

Aus dem
Medizinischen Zentrum für Nervenheilkunde
Klinik für Neurologie
Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. L. Timmermann
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Dopaminerge Stammzellen im rostralen Migrationsstrom der Maus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin (Dr. med.)
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Corinna Heidi Rüschoff-Steiner

(geb. Steiner)

aus Schwalmstadt

Marburg, 2020

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
11.09.2020

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Herr Prof. Dr. Helmut Schäfer
Referent: Herr Prof. Dr. Günter Höglinger
1. Korreferent: Herr Prof. Dr. Michael Bette

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VII
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	XII
1 Einleitung.....	1
1.1 Stammzellen	1
1.1.1 Embryonale Stammzellen.....	1
1.1.2 Adulte Stammzellen	2
1.1.2.1 Neurale Stammzellen	3
1.2 Geschichte der adulten Neurogenese	5
1.3 Neurogene Nischen	6
1.3.1 Regulation der adulten Neurogenese.....	8
1.4 SVZ-RMS-BO-System	13
1.4.1 Aufbau, zelluläre Zusammensetzung und Neurogenese der SVZ.	14
1.4.2 Zellmigration im RMS	18
1.4.3 Differenzierung, Integration und Absterben von Interneuronen im BO	20
1.4.4 Humanes SVZ-RMS-BO-System	24
1.5 Subgranuläre Zone	26
1.6 Parkinson-Syndrom: Epidemiologie, Ätiologie, Symptomatik, Diagnostik.....	27
1.7 Behandlung des idiopathischen Parkinson-Syndroms.....	33
1.7.1 Medikamentöse Therapie.....	33
1.7.2 Stammzelltherapie.....	35
1.7.2.1 Humane embryonale Stammzellen.....	36
1.7.2.2 Fetale neurale Stammzellen.....	37
1.7.2.3 Induzierte pluripotente Stammzellen	38

1.7.2.4	Direkt induzierte dopaminerge Neurone	41
1.6	Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit	43
2	Material und Methoden	44
2.1	Material	44
2.1.1	Chemikalien.....	44
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	45
2.1.3	Geräte	47
2.1.4	Puffer und Lösungen	48
2.1.5	Antikörper	50
2.1.6	Versuchstiere	52
2.2	Methoden.....	52
2.2.1	Versuchsaufbau/experimentelles Design	52
2.2.2	Herstellung der physikalischen Barriere	54
2.2.3	Implantation der physikalischen Barriere.....	54
2.2.4	Implantation der osmotischen Minipumpe und AraC-Applikation ..	55
2.2.5	BrdU-Applikation	57
2.2.6	Transkardiale Perfusion	58
2.2.7	Gewebepräparation, Nachfixierung, Dehydrierung.....	58
2.2.8	Herstellung von Gewebeschnitten.....	59
2.2.9	Immunhistochemie	59
2.2.9.1	DAB-Immunhistochemie.....	60
2.2.9.2	Fluoreszenz-Immunhistochemie.....	61
2.2.10	Lichtmikroskopie und Stereologie.....	64
2.2.11	Konfokalmikroskopie	65
2.2.12	Statistik.....	66
3	Ergebnisse.....	67
3.1	BrdU+-Zellen in der SVZ.....	67

3.2	BrdU+-Zellen im BO	68
3.2.1	BrdU+-Zellen in der PGL des BO	69
3.2.2	BrdU+-Zellen in der GCL des BO	70
3.3	Phänotypisierung BrdU+-Zellen in der PGL des BO	73
3.3.1	Koexpression von NeuN in BrdU+-Zellen der PGL des BO	73
3.3.2	Koexpression von TH in BrdU+-Zellen der PGL des BO	74
3.4	Apoptoserate in der PGL des BO	76
3.5	TH-Färbung in der PGL des BO	78
3.5.1	TH+-Neurone in der PGL des BO	78
4	Diskussion	80
4.1	Blockierung der Abwanderung von Neuroblasten aus der SVZ	80
4.2	Lokalisation dopaminerger Stammzellen im RMS	81
4.3	Regionalisierung von NSCs	86
4.4	Ausblick: Neue Quellen für die Stammzelltherapie des Morbus Parkinson	87
5	Zusammenfassung	91
6	Summary	93
	Literaturverzeichnis	95
	Anhang	125
a.	Verzeichnis der akademischen Lehrer	125
b.	Danksagung	126
c.	Publikation	127

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
AK	Antikörper
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
ANOVA	Analysis of Variance
AraC	Cytosine β-D-Arabinofuranoside Hydrochloride, Cytosin-β-D-Arabinofuranosid, Cytarabin
ASCL1	Achaete-Scute Homolog 1
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BLBP	Brain Lipid-Binding Protein
BO	Bulbus olfactorius, olfaktorischer Bulbus
BrdU	5'-Bromo-2'-Deoxyuridin, Bromodeoxyuridin
BrdU+	Bromodeoxyuridin-positiv
CalB	Calbindin
CalB+	Calbindin-positiv
CalR	Calretinin
CalR+	Calretinin-positiv
CD34+	Cluster of Differentiation 34-positiv
c-Myc	Avian Myelocytomatosis Virus Oncogene Cellular Homolog
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CTSB	Cathepsin B
DA	Dopamin
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
DAT	Dopamin-Transporter
DAT-SPECT	Dopamin-Transporter-Single-Photon-Emissions-Computertomographie
DCX	Doublecortin
diDNs	Directly Induced Dopaminergic Neurons, direkt induzierte dopaminerge Neurone

Dlx2	Distal-Less Homeobox 2
dUTPs	Deoxyuridine Triphosphate
EGF2	Epidermal Growth Factor 2
et al.	Et altera
etc.	Et cetera
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2
FGF8	Fibroblast Growth Factor 8
FGF20	Fibroblast Growth Factor 20
fNSCs	Fetal Neural Stem Cells, fetale neurale Stammzellen
g	Gramm
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GC	Granular Cells, granuläre Zellen
GCL	Granular Cell Layer, Granulärzellschicht, Stratum granulosum
GDNF	Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor
GFAP	Glial Fibrillary Acid Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
GLAST	Glutamate Aspartate Transporter
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HB-EGF	Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-Like Growth Factor
HCl	Salzsäure
hESCs	Human Embryonic Stem Cells, humane embryonale Stammzellen
hNGF	Human Nerve Growth Factor
hONPs	Human Adult Olfactory Epithelial-Derived Neural Progenitors
Hu/cD	ELAV-Like Neuronal RNA-Binding Proteins
IGF-1	Insulin-Like Growth Factor-1
IHC	Immunhistochemie
Inc.	Incorporated (im Handelsregister eingetragenes Unternehmen, USA)
i.p.	Intraperitoneal
IPL	Interne plexiforme Schicht
IPS	Idiopathisches Parkinson-Syndrom

iPSCs	Induced Pluripotent Stem Cells, induzierte pluripotente Stammzellen
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
Klf4	Krüppel-Like Factor 4
LBs	Lewy-Bodies
LNs	Lewy-Neuriten
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin, Levodopa
LNs	Lewy-Neuriten
LGE	Lateral Ganglionic Eminences, lateraler Ganglien Hügel
M	Mol
MAO	Monoaminoxidase
MAO-B	Monoaminoxidase-B
Mash1	Achaete-Scute Complex-Like 1
Min	Minute
mg	Milligramm
MGE	Medial Ganglionic Eminences, medialer Ganglien Hügel
MI	Mitralzellschicht, Stratum cellularum mitralium
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
mRNA	Messenger-RNA
MT1-MMP	Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NeuN	Neuronales nukleäres Antigen
NeuN+	Neuronales nukleäres Antigen-positiv
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NPCs	Neural Progenitor Cells, neurale Progenitorzellen
NPY	Neuropeptid Y

NSCs	Neural Stem Cells, neurale Stammzellen
Oct4	Octamer-Binding Transcription Factor 4
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
ONL	Olfactory Nerve Layer, olfaktorische Nervenzellschicht
OPL	Externe plexiforme Schicht, Stratum moleculare
PACAP	Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide
Pax 6	Paired Box 6
PhB	Phosphate Buffer, Phosphatpuffer
PB	Physical Barrier, physikalische Barriere
PBS	Phosphate Buffer Solution, Phosphatpufferlösung
PEDF	Pigment Epithelium-Derived Factor
PFA	Paraformaldehyd
PGC	Periglomerular Cells, periglomeruläre Zellen
PGL	Periglomerular Cell Layer, periglomeruläre Zellschicht, Stratum glomerulosum
PSA-NCAM	Polysialic Acid-Neural Cell Adhesion Molecule
RA	Retinoic Acid, Retinoinsäure
REM	Rapid Eye Movement
RMS	Rostral Migratory Stream, rostraler Migrationsstrom
ROI	Region of Interest
ROS	Reactive Oxygen Species, reaktive Sauerstoffspezies
SEM	Standard Error of the Mean
SEZ/RC	Markkern, Körnerzellschicht
SGZ	Subgranuläre Zone
SHH	Sonic Hedgehog
SN	Substantia nigra
SNpc	Substantia nigra pars compacta
Sox2	Sex Determining Region Y-Box 2
S-Phase	Synthese-Phase
SVZ	Subventrikuläre Zone
TdT	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase
TH	Tyrosinhydroxylase
TH+	Tyrosinhydroxylase-positiv
TUNEL	TdT-Mediated dUTP-Biotin Nick End Labeling

TUNEL+	TdT-Mediated dUTP-Biotin Nick End Labeling-positiv
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Wnt1	Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 1
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abbildung 1:** Einteilung und Entwicklung von Stammzellen.
- Abbildung 2:** Schematische Darstellung der neurogenen Nischen und des SVZ-RMS-BO-Systems der Maus.
- Abbildung 3:** Schematischer Aufbau der SVZ.
- Abbildung 4:** Schematische Darstellung der neuronalen Stammzellentwicklung im SVZ-RMS-BO-System adulter Säugetiere.
- Abbildung 5:** Histologischer Aufbau des BO der Maus (links Nissl-Färbung, rechts schematische Darstellung).
- Abbildung 6:** Schematische Übersicht der Integration neu entstandener Interneurone in den BO.
- Abbildung 7:** Schematische Übersicht möglicher Quellen dopaminerger Stammzellen.
- Abbildung 8:** Versuchsaufbau mit Darstellung des zeitlichen Verlaufs und der Durchführung der Tierversuche.
- Abbildung 9:** Illustration eines Sagittal- und Koronarschnittes des Gehirns einer Maus mit eingezeichneter physikalischer Barriere und AraC-Minipumpe.
- Abbildung 10:** Gehirn einer Maus der Experimentalgruppe.
- Abbildung 11:** Prozentuale Darstellung der BrdU+-Zellen in der SVZ bezogen auf die linke Seite der Kontrolltiergruppe Tag 105 als 100%-Referenz.
- Abbildung 12:** Prozentuale Darstellung der BrdU+-Zellen in der PGL des BO bezogen auf die linke Seite der Kontrolltiergruppe Tag 105 als 100%-Referenz.
- Abbildung 13:** Prozentuale Darstellung BrdU+-Zellen in der GCL des BO bezogen auf die linke Seite der Kontrolltiergruppe Tag 105 als 100%-Referenz.
- Abbildung 14:** Darstellung BrdU+-Neurone in einer Immunfluoreszenzfärbung der GCL des BO der Experimentalgruppe Tag 105 und Kontrollgruppe Tag 105.

- Abbildung 15:** Dreifach-Immunfluoreszenzfärbung (TH, BrdU, NeuN) der PGL und GCL des BO der Experimentalgruppe Tag 105.
- Abbildung 16:** Prozentualer Anteil der BrdU+-Zellen mit einer Koexpression von NeuN in der PGL des BO der Experimentalgruppe Tag 105 und Kontrollgruppe Tag 105.
- Abbildung 17:** Anteil der BrdU+-Zellen mit Koexpression von TH in der PGL des BO.
- Abbildung 18:** Dreifach-Immunfluoreszenzfärbung (TH, BrdU, NeuN) der PGL des rechten BO der Experimentalgruppe Tag 105.
- Abbildung 19:** Prozentuale Darstellung TUNEL+-Zellen in der PGL des BO mit 100%-Referenz der linken Seite der Kontrollgruppe.
- Abbildung 20:** TUNEL-Immunfluoreszenzfärbung der PGL des rechten BO der Experimentalgruppe Tag 105.
- Abbildung 21:** Prozentuale Darstellung TH+-Zellen der PGL des BO bezogen auf die linke Seite der Kontrollgruppe Tag 105 als 100%-Referenz.
- Abbildung 22:** Lichtmikroskopische Darstellung einer immunhistochemischen TH-Färbung (DAB-IHC) der PGL des rechten BO.
- Abbildung 23:** Herkunft granulärer und periglomerulärer Interneurone des BO.
-
- Tabelle 1:** Übersicht der verwendeten Chemikalien.
- Tabelle 2:** Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien.
- Tabelle 3:** Übersicht der verwendeten Geräte und Software.
- Tabelle 4:** Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen.
- Tabelle 5:** Übersicht der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper.
- Tabelle 6:** Protokoll der immunhistochemischen DAB-Färbung.
- Tabelle 7:** Übersicht der verwendeten Fluoreszenz-Farbstoffe.
- Tabelle 8:** Protokoll der Dreifach-Färbung (TH, BrdU, NeuN).

1 Einleitung

1.1 Stammzellen

Stammzellen zeichnen sich durch die Eigenschaft aus, sich immer wieder selbst erneuern zu können, ohne dabei auszureifen. Dieser Vorgang beruht auf dem Mechanismus der symmetrischen Replikation. Hierbei führt die Zellteilung einer Stammzelle zur Entstehung einer genetisch identischen Tochterzelle, welche ebenfalls Stammzelleigenschaften besitzt. Eine weitere Charakteristik von Stammzellen ist, dass aus ihnen Progenitorzellen verschiedener Zelllinien hervorgehen können. Bei diesem Vorgang kommt ihre Fähigkeit der asymmetrischen Replikation zum Tragen. Dies bedeutet, dass bei jeder Zellteilung einer Stammzelle eine der beiden gebildeten Zellen eine Kopie der Mutterzelle entspricht und selbst erneut als Stammzelle dient, während die andere Zelle weiter ausdifferenziert und durch mitotische Teilung nur noch Zellen ihrer eigenen, bereits determinierten Zelllinie bilden kann (Potten and Loeffler, 1990; Qian et al., 1998; Weissman, 2000). Generell können embryonale von adulten Stammzellen unterschieden werden (Hadjantonakis and Papaioannou, 2001). Die Stammzellbiologie ist ein heute intensiv beforschtes Gebiet, in welches große Hoffnungen bezüglich Behandlung und Heilung von Krankheiten gesetzt werden. Ziel der Stammzellforschung ist es, Stammzellen eines Tages zur Regeneration von menschlichem Gewebe einsetzen zu können und damit langfristig einen kurativen Ansatz für bis dato unheilbare Krankheiten zu erschaffen. Dieser Arbeitsbereich wird als regenerative Medizin bezeichnet (Fuchs and Segre, 2000; Weissman et al., 2001; Lerou and Daley, 2005).

1.1.1 Embryonale Stammzellen

Aus der Befruchtung einer Oozyte durch ein Spermium geht die Zygote hervor, welcher nach Erreichen des 2-, 4-, und 8-Zell-Stadiums schließlich die Entwicklung von Morula und Blastozyste folgt. Man geht davon aus, dass die enthaltenen Zellen etwa bis zum 8-Zell-Stadium totipotent sind. Totipotente Zellen sind noch derart undifferenziert und vielfältig in ihrer Entwicklungsfähigkeit, dass sie durch die Bildung von Zellen aller drei Keimblätter, Endo-, Ekto- und Mesoderm, ein komplettes Lebewesen

hervorbringen können. Ab dem vierten bis fünften Entwicklungstag hat die befruchtete Eizelle das Blastozysten-Stadium erreicht, welches einer Anhäufung von mehreren hundert Zellen entspricht (Schiebler, 2005). Die initial totipotenten Stammzellen haben sich in diesem Stadium zu pluripotenten Stammzellen weiterentwickelt, welche im Inneren der Blastozyste, dem Embryoblast, zu finden sind (siehe Abbildung 1). Diese pluripotenten Stammzellen zeichnen sich dadurch aus, zu allen Geweben des menschlichen Körpers ausdifferenzieren, jedoch kein komplettes Individuum mehr hervorbringen zu können (Martin, 1981). *In vitro* können embryonale Stammzellen sowohl in undifferenzierten Zelllinien gehalten werden, es besteht jedoch auch die Möglichkeit, ihre Entwicklung hin zu einer bestimmten Zelllinie zu induzieren (Evans and Kaufman, 1981; Hadjantonakis and Papaioannou, 2001; Murray and Edgar, 2001). Im Jahr 2003 zeigten Hubner und Kollegen, dass in Zellkultur transferierte embryonale Stammzellen der Maus auch fähig sind, Oozyten zu bilden (Hubner et al., 2003). Pluripotente Stammzellen entsprechen den eigentlichen embryonalen Stammzellen. Sie sind im Gegensatz zu totipotenten Zellen zur ständigen Selbsterneuerung fähig, was auf die Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren zurückgeführt wird (Cavaleri and Scholer, 2003; Sato et al., 2004). Generell ist die Entnahme pluripotenter Stammzellen aus der Blastozyste ethisch hochumstritten, da die Blastozyste hierbei zerstört wird.

1.1.2 Adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen kommen in vielen Geweben postnataler und adulter Säugetiere als multipotente Stammzellen vor. Als hämatopoetische Stammzellen sind sie im Knochenmark, als Gewebestammzellen unter anderem in Gastrointestinaltrakt, Gehirn, Kornea, Haut, Nabelschnur und Nabelschnurblut zu finden (Dua and Azuara-Blanco, 2000; Lavker and Sun, 2000; Watt and Hogan, 2000; Marshman et al., 2002; Alonso and Fuchs, 2003; Dziasko and Daniels, 2016). Multipotente adulte Stammzellen haben im Vergleich zu embryonalen Stammzellen ihre Pluripotenz verloren. Sie weisen ihnen gegenüber eine eingeschränkte Differenzierungskapazität auf und sie sind gewebespezifisch (Hadjantonakis and Papaioannou, 2001). Auch adulte multipotente Stammzellen sind zur Selbstregeneration fähig, aber in einem

wesentlich geringeren Ausmaß als pluripotente embryonale Stammzellen (Potten and Loeffler, 1990).

1.1.2.1 Neurale Stammzellen

Neurale Stammzellen (NSCs) stellen eine gewebespezifische Subgruppe der adulten Stammzellen dar und gehören zur Gruppe der astroglialen Zellen (Lim and Alvarez-Buylla, 2016). Die Entdeckung der NSCs durch Joseph Altman geht auf die frühen 1960er Jahre zurück (Altman, 1962; Altman and Das, 1965b). Anfang der 1990er Jahre wurden NSCs aus dem Gehirn embryonaler Mäuse entnommen und es gelang erstmals eine Anzucht und Vermehrung selbstregenerierender Kulturen *in vitro* (Reynolds et al., 1992; Richards et al., 1992; Morshead et al., 1994; Weiss et al., 1996). Später gelang dies auf Zellkulturebene auch mit NSCs des adulten Gehirns aus verschiedenen anderen Hirnregionen wie Subventrikulärzone, Hippocampus, Neocortex, Striatum, Amygdala sowie Substantia nigra (SN) (Reynolds and Weiss, 1992; Morshead et al., 1994; Doetsch et al., 1999a; Doetsch et al., 1999b; Laywell et al., 2000; Gould, 2007). Es gibt jedoch nach heutigen Erkenntnissen im Gehirn von Säugetieren nur zwei Orte, an welchen NSCs auch im postnatalen beziehungsweise adulten Stadium *in vivo* noch zur Proliferation fähig sind: Dies ist zum einen die subventrikuläre Zone (SVZ) im Vorderhirn und zum anderen die subgranuläre Zone (SGZ) des hippocampalen Gyrus dentatus (Doetsch et al., 1999a; Taupin and Gage, 2002). In SVZ und SGZ entstehen aus NSCs neurale Progenitorzellen (NPCs), welche sich weiter in Neurone oder Gliazellen differenzieren (Gage, 2000). NSCs sind undifferenzierte multipotente Zellen, welche zur ständigen Selbsterneuerung fähig sind. Aus ihnen können Tochterzellen entstehen, welche die identische genetische Information tragen wie sie selbst und somit von ihnen nicht zu differenzieren sind. Früheste Vorläufer der NSCs im sich entwickelnden embryonalen Gehirn stellen neuroepitheliale Stammzellen dar. Aus ihnen geht die Radialglia hervor, welche weiter zu Astrozyten ausreift. Eine spezielle Subgruppe von Astrozyten fungiert im adulten Gehirn als NSCs (Lois and Alvarez-Buylla, 1993; Doetsch et al., 1999a). Sowohl von der Radialglia als auch von Astrozyten können durch Proliferation Gliazellen und Neurone abstammen (Frederiksen et al., 1988; McKay, 1997; Aguirre and Gallo, 2004). Hieraus wird deutlich, dass die

Grenzen zwischen glialen und neuronalen Zelllinien fließend sind und keiner strikten Trennung unterliegen, wie dies noch vor einigen Jahren angenommen wurde (Alvarez-Buylla et al., 2001; Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009).

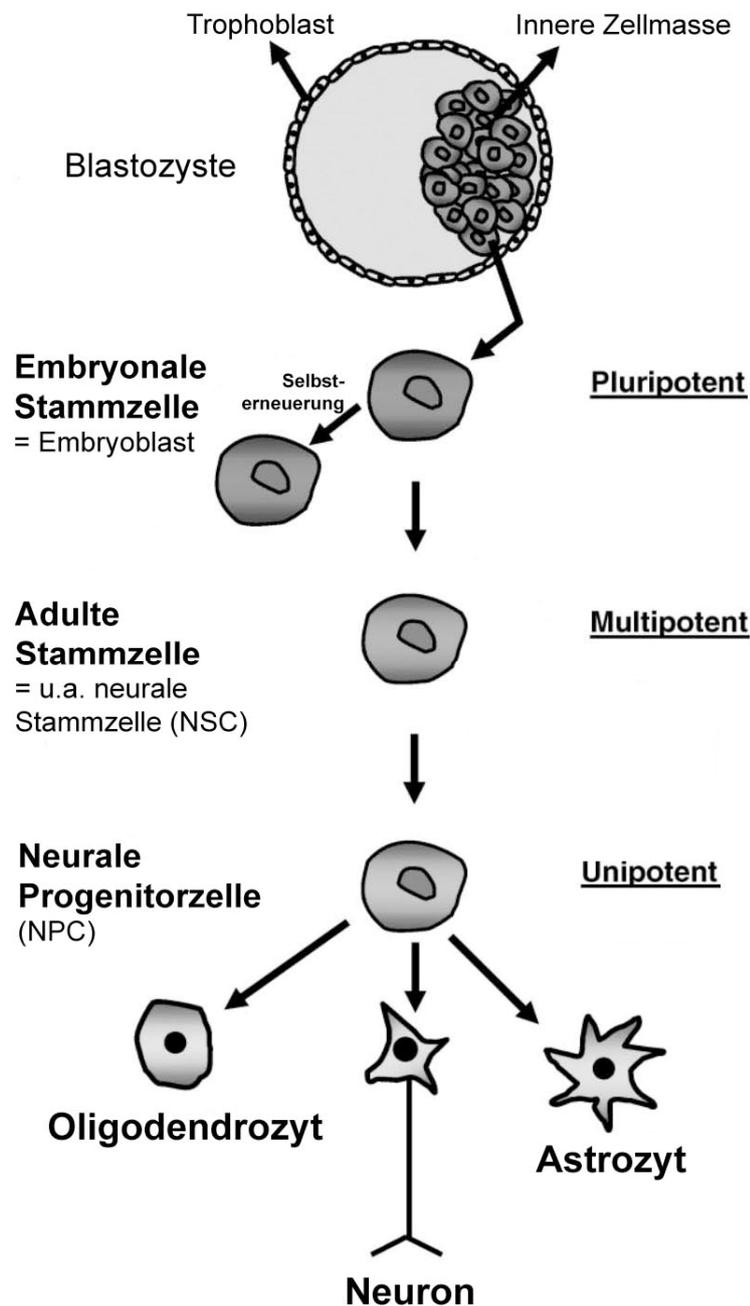


Abbildung 1: Einteilung und Entwicklung von Stammzellen.

