-2033
- Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH (1997)**
Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain
Journal of Neuroscience; 17:5820-5829
- Kulkarni VA, Jha S, Vaidya VA (2002)**
Depletion of norepinephrine decreases the proliferation, but does not influence the survival and differentiation of granule cell progenitors in the adult rat Hippocampus
European Journal of Neuroscience; 16:2008-2012
- Kuo CT, Mirzadeh Z, Soriano-Navarro M, Rasin M, Wang D, Shen J, Sestan N, Garcia-Verdugo J, Alvarez-Buylla A, Jan LY, Jan YN (2006)**
Postnatal deletion of Numb/Numbl like reveals repair and remodeling capacity in the subventricular neurogenic niche
Cell; 127:1253-1264

Lee J, Seroogy KB, Mattson MP (2002)

Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice
Journal of Neurochemistry; 80:539-547

Lemke MR (2008)

Depressive symptoms in Parkinson's disease
European Journal of Neurology; 15 (Suppl 1):21-25

Lemkine GF (2005)

Adult neural stem cell cycling in vivo requires thyroid hormone and its alpha receptor
FASEB Journal; 19:863-865

Lendahl U, Zimmerman LB, McKay R (1990)

CNS Stem Cells Express a New Class of Intermediate Filament Protein
Cell; 60:585-595

Lennington JB, Yang Z, Conover JC (2003)

Neural stem cells and the regulation of adult neurogenesis
Reproductive Biology and Endocrinology; 1:99 Review

Lennington JB, Sampson RM, Conover JC (2007)

Effect of dopamine signalling on subventricular zone neurogenesis
Poster 565.7/E18; San Diego Convention Center, 06.11.2007

Leuner B, Gould E, Shors TJ (2006)

Is there a link between adult neurogenesis and learning?
Hippocampus; 16:216-224

Lidow MS, Rakic P (1995)

Neurotransmitter receptors in the proliferative zones of the developing primate occipital lobe
Journal of Comparative Neurology; 360:393-402

Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2000)

Noggin antagonizes BMP signalling to create a niche for adult neurogenesis
Neuron; 28:713-726

Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A (2004)

Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders – how to make it work
Nature Medicine; 10 (Suppl):S42-S50

Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR (1998)

Increased Neurogenesis in the Dentate Gyrus after Transient Global Ischemia in Gerbils
Journal of Neuroscience; 18:7768-7778

Liu X, Wang Q, Haydar TF, Bordey A (2005)

Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors
Nature Neuroscience; 8:1179-1187

Lledo PM, Saghatelian A (2005)

Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: joining the network, life–death decisions, and the effects of sensory experience
Trends in Neurosciences; 28:248-254

Lois C, Alvarez-Buylla A (1993)

Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia
Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) USA; 90:2074-2077

Lois C, Alvarez-Buylla A (1994)

Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain
Science; 264:978-981

Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1996)

Chain migration of neuronal precursors
Science; 271:978-981

Luo J, Daniels SB, Lenington JB, Notti RQ, Conover JC (2006)

The aging neurogenic subventricular zone
Aging Cell; 5:139-152

Lupien SJ, de Leon M, de Santi S, Convit A, Tarshish N, Nair NPV, Thakur M, McEwen BS, Hauger RL, Meaney MJ (1998)

Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits
Nature Neuroscience; 1:69-73

Luskin MB (1993)

Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone
Neuron; 11:173-189

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
Molecular and Cellular Neuroscience; 8:351-366

Lynd-Balta E, Haber SN (1994)

The organization of midbrain projections to the striatum in the primate: sensorimotor-related striatum versus ventral striatum
Neuroscience; 59:625-640

- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS (2000)**
Chronic Antidepressant Treatment Increases Neurogenesis in Adult Rat Hippocampus
The Journal of Neuroscience; 20(24):9104-9110
- Mayeux R, Chen J, Mirabello E, Marder K, Bell K, Dooneief G, Cote L, Stern Y (1990)**
An estimate of the incidence of dementia in idiopathic Parkinson's disease
Neurology; 40:1513–1517
- McGeer PL, McGeer EG, Suzuki JS (1977)**
Aging and extrapyramidal function
Archives of Neurology; 34:33-35
- Meco G, Pratesi L, Bonifati V (1991)**
Cardiovascular reflexes and autonomic dysfunction in Parkinson's disease
Journal of Neurology; 238:195-199
- Merkle FT, Tramontin AD, Garcı-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2004)**
Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone
Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) USA; 101:17528-17532
- Mignone JL, Kukekov V, Chiang AS, Steindler D, Enikolopov G (2004)**
Neural Stem and Progenitor Cells in Nestin-GFP Transgenic Mice
Journal of Comparative Neurology; 469:311-324
- Mohapel P, Leanza G, Kokaia M, Lindvall O (2005)**
Forebrain acetylcholine regulates adult hippocampal neurogenesis and learning
Neurobiology of Aging; 26:939-946
- Morrish PK, Rakshi JS, Bailey DL (1998)**
Measuring the rate of progression and estimating the preclinical period of Parkinson's disease with [18F]dopa PET
Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry; 64:314-319
- Moscovitch M, Rosenbaum RS, Gilboa A, Addis DR, Westmacott R, Grady C, McAndrews MP, Levine B, Black S, Winocur G, Nadel L (2005)**
Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory
Journal of Anatomy; 207:35-66
- Nacher J, Rosell DR, Alonso-Llosa G, McEwen BS (2001)**
NMDA receptor antagonist treatment induces a long-lasting increase in the number of proliferating cells, PSA-NCAM-immunoreactive granule neurons and radial glia in the adult rat dentate gyrus
European Journal of Neuroscience; 13:512-520

- Nait-Oumesmar B, Picard-Riera N, Kerninon C, Decker L, Seilhean D, Höglinger GU, Hirsch EC, Reynolds R, Van Evercooren AB (2007)**
Activation of the subventricular zone in multiple sclerosis: Evidence for early glial progenitors
Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) USA; 104:4694-4699
- Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson PS (1999)**
Enriched Environment Increases Neurogenesis in the Adult Rat Dentate Gyrus and Improves Spatial Memory
Journal of Neurobiology; 39:569-578
- Nowakowski RS, Hayes NL (2000)**
New neurons: extraordinary evidence or extraordinary conclusion?
Science; 288:771a
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Benitez-Temino B, Blesa FJ, Guridi J, Marin C, Rodriguez M (2008)**
Functional Organization of the Basal Ganglia: Therapeutic Implications for Parkinson's Disease
Movement Disorders; 23 (Suppl 3):548-559
- Oertel WH, Hoglinger GU, Caraceni T, Girotti F, Eichhorn T, Spottke A, Krieg J, Poewe W (2001)**
Depression in Parkinson's disease. An update
Advances in Neurology; 86:373-383
- Ohtani N, Goto T, Waeber C, Bhide PG (2003)**
Dopamine modulates cell cycle in the lateral ganglionic eminence
Journal of Neuroscience; 23:2840-2850
- Olariu A, Cleaver KM, Shore LE, Brewer MD, Cameron HA (2005)**
A natural form of learning can increase and decrease the survival of new neurons in the dentate gyrus
Hippocampus; 15:750-762
- Packer MA, Stasiv Y, Benraiss A, Chmielnicki E, Grinberg A, Westphal H, Goldman SA, Enikolopov G (2003)**
Nitric oxide negatively regulates mammalian adult neurogenesis
Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) USA; 100:9566-9571
- Palma V (2005)**
Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain
Development; 132:335-344
- Palmer TD, Takahashi J, Gage FH (1997)**
The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells
Molecular and Cellular Neuroscience; 8:389-404

- Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH (1999)**
Fibroblast Growth Factor-2 Activates a Latent Neurogenic Program in Neural Stem Cells from Diverse Regions of the Adult CNS
Journal of Neuroscience; 19:8487-8497
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH (2000)**
Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis
Journal of Comparative Neurology; 425:479-494
- Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH (1997)**
Dentate Granule Cell Neurogenesis Is Increased by Seizures and Contributes to Aberrant Network Reorganization in the Adult Rat Hippocampus
Journal of Neuroscience; 17:3727-3738
- Parent JM, Vexler ZS, Gong C, Derugin N, Ferriero DM (2002)**
Rat Forebrain Neurogenesis and Striatal Neuron Replacement after Focal Stroke
Annals of Neurology; 52:802-813
- Parent JM (2003)**
Injury-induced neurogenesis in the adult mammalian brain
Neuroscientist; 9:261-272
- Park JH, Cho H, Kim H, Kim K (2006)**
Repeated brief epileptic seizures by pentylentetrazole cause neurodegeneration and promote neurogenesis in discrete brain regions of freely moving adult rats
Neuroscience; 140:673-684
- Parkinson J, Member of the Royal College of Surgeons (1817)**
An essay on the shaking palsy
Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neuroscience 2002; 14:223-236
- Parnavelas JG (2000)**
The origin and migration of cortical neurones: new vistas
Trends in Neuroscience; 23:126-131
- Pereira AC, Huddleston DE, Brickman AM, Sosunov AA, Hen R, McKhann GM, Sloan R, Gage FH, Brown TR, Small SA (2007)**
An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus
Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) USA; 104:5638-5643
- Perez-Martin M, Azcoitia I, Trejo JL, Sierra A, Garcia-Segura LM (2003)**
An antagonist of estrogen receptors blocks the induction of adult neurogenesis by insulin-like growth factor-I in the dentate gyrus of adult female rat
European Journal of Neuroscience; 18:923-930

Petreanu L, Alvarez-Buylla A (2002)

Maturation and death of adult-born olfactory granule neurons: role of olfaction
Journal of Neuroscience; 22:6106-6113

Phillipson OT, Griffiths AC (1985)

The topographic order of inputs to nucleus accumbens in the rat
Neuroscience; 16:275-296

Pillon B, Ertle S, Deweer B, Bonnet A, Vidailhet M, Dubois B (1997)

Memory for spatial location in 'de novo' parkinsonian patients
Neuropsychologia; 35:221-228

Pirozzolo FJ, Hansch EC, Mortimer JA, Webster DD, Kuskowski MA (1982)

Dementia in Parkinson disease: a neuropsychological analysis
Brain and Cognition; 1:71-83

Poewe W (2008)

Non-motor Symptoms in Parkinson's disease
European Journal of Neurology; 15 (Suppl. 1):14-20

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
Annals of Neurology; 56:173-181

Popolo M, McCarthy DM, Bhide PG (2004)

Influence of dopamine on precursor cell proliferation and differentiation in the embryonic mouse telencephalon
Developmental Neuroscience; 26:229-244

Quiñones-Hinojosa A, Sanai N, Soriano-Navarro M, Gonzalez-Perez O, Mirzadeh Z, Gil-Perotin S, Romero-Rodriguez R, Berger M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2006)

Cellular Composition and Cytoarchitecture of the Adult Human Subventricular Zone: A Niche of Neural Stem Cells
Journal of comparative Neurology; 494:415-434

Quiñones-Hinojosa A, Chaichana K (2007)

The human subventricular zone: A source of new cells and a potential source of brain tumors
Experimental Neurology; 205:313-324

Rakic P (2002)

Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis
Journal of Neuroscience; 22:614-618

Ramón y Cajal S (1928)

Degeneration and regeneration of the nervous system (trans. Day RM, from the 1913 spanish edn)
Oxford Univ Press, London

Rao MS, Hattiangady B, Shetty AK (2006)

The window and mechanisms of major age-related decline in the production of new neurons within the dentate gyrus of the hippocampus
Aging Cell; 5:545-558

Rietze R, Poulin P, Weiss S (2000)

Mitotically Active Cells That Generate Neurons and Astrocytes Are Present in Multiple Regions of the Adult Mouse Hippocampus
Journal of Comparative Neurology; 424:397-408

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; 31:1146-1157

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
Journal of Neuroscience; 22:2679-2689