Aus der totipotenten Zygote (nicht abgebildet) entwickelt sich die Blastozyste, die aus pluripotenten embryonalen Stammzellen besteht. Diese Zellen sind zur symmetrischen Replikation (Selbsterneuerung ohne Ausreifung) fähig und können zu allen Geweben des menschlichen Körpers ausdifferenzieren. Die multipotente adulte Stammzelle ist gewebespezifisch (zum Beispiel neurale Stammzellen (NSCs) im Gehirn) und hat nur noch eine eingeschränkte Differenzierungsfähigkeit. Aus neuronalen Progenitorzellen (NPCs) entwickeln sich die ausdifferenzierten Neurone und Gliazellen des Gehirns (modifiziert nach Nandoe Tewarie et al., 2009).

1.2 Geschichte der adulten Neurogenese

„But the functional specialization of the brain imposed on the neurones two great lacunae; proliferative inability and irreversibility of intraprotoplasmatic differentiation. It is for this reason that, once the development was ended, the founts of growth and regeneration of the axons and dendrites dried up irrevocably.”
Cajal (1913-14)

Santiago Ramón y Cajal (1852-1934) gilt heute aufgrund seiner umfangreichen und für damalige Zeiten sehr fortschrittlichen Studien zur Mikroarchitektur sowie zur De- und Regeneration des Nervensystems als Begründer der modernen Neurowissenschaften. Gleichzeitig wird er als der meist zitierte Neurowissenschaftler aller Zeiten gesehen (Cowan, 1989). Bereits im Jahre 1913/14 verwendete Santiago Ramón y Cajal den Begriff der „neuronalen Plastizität“. Er ging davon aus, dass das Gehirn unter bestimmten Bedingungen zu einem gewissen Grad der Anpassung und Regeneration befähigt, zum Großteil jedoch als statisches Konstrukt anzusehen sei (Cajal, 1913-14). Diese Ansichten blieben über viele Jahre im Bereich der Neurowissenschaften bestehen. 1965 brachen Altman und Das mit dem Dogma der statischen Architektur des postnatalen Gehirns und fanden erste Hinweise auf die adulte Neurogenese im Gyrus dentatus des Hippocampus bei Ratten (Altman and Das, 1965a), zwei Jahre später auch bei Meerschweinchen (Altman and Das, 1967). Im Jahre 1969 konnte Altman die adulte Neurogenese schließlich auch im olfaktorischen Bulbus von Ratten nachweisen (Altman, 1969a). Die damals verwendete Methode der [3H]-Thymidin-Autoradiographie erlaubte jedoch keine Unterscheidung zwischen tatsächlichen Neuronen und Gliazellen und so postulierten einige Wissenschaftler, dass die neu entstandenen Zellen Gliazellen entsprächen (Rakic, 1985b, 1985a). Doch obwohl es Kaplan und Hinds 1977 gelang, die neugebildeten Zellen mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen eindeutig als Neurone zu identifizieren (Kaplan and Hinds, 1977) und eine zu Beginn der 1980er Jahre durchgeführte Studie an erwachsenen Kanarienvögeln den funktionellen Zusammenhang zwischen der adulten Neurogenese und dem Erlernen saisonaler Lieder aufzeigte (Goldman

and Nottebohm, 1983; Nottebohm, 1989), blieben anderen Forschern weiterhin Zweifel an den neuen Erkenntnissen. Rakic hielt es für unwahrscheinlich, dass die Ergebnisse auf Primaten und Menschen übertragbar seien. Er nahm hingegen an, dass sich das Gehirn von komplexeren Lebewesen im adulten Stadium sogar durch eine fehlende Produktion neuer Nervenzellen und somit besondere Stabilität auszeichne, um bestehende synaptische Verbindungen und daran gebundene Fähigkeiten nicht zu gefährden (Rakic, 1985b). Diese Einschätzung konnte jedoch im Verlauf widerlegt werden, denn 1998 erbrachte die Arbeitsgruppe um Eriksson mittels Bromodeoxyuridin (5'-Bromo-2'-Deoxyuridin, BrdU)-Markierung von Neuronen erstmals den immunhistochemischen Nachweis der adulten, lebenslang andauernden Neurogenese im humanen Hippocampus (Eriksson et al., 1998). Gould und Kollegen konnten diese im Jahr 1999 auch an Altweltaffen nachweisen, wobei sie zeigten, dass die hippocampale Neurogenese bei älteren Tieren im Vergleich zu Jungtieren geringer ausfiel (Gould et al., 1999a). Heute weiß man aus zahlreichen Studien, dass dem Gehirn von Säugetieren täglich tausende neue Neurone hinzugefügt werden (Kaplan and Bell, 1984; Gould, 2007).

1.3 Neurogene Nischen

Im Gehirn von Säugetieren bleiben unter physiologischen Bedingungen erwiesenermaßen zwei Gehirnregionen auch nach der Geburt ein Leben lang weiterhin zur Neubildung von Neuronen (Neurogenese) befähigt. Dies ist zum einen die SVZ der Seitenventrikel des Telencephalons und zum anderen die SGZ des Gyrus dentatus des Hippocampus (Altman, 1962; Kaplan and Hinds, 1977; Kaplan and Bell, 1984; Alvarez-Buylla and Temple, 1998; Alvarez-Buylla and Lim, 2004; Zhao et al., 2008). Beide Hirnregionen tragen entscheidend zur Plastizität des Gehirns von Säugetieren bei (Kempermann and Gage, 1999).

Es wird kontrovers diskutiert, ob Neurogenese auch in anderen Regionen des zentralen Nervensystems von Säugetieren, wie zum Beispiel dem Neocortex (Gould et al., 1999b; Palmer et al., 1999; Rakic, 2002), dem Striatum (Palmer et al., 1995), der SN (Lie et al., 2002), der Amygdala (Bernier et al., 2002), der Retina (Tropepe et al., 2000) oder dem Rückenmark (Shihabuddin et al., 1997) stattfinden kann. In jedem Fall konnte anhand der aufgeführten Studien gezeigt werden, dass Zellen mit den Eigenschaften von NSCs auch in nicht-

neurogenen Hirnregionen existent sind, hier jedoch vermutlich in einer inaktiven, ruhenden Form vorliegen (Gould, 2007). Nach dem Einbringen dieser Zellen in Zellkultur, nach Transplantation in neurogene Hirnregionen wie das fetale Gehirn oder die adulte SVZ oder SGZ sowie auch *in situ* nach Verletzungen können diese Zellen ihr neurogenes Potential aktivieren und als Stammzellen dienen (Richards et al., 1992; Laywell et al., 2000; Lie et al., 2004; Emsley et al., 2005). Eine Studie von Bhardwaj et al. aus dem Jahr 2006 konnte jedoch die Existenz einer relevanten neokortikalen Neurogenese bei erwachsenen Menschen nahezu vollständig ausschließen (Bhardwaj et al., 2006). Eine im Jahr 2014 erschienene Studie wies hingegen mit der Neurogenese im Striatum des adulten menschlichen Gehirns die Neuentstehung von Nervenzellen in einem primär nicht-neurogenen Hirnareal nach (Ernst et al., 2014).

Die SVZ und die SGZ werden gemeinsam als die „neurogenen Nischen“ des adulten Gehirns bezeichnet (Garcia-Verdugo et al., 2002; Doetsch, 2003). In beiden Hirnregionen herrscht ein spezielles Mikromilieu, welches für die Proliferation von NSCs entscheidend zu sein scheint. Die Stammzellen sind in dieser speziellen Umgebung unterschiedlichen Faktoren ausgesetzt, welche ihre Differenzierung und Integration unterstützen (Richards et al., 1992; Ma et al., 2005). Ependymzellen, Blutgefäße und axonale Innervation scheinen unter anderem das spezielle Milieu der neurogenen Nischen zu fördern (Doetsch, 2003; Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). In den letzten Jahren zeigte sich ein rasant anwachsendes Wissen über die Komplexität der ineinandergreifenden Faktoren, welche die neurogenen Nischen ausmachen und zur Proliferation von NSCs beitragen (Lim and Alvarez-Buylla, 2016).

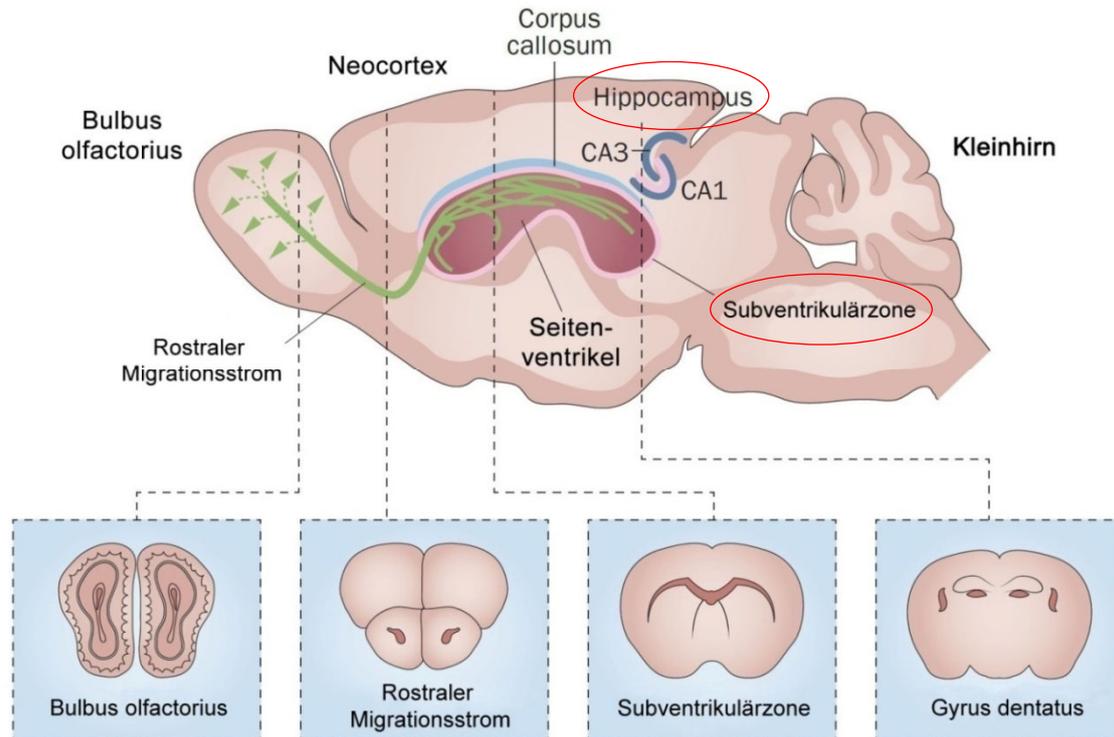


Abbildung 2: Schematische Darstellung der neurogenen Nischen und des SVZ-RMS-BO-Systems der Maus.

In dem Sagittalschnitt durch das Gehirn einer Maus kommen die beiden neurogenen Nischen im adulten Gehirn zur Darstellung. Diese befinden sich in der Subgranulärzone (SGZ) im Gyrus dentatus des Hippocampus und in der Subventrikulärzone (SVZ) im Bereich der Seitenventrikel (rote Umkreisungen). Des Weiteren ist der rostrale Migrationsstrom (RMS) (Darstellung in grün) zu sehen, der als Wanderungspfad dient, über welchen die neugebildeten Neurone aus der SVZ in den Bulbus olfactorius (BO) gelangen. Dort angekommen verlassen die jungen Nervenzellen den RMS und begeben sich zur ihrer Endposition im BO.

Im unteren Bereich der Abbildung sind die jeweiligen anatomischen Positionen von BO, RMS, SVZ und SGZ im Koronarschnitt dargestellt (modifiziert nach Ziegler et al., 2015).

1.3.1 Regulation der adulten Neurogenese

Verschiedene Neurotransmitter sind an der Regulation der adulten Neurogenese beteiligt. Während Serotonin und Glutamat sowohl die Überlebensrate von NSCs erhöhen als auch deren Proliferation in SVZ und SGZ steigern (Brezun and Daszuta, 1999; Banasr et al., 2004; Brazel et al., 2005; Schlett, 2006; Hitoshi et al., 2007), wirken sich Opiode und Stickstoffmonoxid (NO) hemmend auf die Neurogenese aus (Eisch et al., 2000; Moreno-Lopez et al., 2004; Torroglosa et al., 2007). Auch der Neurotransmitter Gamma-Aminobuttersäure (GABA) hat eine entscheidende Bedeutung für Proliferation, Migration und Genexpression der neuronalen Vorläuferzellen

(Platel et al., 2008; Sibbe and Kulik, 2016). Die Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren führt zu einer GABA-abhängigen Depolarisation. Dadurch kommt es sowohl zu einer Hemmung der Zellproliferation mit nachfolgender Reduktion der Anzahl von NSCs (Liu et al., 2005; Fernando et al., 2011) als auch zu einer Hemmung der neuronalen Differenzierung mit daraus resultierender Abnahme der Anzahl proliferierender Neuroblasten (Nguyen et al., 2003). GABA verlangsamt außerdem die Migrationsgeschwindigkeit von Neuroblasten (A-Zellen) in der anterioren SVZ und im rostralen Migrationsstrom (RMS) (Bolteus and Bordey, 2004).

Aus der SVZ entnommene NCSs können *in vitro* mit Hilfe des Wachstumsfaktors EGF2 (Epidermal Growth Factor 2), FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2) oder einer Kombination beider Faktoren vermehrt werden (Palmer et al., 1995; Weiss et al., 1996; Gritti et al., 1999; Temple and Alvarez-Buylla, 1999). *In vivo* führen beide Faktoren zu einer Proliferation der SVZ, jedoch resultiert nur FGF2 auch in einer tatsächlichen Zunahme von neugebildeten Neuronen im Bulbus olfactorius (BO), während EGF2 allein deren Anzahl im BO reduziert (Kuhn et al., 1997). Auch die nasale Applikation der Wachstumsfaktoren FGF2 und HB-EGF (Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-Like Growth Factor) führt zu einer gesteigerten Neurogenese (Jin et al., 2003b). Zigova et al. konnten im Jahr 1998 zeigen, dass durch Infusion des Faktors BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) in die Seitenventrikel des Gehirns adulter Ratten die Anzahl BrdU-positiver (BrdU+) Zellen im BO gesteigert werden kann (Zigova et al., 1998). In einer neueren Publikation aus dem Jahr 2008 waren diese Ergebnisse an adulten Mäusen und Ratten hingegen nicht reproduzierbar (Galvao et al., 2008). Auch die Infusion von CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor) (Emsley and Hagg, 2003), GDNF (Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor) und IGF-1 (Insulin-Like Growth Factor-1) (Dempsey et al., 2003) in die Seitenventrikel steigert die Anzahl BrdU+-Neurone in der SVZ. PEDF (Pigment Epithelium-Derived Factor) erhöht *in vivo* die Teilungsrate der sich langsam teilenden NSCs, *in vitro* war eine erhöhte Selbsterneuerungsrate der adulten NSCs zu beobachten (Ramirez-Castillejo et al., 2006). Auch VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) hat sowohl *in vivo* als auch *in vitro* einen stimulierenden Einfluss auf die Neurogenese (Jin et al., 2002). Es wird angenommen, dass dieser Effekt mit einer durch VEGF

induzierten vermehrten Angiogenese in Zusammenhang steht (Palmer et al., 2000; Louissaint et al., 2002; Greenberg and Jin, 2005). VEGF wird von Astrozyten in der SVZ und im RMS produziert (Balenci et al., 2007). Lim und Alvarez-Buylla konnten im Jahr 1999 zeigen, dass sich der direkte Kontakt zwischen aktiven Astrozyten der SVZ, welche den eigentlichen NSCs entsprechen, mit ruhenden, nicht zur Proliferation vorgesehenen Astrozyten günstig auf die Proliferationsraten der NSCs auswirkt (Lim and Alvarez-Buylla, 1999). In einer aktuellen Publikation konnten Ribeiro Xavier und Kollegen erstmals *in vivo* zeigen, dass in der SVZ und im RMS spezialisierte Mikrogliazellen lokalisiert sind, welche über die Sekretion von Zytokinen (Interleukin 4, 6 und 10) entscheidend die Migration und das Überleben neuronaler Vorläuferzellen fördern (Ribeiro Xavier et al., 2015).

Auch Hormone beeinflussen die Neurogenese auf unterschiedliche Weise. Kortikosteroide führen *in vitro* zu einer verminderten Bildung von Neurosphenen adulter NSCs (Hitoshi et al., 2007). Eine Behandlung mit hochdosierten Kortikosteroiden senkt die neuronale Proliferationsrate im Gyrus dentatus des Hippocampus bei Ratten, während eine Adrenalektomie bei den Tieren dort zu einer gesteigerten Neurogeneserate führt. Glukokortikoid-Gaben nach Adrenalektomie können die hippocampalen Neurone vor einem Adrenalektomie-induzierten Zelltod bewahren (Cameron and Gould, 1994). Pregnenolon-S aus der Gruppe der Neurosteroiden dient als Aktivator der hippocampalen Neurogenese (Mayo et al., 2005), ebenso das weibliche Geschlechtshormon Östrogen (Tanapat et al., 1999). Auch Schilddrüsenhormone stimulieren die Bildung und Entwicklung von NSCs in der SVZ (Fernandez et al., 2004). Für das Hormon Prolactin wurde nachgewiesen, dass es in der Schwangerschaft die Entstehung von NPCs in der SVZ weiblicher Mäuse fördert (Shingo et al., 2003). PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide) und NPY (Neuropeptid Y) aus der Gruppe der Neuropeptide haben ebenfalls einen steigernden Effekt auf die Neurogenese in der adulten SVZ (Mercer et al., 2004; Agasse et al., 2008), NPY außerdem auf die granulären Zellen des Gyrus dentatus des Hippocampus (Howell et al., 2005) und das Riechepithel von Ratten (Hansel et al., 2001).

Mit dem Alter nimmt die Neurogeneserate sowohl in der SVZ als auch im Hippocampus ab (Luo et al., 2006; Leuner et al., 2007; Tanaka et al., 2007),

kann jedoch durch körperliches Training zu einem gewissen Grad reaktiviert werden (van Praag et al., 2005). Generell wirkt sich körperliche Aktivität förderlich auf die hippocampale Neurogenese und das Lernverhalten von Mäusen aus (van Praag et al., 1999a; van Praag et al., 1999b) und reduziert Stress (Kannangara et al., 2011). Kobilko und Kollegen zeigten 2011, dass körperliches Training über erhöhte BDNF-Spiegel die adulte hippocampale Neurogenese ankurbelt (Kobilko et al., 2011). Eine aktuellere Studie unterstützt diese These, indem sie nachweist, dass Ausdauersport durch die Ausschüttung des Muskelproteins Cathepsin B (CTSB) eine erhöhte BDNF- und DCX (Doublecortin)-Expression induziert. Beim Menschen konnte ein Zusammenhang zwischen CTSB-Spiegeln im Blut, körperlicher Fitness und hippocampalem Gedächtnis nachgewiesen werden (Moon et al., 2016). Generell wirkt sich bei Nagern eine reizreiche Umgebung (Enriched Environment), zu welcher neben geeignetem Nest- und zusätzlichem Beschäftigungsmaterial auch eine geruchsreiche Umgebung sowie regelmäßige körperliche Aktivität zählt, vorteilhaft auf die Überlebensdauer hippocampaler Neurone und die Anzahl von Körnerzellen im Gyrus dentatus des Hippocampus aus. Folglich zeigt sich auch eine verbesserte Gedächtnisleistung (Nilsson et al., 1999; Bruel-Jungerman et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass das Volumen der Körnerzellschicht des Hippocampus von Tieren, welche in reizreicher Umgebung lebten, um etwa 15% größer war als bei Artgenossen, welche unter Standardbedingungen gehalten wurden (Kempermann et al., 1997).

Generell haben sowohl Geruchsempfindungen als auch sexuelle Signale einen modulierenden Einfluss auf die adulte Neurogenese. Während eine geruchsreiche Umgebung als ein Teilbereich einer reizreichen Umgebung die Neurogenese fördert (Rochefort et al., 2002), wirkt sich hingegen eine Geruchsdeprivation, zum Beispiel mittels nasaler Okklusion, hemmend auf die Neurogenese im BO adulter Mäuse aus (Corotto et al., 1994; Mandairon et al., 2006). Sexuelle Aktivität hingegen steigert die Anzahl neugebildeter Neurone im akzessorischen BO und im Hippocampus männlicher Ratten (Leuner et al., 2010; Portillo et al., 2012).

Hitoshi und Kollegen konnten in einem Mausmodell zeigen, dass sich chronischer Stress negativ auf die Neurogenese auswirkt und infolgedessen die

Anzahl der in der SVZ lokalisierten NSCs absinkt. Dieser Effekt wird auf die erhöhte Ausschüttung von Glukokortikoiden, welche, wie zuvor erläutert, einen antineurogenen Effekt haben, unter körperlichem und psychischem Stress zurückgeführt. Durch eine Behandlung mit Antidepressiva (Fluoxetin, Imipramin, Serotonin-Reuptake-Inhibitoren) ist dieser Prozess reversibel, wobei diese Medikamente allgemein zu einer Steigerung der Neurogeneserate führen (Hitoshi et al., 2007). Dieser Effekt ist unter anderem durch die Induktion von VEGF (Warner-Schmidt and Duman, 2007, 2008) sowie auch durch eine Aktivierung von Serotoninrezeptoren durch die Erhöhung von Serotonin im synaptischen Spalt zu erklären (Hitoshi et al., 2007). Stressreiche Lebensereignisse hingegen fördern die hippocampale Glutamatausschüttung, welche sich hemmend auf die Vorläuferzellen hippocampaler Körnerzellen auswirkt. Dies erklärt, dass dauerhafter Stress die Struktur des Gyrus dentatus langfristig verändern und dessen Funktion beeinträchtigen kann (Gould and Tanapat, 1999).