Rousselot P, Lois C, Alvarez-Buylla A (1995)

Embryonic (PSA) N-CAM reveals chains of migrating neuroblasts between the lateral ventricle and the olfactory bulb of adult mice
Journal of Comparative Neurology; 351:51-61

Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003)

Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioural effects of antidepressants
Science; 301:805-809

Sapolsky RM (1992)

Do Glucocorticoid Concentrations rise with Age in the Rat?
Neurobiology of Aging; 13:171-174

Sapolsky RM (2004)

Is Impaired Neurogenesis Relevant to the Affective Symptoms of Depression?
Biological Psychiatry; 56: 137-139

Schmidt-Hieber C, Bischofberger PJ (2004)

Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus
Nature; 429:184-187

Schneider JS, Pope-Coleman A (1995)

Cognitive deficits precede motor deficits in a slowly progressing model of parkinsonism in the monkey
Neurodegeneration; 4:245-255

Seki T, Arai Y (1993)

Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat
Journal of Neuroscience; 13:2351-2358

Seri, B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2001)

Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus
Journal of Neuroscience; 21:7153-7160

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
Journal of Comparative Neurology; 478:359-378

Sheline Y, Wany P, Gado M, Csernansky J, Vannier M (1996)

Hippocampal atrophy in recurrent major depression
Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) USA; 93:3908-3913

Sheline YI (2000)

3D MRI Studies of Neuroanatomic Changes in Unipolar Major Depression: The Role of Stress and Medical Comorbidity
Biological Psychiatry; 48: 791-800

Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, Vincent P, Pumiglia K, Temple S (2004)

Endothelial cells stimulate selfrenewal and expand neurogenesis of neural stem cells
Science; 304:1338-1340

Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, Cross JC, Weiss S (2003)

Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin
Science; 299:117-120

Shors TJ, Miesgaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E (2001)

Neurogenesis in the adult rat is involved in the formation of trace Memories
Nature; 410:372-376

Snyder JS, Hong NS, McDonald R, Wojtowicz JM (2005)

A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory
Neuroscience; 130:843-852

Stanfield BB, Trice JE (1988)

Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections
Experimental Brain Research; 72:399-406

Stocchi F, Brusa L (2000)

Cognition and emotion in different stages and subtypes of Parkinson's disease
Journal of Neurology; 247 (Suppl 2):114-121

Swanson LW (1982)

The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat
Brain Research Bulletin; 9:321-353

Swift MJ, Crago PE, Grill WM (2005)

Applied electric fields accelerate the diffusion rate and increase the diffusion distance of Dil in fixed tissue
Journal of Neuroscience Methods; 141:155-163

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
Movement Disorders; 16:41-6

Tomasevic G, Kamme F, Wieloch T (1998)

Changes in proliferating cell nuclear antigen, a protein involved in DNA repair, in vulnerable hippocampal neurons following global cerebral ischemia
Molecular Brain Research; 60:168-176

Tropepe V, Craig CG, Morshead CM, Kooy D van der (1997)

Transforming growth factor-alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma
Journal of Neuroscience; 17:7850-7859

Uhl GR, Hedreen JC, Price DL (1985)

Parkinson's disease: loss of neurons from the ventral tegmental area contralateral to therapeutic surgical lesions
Neurology; 35:1215-1218

Van der Heuvel D, Pasterkamp RJ (2008)

Getting connected in the dopamine system
Progress in Neurobiology; 85:75-93

Van Kampen JM, Hagg T, Robertson HA (2004)

Induction of neurogenesis in the adult rat subventricular zone and neostriatum following dopamine D receptor stimulation
European Journal of Neuroscience; 19:2377-2387

Van Praag H, Kempermann G, Gage FH (1999)

Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus
Nature Neuroscience; 2:266-270