Eine aktuelle Studie aus dem Jahr 2019 zeigte, welche Auswirkungen soziale Isolation und eine reizarme Umgebung auf das menschliche Gehirn haben. Bei Teilnehmern einer 14-monatigen Polarexpedition konnte ein signifikanter Schrumpfungsprozess des hippocampalen Gyrus dentatus von 7,2% nachgewiesen werden, parallel kam es zu sinkenden BDNF-Spiegeln im Blut der Probanden sowie Einbußen in Kognitionstests betreffend des räumlichen Denkens und selektiver Aufmerksamkeit (Stahn et al., 2019).

Im Rahmen zerebraler pathologischer Veränderungen wie Ischämien, epileptischer Krampfanfälle oder fokaler Neurodegeneration ist die Neurogenese in der SVZ und SGZ gesteigert (Parent et al., 1997; Jin et al., 2001; Parent et al., 2002; Zhang et al., 2004). Die neugebildeten Neurone könnten als Zellersatz für geschädigte Hirnareale dienen (Liu et al., 1998; Romanko et al., 2004; Zhang et al., 2004). Im Jahr 2000 wurde erstmals gezeigt, dass durch apoptotische neuronale Degeneration die Differenzierung von NSCs hin zu ausgereiften Neuronen auch in normalerweise nicht-neurogenen Hirnregionen wie dem adulten Neocortex von Säugetieren induziert werden kann (Magavi et al., 2000). Maucksch et al. stellten fest, dass es nach Verletzungen des Gehirns durch sezernierte Faktoren wie IGF-1 zu einer Einwanderung von NPCs in die beschädigten Hirnregionen kommen kann

(Maucksch et al., 2013). Macas und Kollegen zeigten, dass das menschliche Gehirn prinzipiell bis ins hohe Lebensalter auf zerebrale Insulte mit einer gesteigerten Neurogenese in der SVZ reagiert (Macas et al., 2006). In einer Arbeit von Nakatomi und Kollegen wurde nachgewiesen, dass eine Regeneration pyramidalen Neurone des Hippocampus nach ischämischen Ereignissen mittels Rekrutierung endogener NSCs möglich ist, sich diese neugebildeten Neurone in das bestehende neuronale Netzwerk einfügen und auch funktionell zu einer Verbesserung bestehender neurologischer Defizite beitragen können (Nakatomi et al., 2002). Generell wird beobachtet, dass die Neurogenese unter pathologischen Bedingungen gesteigert ist (Fallon et al., 2000; Magavi et al., 2000; Nakatomi et al., 2002).

Aus all diesen neuen Erkenntnissen entstand mit der regenerativen Medizin die Idee, diesen Mechanismus gezielt für neuronale Reparaturvorgänge im zentralen Nervensystem nutzen zu können. Es muss jedoch einschränkend festgestellt werden, dass die tatsächliche endogene regenerative Kapazität des Gehirns aus heute noch unbekanntem Gründen limitiert und streng reguliert zu sein scheint (Magavi et al., 2000).

1.4 SVZ-RMS-BO-System

In der SVZ entstehen zeitlebens bis ins hohe Erwachsenenalter hinein (Altman, 1969a; Sturrock and Smart, 1980) sowohl neue Neurone als auch Gliazellen (Astrozyten und Oligodendrozyten) (Lois and Alvarez-Buylla, 1993; Kirschenbaum and Goldman, 1995; Taupin and Gage, 2002). Diese gehen aus NSCs (B-Zellen) hervor, welche in großer Anzahl entlang der lateralen Wände der Seitenventrikel zu finden sind (Mirzadeh et al., 2008; Ponti et al., 2013). Täglich werden in der SVZ von Mäusen circa 30.000 junge Nervenzellen gebildet, welche für den BO bestimmt sind und in diesen über den RMS einwandern (Lois and Alvarez-Buylla, 1994) (siehe Abbildung 2). Im BO angekommen differenzieren sich die jungen Neurone weiter in verschiedene Subtypen von Interneuronen, um sich anschließend in das bereits bestehende neuronale Netzwerk einzufügen (Luskin, 1993). Dieser Vorgang der Entstehung, Wanderung und Integration von Neuronen wurde bereits im Jahr 1969 erstmals von dem amerikanischen Neurobiologen Joseph Altman beschrieben (Altman, 1969b).

1.4.1 Aufbau, zelluläre Zusammensetzung und Neurogenese der SVZ

Die SVZ (Boulder Committee, 1970) ist eine dünne Zellschicht, welche an der lateralen Wand der beiden Seitenventrikel des Großhirns gelegen ist. Sie wird durch eine einlagige Schicht ependymaler Zellen von den inneren Liquorräumen der Seitenventrikel abgegrenzt. Im Gehirn adulter Säugetiere einschließlich des Menschen beinhaltet die SVZ den größten Pool sich teilender NSCs, sogenannter B-Zellen (Sanai et al., 2004; Curtis et al., 2007). Im Gehirn adulter Mäuse sind viele tausende NSCs über die Wände der Seitenventrikel verteilt (Mirzadeh et al., 2008; Ponti et al., 2013). Die SVZ entsteht während der Embryonalentwicklung im Bereich der medialen und lateralen Ganglienhügel (Altman and Bayer, 1995). Aufgrund ihrer proliferativen Aktivität und Position ist es wahrscheinlich, dass die adulte SVZ ein Überbleibsel der embryonalen SVZ des lateralen Ganglienhügels ist (Bayer et al., 1994). Aus der embryonalen SVZ gehen Zellen für Diencephalon, Basalganglien und Cortex hervor (Rakic and Sidman, 1969; de Carlos et al., 1996; Anderson et al., 1997). Auf zellulärer Ebene besteht die SVZ aus einem komplexen Netzwerk von vier Zelltypen. Diese entsprechen A-, B-, C- und E-Zellen, wobei A-, B- und C-Zellen als NPCs zusammengefasst werden. Diese bis heute allgemeingültige Nomenklatur wurde im Jahre 1997 von Doetsch und Kollegen anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen vorgenommen (Doetsch et al., 1997). Typ B-Zellen entsprechen den eigentlichen NSCs in der SVZ und sind zur ständigen Selbsterneuerung fähig. Aus ihnen gehen sowohl während der Embryonalperiode als auch im erwachsenen Gehirn kontinuierlich neue Neurone und Gliazellen hervor (Doetsch et al., 1999a). Typ B-Zellen leiten sich von der Gruppe der radialen Gliazellen ab (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009), welche indes als die Vorläufer von Astrozyten betrachtet werden (Schmechel and Rakic, 1979; Voigt, 1989). Typ B-Zellen selbst können anhand ihrer Ultrastruktur und ihrer immunzytochemischen Eigenschaften als Astrozyten bezeichnet werden (Seri et al., 2001). Neben dem für Astrozyten typischen Marker GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) (Garcia et al., 2004) exprimieren B-Zellen zusätzlich Nestin und Vimentin (Doetsch et al., 1997) sowie GLAST (Glutamate Aspartate Transporter) und BLBP (Brain Lipid-Binding Protein) (Namba et al., 2005; Codega et al., 2014; Fuentealba et al., 2015; Llorens-Bobadilla et al., 2015). Insgesamt weist nur ein geringer Anteil

aller Astrozyten des adulten zentralen Nervensystems (ZNS) Stammzelleigenschaften auf (Jackson and Alvarez-Buylla, 2008). B-Zellen stellen eine spezielle Subgruppe von Astrozyten dar (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009) und unterscheiden sich von nicht-neurogenen Astrozyten durch ihre Uni- oder Bipolarität sowie eine verminderte Anzahl von Zellfortsätzen (Garcia et al., 2004). Histomorphologisch weisen NSCs ein helles Zytoplasma, einen hohen Gehalt an Intermediärfilamenten, zytoplasmatische Dense Bodies, Glykogengranulae und Gap Junctions auf (Jackson and Alvarez-Buylla, 2008). B-Zellen werden in neueren Publikationen abhängig von ihrer Lage in der SVZ in B1- und B2-Zellen unterteilt. Das Soma der B1-Zellen liegt direkt unter den Ependymzellen (E-Zellen), welche die Ventrikel auskleiden. Ihre apikalen Fortsätze erstrecken sich bis in die Seitenventrikel hinein und werden von Liquor umspült (Falcao et al., 2012), im basalen Bereich stehen die Ausläufer der B1-Zellen mit Blutgefäßen in Kontakt (siehe Abbildung 3). Auch untereinander sind die B1-Zellen durch Gap Junctions verbunden (Mirzadeh et al., 2008; Shen et al., 2008; Fuentealba et al., 2012). B1-Zellen können sowohl in einer ruhenden als auch aktivierten Form, dann als B1a-Zellen benannt, vorliegen. B2-Zellen haben keinen Kontakt zum Liquor der Seitenventrikel und sind eher in der Nähe des Striatums zu finden, wo ihre Fortsätze zum Abschirmen von migrierenden Neuroblasten (A-Zellen) dienen (Codega et al., 2014; Mich et al., 2014). Aus aktivierten B-Zellen, welche nur eine sehr geringe Teilungsrates aufweisen, entstehen C-Zellen, die unreifen Vorläuferzellen entsprechen. Sie sind in der SVZ, nicht jedoch im RMS zu finden. C-Zellen liegen oft in Clustern und teilen sich mehrfach schnell, bevor sie sich zu A-Zellen, sogenannten migrierenden Neuroblasten, differenzieren (Doetsch et al., 1997; Doetsch et al., 1999a). Der Algorithmus der adulten Neurogenese in der SVZ durchläuft auf zellulärer Ebene stets das Schema $B \rightarrow C \rightarrow A$. Die eingangs erwähnten Ependymzellen (E-Zellen) kleiden die Seitenventrikel mit einer einlagigen Zellschicht aus und grenzen so die SVZ von den Liquorräumen ab. In der Vergangenheit wurde angenommen, dass Ependymzellen die eigentlichen Stammzellen der SVZ seien (Johansson et al., 1999). Diese Annahme konnte im Verlauf widerlegt werden. Es zeigte sich, dass Ependymzellen ruhenden Zellen entsprechen und selbst keine

Stammzeleigenschaften besitzen (Chiasson et al., 1999; Capela and Temple, 2002; Spassky et al., 2005).

Bereits im Jahr 1999 konnte die Arbeitsgruppe um Doetsch et al. zeigen, dass es nach Aufbringen der antimitotischen Substanz Cytosin- β -D-Arabinofuranosid (Cytarabin, AraC) auf die Hirnoberfläche gelang, sowohl Typ C-Zellen (junge Vorläuferzellen) als auch Typ A-Zellen (migrierende Neuroblasten) aus der SVZ zu eliminieren, während die langsam proliferierenden Typ B-Zellen (Astrozyten) bestehen blieben und sich weiter teilten. Nach Beendigung der Behandlung mit AraC fand eine rasche Regeneration der SVZ ausgehend von den persistierenden B-Zellen statt, wobei nach 2 Tagen zunächst C-Zellen und nach 4 Tagen A-Zellen wieder nachweisbar waren. Nach 10 Tagen hatte sich die Zellzusammensetzung der SVZ vollständig auf Ausgangsbedingungen vor der Behandlung regeneriert (Doetsch et al., 1999b).

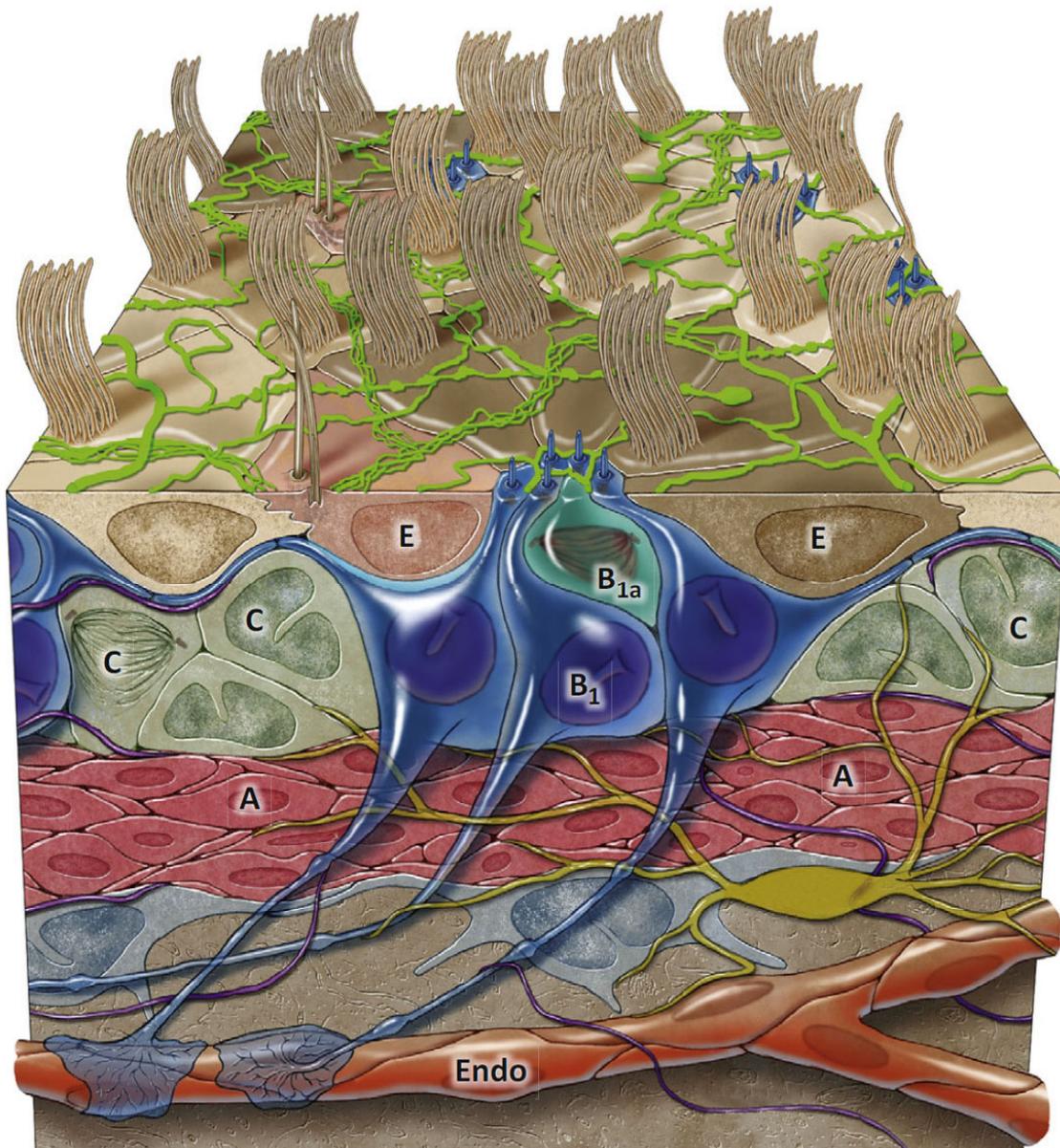


Abbildung 3: Schematischer Aufbau der SVZ.

Aus NSCs, sogenannten B-Zellen (B1, blau und B1a, türkis), entwickeln sich in Clustern liegende C-Zellen (C, grün) und aus ihnen migrierende A-Zellen (A, rot). B1-Zellen stehen mit Gefäßen in Kontakt und ihre Fortsätze ragen zum Teil zwischen den Ependymzellen (E, braun) hindurch in das Lumen der Seitenventrikel hinein. Somit stehen B1-Zellen mit dem Liquor in Kontakt. B2-Zellen (in der Abbildung nicht gezeigt) weisen diese Eigenschaften nicht auf, sie sind eher im Inneren der SVZ in der Nähe des Striatums zu finden und dienen zur Abschirmung von A-Zellen. A-Zellen sind migrierende Neuroblasten, welche die SVZ über den RMS verlassen und in den BO einwandern. E-Zellen, welche keine Stammzeleigenschaften besitzen, kleiden die Seitenventrikel mittels eines einschichtigen zilierttragenden Epithels aus und schirmen so die SVZ vom Ventrikellumen der Seitenventrikel ab (modifiziert nach Lim and Alvarez-Buylla, 2014).

1.4.2 Zellmigration im RMS

Die migrierenden Neuroblasten (A-Zellen) begeben sich täglich zu Tausenden auf die bei Mäusen vier bis fünf Millimeter lange Reise von der SVZ in Richtung BO. Sie wandern mittels Kettenmigration dicht gepackt über einen vorgegebenen Migrationspfad, den RMS, in den BO ein (Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Rousselot et al., 1995; Lois et al., 1996). Die Wanderungsdauer der A-Zellen von der SVZ in den BO beläuft sich auf zwei bis sechs Tage (Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996). Der RMS ist ein glialer Tunnel, welcher von den Fortsätzen umgebender spezialisierter, sich langsam teilender Astrozyten (B-Zellen) und Extrazellulärmatrix (unter anderem Chondroitinsulfat-Proteoglycane, Tenascin, Laminin) gebildet wird (Miragall et al., 1990; Jankovski and Sotelo, 1996; Lois et al., 1996; Thomas et al., 1996; Peretto et al., 1997; Murase and Horwitz, 2002). Die Kettenmigration stellt eine tangentielle Migrationsform dar, bei welcher sich die Zellen gegenseitig als Migrationshilfe dienen und so die Wanderungsrichtung vorgeben. Erstmals wurde diese spezielle Migrationsform *in vitro* mittels Zellexplantaten aus der SVZ dargestellt. Die A-Zellen wandern mit einer Geschwindigkeit von bis zu 120 $\mu\text{m}/\text{h}$ durch den RMS hindurch (Wichterle et al., 1997). Der Vorgang der Kettenmigration beruht auf homotypischen Interaktionen zwischen den Zellen selbst, radiale Gliazellen und Axone der umgebenden Astrozyten scheinen bei diesem Migrationsvorgang keinen direkten Einfluss als Migrationssubstrat oder Richtungsweiser zu haben (Lois et al., 1996; Wichterle et al., 1997). Jedoch scheinen den RMS durchziehende Blutgefäße den wandernden Neuroblasten als zusätzliche Orientierungshilfe zu dienen (Snapyan et al., 2009; Whitman et al., 2009). Auch die den RMS umgebenden GFAP-positiven Astrozyten sezernieren Faktoren, welche sich fördernd auf das Migrationsverhalten der A-Zellen auswirken (Mason et al., 2001). Es wird außerdem von einigen Arbeitsgruppen angenommen, dass die den RMS umgebenden Astrozyten selbst zur Proliferation fähig sind und somit als NPCs im RMS dienen können, womit der RMS ein eigenes Stammzellreservoir besäße (Gritti et al., 2002; Hack et al., 2005). Während ihrer Wanderung teilen und differenzieren sich die A-Zellen weiter (Menezes et al., 1995; Wichterle et al., 1997). Dabei exprimieren sie die für migrierende Neuroblasten typischen Marker DCX, ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein sowie das Glycoprotein PSA-NCAM (Polysialic

Acid-Conjugated Neural Cell Adhesion Molecule) (siehe Abbildung 4). Beide haben einen entscheidenden Einfluss auf das Migrationsverhalten der Neuroblasten (Rousselot et al., 1995; Gleeson et al., 1999; Chazal et al., 2000; Ocbina et al., 2006). So weisen Mäuse, welche PSA-NCAM nicht exprimieren können, eine gestörte Migration der A-Zellen im RMS mit einem folglich kleineren BO auf (Tomasiewicz et al., 1993; Cremer et al., 1994; Hu et al., 1996; Chazal et al., 2000). Die PSA-NCAM-Expression nimmt generell im höheren Alter ab (Bonfanti et al., 1992). Durch die Abwesenheit des BO bei bulbektomierten Tieren bleibt die Wanderung der A-Zellen im RMS Richtung BO unbeeinträchtigt. Somit scheinen vom BO selbst sezernierte chemoattraktive Faktoren für die Zellmigration im RMS von untergeordneter Bedeutung zu sein (Kirschenbaum et al., 1999).

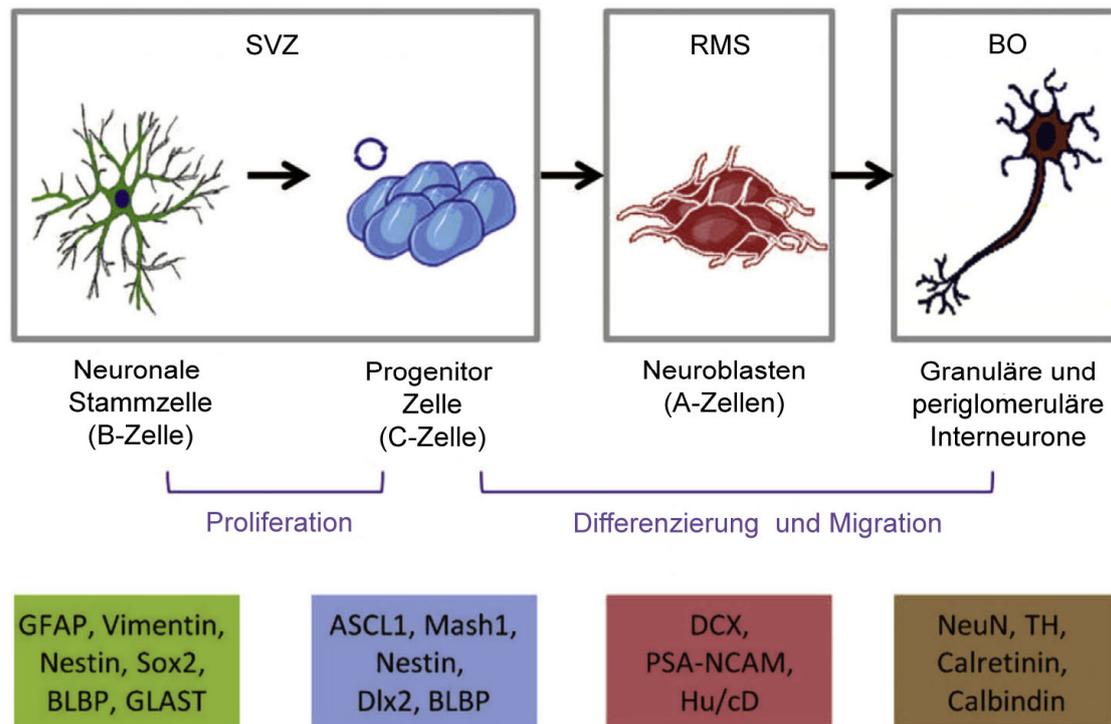


Abbildung 4: Schematische Darstellung der neuronalen Stammzellentwicklung im SVZ-RMS-BO-System adulter Säugetiere.

Die NSCs der SVZ (B-Zellen) exprimieren die Marker GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein), Vimentin, Nestin, Sox2 (Sex Determining Region Y-Box 2), BLBP (Brain Lipid-Binding Protein) und GLAST (Glutamate Aspartate Transporter). Im weiteren Verlauf proliferieren B-Zellen zu sich schnell teilenden C-Zellen, die ein geändertes Markerprofil, bestehend aus ASCL1 (Achaete-Scute Homolog 1), Mash1 (Achaete-Scute Complex-Like 1), Nestin, Dlx2 (Distal-Less Homeobox 2) und BLBP aufweisen. C-Zellen reifen weiter zu Neuroblasten, sogenannten A-Zellen, heran. A-Zellen migrieren durch den RMS in Richtung BO und differenzieren sich auf ihrem Weg weiter. Sie zeigen eine Positivität für DCX (Doublecortin), PSA-NCAM (Polysialic Acid-Neural Cell Adhesion Molecule) und Hu/cD (ELAV-Like Neuronal RNA-Binding Proteins). Im BO angekommen integrieren sich die Interneurone in die Granulär (GCL)- oder Periglomerulärzellschicht (PGL) und weisen nun mit der Expression von NeuN (neuronales nukleäres Antigen), TH (Tyrosinhydroxylase), Calretinin und Calbindin Marker ausdifferenzierter Neurone auf (modifiziert nach Migaud et al., 2016).

1.4.3 Differenzierung, Integration und Absterben von Interneuronen im BO

Täglich wandern zwischen 10.000 bis zu 80.000 A-Zellen mittels Kettenmigration über den RMS in den olfaktorischen Bulbus ein (Kaplan et al., 1985; Lois and Alvarez-Buylla, 1994). Dort angekommen verlassen sie in der Mitte des BO den RMS und die tangentielle Migration geht in eine radiale Migrationsform über, bei welcher jede Zelle einzeln ihren Weg fortsetzt. Die Loslösung der Neuroblasten voneinander beim Austritt aus dem RMS wird durch das Protein Reelin, welches von Mitralzellen im BO produziert wird,

initiiert (Hack et al., 2002). Für die radiale Migration im BO spielt das extrazelluläre Matrixprotein Tenascin-R eine wichtige Rolle (Saghatelian et al., 2004). Teilweise wandern A-Zellen an Gefäßen entlang, welche ihnen als Gerüst dienen. Dieser Vorgang wird als vasophile Migration bezeichnet (Bovetti et al., 2007). Die im BO ankommenden A-Zellen wandern von der innersten Schicht des BO, der subependymalen Zone, nach außen in die darüber gelegene Granulärzellschicht (Granular Cell Layer, GCL) oder in die noch weiter peripher gelegene Periglomerulärzellschicht (Periglomerular Cell Layer, PGL) ein (zum Aufbau des BO siehe Abbildung 5). Während dieser Wanderung differenzieren sich die jungen Nervenzellen weiter und integrieren sich schließlich in das bereits bestehende neuronale Netzwerk. Abhängig von ihrer schlussendlichen Position im BO werden sie als granuläre Interneurone in der GCL oder periglomeruläre Interneurone in der PGL bezeichnet (Luskin, 1993; Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Goldman, 1995; Betarbet et al., 1996; Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002). Beide Typen von Interneuronen werden bei adulten Säugetieren kontinuierlich in den BO rekrutiert (Luskin and Boone, 1994; Carleton et al., 2003). Die Hälfte aller neu entstandenen Interneurone geht jedoch bald nach dem Erreichen des BO und der anschließenden Maturation und Differenzierung durch programmierten Zelltod wieder zugrunde. Dies ist ein Vorgang, der einen wichtigen regulativen Einfluss auf das Zellgleichgewicht des BO zu haben scheint (Biebl et al., 2000). Die Entscheidung, ob ein Interneuron überlebt oder apoptotisch wird, hängt neben zahlreichen weiteren Faktoren von dem Input an Signalen ab, welchen es von anderen Zellen erhält (Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002; Whitman and Greer, 2007). Funktionell bilden die neu im BO ankommenden Interneurone Glutamat- und GABA-Rezeptor-Kanäle aus und reagieren ebenso auf Stimulationen des Nervus olfactorius (Belluzzi et al., 2003). Diejenigen Interneurone, welche die initiale dreimonatige Phase der Selektion überleben und denen es gelungen ist, sich erfolgreich in das bestehende Zellnetzwerk zu integrieren, erreichen in Nachbeobachtungsstudien ein Alter von mindestens 19 Monaten (Kaplan et al., 1985; Winner et al., 2002). Da der andauernde Zellturnover einen balancierten Zellumsatz darstellt, bleibt die Größe des BO bei adulten Mäusen nach Abschluss des Wachstums weitestgehend unverändert (Pomeroy et al., 1990; Biebl et al., 2000; Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002; Lledo et al., 2006). Die im

BO ankommenden Neuroblasten integrieren sich in einem Verhältnis von 3:1 in die GCL (granuläre Interneurone) und die PGL (periglomeruläre Interneurone) (Luskin, 1993; Zigova et al., 1996). Sowohl granuläre als auch periglomeruläre Interneurone bilden axo-dendritische und dendro-dendritische Synapsen mit Mitral- und Büschelzellen aus, welche als Hauptverschaltungsneurone wichtige Zellen für die Geruchswahrnehmung im BO darstellen (Urban and Sakmann, 2002; Belluzzi et al., 2003; Whitman and Greer, 2007).

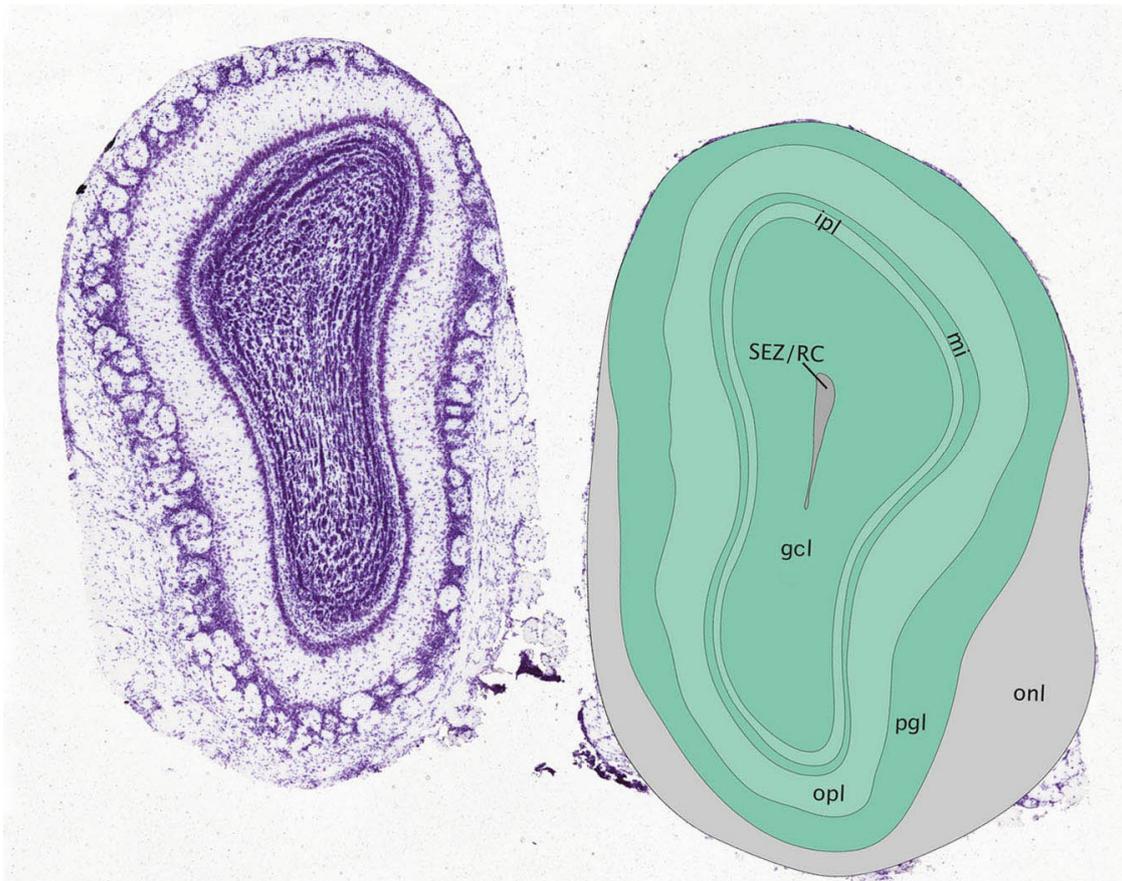


Abbildung 5: Histologischer Aufbau des BO der Maus (links Nissl-Färbung, rechts schematische Darstellung).

Der BO besteht aus sieben Zellschichten (von innen nach außen betrachtet):

- 1) Markkern = Körnerzellschicht (SEZ/RC)
- 2) Stratum granulosum = Granulärzellschicht (GCL)
- 3) Interne plexiforme Schicht (IPL)
- 4) Stratum cellularum mitralium = Mitralzellschicht (MI)
- 5) Stratum moleculare = Externe plexiforme Schicht (OPL)
- 6) Stratum glomerulosum = Periglomerulärzellschicht (PGL)
- 7) Stratum nervosum = Axonschicht, olfaktorische Nervenschicht (ONL)

(nach Allen Human Brain Atlas, Allen Institute for Brain Science, atlas.brain-map.org, Zugriffsdatum: 15.02.2017)

Granuläre Zellen (GC) produzieren vorwiegend GABA und weisen eine Positivität für den Marker Calretinin auf. Periglomeruläre Zellen (PGC) können sowohl rein GABAerg als auch kombiniert GABAerg und dopaminerg sein (Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002; Winner et al., 2002). Die periglomerulären GABAergen Interneurone sind um die Glomeruli herum angeordnet und können anhand von Zellmarkern weiter in verschiedene Subtypen mit unterschiedlichen Funktionen eingeteilt werden: Diese Subtypen sind Tyrosinhydroxylase (TH⁺)-, Calretinin (CalR⁺)- oder Calbindin (CalB⁺)-positive Zellen (siehe Abbildung 6) (Kosaka et al., 1998; Kohwi et al., 2005; Parrish-Aungst et al., 2007). Das Vorkommen dopaminerg TH⁺-Neurone ist im BO ausschließlich auf die PGL beschränkt, wo diese Subgruppe von Interneuronen synaptische Kontakte mit olfaktorischen Sinneszellen bildet (Halasz et al., 1977). Granuläre Interneurone können in tiefe und oberflächlich gelegene Subtypen eingeteilt werden (Kohwi et al., 2005). Sowohl granuläre als auch periglomeruläre Interneurone haben einen entscheidenden Einfluss auf die Prozessierung und Diskriminierung von Gerüchen im BO (Kosaka et al., 1995; Shepherd et al., 2007). Insgesamt unterliegen sowohl PGC als auch GC einer ständigen Erneuerung, wodurch im BO ein hoher Zellumsatz stattfindet. Apoptotische Zellen werden kontinuierlich durch neu entstandene Interneurone ersetzt, wobei das Ausmaß des vorhandenen Zelluntergangs unmittelbar an olfaktorische Einflüsse geknüpft zu sein scheint (Najbauer and Leon, 1995; Fiske and Brunjes, 2001). Daher zeichnet sich der BO als eine der wenigen adulten Hirnregionen durch eine hohe neuronale Plastizität aus (Luskin and Boone, 1994; Carleton et al., 2003).

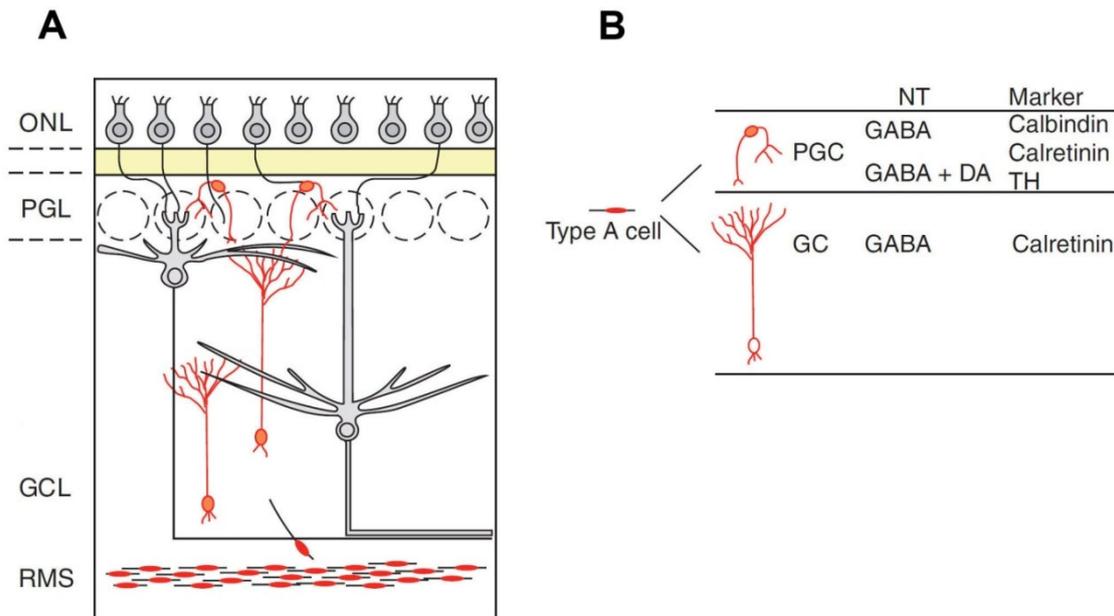


Abbildung 6: Schematische Übersicht der Integration neu entstandener Interneurone in den BO.

A: Schematischer Querschnitt durch den BO. In dieser Abbildung werden nicht alle Zellschichten des BO, sondern nur die ONL, die PGL sowie die GCL dargestellt. Die über den RMS dicht gepackt einwandernden A-Zellen lösen sich voneinander und gelangen mittels radialer Migration in die GCL und PGL und differenzieren sich zu ausgereiften Interneuronen, die in das bestehende Nervengeflecht integriert werden.

B: Übersicht der Interneurone des BO. Die über den RMS einwandernden A-Zellen differenzieren sich zu granulären Zellen (GC) und periglomerulären Zellen (PGC). GC produzieren den Neurotransmitter GABA (Gamma-Aminobuttersäure) und exprimieren den Marker Calretinin. Die im BO peripherer gelegenen PGC können unterteilt werden in rein GABAerge sowie in GABA- und Dopamin (DA)-produzierende Zellen. PGC exprimieren die Marker Calbindin, Calretinin und/oder TH (modifiziert nach Lim and Alvarez-Buylla, 2016).

1.4.4 Humanes SVZ-RMS-BO-System

Auch im menschlichen Gehirn können NPCs sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden (Kirschenbaum et al., 1994; Pincus et al., 1998; Sanai et al., 2004). Im Jahr 1999 gelang Bernier et al. der Nachweis einer humanen SVZ im menschlichen Vorderhirn und die detaillierte Beschreibung von deren zytoarchitektonischer und molekularer Struktur (Bernier et al., 2000). Auch beim Menschen stellt die SVZ ebenso wie bei anderen Säugetieren das größte Reservoir für adult-geborene Gliazellen und Neurone dar, weist jedoch einen andersartigen Aufbau als die gut erforschte SVZ von Ratten und Mäusen auf (Sanai et al., 2004; Sanai et al., 2011). Beim Menschen ist die SVZ im temporalen Bereich der Seitenventrikel prominenter ausgebildet als bei Nagern

(Bernier et al., 2000). Kirschenbaum und Kollegen gelang es bereits 1994, Zellen aus ebendieser Region *in vitro* zu Nervenzellen heranzuzüchten (Kirschenbaum et al., 1994). Bezüglich des Aufbaus der SVZ findet sich beim Menschen eine sogenannte Gap Layer, welche aus einem dichten Fasernetzwerk der Fortsätze von Ependymzellen und Astrozyten besteht und im Erwachsenenalter sehr zellarm, bei Kindern bis zum Alter von sechs Monaten jedoch mit vielen jungen DCX-positiven migrierenden Neuronen besiedelt ist. Nach Abschluss des sechsten Lebensmonats scheint die Neurogenese in der SVZ deutlich regredient, jedoch auch im Erwachsenenalter weiterhin vorhanden zu sein (Weickert et al., 2000; Sanai et al., 2011). Insgesamt ist die adulte humane SVZ im Vergleich zur SVZ von Nagern als eher zellarm zu bezeichnen (Sanai et al., 2004; Quinones-Hinojosa et al., 2006). *In vitro* weisen einige der aus der humanen SVZ entnommenen Astrozyten Stammzelleigenschaften auf, jedoch ist deren Funktion und Potential *in vivo* noch unklar und wird von unterschiedlichen Autoren kontrovers diskutiert (Weickert et al., 2000; Quinones-Hinojosa et al., 2006; Sanai et al., 2011; Ernst et al., 2014). Es erschien bisher unklar, ob und in welcher Form auch der RMS im menschlichen Gehirn existiert. Bei Kindern unter 18 Monaten lässt sich ein kräftiger RMS nachweisen, welcher nicht nur den BO, sondern auch den präfrontalen Cortex mit jungen Neuronen versorgt (Sanai et al., 2011). Auch Paredes und Kollegen konnten in einer aktuellen Studie an *post mortem*-Gewebe von Säuglingen junge Nervenzellen nachweisen, welche mittels Kettenmigration beachtliche Distanzen in Richtung Frontallappen zurücklegen. Dort angekommen, verteilen sie sich im kortikalen Gewebe, differenzieren aus und integrieren sich in inhibitorische Schaltkreise (Paredes et al., 2016). Curtis und Kollegen konnten in ihren Untersuchungen im Jahr 2007 bei erwachsenen Menschen ebenfalls einen RMS beschreiben, jedoch verläuft dieser lateraler als beim Nager und geht aus einer sogenannten lateralen Erweiterung der SVZ (Lateral Ventricular Extension) hervor (Curtis et al., 2007). Wie im Gehirn von Nagern entstehen in der menschlichen SVZ kontinuierlich PSA-NCAM-positive Vorläuferzellen, welche in Richtung BO abwandern, jedoch geschieht dies im Gegensatz zu Nagern scheinbar nicht mittels Kettenmigration (Sanai et al., 2004). Insgesamt ist das olfaktorische System beim Menschen (mikrosmatisches System) verglichen mit dem in Nagern (makrosmatisches System) in Relation deutlich

weniger dominant ausgeprägt, sodass sich auch der Nachweis des humanen SVZ-RMS-BO-Systems deutlich schwieriger gestaltet als dies bei Nagern der Fall ist (Bernier et al., 2000).

1.5 Subgranuläre Zone

Die SGZ ist eine dünne Lamina, welche zwischen der Körnerzellschicht (Stratum granulosum) und der Hilusregion CA4 im Hippocampus gelegen ist. Die SGZ stellt neben der SVZ die zweite Hirnregion dar, in der lebenslang die Bildung von neuen Neuronen stattfindet. Die Neurogenese in der SGZ fällt jedoch generell um einiges geringer aus als diejenige in der SVZ und nimmt identisch zur SVZ mit dem Alter ab (Kuhn et al., 1996; Jin et al., 2003a; Enwere et al., 2004). Täglich werden der SGZ adulter Ratten etwa 9000 neu entstandene Neurone hinzugefügt, was einem Anteil von 0,03% der Gesamtheit aller Neurone in der SGZ entspricht (Kempermann et al., 1997; Alvarez-Buylla et al., 2001). Wie in der SVZ gehen in der SGZ aus NSCs NPCs hervor, welche junge Neurone bilden. Diese reifen heran und integrieren sich schließlich als funktionelle Körnerzellen in bestehende neuronale Netzwerke (van Praag et al., 2002). Im Gegensatz zu den in der SVZ gebildeten Neuronen, welche einige Millimeter zum BO wandern, legen die in der SGZ produzierten Neurone nur sehr geringe Distanzen zurück, um in die hippocampale Körnerzellschicht einzuwandern (Gould and Cameron, 1996). Dort angekommen, folgen sie einem bestimmten Anordnungsmuster: Während die adult-geborenen Neurone eher in der Mitte und in den inneren Schichten des Stratum granulosums zu finden sind, werden die äußeren Schichten durch embryonale oder postnatal entstandene Neurone gebildet (Mathews et al., 2010). Ähnlich wie im RMS scheint auch in der SGZ das Molekül PSA-NCAM für die Migration der Neurone von entscheidender Bedeutung zu sein (Bonfanti et al., 1992; Seki and Arai, 1993). Wie bei anderen Säugetieren bleibt auch das menschliche Gehirn lebenslang zur hippocampalen Neurogenese befähigt, wie Eriksson et al. in einer *post mortem*-Studie an humanem Hirngewebe zeigen konnten, nachdem die Probanden zu Lebzeiten BrdU-Injektionen unterzogen wurden (Eriksson et al., 1998). Die hippocampale Funktion wird durch die adulte Neurogenese nachhaltig beeinflusst. So führt körperliche Fitness sowohl beim Nager als auch beim Menschen zu verbesserten Gedächtnisfunktionen und steigert nachhaltig

die kognitive Leistungsfähigkeit, wobei als Grund dafür unter anderem eine gesteigerte hippocampale Neurogenese angenommen wird (van Praag et al., 2005; Yau et al., 2011; Yau et al., 2014; Moon et al., 2016; Ma et al., 2017). Soziale Isolation und Reizdeprivation scheint sich hingegen negativ auf die Neubildung von Nervenzellen im Hippocampus auszuwirken mit der Folge einer Volumenminderung bestimmter hippocampaler Areale und schlechteren Resultaten in Kognitionsuntersuchungen (Stahn et al., 2019). Insgesamt bleibt die funktionelle Signifikanz der humanen adulten Neurogenese des Hippocampus und das Differenzierungspotential hippocampaler Stammzellen bis zum heutigen Zeitpunkt unklar und wird von verschiedenen Autoren kontrovers diskutiert (LaDage, 2015).