- 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
Journal of Neuroscience; 25:8680-8685
- Vega CJ, Peterson DA (2005)**
Stem cell proliferative history in tissue revealed by temporal halogenated thymidine analog discrimination
Nature Methods; 2(3): 167-169
- Ventura RE, Goldman JE (2007)**
Dorsal Radial Glia Generate Olfactory Bulb Interneurons in the Postnatal Murine Brain
Journal of Neuroscience; 27:4297-4302
- 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
European Journal of Neuroscience; 16:1681-1689
- Winner B, Geyer M, Couillard-Despres S, Aigner R, Bogdahn U, Aigner L, Kuhn G, Winkler J (2006)**
Striatal deafferentation increases dopaminergic neurogenesis in the adult olfactory bulb
Experimental Neurology; 197:113-121
- Winocur G, Wojtowicz M, Sekeres M, Snyder JS, Wang S (2006)**
Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function
Hippocampus; 16:296-304
- Wolters ECH, Francot C, Bergmans P, Winogrodzka A, Booij J, Berendse HW, Stoof JC (2000)**
Preclinical (premotor) Parkinson's disease
Journal of Neurology; 247 (Suppl 2):103-109
- Yamaguchi M, Saito H, Suzuki M, Mori K (2000)**
Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-GFP transgenic mice
Neuroreport; 11:1991-1996
- Yamamoto S, Yamamoto N, Kitamura T, Nakamura K, Nakafuku M (2001)**
Proliferation of Parenchymal Neural Progenitors in Response to Injury in the Adult Rat Spinal Cord
Experimental Neurology; 172:115-127

Zhao C, Deng W, Gage FH (2008)

Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis
Cell; 132: 645-660

Zhu XJ, Hua Y, Jiang J, Zhou QG, Luo CX, Han X, Lu YM, Zhu DY (2006)

Neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide inhibits neurogenesis in the adult dentate gyrus by downregulating cyclic AMP response element binding protein phosphorylation
Neuroscience; 141:827-836

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
Molecular and Cellular Neuroscience; 11:234-245

Zimmerman L, Parr B, Lendahl U, Cunningham M, McKay R, Gavin B, Mann J, Vassileva G, McMahon A (1994)

Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors
Neuron; 12:11-24

IX. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken die mir mein Studium und meine akademische Ausbildung ermöglichten. Trotz teilweise großer Entfernung waren sie mir immer nahe und haben mich bei der Verfolgung meine beruflichen und privaten Ziele ausnahmslos unterstützt.

Bei dem Prozess und der Anfertigung dieser Arbeit wurde ich von vielen weiteren Personen unterstützt, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Mein besonderer Dank gilt:

Meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. Günter Höglinger für die Bereitstellung des Themas, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die zu jederzeit sehr freundliche und kompetente Unterstützung.

Meinen beiden Betreuern Dr. Andreas Borta und Dr. Oscar Arias-Carrión. Andreas danke ich für die von Anfang an andauernde, geduldige und fortwährende Mitarbeit und die freundschaftliche Begleitung ohne die das Projekt nicht möglich gewesen wäre. Oscar danke ich, für die gerade zu Ende des Projektes aktive Mitwirkung bei der Immunhistologie, der Mikroskopie und Fertigstellung der Bilder.

Dr. Depboylu, Sabine Anfimov und Silke Caspari für die Einweihung in die Kunst der Immunhistologie und Gewebeaufarbeitung sowie die Bereitschaft mich von ihrem reichhaltigen Erfahrungsschatz profitieren zu lassen.

Sämtlichen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe „experimentelle Neurologie“ für die Zusammenarbeit und die gute Stimmung im Labor sowie allen Mitarbeitern des Biomedizinischen Forschungszentrum Marburg für die Bereitstellung der nötigen Infrastruktur und der reibungslosen Haltung und Pflege der Tiere.

Meiner alten WG, Christian, Georg und Arne für die Geduld, die Unterstützung und auch die nötige Ablenkung in schwereren Zeiten.

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

Und Angela für die, die Sie ist.

X. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Topographie der dopaminergen Innervation adulter Neurogenese: *postmortem* Tracing-Studie in Ratten und Mäusen“ unter Leitung von PD Dr. Höglinger mit Unterstützung durch Dr. A. Borta und Dr. O. Arias-Carrión ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in dieser Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Berlin, den

Bastian Ipach