1.6 Parkinson-Syndrom: Epidemiologie, Ätiologie, Symptomatik, Diagnostik

Das Parkinson-Syndrom wurde erstmals im Jahre 1817 durch den englischen Chirurgen James Parkinson (1755-1824) als eigenständige Krankheitsentität erfasst und in seinem Werk *„An Essay on the Shaking Palsy“* (*„Eine Abhandlung über die Schüttellähmung“*) beschrieben (Parkinson, 1817). Bis zur Etablierung der Begriffe „Parkinson-Syndrom“, „Parkinson-Krankheit“ und „Parkinsonismus“ durch den französischen Psychiater Jean-Martin Charcot vergingen jedoch noch einige Jahrzehnte (Goetz, 2011). Die Prävalenz der Parkinson-Erkrankung liegt in Europa bei 100-200/100.000 Einwohner (von Campenhausen et al., 2005). Weltweit sind circa fünf Millionen Menschen von der Erkrankung betroffen, davon allein mehr als eine Millionen jeweils in Europa und den USA (Olanow et al., 2009b). Das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS) stellt neben dem essentiellen Tremor die häufigste Bewegungsstörung und nach dem Morbus Alzheimer die zweithäufigste chronische neurodegenerative Erkrankung dar (Tanner and Aston, 2000; Elbaz et al., 2016). Männer und Frauen sind bis zum 60. Lebensjahr nahezu gleich häufig von der Krankheit betroffen, wobei im weiter fortgeschrittenen Lebensalter eine höhere Inzidenz und Prävalenz beim männlichen Geschlecht zu verzeichnen ist (de Rijk et al., 2000; Ascherio et al., 2004; Taylor et al., 2007; Abdullah et al., 2015). In einer aktuell erschienenen Studie, welche epidemiologische Patientendaten aus Olmstedt County, Minnesota, USA aus den Jahren 1976 bis

2005 analysierte, zeigte sich außerdem ein gesamtheitlicher Anstieg der Inzidenz des IPS und anderer Parkinsonerkrankungen in dem entsprechenden Zeitraum, von welchem insbesondere Männer ab dem 70. Lebensjahr betroffen waren (Savica et al., 2016). Generell weisen Männer gegenüber Frauen ein höheres Risiko auf, am IPS zu erkranken (de Lau et al., 2004; Wooten et al., 2004). Die Ätiologie des IPS ist bis heute unklar. Das Alter sowie genetische, immunologische und umweltbedingte Faktoren scheinen eine wesentliche Rolle bei der Krankheitsentstehung zu spielen (Barbeau et al., 1987; Semchuk et al., 1992; Priyadarshi et al., 2001; Di Monte, 2003; Allam et al., 2005; Klein and Schlossmacher, 2007; Schapira, 2009; Dexter and Jenner, 2013; Matheoud et al., 2016; Quandt et al., 2016). Der Konsum von Nikotin, Kaffee und Mate-Tee scheint einen protektiven Effekt bezüglich der Entwicklung eines IPS zu haben, wobei dem im Kaffee enthaltenen Stoff Quercetin neuroprotektive Eigenschaften zugeschrieben werden. Bezüglich der positiven Auswirkungen des Rauchens auf das IPS wird vermutet, dass diese durch die Aktivierung Nikotin-induzierter Gene oder die Hemmung der Aktivität der Monoaminoxidase (MAO) durch den Tabakrauch zu erklären sein könnten (Gatto et al., 2015; Haglin, 2015; Li et al., 2015; Cakmak, 2016; Lee et al., 2016; Madeira et al., 2017; Kasabova-Angelova et al., 2018). Diskutiert wird auch ein Effekt auf die Mechanismen dopaminergischer Synapsen (Gigante et al., 2016). Der Begriff „Parkinson-Syndrom“ stellt einen Sammelbegriff für verschiedene Formen der Parkinson-Erkrankung dar. Prinzipiell wird das IPS, welches mit 75% aller an Parkinson leidenden Patienten den Hauptanteil der Erkrankung ausmacht, von nicht-idiopathischen Parkinson-Syndromen unterschieden. Zu diesen zählen neben genetisch bedingten Parkinson-Erkrankungen atypische Parkinson-Syndrome, welche als Begleiterscheinung anderer neurodegenerativer Erkrankungen (Multisystematrophie, progressive supranukleäre Blickparese, Demenz vom Lewy-Body-Typ, kortikobasale Degeneration) auftreten können. Als dritte Gruppe werden zu den nicht-idiopathischen Parkinson-Syndromen die sekundären, symptomatischen Parkinson-Syndrome gezählt, welche auf mannigfaltige Entstehungsursachen zurückzuführen sind und unter anderem medikamenteninduziert, toxisch, paraneoplastisch oder posttraumatisch bedingt sein können (Oertel et al., 2011). Die Diagnose des IPS beruht in erster Linie auf dem Vorliegen

eindeutiger klinischer Symptome, wobei die Diagnosestellung im Frühstadium der Erkrankung aufgrund unspezifischer Symptome oder der noch sehr milden Ausprägung der klassischen Symptome erschwert sein kann. In diesen Fällen kann eine Dopamin-Transporter-Single-Photon-Emissions-Computertomographie (DAT-SPECT) die Diagnose bestätigen oder widerlegen und auch gegenüber anderen Differentialdiagnosen abgrenzen (Scherfler et al., 2007). Die Anwendung dieser bildgebenden Untersuchung beruht auf der Tatsache, dass sich das Expressionslevel von DAT-mRNA parallel zum Zellabbau dopaminerger Neurone in der SN verhält (Uhl et al., 1994). Auch die probatorische Gabe von Levodopa mit anschließender Symptombesserung ist ein wichtiges diagnostisches Merkmal des IPS (Karow and Lang-Roth, 2011). Bezüglich der Symptomatik können motorische von nicht-motorischen Symptomen unterschieden werden. Das motorische Hauptsymptom ist eine Brady- beziehungsweise Akinese, welche von mindestens einem der Kardinalsymptome Rigor, Ruhetremor und posturaler Instabilität (Störung der Halte- und Stellreflexe) begleitet wird. Diese Kardinalsymptome können in unterschiedlicher Ausprägung vorhanden sein. Meistens beginnen die motorischen Symptome einseitig beziehungsweise seitenbetont und behalten im weiteren Erkrankungsverlauf ihre Asymmetrie bei (Fahn, 2003; Savitt et al., 2006; Weintraub et al., 2008). Nicht-motorische Symptome umfassen Veränderungen der Stimmungslage, der Kognition, Schlafstörungen sowie autonomer Funktionen und sind insgesamt weit verbreitet (Chaudhuri and Schapira, 2009; Mehndiratta et al., 2011; Pont-Sunyer et al., 2015; Marras and Chaudhuri, 2016). In einer aktuellen Studie von Zhang und Kollegen waren 70,8% aller untersuchten Patienten mit IPS von nicht-motorischen Symptomen betroffen (Zhang et al., 2016). Die autonomen Funktionsstörungen betreffen vorwiegend den kardiovaskulären (Blutdruckregulationsstörungen, orthostatische Hypotonie), gastrointestinalen (Schluckstörungen, Magenentleerungsstörungen, chronische Obstipation) und urogenitalen Bereich (imperativer Harndrang, erektile Dysfunktion) und sind bei älteren Patienten, erforderlichen hohen Dosen dopaminerger Medikation und in fortgeschrittenen Krankheitsstadien stärker ausgeprägt (Jost, 2003; Verbaan et al., 2007; Knudsen et al., 2016). Frühsymptome der Erkrankung sind oft unspezifisch und können dem eigentlichen Auftreten der motorischen Krankheitszeichen um bis

zu 20 Jahre vorausgehen (Mehndiratta et al., 2011; Postuma and Berg, 2016). Diese Prodromi des IPS äußern sich beispielsweise in Schmerzen der Extremitäten, welche zunächst fälschlicherweise als dem Alter geschuldete degenerative Veränderungen interpretiert werden können. Generell stellen Schmerzen beim IPS auch in späteren Krankheitsstadien ein häufiges Problem dar (Giuffrida et al., 2005; Ha and Jankovic, 2012; Skogar et al., 2012; Wasner and Deuschl, 2012). Auch kann es bei Patienten bereits in frühen Krankheitsstadien zu Depressionen und Schlafstörungen, insbesondere REM-Schlaf-Verhaltensstörungen, kommen (Ravina et al., 2007; Storch et al., 2008; Postuma et al., 2016; Zhang et al., 2016). Als weiteres Frühsymptom eines IPS kann eine Hyposmie auftreten, welche sich im Verlauf bis zur kompletten Anosmie ausweiten kann. Riechstörungen können den motorischen Symptomen des IPS bis zu fünf Jahre vorausgehen (Ponsen et al., 2004; Haehner et al., 2007; Berendse et al., 2011). Der Grund für die olfaktorische Dysfunktion könnte in einer Zunahme der dopaminergen Neurone im BO liegen, welche inhibitorisch auf die Glomeruli in der PGL wirken und so die Geruchsempfindung modulieren und herabsetzen. Huisman und Kollegen zeigten, dass die Anzahl dopaminergener Neurone im BO bei Parkinson-Patienten doppelt so hoch ist wie diejenige bei gesunden Probanden gleichen Geschlechts und Alters (Huisman et al., 2004). Eine aktuelle Tracing-Studie an Ratten zeigte erstmals eine direkte Projektion von Axonen dopaminergener Neurone aus der SN bis in den BO hinein. Eine Injektion dopaminergener Neurotoxine in den BO hatte wiederum neben einem Rückgang dopaminergener Neurone in der SN auch eine eingeschränkte Riechleistung der Tiere zur Folge. Somit konnte erstmals ein neuroanatomischer Beleg für die Verbindung von BO und SN erbracht werden, der auch die beim IPS häufig auftretende Hyposmie erklären könnte. Dieses neue Erkenntnis untermauert ebenfalls die Hypothese, dass über das olfaktorische System aufgenommene Toxine die SN erreichen und schädigen könnten (Hoglinger et al., 2015). Im Allgemeinen ist eine olfaktorische Dysfunktion mit einem schwereren Krankheitsverlauf und einer beschleunigten Krankheitsprogression assoziiert und liegt eher bei älteren Patienten vor (Cavaco et al., 2015; Zhang et al., 2016).

Das IPS beruht auf dem Zelltod dopaminergener melaninhaltiger Neurone in der Substantia nigra pars compacta (SNpc), wodurch der für den Nucleus caudatus

und das Putamen, gemeinsam als Striatum bezeichnet, bestimmte dopaminerge Input dauerhaft verloren geht (Damier et al., 1999; Dauer and Przedborski, 2003). Der Zelltod der dopaminergen Neurone in der SNpc wird durch mehrere bekannte Faktoren mitbestimmt. Zu diesen zählen die mitochondriale Dysfunktion, oxidativer Stress durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), mikrogliale Entzündungsreaktionen und Veränderungen in der Proteinverarbeitung mit dem Resultat der Anreicherung fehlgefalteter Proteine, sogenannter Lewy-Bodies (LBs) (Jenner and Olanow, 1998; Yoo et al., 2003; Mattson, 2006; Vives-Bauza et al., 2010; Halliday and Stevens, 2011; Dexter and Jenner, 2013; Pienaar and Chinnery, 2013; Xiong et al., 2013). LBs sind nach heutigem Kenntnisstand die Auslöser des Zelluntergangs der nigrostriatalen Neurone in der SNpc. Aufgrund ihrer Fehlfaltung können sie von den betroffenen Zellen nicht abgebaut werden und es kommt zu einer intrazellulären Akkumulation der LBs. Dadurch schädigen und zerstören sie vermutlich den Zellkern, wodurch es nachfolgend zum Zelluntergang kommt (Power et al., 2017). Bei Beginn der motorischen Symptome des IPS sind bereits zwischen 30 bis 50% dieser Neurone zugrunde gegangen und der Dopamingehalt des Putamens ist infolgedessen bereits um circa 80% des Ausgangswerts verringert (Marsden, 1990; Ma et al., 1997; Greffard et al., 2006; Nandhagopal et al., 2008). Im Rahmen des normalen Alterungsprozesses bei gesunden Menschen fallen pro Dekade etwa 4,7% der pigmentierten Neurone der kaudalen SNpc aus, während sich der Wert bei am IPS erkrankten Patienten mit 45% auf circa das Zehnfache beläuft (Fearnley and Lees, 1991). LBs sind in allen Fällen des IPS als histopathologisches Kriterium vorhanden, sind jedoch nicht spezifisch für das IPS, sondern können auch bei anderen neurodegenerativen Krankheiten wie der Alzheimer-Erkrankung, der Lewy-Body-Demenz und ebenso als Zufallsbefund bei gesunden älteren Menschen gefunden werden (Gibb and Lees, 1988; Hansen et al., 1990; Schulz and Dichgans, 1999; Jellinger, 2003). Das kombinierte Auftreten von LBs und nigrostriatalem Zelluntergang stellt das neuropathologisch beweisende Kennzeichen des IPS dar (Greffard et al., 2006; Dickson et al., 2009). LBs bestehen hauptsächlich aus Ubiquitin und α -Synuclein, jedoch sind auch viele andere Proteine wie Synphilin, Parkin und Neurofilamente an ihrer Bildung beteiligt (Pappolla, 1986; Spillantini et al., 1998; Dauer and Przedborski, 2003).

Die circa 15 µm durchmessenden LBs sind runde, konzentrische, eosinophile, zytoplasmatische Zellaggregate. Sie lagern sich in den Somata und Dendriten der noch vorhandenen gesunden monoaminergen, meist dopaminergen, Neurone in der SNpc ab. Sie werden dann auch als Lewy-Neuriten (LNs) bezeichnet. LBs können sich auch auf andere Hirnregionen ausbreiten, indem sie von einem Neuron zum nächsten weitergegeben werden (Forno, 1996; Braak et al., 2003; Dauer and Przedborski, 2003). Neben dopaminergen Neuronen in der SNpc sind auch serotonerge Neurone im Raphekern, noradrenerge Neurone im Locus coeruleus und cholinerge Neurone im Nucleus basalis Meynert, Nucleus pedunculo pontinus tegmentalis und in den dorsolateralen tegmental Nuclei des Hirnstammes vom Befall mit α -Synuclein und dem nachfolgendem Zelluntergang betroffen (Braak et al., 2003; Grimbergen et al., 2009; Brichta et al., 2013; Grosch et al., 2016). Neue Studien zeigen, dass α -Synuclein mittels intra- und interneuronalem Transfer via Medulla oblongata den Nervus vagus erreichen und sich über diesen schließlich bis in das enterische Nervensystem der Magen-Darmwand ausbreiten kann, wo das Protein in viszeromotorischen Projektionen des Nervens nachweisbar ist (Keshavarzian et al., 2015; Ulusoy et al., 2016). Generell erlangte die Erforschung der Interaktion zwischen Darmflora und ZNS in den vergangenen Jahren zunehmendes Interesse, da angenommen wird, dass das intestinale Mikrobiom sowohl das IPS als auch andere neurodegenerative Erkrankungen in ihrer Entstehung und ihrem Verlauf entscheidend beeinflussen kann (Scheperjans et al., 2015; Sampson et al., 2016; Scheperjans, 2016; Unger et al., 2016). In einigen Publikationen wird diese Verbindung zwischen Gehirn und Gastrointestinaltrakt als „Gehirn-Darm-Mikrobiom-Achse“ („Brain-Gut-Microbiota-Axis“) bezeichnet (Mulak and Bonaz, 2015). Die weitere Bedeutung dieser neuen Entdeckung und sich daraus möglicherweise ergebende Konsequenzen für die klinische Behandlung müssen jedoch in größeren Studienpopulationen zunächst genauer verifiziert werden.

1.7 Behandlung des idiopathischen Parkinson-Syndroms

1.7.1 Medikamentöse Therapie

Da die Ätiologie des IPS trotz intensiver Forschung der letzten Jahrzehnte weiterhin unbekannt ist, ist eine kausale Therapie der Erkrankung aktuell noch nicht möglich. Die vorrangige medikamentöse Behandlung des IPS stellt auch heute noch die symptomatische Dopaminersatztherapie mit L-DOPA (Levodopa, L-3,4-Dihydroxyphenylalanin) dar, welche seit Ende der 1960er Jahre verfügbar ist (Cotzias et al., 1967; Cotzias et al., 1969). Diese Therapieform zielt auf den Ausgleich des striatalen Dopaminmangels ab. Über den Krankheitsverlauf hinweg profitieren alle Patienten von der Dopaminsubstitution, jedoch lässt die Effizienz dieser Medikation mit Fortschreiten der Erkrankung häufig nach. Fünf Jahre nach Therapiebeginn zeigt nur noch ein Viertel der Patienten ein gutes und sicheres Ansprechen auf die Medikamente (Fahn, 1992). Auch besteht Uneinigkeit darüber, wann mit einer L-DOPA-Therapie begonnen werden soll, zumal das Medikament in der Vergangenheit unter Verdacht stand, die Krankheitsprogression zu beschleunigen und selbst durch die Förderung der Bildung freier Radikale neurotoxisch zu sein (Fahn, 1996, 1999; Weiner, 2006). Generell wird die medikamentöse Therapie mit L-DOPA häufig von im Verlauf zunehmenden motorischen hyper- und hypokinetischen Wirkungsfluktuationen (On-Off-Phänomenen, End-of-Dose-Akinesien, Freezing, Dyskinesien) und nicht-motorischen Nebenwirkungen (Halluzinationen, orthostatischer Hypotension) begleitet (Giladi et al., 1992; Lang and Lozano, 1998). Da Dopamin (DA) selbst nicht in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, wird der Dopaminvorläufer L-DOPA meist mit einem peripheren Decarboxylasehemmer (Benserazid, Carbidopa) oder einem Catechol-O-Methyltransferase (COMT)-Inhibitor (Tolcapone, Entacapone) kombiniert, um dem peripheren Abbau von L-DOPA zu DA entgegenzuwirken. Des Weiteren sind COMT-Hemmer sowohl in der Lage, Wirkungsfluktuationen des L-DOPAs auszugleichen, als auch die täglich erforderliche Gesamtdosis zu minimieren (Parkinson Study Group, 1997; Kurth et al., 1997). Sowohl Decarboxylasehemmer als auch COMT-Hemmer können jedoch als Begleiterscheinung zu vermehrten „Off-Phänomenen“ und Dyskinesien führen (Fox et al., 2011). Grundsätzlich sollte bei der Behandlung mit L-DOPA die Dosis so gering wie möglich gehalten und das Medikament

einschleichend dosiert werden. Als weitere Wirkstoffklasse stehen Dopaminagonisten zur Verfügung, wobei Ergotamin-Derivate (Bromocriptin, Pergolid, Lisurid, α -Dihydroergocriptin, Cabergolin) von Non-Ergot-Abkömmlingen (Ropirinol, Pramipexol, Piribedil, Rotigotin, Apomorphin) unterschieden werden. Die Monotherapie mit Non-Ergot-Medikamenten wird häufig als erste Wahl bei jüngeren Patienten unter 70 Jahren eingesetzt (Karow and Lang-Roth, 2011). In fortgeschrittenen Erkrankungsstadien wird meistens die Hinzunahme von L-Dopa zur bestehenden Therapie mit einem Dopaminagonisten nötig, um noch adäquate Wirkerfolge zu erzielen. Generell bietet sich die Kombination eines Dopaminagonists mit L-DOPA an, um den L-DOPA-Bedarf langfristig zu senken (Kulisevsky and Lopez-Villegas, 1997). Vorsicht ist bei der Behandlung älterer Patienten mit Dopaminagonisten geboten, da es bei dieser Patientengruppe zu Halluzinationen und psychotischen Zuständen kommen kann. Die Monoaminoxidase-B (MAO-B)-Hemmer Selegilin und Rasagilin erhöhen, ähnlich wie L-DOPA, die Konzentration von DA im Striatum (Poeck and Hacke, 2001). Selegilin scheint teilweise seine Wirkung über die Produktion von neurotrophen Faktoren, den Schutz vor apoptotischem Zelltod und über das Abfangen von ROS zu entfalten (Tatton et al., 1994; Nagatsu and Sawada, 2006). Früher vermutete neuroprotektive Eigenschaften konnten in langfristigen Studien nicht bestätigt werden, jedoch kann durch die Gabe von MAO-B-Hemmern die L-Dopa-Therapie hinausgezögert werden. Auch eine Kombinationstherapie mit L-Dopa ist möglich (Karow and Lang-Roth, 2011). Ähnlich wie Decarboxylase- und COMT-Hemmer können auch Dopaminagonisten und MAO-Hemmer Dyskinesien induzieren oder verschlechtern (Fox et al., 2011). Der NMDA-Antagonist Amantadin gehört zur Gruppe der Virostatika. Seine Wirkung beim IPS wurde rein zufällig entdeckt. Für die Dauertherapie des IPS ist Amantadin nur bedingt geeignet, da bereits nach einer Behandlungsdauer von wenigen Monaten mit einer Toleranzentwicklung zu rechnen ist (Poeck and Hacke, 2001). Dieses Medikament kann jedoch in der initialen Erkrankungsphase bei Patienten mit milder Symptomatik versucht werden (Kulisevsky and Lopez-Villegas, 1997). Auch in späteren Stadien des IPS kann Amantadin motorische Fluktuationen und somit körperliche Einschränkungen der Patienten bedeutend bessern, weshalb es auch bei akinetischen Krisen Anwendung findet, wo es

intravenös verabreicht wird (Shannon et al., 1987; Greulich and Fenger, 1995; Adler et al., 1997; Verhagen Metman et al., 1998; Karow and Lang-Roth, 2011). Durch die Einnahme anticholinergischer Medikamente (Biperiden, Trihexyphenidyl, Metixen), welche zur zentralen Hemmung exzitatorischer cholinergischer Neurone führen, sind nur milde bis moderate Besserungen der Symptomatik des IPS zu erwarten (Lang and Lozano, 1998). Während durch alle anderen Medikamente vorwiegend Akinese und Rigor beeinflusst werden, wirken Anticholinergika vor allem auf den Tremor, weniger stark auf den Rigor und beeinflussen kaum die akinetischen Symptome (Karow and Lang-Roth, 2011). Aufgrund ihres Nebenwirkungsprofils sind Anticholinergika für ältere Patienten weniger geeignet, sondern finden eher bei jüngeren Patienten mit ausgeprägtem Tremor Anwendung (Kulisevsky and Lopez-Villegas, 1997).

Für Patienten in sehr fortgeschrittenen Erkrankungsstadien und für solche mit starken Medikamentennebenwirkungen wie motorische Fluktuationen stellt die Tiefenhirnstimulation des Nucleus subthalamicus eine weitere, jedoch invasivere Therapieoption dar (Limousin et al., 1995; Wolters, 2007; Hilker et al., 2011). Diese Therapieform wirkt sehr gut auf die motorische Symptomatik des IPS, wobei die Dosis der L-DOPA-Medikation häufig drastisch reduziert werden kann (Rascol et al., 2011). Bezüglich des Nebenwirkungsprofils stehen bei dieser Behandlungsform kognitive Veränderungen im Vordergrund (Xie et al., 2016).

1.7.2 Stammzelltherapie

Da der langfristige Behandlungserfolg der medikamentösen Therapie des IPS limitiert und im Krankheitsverlauf mit zahlreichen Nebenwirkungen assoziiert ist, wird in der experimentellen Forschung ständig nach neuen Therapieansätzen gesucht. Das grundsätzliche Ziel der regenerativen Medizin ist es, krankes durch gesundes Gewebe zu ersetzen und damit erloschene Funktionen des menschlichen Körpers wiederherzustellen. Im Falle des IPS wäre durch die Transplantation dopaminergischer Zellen in die SN zumindest die motorische Komponente der Erkrankung behandelbar. Bisher sind insgesamt vier Arten von Stammzellen, welche zur Herstellung dopaminergischer Neurone und somit zur Behandlung des IPS genutzt werden könnten, bekannt: Humane embryonale Stammzellen (Human Embryonic Stem Cells, hESCs), fetale neurale

Stammzellen (Fetal Neural Stem Cells, fNSCs), induzierte pluripotente Stammzellen (Induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs) und direkt induzierte dopaminerge Neurone (Directly Induced Dopaminergic Neurons, diDNs).

1.7.2.1 Humane embryonale Stammzellen

hESCs sind pluripotente Zellen und finden sich in der inneren Zellmasse der Blastozyste, dem sogenannten Embryoblasten (Thomson et al., 1998). In den letzten Jahren wurden zahlreiche Faktoren gefunden, welche *in vitro* die Entwicklung von hESCs hin zu dopaminergen Neuronen vorantreiben können. Diese Faktoren sind unter anderem SHH (Sonic Hedgehog), Wnt1 (Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 1), verschiedene Wachstumsfaktoren wie FGF2, FGF8, FGF20 und RA (Retinoic Acid, Retinoinsäure) (Yan et al., 2005; Parmar and Li, 2007; Shimada et al., 2009; Cooper et al., 2010; Fasano et al., 2010). Auch die Aktivierung von Genen und Transkriptionsfaktoren scheint bei der Bildung von dopaminergen Zellen aus hESCs eine entscheidende Rolle zu spielen (Cai et al., 2009; Hong et al., 2014). Durch das umfangreiche Wissen zur Differenzierung dopaminergener Neurone aus hESCs können diese Zellen heutzutage auf Zellkulturebene bereits in großem Umfang produziert werden. In Tierversuchen bei an Parkinson erkrankten Nagern und Primaten zeigten sich nach Transplantation von hESCs ins ZNS positive Behandlungsergebnisse mit verbesserten motorischen und kognitiven Leistungen der Tiere (Muramatsu et al., 2009; Kriks et al., 2011). Die Ergebnisse bezüglich Potenz und Effektivität der Behandlungsmethode im experimentellen Tierversuch sind ähnlich gut wie bei der Implantation fetaler mesencephaler Stammzellen (Grealish et al., 2014). Es wurden in jüngster Vergangenheit auch einige wenige Implantationsstudien mit hESCs am Menschen bei Patienten mit Rückenmarksverletzungen, Diabetes mellitus Typ I, Herzinsuffizienz und altersbedingter Makuladegeneration (AMD) der Retina begonnen (Ilic et al., 2015; Ilic and Ogilvie, 2017). Das zurückhaltende Vorgehen in der Durchführung klinischer Patientenstudien beruht auf Bedenken bezüglich der Sicherheit von hESCs. Neben der Angst vor der Entstehung möglicher Neoplasien, die eventuell durch eine akzidentelle Mitimplantation unreifer Zellen zwischen den ausdifferenzierten Neuronen hervorgerufen werden könnten, betreffen die Bedenken vor allem

immunologische Phänomene und ethische Implikationen, da es bei der Gewinnung der hESCs zur Zerstörung der Blastozyste kommt (Han et al., 2015a).

1.7.2.2 Fetale neurale Stammzellen

Erstmals im Jahr 1979 implantierten Forscher in experimentellen Tierversuchen fetales mesencephales Hirngewebe, welches reich an dopaminergen Neuroblasten ist, in die Gehirne von an Parkinson erkrankten Ratten (Bjorklund and Stenevi, 1979; Perlow et al., 1979). Im Verlauf erfolgte die Erprobung der neuen Methode in weiteren Tierversuchen, wobei eine Besserung der Krankheitssymptome bei diesen Tieren zu beobachten war (Dunnett et al., 1983; Freund et al., 1985; Annett et al., 1997). Ende der 1980er Jahre kamen intrastriatale fetale Zellimplantate auch bei am IPS erkrankten Patienten erstmals zur Anwendung (Brundin et al., 1987). In zahlreichen klinischen Studien der kommenden Jahre zeigte sich, dass die Transplantation dieser fetalen neuralen Vorläuferzellen zu einer funktionellen Besserung der Krankheitssymptomatik beim Menschen führen kann (Kordower et al., 1995; Wenning et al., 1997; Piccini et al., 1999). Besonders positiv beeinflusst wurden Rigidität und Brady- beziehungsweise Akinese. Teilweise wurde eine medikamentöse Therapie, zumindest für eine gewisse Zeit, überflüssig beziehungsweise zeigte sich eine Besserung der häufigen motorischen Fluktuationen unter L-DOPA-Therapie (Lindvall et al., 1990; Widner et al., 1992; Peschanski et al., 1994). Auch langfristig ließ sich dieser Behandlungserfolg in Nachbeobachtungsstudien nach intrastriatarer Implantation fetaler dopaminergener Stammzellen verifizieren (Mendez et al., 2005; Kefalopoulou et al., 2014). In einer weiteren, erst kürzlich erschienenen Studie war das bei einem Patienten vor 24 Jahren unilateral eingebrachte Implantat *post mortem* weiterhin lokalisierbar und die transplantierten Zellen produzierten fortlaufend DA. Jedoch waren mittlerweile 11-12% der implantierten Zellen von LBs befallen, was darauf schließen lässt, dass ein Übergreifen der Erkrankung auf die gesunden implantierten Zellen stattgefunden hatte, zumal sich im restlichen Gehirn des Patienten ausgeprägte degenerative Veränderungen des IPS feststellen ließen. Auch klinisch war 14 Jahre *post implantationem* ein fortschreitendes Nachlassen der einst positiven Wirkung der implantierten

Zellen zu verzeichnen, welches sich für den Patienten in Form von motorischen Dysfunktionen und kognitiven Einbußen bemerkbar machte (Li et al., 2016). Auch eine weitere Arbeitsgruppe zeigte nach einer Nachbeobachtungszeit von 14 Jahren nach der Zellimplantation einen teilweisen Befall des Implantats mit LBs (Kordower et al., 2008). Als gravierende Nebenwirkung der Implantationstherapie wurde der Verlauf bei einigen Patienten durch komplizierende Implantat-induzierte Dyskinesien beeinträchtigt (Hagell et al., 2002; Olanow et al., 2003; Olanow et al., 2009a). In einem aktuell berichteten Fall führte die Implantationsbehandlung mit fetalen dopaminergen Vorläuferzellen sogar zu einer klinischen Verschlechterung des IPS mit der Entwicklung ausgeprägter Dyskinesien trotz postmortal sehr guter Darstellbarkeit der dopaminergen Neurone und sehr guter dopaminergereinnervation des Striatums auch 16 Jahre nach der Behandlung. Als Grund für die Diskrepanz zwischen guten histologischen Ausgangsbefunden und schlechtem klinischem Outcome nahmen die Autoren der Studie an, dass die dopaminergen Zellen zwar DA produzierten, dies aber zu wenig für eine klinische Besserung der motorischen Symptomatik sei, jedoch die beschriebenen Dyskinesien durch das produzierte DA ausgelöst würden (Kordower et al., 2017). Bereits ältere Studien zeigten, dass nicht alle Patienten gleichermaßen von der Implantation fetaler mesencephaler Zellen profitieren. In einer Studie aus dem Jahr 2001 waren dies insbesondere jüngere Patienten, während sich bei älteren Patienten kein signifikanter Behandlungserfolg verzeichnen ließ (Freed et al., 2001).

1.7.2.3 Induzierte pluripotente Stammzellen

Da die vorgängig beschriebene Transplantation von embryonalen als auch fetalen Stammzellen generell mit zahlreichen ethischen Implikationen und medizinischen Einschränkungen behaftet ist, wird weiterhin nach alternativen Gewebequellen zu Transplantationszwecken gesucht. Im Jahr 2006 gelang es japanischen Stammzellforschern erstmals an Mausfibroblasten, diese bereits ausdifferenzierten Zellen wieder zu pluripotenten embryonalen Stammzellen, dann als sogenannte iPSCs bezeichnet, zu entdifferenzieren (Takahashi and Yamanaka, 2006). Nur ein Jahr später gelang diese Reprogrammierung der Pluripotenz auch an humanen ausdifferenzierten Zellen. iPSCs können, wie

embryonale Stammzellen, zu allen Zelltypen des Körpers ausdifferenziert werden und sind ebenfalls zur Selbstregeneration fähig (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). Durch Anwendung der vier Transkriptionsfaktoren Oct4 (Octamer-Binding Transcription Factor 4), Sox2 (Sex Determining Region Y-Box 2), Klf4 (Krüppel-Like Factor 4), und c-Myc (Avian Myelocytomatosis Virus Oncogene Cellular Homolog) können sowohl aus embryonalen als auch aus fetalen und adulten Hautfibroblasten iPSCs erzeugt werden (Takahashi et al., 2007; Park et al., 2008c; Tsai et al., 2010). Mittlerweile sind neben zahlreichen genetischen Methoden und der Anwendung von Virusvektoren (Retro- und Lentiviren) auch zahlreiche neue Strategien zur Herstellung von Transgen- und Virus-freien iPSCs vorhanden (Yu et al., 2007; Okita et al., 2008; Kim et al., 2009a; Soldner et al., 2009; Warren et al., 2010; Okita et al., 2011; Hou et al., 2013). Während es sich bei der vorgängig beschriebenen Transplantation von hESCs und fNSCs um allogene Verfahren handelt, entspricht die Transplantation von iPSCs einer autologen zellbasierten Therapie, da die *in vitro* entwickelten Zellen Abkömmlinge somatischer eigener Körperzellen eines Individuums darstellen. Daher wäre bei einer Behandlung mit iPSCs mit einer besseren Verträglichkeit und weniger immunologischen Komplikationen zu rechnen (Zhao et al., 2011; de Almeida et al., 2014). iPSCs kommen bisher bei der Entwicklung zellulärer Krankheitsmodelle, als Testobjekte in der Medikamentenentwicklung und -erprobung, bei Toxizitätsscreenings sowie in der Erforschung von Gentherapien zum Einsatz (Trounson et al., 2012; Jang et al., 2014; Singh et al., 2015; Spitalieri et al., 2015). Es ist bereits gelungen, krankheitsspezifische iPSC-Zelllinien, unter anderem von Patienten mit IPS, amyotropher Lateralsklerose, spinaler Muskelatrophie, Duchenne'scher Muskeldystrophie, Fanconi-Anämie und juvenilem Diabetes mellitus Typ I, zu generieren (Dimos et al., 2008; Park et al., 2008a; Ebert et al., 2009; Raya et al., 2009; Hashimoto et al., 2016). Zum Zellersatz wurden humane iPSCs bisher in Parkinson-Modellen an Nagern getestet, wo sich die ins Gehirn der Tiere applizierten iPSCs zu NSCs und schließlich zu dopaminergen Neuronen ausdifferenzierten, integrierten und im Verlauf zu einer funktionellen Besserung der Krankheitssymptome führten (Wernig et al., 2008; Han et al., 2015b). Auch in einem Sichelzellanämie-Mausmodell konnten die Tiere durch die autologe Transplantation von, aus Fibroblasten mittels Retroviren und Onkogenen

produzierten, iPSCs geheilt werden (Hanna et al., 2007). Mittlerweile gelang auch die Etablierung von Selektionsverfahren für ausdifferenzierte dopaminerge Neurone, sodass schließlich nur diese und keinerlei möglichen Vorläuferzellen in die Gehirne der an Parkinson erkrankten Tiere transplantiert wurden. Durch Anwendung dieser Methoden zur Vermeidung der Transplantation undifferenzierter Zellvorstufen erhoffen sich die Forscher, die Gefahr der theoretisch denkbaren Entwicklung von Neoplasien reduzieren zu können (Doi et al., 2014). iPSCs können heute nicht nur aus Fibroblasten, sondern aus ganz unterschiedlichen Gewebearten hergestellt werden. Es ist jedoch aus Studien an Mäusen bekannt, dass insbesondere von adulten Tieren gewonnene und zu iPSCs reprogrammierte Gewebe, abhängig von der jeweiligen Gewebequelle, unterschiedliche Entartungswahrscheinlichkeiten und Differenzierungspotentiale aufweisen. Aus fetalen Geweben produzierte iPSCs haben im Tierversuch eine geringere Neigung zur Bildung von Tumorformationen als iPSCs adulter Gewebequellen (Miura et al., 2009). Die Bildung humaner iPSCs ist bisher aus Fibroblasten, Keratinozyten und Melanozyten der Haut, Nabelschnurblutzellen sowie CD34+ peripheren Blutzellen, Fettgewebstammzellen und fNSCs gelungen (Takahashi et al., 2007; Aasen et al., 2008; Huangfu et al., 2008; Nakagawa et al., 2008; Giorgetti et al., 2009; Haase et al., 2009; Kim et al., 2009b; Loh et al., 2009; Sun et al., 2009; Utikal et al., 2009; Giorgetti et al., 2010). Trotz aller Fortschritte in der Herstellung und Selektion von iPSCs wurden diese bisher erst in wenigen Patientenstudien bei Menschen mit AMD eingesetzt. Im Verlauf wurde eine japanische Studie zur Behandlung der AMD aufgrund von fraglich aufgetretenen kanzerogenen Mutationen in den iPSCs pausiert, im Verlauf jedoch wieder aufgenommen (Garber, 2015). Bei neurodegenerativen Hirnerkrankungen wie dem IPS kamen iPSCs bisher aufgrund der bereits erwähnten Sicherheitsbedenken noch nicht zum Einsatz. Einen weiteren Grund für die bisher eher zurückhaltende Anwendung von iPSCs stellt der hohe erforderliche Zeitaufwand in der Herstellung dieser Zellen dar. Der Zeitraum für die Vermehrung der Zellen nach einer Biopsie wird mit etwa zwei Monaten angegeben. Damit ist das Verfahren als sehr arbeitsintensiv und langwierig einzustufen (Park et al., 2008b). Dennoch stellt die Entwicklung der Methode zur Herstellung von iPSCs einen Meilenstein im Bereich der regenerativen Medizin dar. Im Jahr 2012 wurde der Entdecker der iPSCs, der

japanische Stammzellforscher Shinya Yamanaka, mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.

1.7.2.4 Direkt induzierte dopaminerge Neurone

Um den langwierigen Umweg über die Reprogrammierung von Fibroblasten über iPSCs hin zu dopaminergen Neuronen zu vermeiden, wird in jüngster Zeit versucht, Fibroblasten von am IPS erkrankten Patienten direkt in dopaminerge Neurone umzuwandeln. Diese Zellen werden als diDNs bezeichnet (Han et al., 2015a). Erstmals gelang dieser Schritt unter Zuhilfenahme unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren verschiedenen Arbeitsgruppen im Jahr 2011 (Caiazzo et al., 2011; Pfisterer et al., 2011). Heute sind zahlreiche weitere Transkriptionsfaktoren als auch virale Vektoren für die Herstellung von NPCs bekannt (Meyer et al., 2015). Auch bei Mausfibroblasten gelang die direkte Differenzierung in neuronale Vorläuferzellen, welche sich nach Transplantation zu dopaminproduzierenden Neuronen ausdifferenzierten und funktionell in das Hirngewebe der Tiere integrierten (Kim et al., 2011; Han et al., 2012; Thier et al., 2012; Kim et al., 2014). Ähnliches wurde bei aus fetalen humanen Fibroblasten gewonnenen diDNs festgestellt. Diese überlebten im Anschluss an die Transplantation in die Gehirne von Ratten und behielten auch ihren Phänotyp dauerhaft bei (Pereira et al., 2014).

Insgesamt wird deutlich, dass die Stammzellforschung immer weiter voranschreitet und somit eines Tages auch die heute noch im Vordergrund stehenden Sicherheitsbedenken und ethischen Fragestellungen durch immer spezifischere Herstellungstechniken derartiger Zellen minimiert beziehungsweise gänzlich aus dem Weg geräumt werden könnten. So ist die Hoffnung für die Zukunft, viele Krankheiten durch eine für den Patienten maßgeschneiderte Zellersatztherapie lindern oder sogar heilen zu können.

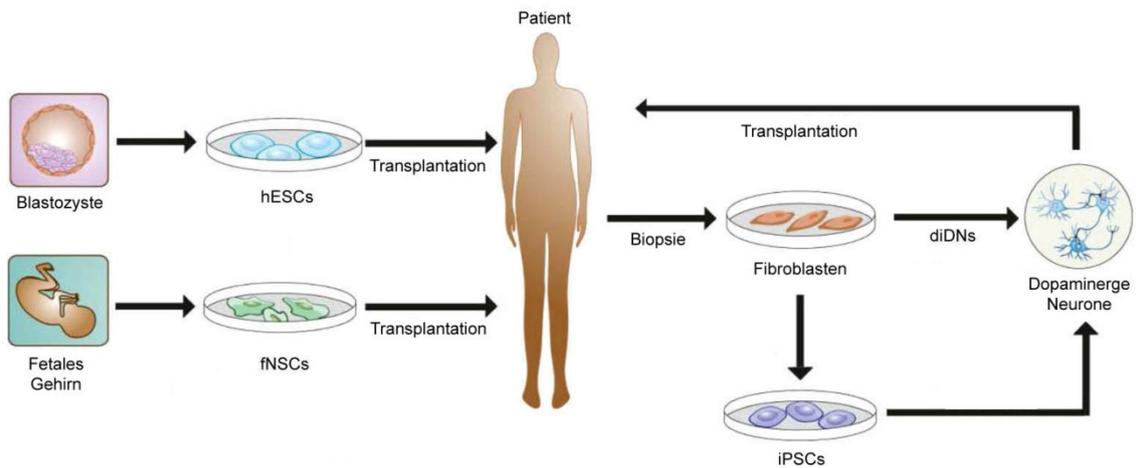


Abbildung 7: Schematische Übersicht möglicher Quellen dopaminergener Stammzellen.

Insbesondere die hier dargestellten dopaminergen Stammzellquellen werden in der aktuellen Literatur untersucht und diskutiert. Dazu gehören neben humanen embryonalen Stammzellen (hESCs), die aus befruchteten Eizellen im Blastozystenstadium gewonnen werden, fetale neurale Stammzellen (fNSCs), welche aus fetalen Gehirnen entnommen werden. Zur Gewinnung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs) und direkt induzierten dopaminergen Neuronen (diDNs) werden meist Fibroblasten mittels einer Hautbiopsie gewonnen, es sind jedoch auch bereits andere Gewebequellen bekannt. Diese Zellen können entweder direkt (diDNs) oder via vorausgehender Dedifferenzierung (iPSCs) in dopaminerge Neurone ausdifferenziert und anschließend transplantiert werden (modifiziert nach Han et al., 2015a).

1.6 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Dank intensiver Forschung der letzten Jahrzehnte ist heute bekannt, dass im Gehirn von Säugetieren NSCs vorkommen. Trotz der Existenz dieser Zellen hat das adulte Gehirn nur eine limitierte Regenerationskapazität. Ziel der Stammzellforschung ist es, endogene NSCs eines Tages zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen, wie beispielsweise dem Morbus Parkinson, einsetzen zu können. Durch das Ersetzen zugrunde gegangener dopaminergere Neurone wären zumindest die motorischen Symptome der Erkrankung behandelbar. Es ist heute allgemeingültiger wissenschaftlicher Konsens, dass postnatal an bestimmten Orten des Gehirns, in sogenannten neurogenen Nischen, endogene NSCs zu finden sind. Aus diesen NSCs gehen unter anderem dopaminerge Interneurone hervor, welche kontinuierlich in den BO einwandern. Jedoch ist bis heute unklar, ob diejenigen NSCs, welche speziell dopaminerge Neurone hervorbringen, in der SVZ oder im RMS lokalisiert sind. Bisher ist die Antwort auf diese Fragestellung nicht bekannt und wird von unterschiedlichen Autoren kontrovers diskutiert.

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, folgende Fragestellungen zu beantworten:

- Wo ist der Entstehungsort der in den BO einwandernden dopaminergen Interneurone im SVZ-RMS-BO-System?
- Werden granuläre und periglomeruläre Interneurone des BO an unterschiedlichen Orten im SVZ-RMS-BO-System gebildet?
- Verändert sich durch die mechanische Unterbrechung des RMS die Apoptoserate der periglomerulären dopaminergen Zellen im BO?
- Welchen Einfluss hat die Unterbrechung des RMS auf die Anzahl dopaminergere Zellen im BO?

Die Beantwortung dieser Fragen in einem Mausmodell trägt zum grundlegenden Verständnis der Verteilung von NSCs bei. Bei einer Regionalisierung bestimmter Subgruppen von NSCs wäre es denkbar, speziell diese Zellen aus dem Gehirn zu entnehmen und *in vitro* in dopaminerge Zellen auszudifferenzieren. Eine weitere Option wäre möglicherweise, diese Zellen *in vivo* zur Proliferation anzuregen. Die Klärung dieser Fragen kann dazu beitragen, adulte endogene Stammzellen eines Tages klinisch-therapeutisch, insbesondere zur Behandlung der Parkinson-Erkrankung, einzusetzen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Bezugsquelle
Aqua dest. (H ₂ O dest.)	Biomedizinisches Forschungszentrum – Marburg, Deutschland
AraC (Cytosine β-D-Arabinofuranoside Hydrochloride)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH – Steinheim, Deutschland
ABC-Kit	Vector Laboratories Inc. – Burlingame, Kalifornien, USA
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH – Steinheim, Deutschland
BrdU (5-Bromo-2`Deoxyuridine), Minimum 99% HPLC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH – Steinheim, Deutschland
Chromalaun	Sigma-Aldrich Chemie GmbH – Steinheim, Deutschland
Corbit-Balsam, Einschlussmittel für die mikroskopische Technik	Hecht – Kiel-Hassee, Deutschland
DAB (3,3'-Diaminobenzidine)	Serva Electrophoresis GmbH – Heidelberg, Deutschland
Ethanol 70%	Otto Fischar GmbH – Saarbrücken, Deutschland
Ethylenglycol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH – Steinheim, Deutschland
Gelatine	Merck KGaA – Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH – Steinheim, Deutschland
Ketamin 10%	Intervet Deutschland GmbH – Unterschleißheim, Deutschland
Methanol 99,8%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH – Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid 0,9% (NaCl)	Laboratori Diaco Biomedicali S.p.A. – Trieste, Italien

NaCl (Natriumchlorid)	Merck KGaA – Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid-Lösung 1 N (NaOH)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH – Steinheim, Deutschland
Natrium-Hypochlorid, 13% freies Chlor	Acros Organics, Thermo Fisher Scientific – Geel, Belgien
NaOH 30% (Natriumhydroxid)	Merck KGaA – Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	Carl-Roth GmbH – Karlsruhe, Deutschland
Pferdeserum („Normal Horse Serum“)	Vector Laboratories Inc. – Burlingame, Kalifornien, USA
Polyvinylalkohol-Eindeckmedium mit DABCO, nichtverblässend (Eindeckmedium für Fluoreszenzschnitte)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH – Buchs, Schweiz
Rompun® 2% (Xylazin 20 mg)	Bayer AG – Leverkusen, Deutschland
Salzsäure 2N (HCl)	Carl Roth GmbH – Karlsruhe, Deutschland
Streptavidin	Dako Deutschland GmbH – Hamburg, Deutschland
Sucrose 99,5% (Saccharose, α -D- Glucopyranosyl β -D-Fructofuranoside)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH – Steinheim, Deutschland
Triton-X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH – Steinheim, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30% (H ₂ O ₂)	Acros Organics, Thermo Fisher Scientific – Geel, Belgien
Xylol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH – Steinheim, Deutschland
Ziegenserum „Normal Goat Serum“	Vector Laboratories Inc. – Burlingame, Kalifornien, USA

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Material	Bezugsquelle
Bepanthen®-Salbe (Dexpanthenol)	Bayer AG – Leverkusen, Deutschland
Betaisodona®-Salbe (Povidon-Iod)	Mundipharma GmbH – Limburg, Deutschland

Cryotube CryoPure 1,8 ml	Sarstedt AG & Co. – Nümbrecht, Deutschland
Deckgläser 24*40 mm, 24*50 mm, 24*60 mm	Gerhard Menzel GmbH – Braunschweig, Deutschland
Einbettmedium für Gefrierschnitte (Tissue Freezing Medium)	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH – Wetzlar, Deutschland
Einmal-Skalpelle	B. Braun Melsungen AG – Melsungen, Deutschland
Einmalhandschuhe, NOBAGLOVE®-Nitril weiß, Größe S	NOBA Verbandmittel Danz GmbH & Co. KG – Wetter, Deutschland
Glasflaschen mit Verschluss	Otto E. Kobe KG – Marburg, Deutschland
Mikrotomklingen Breitband- Einwegklingen, Typ 818	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH – Wetzlar, Deutschland
Minipumpen Alzet, Brain Infusion Kit 3 (1-3 mm), Flussrate 0,5 µl/h	Durect Corporation, Alzet Osmotic Pumps – Cupertino, Kalifornien, USA
Nahtmaterial Prolene, Ethicon	Johnson & Johnson Medical GmbH – Norderstedt, Deutschland
Nitril-Chemikalienschutz-Einmal- Handschuhe "SEMPERGUARD®"	Semperit Technische Produkte GmbH – Wien, Österreich
Objektträger, 25*75*1 mm	Gerhard Menzel GmbH – Braunschweig, Deutschland
Onkologische Schutzhandschuhe NOBAGLOVE®-Cytostax, Größe S	NOBA Verbandmittel Danz GmbH & Co. KG – Wetter, Deutschland
Overhead-Folie aus Polyester (Stärke 0,11 mm), Herstellung der physikalischen Barriere	Avery Zweckform GmbH – Oberlaindern, Deutschland
Phosphatzement Pulver und Flüssigkeit	Heraeus Kulzer GmbH – Hanau, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf AG – Hamburg, Deutschland
Saugtupfer Sugi®	Kettenbach GmbH & Co. KG – Eschenburg, Deutschland
Terralin-Liquid (Desinfektionsmittel)	Schülke & Mayr – Norderstedt, Deutschland
Trockeneis	Apotheke Philipps-Universität – Marburg, Deutschland

2.1.3 Geräte

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Geräte und Software.

Gerät	Bezugsquelle
Dispergierer Ultra-Turrax®	IKA®-Werke GmbH & Co. KG – Staufen, Deutschland
Image J, Version 1.43	http://rsbweb.nih.gov/ij/
Kaltlichtlampe Flexilux 300 Longlife	Schölly Fiberoptic GmbH – Denzlingen, Deutschland
Koordinatenmesser	Stoelting Co. – Wood Dale, Illinois, USA
Laser-Konfokalmikroskop Leica TCS SP5	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Mikroskopie und Histologie – Wetzlar, Deutschland
Lichtmikroskop Nikon Microphot-FX	Nikon GmbH – Düsseldorf, Deutschland
Lupe Photo Binoculars 0,5x	Nikon GmbH – Düsseldorf, Deutschland
Mikrotom Cryostat Leica CM3050 S	Leica Biosystems Nussloch GmbH – Nussloch, Deutschland
Perfusionspumpe Masterflex Perfusion Pump Controller	Cole Parmer Instrument Co. – Chicago, Illinois, USA
pH-Meter UltraBasic	Denver Instrument GmbH – Göttingen, Deutschland
Pipetten, 10-100 ul/ 100-1000 ul/ 1000 ul	Eppendorf AG – Hamburg, Deutschland
Präparierbesteck	Carl Roth GmbH & Co. KG – Karlsruhe, Deutschland
Präzisionswaage 440-47N, Wägebereich maximal 2000 g	Kern & Sohn GmbH – Balingen, Deutschland
Präzisionswaage elektronisch 770-13, Wägebereich 600 ct	Kern & Sohn GmbH – Balingen, Deutschland
Schüttelwasserbad GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik mbH – Burgwedel, Deutschland
Spiegelreflexkamera digital, Olympus E-330	Olympus Deutschland GmbH – Hamburg, Deutschland
SPSS für Windows, Version 25	IBM Co. – Armonk, New York, USA
Stereotaxierahmen	Stoelting Co. – Wood Dale, Illinois, USA

Stereotaxie Atlas-Maus	The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates 2nd Edition; George Paxinos & Keith B.J. Franklin, 2001, Elsevier-Verlag
Stereoinvestigator Software, Version 8	MicroBrightField, Magdeburg, Deutschland
Thermometer	NeoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH – Heidelberg, Deutschland
Trepanationsbohrer	Proxxon Werkzeug GmbH – Niersbach, Deutschland

2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen.

Puffer und Lösungen	Ansatz
0,2M Phosphat-Puffer-Lösung (PhB-Stammlösung, pH 7,4)	230 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 52,44 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 L H_2O dest. Der pH-Wert der Lösung sollte bei 7,4 liegen, gegebenenfalls Einstellung mit 2M NaOH.
0,1M Phosphat-Puffer-Lösung (PBS-Gebrauchslösung)	9 g NaCl 50 ml 0,2M PhB-Stammlösung 950 ml H_2O dest.
8% Paraformaldehyd-Lösung (PFA-Stammlösung)	20 g PFA 241,66 ml H_2O dest. 1 Trpf. 30% NaOH Bei Herstellung Mundschutz verwenden. Aqua dest. wurde auf 60°C erwärmt, dann wurde PFA und NaOH hinzugegeben. Im Anschluss wurde die Lösung durch einen Faltenfilter filtriert, um feste Bestandteile zu entfernen. Die Lösung war nach Herstellung circa eine Woche zur Verwendung geeignet.

4% Paraformaldehyd-Lösung (PFA-Gebrauchslösung)	8%-ige PFA-Stammlösung wurde mit 0,2M PhB-Stammlösung im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Lösung wurde im eiskalten Zustand verwendet.
Boratpuffer (pH 8,5)	15,45 g Borsäure 5 ml 10N NaOH 450 ml H ₂ O dest. Der pH-Wert der Lösung sollte bei 8,5 liegen, gegebenenfalls Einstellung mit 10N NaOH.
Tritonlösung	100 ml 3% Triton-X-100 900 ml 0,1M PBS
30% Sucrose	300 g Sucrose 99,5% (= Saccharose) 800 ml PhB 0,1M PhB-Gebrauchslösung
Antifreeze (Gefrierschutzlösung für Hirnschnitte)	5,18 g Na ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O 1,57 g NaH ₂ PO ₄ • 2H ₂ O 400 ml H ₂ O dest. 300 ml Ethylenglycol 300 ml Glyzerin
Gelatine-Lösung (zum Gelatinieren von Objektträgern)	13 g Gelatine 0,18 g Chromkaliumsulfat 300 ml H ₂ O dest. 13 g Gelatine wurden in 300 ml destilliertes Wasser gegeben, woraufhin die Lösung zunächst eine Stunde ruhen gelassen wurde. Dann wurde nach Hinzugabe von 180 mg Chromalaun die Lösung auf 40°C erhitzt und anschließend filtriert. Zum Gelatinieren der Objektträger wurde die Lösung zum Verflüssigen in ein Wasserbad gestellt und die Objektträger durch Eintauchen damit benetzt. Anschließend Lagerung der Objektträger zum Trocknen unter dem Abzug.

DAB-Konzentrat (bei Herstellung Mundschutz verwenden)	100 mg DAB (3,3'-Diaminobenzidine) 10 ml H ₂ O dest. 10 ml 0,2M PhB Die Lösung wurde nach Herstellung durch einen Faltenfilter filtriert und in Aliquots (1 ml) eingefroren.
DAB-Gebrauchslösung	1 ml DAB-Konzentrat (entspricht einem Aliquot) 9 ml 0,1M PhB 0,2 ml 1% H ₂ O ₂ (50µl 30% H ₂ O ₂ + 1,45 ml H ₂ O)

2.1.5 Antikörper

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper.

Primärantikörper	Marker für	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-TH (AB152) Wirt: Kaninchen Art: Polyklonal	Dopaminerge Neurone	1:1000	Merck Millipore – Temecula, Kalifornien, USA
Anti-BrdU (OBT0030) Wirt: Ratte Art: Monoklonal	BrdU-Detektion	1:500	Bio-Rad AbD Serotec GmbH – Puchheim, Deutschland
Anti-NeuN (MAB377B) Wirt: Maus Art: Monoklonal Konjugat: Biotin	Neurone	1:1000	Merck Millipore – Temecula, Kalifornien, USA

Sekundärantikörper	Konjugat	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-TH (711-065-152) AffiniPure Esel Anti-Kaninchen IgG (H+L) Wirt: Esel Ziel: Kaninchen Spezifität: IgG (H+L) Art: Polyklonal	Biotin-SP (Long Spacer)	1:500	Jackson ImmunoResearch Inc. – West Grove, Pennsylvania, USA
Anti-TH (111-175-144) Cy TM 5 AffiniPure Ziege Anti-Kaninchen IgG (H+L) Wirt: Ziege Ziel: Kaninchen Spezifität: IgG (H+L) Art: Polyklonal	Cyanine Cy TM 5	1:500	Jackson ImmunoResearch Inc. – West Grove, Pennsylvania, USA
Anti-BrdU (A11006) Ziege Anti-Ratte IgG (H+L) (A-11006) Wirt: Ziege Ziel: Ratte Spezifität: IgG (H+L) Art: Polyklonal	Alexa Fluor® 488	1:1000	Thermo Fisher Scientific – Rockford, Illinois, USA
Anti-NeuN (115-166-003) Cy TM 3 AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Ziege Anti-Maus IgG (H+L) Wirt: Ziege Ziel: Maus Spezifität: IgG (H+L) Art: Polyklonal	Cyanine Cy TM 3	1:500	Jackson ImmunoResearch Inc. – West Grove, Pennsylvania, USA

2.1.6 Versuchstiere

Für die Durchführung der Tierversuche lag die Genehmigung des Regierungspräsidiums Gießen vor (Ordnungsnummer V54-19c20-15(1)MR20/15Nr.41/2009). Alle Versuche wurden in den Räumlichkeiten des biomedizinischen Forschungszentrums (BMFZ) der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

Verwendet wurde eine Gesamtzahl von 26 adulten männlichen Mäusen des Stammes C57Bl/6 (Charles River, Sulzfeld, Deutschland). Die Tiere waren zu Beginn des Experiments 10 Wochen alt und wiesen jeweils ein Körpergewicht von 20-25 Gramm auf. Die Tiere wurden in Macrolon-Käfigen (Firma Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland) unter kontrolliert pathogenfreien Bedingungen mit freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Temperatur und Luftfeuchtigkeit in den Räumlichkeiten des Tierstalls lagen im Rahmen der gesetzlich vorgegebenen Zulassungsgrenzen für die Haltung von Nagetieren. Der Hell-Dunkel-Zyklus in den Tierställen war auf 12/12 Stunden eingestellt (Hellphase 7-19 Uhr, Dunkelphase 19-7 Uhr). Die Versorgung der Tiere wurde freundlicherweise durch die Tierpfleger des BMFZ Marburg übernommen, welche die Tiere auch täglich auf ihren Gesundheitszustand untersuchten.

Generell handelt es sich bei C57Bl/6-Mäusen um den klassischen Modellorganismus für Studienzwecke der adulten Neurogenese, für welchen alle notwendigen Methoden validiert sind.

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchsaufbau/experimentelles Design

Für das Gesamtprojekt wurden insgesamt 26 Tiere nach dem im Folgenden beschriebenen Verfahren durch die Doktorandin Corinna Rüschoff-Steiner operiert, experimentell behandelt und zu unterschiedlichen Nachbeobachtungszeitpunkten (Tag 0, 2, 14, 55 und 105) geopfert. Die Gehirne der Tiere wurden entnommen und zur weiteren histologischen Aufarbeitung vorbereitet. Die Arbeit wurde in einen Kurzzeit- und Langzeitbeobachtungsarm aufgeteilt:

Die Gewebefärbungen und Auswertungen der Kurzzeitbeobachtungsgruppe (Tag 0, 2 und 14) sind Inhalt einer anderweitigen Dissertation und wurden von

der Doktorandin Frau Kerstin Schweyer am Klinikum rechts der Isar an der Technischen Universität München durchgeführt.

Die Ergebnisse der Gewebeuntersuchungen der Langzeitbeobachtungsgruppe (Tag 55 und 105) sind Gegenstand der vorliegenden Doktorarbeit. Alle der folgenden Ausführungen beziehen sich ausschließlich auf die Tiere dieser Gruppe.

Die Tiere innerhalb der Langzeitbeobachtungsgruppe wurden randomisiert einer Experimentalgruppe (Tag 55 und 105) sowie einer Kontrollgruppe zugeordnet. Die Anzahl der Tiere in der Experimentalgruppe belief sich auf 8 Tiere (Tag 55 $n=4$, Tag 105 $n=4$), in der Kontrollgruppe befanden sich 3 Tiere, sodass insgesamt 11 Tiere in der Langzeitbeobachtungsgruppe behandelt wurden.

Bei den Tieren der Experimentalgruppe wurde zu Beginn des Experiments die Implantation der physikalischen Barriere (PB) in den RMS auf der rechten Seite vorgenommen. Nach einer Woche folgte die Einsetzung einer Minipumpe für die kontinuierliche Applikation von AraC auf die Gehirnoberfläche zur Unterdrückung der Zellproliferation in der SVZ für insgesamt 7 Tage. Der Zeitpunkt nach abgeschlossener AraC-Infusion wurde als Tag 0 definiert. Es folgte einmal täglich eine intraperitoneale BrdU-Injektion über 6 Tage. Die Tiere wurden an Tag 55 und Tag 105 geopfert.

Die Tiere der Kontrollgruppe wurden keinem operativen Eingriff unterzogen, es wurde weder eine PB noch eine Minipumpe zur AraC-Infusion implantiert. Es erfolgte lediglich, identisch zu den Tieren der Experimentalgruppe, die tägliche Applikation von BrdU über 6 Tage. Die Tiere der Kontrollgruppe wurden ebenfalls an Tag 105 geopfert (siehe Abbildung 8).

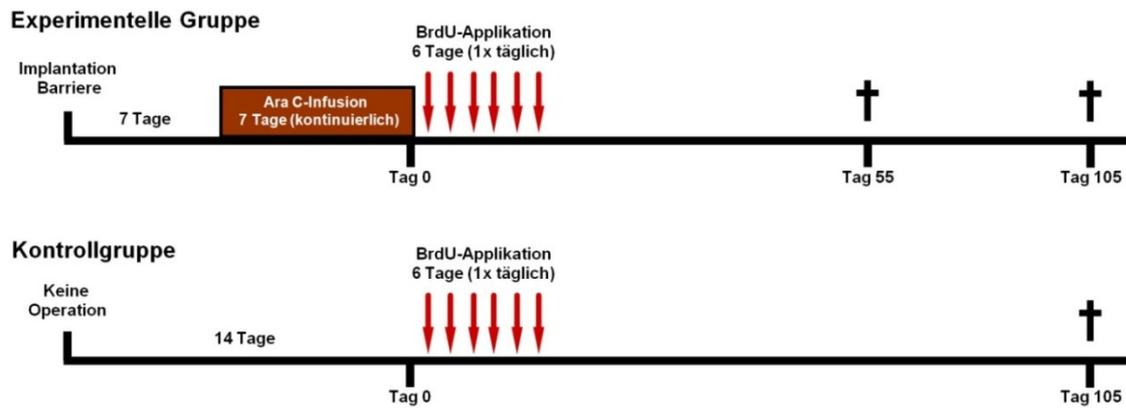


Abbildung 8: Versuchsaufbau mit Darstellung des zeitlichen Verlaufs und der Durchführung der Tierversuche.

Den Versuchstieren der experimentellen Gruppe (n=8) wurde zu Beginn eine physikalische Barriere (PB) zur Unterbrechung des RMS auf der rechten Seite des Gehirns implantiert. Nach 7 Tagen folgte eine kontinuierliche Cytarabin (AraC)-Infusion mit Hilfe einer Minipumpe über einen Zeitraum von 7 Tagen zur Unterdrückung der Zellproliferation in der SVZ. Anschließend erfolgte einmal täglich eine intraperitoneale Bromodeoxyuridin (BrdU)-Applikation über 6 Tage. An Tag 55 (n=4) und Tag 105 (n=4) wurden die Tiere geopfert.

Die Versuchstiere der Kontrollgruppe (n=3) erhielten keine Operation (weder PB- noch Minipumpenimplantation). Es erfolgte lediglich eine intraperitoneale BrdU-Applikation einmal täglich über insgesamt 6 Tage. Danach wurden die Versuchstiere der Kontrollgruppe an Tag 105 geopfert.

2.2.2 Herstellung der physikalischen Barriere

Die physikalische Barriere (PB) aus Polyester (handelsübliche Overhead-Folie) wurde eigenhändig mit Hilfe eines Lineals und einem Cutter auf die entsprechend benötigten Maße zugeschnitten: Länge 3,5 mm, Breite 2,0 mm bei einer vorgegebenen Folienstärke von 0,11 mm.

2.2.3 Implantation der physikalischen Barriere

Ziel der Implantation der PB aus Polyester war die mechanische Unterbrechung des RMS auf der rechten Seite des Gehirns (siehe Abbildung 9). Dazu wurden die Versuchstiere mittels intraperitonealer Injektion eines Narkosegemischs aus Ketamin (80 mg/kgKG) und Xylazin 2% (4 mg/kgKG verdünnt mit NaCl 0,9%) in Vollnarkose versetzt. Die Hornhaut der Augen wurde durch das Auftragen von Dexpanthenol-Salbe vor dem Austrocknen geschützt. Nach Eintreten einer ausreichenden Narkosetiefe, welche durch das Setzen eines Schmerzreizes an der Vorderpfote überprüft wurde, wurden die Mäuse in den Stereotaxierahmen eingespannt. Die nachfolgende Operation wurde unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Zunächst wurde die Haut über der Schädelkalotte

mit einem Rasierer vom Fell befreit und anschließend mit einem Tupfer gesäubert. Durch einen sagittalen Hautschnitt im Bereich der Mittellinie wurde nun der Zugang zur Schädelkalotte geschaffen. Ausgehend von Bregma wurden die entsprechenden Koordinaten auf dem Schädelknochen aufgesucht:

Anterior-posterior +1,75 mm	relativ zu Bregma*
Medio-lateral 0 bis +2,0 mm (Breite der PB)	relativ zu Bregma*
Dorso-ventral -3,5 mm (Länge der PB)	relativ zur Dura*

* basierend auf dem Stereotaxie-Mausatlas von Paxinos und Franklin (2001)

Mit Hilfe eines Feinbohrers wurde die Schädelkalotte eröffnet, um anschließend die PB möglichst senkrecht zur Gehirnoberfläche mit ganzer Länge von entsprechend 3,5 mm in das Gehirngewebe vorzuschieben, sodass sie mit der Gehirnoberfläche abschloss. Nach Beendigung der Operation, deren Dauer sich pro Tier jeweils über circa 30-40 Minuten erstreckte, wurde die Haut über dem Schädelknochen mit mehreren Hautnähten verschlossen und die Wunde mit Povidon-Iod abgedeckt. Die Mäuse wurden zurück in ihre Käfige gebracht und bis zum Aufwachen mit einer Wärmelampe beschienen.

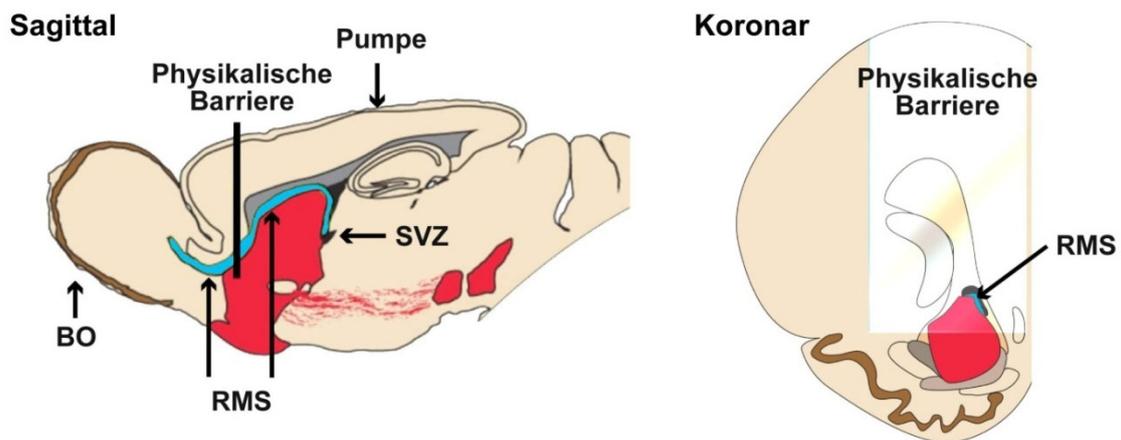


Abbildung 9: Illustration eines Sagittal- und Koronarschnittes des Gehirns einer Maus mit eingezeichneter physikalischer Barriere und AraC-Minipumpe. (modifiziert nach Allen Human Brain Atlas, Allen Institute for Brain Science, atlas.brain-map.org, Zugriffsdatum: 27.01.2017)

2.2.4 Implantation der osmotischen Minipumpe und AraC-Applikation

Die kontinuierliche Abgabe des Zytostatikums AraC über eine Minipumpe auf die Gehirnoberfläche hatte zum Ziel, alle proliferierenden Vorläuferzellen aus

dem RMS zu eliminieren. Vor dem Eingriff wurden die Pumpen entsprechend den Vorschriften des Herstellers mit AraC befüllt und die Applikationskanülen auf eine Länge von einem Millimeter gekürzt, sodass diese auf der Gehirnoberfläche zu Liegen kamen.

Zur Einleitung der Operation wurden die Tiere mittels intraperitonealer Injektion eines Narkosegemischs aus Ketamin (80 mg/kgKG) und Xylazin 2% (4 mg/kgKG verdünnt mit NaCl 0,9%) in Vollnarkose versetzt. Die Hornhaut der Augen wurde mit Dexpanthenol-Salbe vor dem Austrocknen geschützt. Nach dem Einspannen der Tiere in den Stereotaxierahmen wurde die im Rahmen des vorausgehenden Eingriffs gesetzte Operationsnarbe wieder eröffnet. Nach der Identifikation von Bregma als Referenzpunkt auf der Schädelkalotte wurden von dort ausgehend die folgenden Koordinaten aufgesucht:

Anterior-posterior 0 mm	relativ zu Bregma*
Medio-lateral +1,1 mm	relativ zu Bregma*
Dorso-ventral -1,0 mm	relativ zur Dura*

* basierend auf dem Stereotaxie-Mausatlas von Paxinos und Franklin (2001)

An entsprechender Stelle (siehe Abbildung 10) wurde durch Kratzen mit einem Spatel die Schädelkalotte aufgeraut, das periostale Bindegewebe entfernt und der Schädelknochen mit einem Tupfer getrocknet, um anschließend eine bessere Fixierung der Kanüle zu gewährleisten. Anschließend wurde die Schädelkalotte mit einem Trepanationsbohrer an dieser Stelle eröffnet. Die Kanülen der Minipumpen wurden an dieser Stelle auf die Gehirnoberfläche aufgebracht und an der Schädelkalotte mit Dentalzement befestigt. Nach der Aushärtung des Zementes wurde zur Platzierung der Minipumpe eine subkutane Tasche in der Mittellinie in Verlängerung des Schnittes der Schädelkalotte stumpf präpariert, in welcher die Pumpe im Bereich des Rückgrates zum Liegen kam.

AraC 2% wurde mit Hilfe der Minipumpe kontinuierlich über einen Zeitraum von 7 Tagen auf die Hirnoberfläche mit einer Flussrate von 0,5 µl/h aufgebracht. Nach Beendigung der Infusion wurden die Minipumpen mitsamt Kanülen in einer erneuten kurzen Operation entfernt und auf ihre vollständige Entleerung geprüft. Es waren alle Pumpen komplett entleert. Dieser Tag wurde im weiteren

Experiment als Tag 0 definiert, da nun alle proliferierenden Stammzellen (A- und C-Zellen) untergegangen sein sollten.

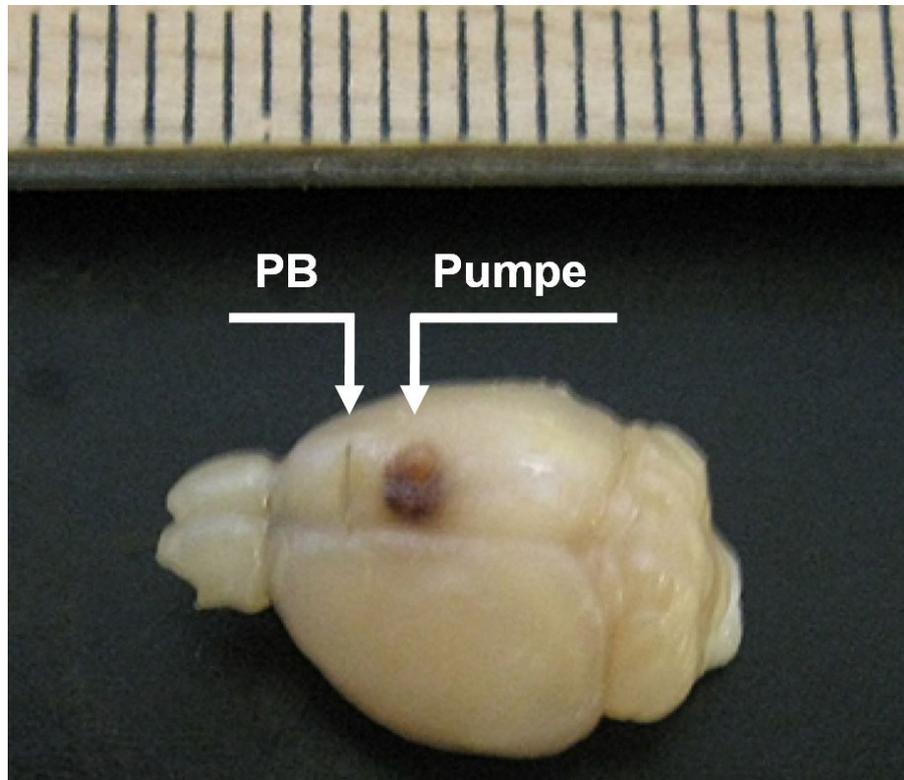


Abbildung 10: Gehirn einer Maus der Experimentalgruppe.

Die PB, welche den rechten RMS durchtrennt, befindet sich noch im Gehirn (siehe Pfeil PB). An der Stelle, wo die Kanüle der Minipumpe auf der Gehirnoberfläche zum Liegen kam, zeigt sich ein Umgebungshämatom (siehe Pfeil Pumpe).

2.2.5 BrdU-Applikation

BrdU fungiert als Thymidin-Analogon und wird an Stelle von Thymidin in die DNA der proliferierenden Stammzellen eingebaut. Die Applikation von BrdU ermöglicht es, zum Zeitpunkt der Verabreichung mitotisch aktive Zellen (S-Phase des Zellzyklus) *in vivo* zu markieren und anschließend mittels immunhistochemischer Färbung darstellen zu können (Corotto et al., 1993). Studien konnten bestätigen, dass ein Großteil (etwa 90%) der sich teilenden Zellen mittels BrdU dargestellt werden können (Burns and Kuan, 2005).

Von Tag 1 bis Tag 6 erfolgte dafür bei allen Tieren (Kontrollgruppe ohne vorherige Operation und AraC-Behandlung, experimentelle Gruppe mit vorheriger Operation und AraC-Behandlung) jeweils zur gleichen Uhrzeit eine einmal tägliche intraperitoneale Injektion von BrdU in einer Konzentration von

100 mg/kgKG. Die Injektionslösung wurde täglich vor der Applikation frisch hergestellt, indem BrdU in einer Konzentration von 10 mg/ml in 0,9%-iger Kochsalzlösung unter Hinzugabe von 30 µg NaOH gelöst und vor Lichteinfall geschützt wurde. Vor der Verabreichung wurde das Körpergewicht der Tiere ermittelt. Auch nach diesen 6 Tagen wurde der Gesundheitszustand der Tiere durch die zuständigen Tierpfleger weiterhin täglich evaluiert.

2.2.6 Transkardiale Perfusion

An den festgelegten Tagen 55 und 105 wurden die Tiere mittels transkardialer Perfusion geopfert. Hierzu wurden die Versuchstiere zunächst mittels intraperitonealer Gabe von Pentobarbital-Natrium entsprechend den Empfehlungen des Herstellers euthanasiert (600 mg/kgKG i.p.). Die Mäuse wurden in Rückenlage an allen vier Extremitäten fixiert, anschließend wurden Abdomen und Brustkorb mittels eines medianen Längsschnittes geöffnet. Die Perfusionskanüle wurde in den linken Ventrikel des noch schlagenden Herzens eingebracht und die Perfusion gestartet. Unmittelbar danach wurde das rechte Atrium durch einen Schnitt eröffnet, um ein Abfließen des venösen Blutes sowie der Perfusionsflüssigkeit zu gewährleisten. Zunächst wurde das Gefäßsystem für circa 10 Minuten mit phosphatgepufferter Normalsalzlösung (0,1M PBS-Lösung) ausgewaschen, im Anschluss wurde das Fixativ (4%-iges eisgekühltes PFA) verabreicht. Beide Lösungen wurden mittels einer Perfusionspumpe mit einer Durchflussrate von 10 ml/min appliziert, um Gewebeschädigungen zu vermeiden. Die Gesamtdauer einer einzelnen Perfusion lag somit bei etwa 20 Minuten.

2.2.7 Gewebepräparation, Nachfixierung, Dehydrierung

Unmittelbar nach abgeschlossener Perfusion wurden die Gehirne der Tiere entnommen. Hierzu wurde jedes Tier zunächst mit einer Schere dekapitiert und die Haut über dem Schädelknochen mittels eines Sagittalschnitts eröffnet. Mit einer Pinzette wurde sodann die Sagittalschuppe vom Foramen magnum ausgehend abgehoben, sodass das Schädeldach mit Hilfe einer kleinen Schere im Verlauf der Sutura sagittalis vorsichtig eingeschnitten werden konnte. Anschließend wurde mit einer Pinzette das knöcherne Schädeldach abgehoben

und das Gehirn mit Hilfe eines Spatels von der Schädelbasisplatte gelöst. Es wurde hierbei auf vollständige Unversehrtheit des Gehirns, insbesondere des olfaktorischen Bulbus, geachtet. Im Anschluss wurden alle Gehirne in 4%-iger PFA-Lösung bei 4°C nachfixiert, bis das Gehirn auf den Boden des Behältnisses abgesunken war, was nach circa 24 Stunden der Fall war. Danach wurden die Gehirne in eine 30%-ige Sucroselösung gegeben, welche in den nächsten drei aufeinanderfolgenden Tagen täglich gewechselt wurde. Danach wurden die Gehirne zur Kryoprotektion in 30%-iger Sucrose bei -20°C bis zur nachfolgenden Weiterverarbeitung gelagert.

2.2.8 Herstellung von Gewebeschnitten

Nach Entnahme der Gehirne aus der Sucrose-Lösung wurden diese nach vorsichtigem Abtupfen auf der Trägerplatte des Gefriermikrotoms mit Einbettmedium für Gefrierschnitte befestigt und anschließend mit Trockeneis durchgefroren. Dann wurde zur späteren Orientierung bei der Weiterverarbeitung auf der linken Seite des Gehirns eine punktförmige Markierung gesetzt, bevor der Schneidevorgang am BO begonnen wurde. Es wurden koronare Gewebeschnitte mit einer Schichtdicke von 30 µm bei einer Umgebungstemperatur von -20°C angefertigt. Der Schneidevorgang galt mit Ankunft im Bereich des Cerebellums als beendet. Die Schnitte wurden in zehn Schnittserien in Cryotubes in Antifreeze-Lösung gesammelt („Free-Floating-Methode“) und bis zur Weiterverarbeitung tiefgekühlt bei -20°C aufbewahrt. Später wurde mit Auswahl eines Cryotubes somit jeder zehnte Schnitt gefärbt.

2.2.9 Immunhistochemie

Bei der Immunhistochemie (IHC) handelt es sich um eine Methode zur Sichtbarmachung von Proteinen mit Hilfe von Antikörpern. Dazu wurden die in Tabelle 5 (Kapitel 2.1.5.) aufgeführten Primär- und Sekundärantikörper verwendet. Für die Visualisierung der Antikörperreaktion standen zwei verschiedene Methoden zur Verfügung:

Dazu wurde entweder ein biotinylierter Sekundärantikörper verwendet, an den eine Avidin-Biotin-Peroxidase binden konnte, welche wiederum mit dem Chromogen 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) zu einem farbigen Produkt reagierte

(DAB-IHC). Die entstandene braun-schwarze Farbreaktion konnte unter dem Lichtmikroskop ausgewertet werden.

Alternativ wurden Sekundärantikörper mit daran gebundenen Fluorochromen verwendet, die durch Fluoreszenzlicht unter einem Fluoreszenzmikroskop angeregt werden konnten und daraufhin farbige Lichtsignale emittierten (Fluoreszenz-IHC).

2.2.9.1 DAB-Immunhistochemie

Mit Hilfe der DAB-IHC erfolgte der Nachweis des Enzyms Tyrosinhydroxylase (TH) im BO, welches die Aminosäure Tyrosin zu L-DOPA hydroxyliert und spezifisch für monoaminerge Zellen ist.

Das Protokoll unter Verwendung der entsprechenden Antikörper (siehe Tabelle 5) ist nachfolgend in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Protokoll der immunhistochemischen DAB-Färbung.

Arbeitsschritt	Chemikalien und Antikörper	Zeitdauer	Verdünnung
Tag 1			
Waschen	0,1M PBS	3x 10 Minuten	
Peroxidaseblockierung	Methanol 100% H ₂ O ₂ 35% 0,1M PBS	15 Minuten	
Waschen	0,1M PBS	3x 10 Minuten	
Präinkubation (zur spezifischeren Ak-Bindung)	0,3% Triton/ 0,1M PBS 5% Pferde-Serum	1 Stunde	
Waschen	0,1M PBS	3x 10 Minuten	
Inkubation Primär-Ak bei 4°C (Kältekammer)	0,3% Triton/ 0,1M PBS 5% Pferde-Serum Anti-TH-Ak	Über Nacht, circa 20 Stunden	1:1000
Tag 2			
Waschen	0,1M PBS	3x 10 Minuten	

Inkubation Sekundär-Ak	0,3% Triton/ 0,1M PBS Anti-TH Esel Anti-Kaninchen IgG (H+L), Biotin-SP-gekoppelt	1 Stunde	1:500
Inkubation in Avidin/Biotin-Peroxidase-Lösung (30 Minuten vor Gebrauch ansetzen)	0,1M PBS ABC-Kit Vectastain®	1 Stunde	
Waschen	0,1M PBS	3x 10 Minuten	
DAB-Färbung	DAB-Konzentrat 0,1M PBS 1% H ₂ O ₂	1-5 Minuten, Schnitte in 0,1M PBS überführen, um Färbung zu stoppen	

2.2.9.2 Fluoreszenz-Immunhistochemie

Durch die Anwendung einer Dreifach-Färbung für TH, BrdU und NeuN (neuronales nukleäres Antigen) im BO konnte jede einzelne Zelle hinsichtlich des gleichzeitigen Vorliegens der drei Zielantigene untersucht werden. Im Fluoreszenzmikroskop fluoreszierten die Marker bei unterschiedlichen Wellenlängen, wodurch eine farbliche Unterscheidung möglich war. Hierbei galt es jedoch bei der Anwendung der Primärantikörper zu beachten, dass jeder der verwendeten Antikörper aus einer anderen Spezies stammen musste, um Kreuzreaktionen zu vermeiden. Die Schnitte wurden dazu mit den Primärantikörpern für BrdU (Wirt Ratte), NeuN (Wirt Maus) und TH (Wirt Kaninchen) sowie den dazu passenden Sekundärantikörpern (siehe Tabelle 5) mit entsprechend gebundenen Fluoreszenz-Farbstoffen (siehe Tabelle 7) nach Vorschrift des Protokolls der Dreifach-Färbung (siehe Tabelle 8) inkubiert.

Wenn nicht anders angegeben, erfolgten alle Arbeitsschritte bei Raumtemperatur. Nach Beendigung der Färbung wurden die histologischen Schnitte bis zum Aufziehen auf Objektträger in NaCl 0,9% unter Lichtschutz

gelagert. Nach dem Aufziehen auf gelatinierte Objektträger wurden die Schnitte umgehend mit Polyvinyl-Alkohol DABCO Mounting-Medium eingedeckt.

In der SVZ wurde eine Einzel-Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis BrdU+-Zellen durchgeführt. Das angegebene Protokoll der Dreifach-Färbung wurde entsprechend verkürzt und nur mit dem entsprechenden Primär- und Sekundärantikörper zur Färbung des Thymidinanalogons BrdU durchgeführt.

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Fluoreszenz-Farbstoffe.

Farbstoff	Absorptionsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)
Indocarbocyanine, Cy3	550	570
Indodicarbocyanine, Cy5	650	670
Alexa Fluor 488	495	519

Tabelle 8: Protokoll der Dreifach-Färbung (TH, BrdU, NeuN).

Arbeitsschritt	Chemikalien und Antikörper	Zeitdauer	Verdünnung
Tag 1			
Waschen	0,1M PBS	4x 5 Minuten	
Peroxidaseblockierung	Methanol 100% H ₂ O ₂ 35% 0,1M PBS	15 Minuten	
Waschen	0,1M PBS	4x 5 Minuten	
DNA-Denaturierung	2N HCl	30 Minuten	
bei 37°C im Wasserbad			
Waschen (zur pH-Neutralisierung)	0,1M Borat-Puffer, pH 8,5	4x 5 Minuten	
Waschen	0,1M PBS	4x 5 Minuten	
Präinkubation (zur spezifischeren Ak-Bindung)	0,3% Triton/ 0,1M PBS 5% Ziegen-Serum	2 Stunden	
Inkubation 1. Primär-Ak bei 4°C (Kältekammer)	0,1M PBS 5% Ziegen-Serum Anti-BrdU-Ak	Über Nacht, circa 20 Stunden	1:500
Tag 2			
Waschen	0,1M PBS	4x 5 Minuten	

Inkubation 1.	0,1M PBS	2 Stunden	1:1000
Sekundär-Ak unter Lichtschutz	5% Ziegen-Serum Anti-BrdU Ziege Anti-Ratte IgG, Alexa Fluor 488-gekoppelt		
Waschen	0,1M PBS	4x 5 Minuten	
Inkubation 2. Primär- Ak bei 4°C (Kältekammer)	0,1M PBS 5% Ziegen-Serum Anti-NeuN-Ak	Über Nacht, circa 20 Stunden	1:1000
Tag 3			
Waschen	0,1M PBS	4x 5 Minuten	
Inkubation 2. Sekundär-Ak unter Lichtschutz	0,1M PBS 5% Ziegen-Serum Anti-NeuN Ziege Anti-Maus IgG, Cyanine Cy™3- gekoppelt	2 Stunden	1:500
Waschen	0,1M PBS	4x 5 Minuten	
Inkubation 3. Primär- Ak bei 4°C (Kältekammer)	0,1M PBS 5% Ziegen-Serum Anti-TH-Ak	Über Nacht, circa 20 Stunden	1:1000
Tag 4			
Waschen	0,1M PBS	4x 5 Minuten	
Inkubation 3. Sekundär-Ak unter Lichtschutz	0,1M PBS 5% Ziegen-Serum Anti-TH Ziege Anti- Kaninchen IgG, Cyanine Cy™5- gekoppelt	2 Stunden	1:500
Waschen	0,1M PBS	4x 5 Minuten	
Aufbewahrung in NaCl 0,9% unter Lichtschutz bis zum Aufziehen auf Objektträger			

TUNEL-Färbung

Zur Detektion von apoptotischen Zellen wurde das Detektionskit Click-iT® TUNEL Alexa Fluor® 488 Imaging Assay For Microscopy & HCS (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) verwendet. Die TUNEL-Methode (TdT-Mediated dUTP-Biotin Nick End Labeling) beruht auf der enzymatischen Markierung von freien 3'-OH-Enden durch das Enzym Terminale Desoxynucleotidyl Transferase (TdT). Freie 3'-OH-Enden entstehen bei Doppelstrangbrüchen der DNA in apoptotischen Zellen. Mit Hilfe von TdT war es möglich, an diese freien Enden Nukleotide mit gekoppeltem Fluorescein zu binden, die mittels Konfokalmikroskopie sichtbar gemacht werden konnten.

Nach einer Vorbehandlung wurde die TUNEL-Färbung gemäß der Anleitung des Kits durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte zur Steigerung der Zellpermeabilität zuerst für 20 Minuten in PhB und 0,3% Triton inkubiert. Dann wurden die Schnitte zweimalig in Citratpuffer (pH 5,8) bis zum Siedepunkt in der Mikrowelle erhitzt, um sie danach 20 Minuten in dem erhitzten Citratpuffer abkühlen zu lassen. Im Anschluss wurden die Schnitte in 0,1M PhB mit 5% Normal Goat Serum und 1:1000 verdünntem BSA für eine Stunde geblockt. Jetzt folgte die eigentliche TUNEL-Färbung. Dazu wurden die Schnitte über Nacht bei 4 Grad Celsius in einem TdT-Reaktionsgemisch (bestehend aus TdT, Nukleotiden und Puffer) inkubiert. Dadurch wurden die freien 3'-OH-Enden mit modifizierten Deoxyuridin-Triphosphaten (dUTPs) markiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte erneut in 0,1M PhB mit 5% Normal Goat Serum und 1:1000 verdünntem BSA für eine Stunde geblockt und mehrmals in PhB gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation in dem Click-it-Reaktionsgemisch (bestehend aus dem Fluorochrom Alexa Fluor 488 und Kupfer-Puffer) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Dadurch konnten die modifizierten dUTPs mit dem Fluorochrom Alexa Fluor 488 sichtbar gemacht werden. Zum Schluss wurden die Schnitte nochmals mit 3%-igem BSA in PBS gewaschen.

2.2.10 Lichtmikroskopie und Stereologie

Die Zellzählung von TH-angefärbten Zellen erfolgte mit dem Lichtmikroskop Nikon Microphot-FX bei 40-facher Vergrößerung mit Hilfe des halb-automatischen Stereologiesystems StereoInvestigator (StereoInvestigator Software Version 8, MicroBrightField, Magdeburg, Deutschland) unter

verblindeten Bedingungen. Das Programm unterteilte den gewünschten Untersuchungsbereich automatisch in ein dreidimensionales Gitternetz. Dieses wurde in Form einer zweidimensionalen Zählfläche (x-y) mit einem z-Meter zur Tiefenregulation dargestellt. Es wurde innerhalb des Programms die sogenannte Optical Fractionator-Methode angewandt, welche darauf beruht, dass die Zählfläche von zwei roten (unten und links) und zwei grünen Linien (oben und rechts) eingegrenzt wird. Es werden bei der Analyse nur Zellen in die Quantifizierung miteinbezogen, deren Zellkörper sich innerhalb der Zählfläche oder auf einer der beiden grünen Linien befinden. Zellkörper, die hingegen mit mindestens einer der beiden roten Linien in Berührung kommen, werden bei der Auszählung nicht berücksichtigt. Da bei der Anwendung dieser Methode nicht jede immunhistochemisch-positive Zelle ausgezählt wird, kann eine Überschätzung der Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen vermieden werden. Zur Definition der jeweiligen auszuzählenden Bereiche, der Region of Interest (ROI), wurde der Stereotaxie-Atlas für Mäuse von Paxinos und Franklin hinzugezogen.

Die Gesamtzahl TH+-Neurone wurde in der PGL des BO (3,74 mm bis 6,86 mm relativ zu Bregma) quantifiziert.

2.2.11 Konfokalmikroskopie

Die Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskopie stellt eine Weiterentwicklung der konventionellen Lichtmikroskopie dar und bedient sich dem physikalischen Effekt der Fluoreszenz. Die Konfokalmikroskopie ermöglicht es, phänotypische Marker in drei orthogonalen Ebenen (x, y, z) nachzuweisen. Zur Untersuchung einer Zelle werden von dieser mehrere Schichtaufnahmen angefertigt. Signalanteile außerhalb der Untersuchungsebene werden im Gegensatz zur Lichtmikroskopie ausgeblendet. Durch späteres Übereinanderlegen der Schichten kann ein dreidimensionales Bild einer Zelle rekonstruiert werden. Durch die Emission von monochromatischem Licht eines Lasers gelingt die Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen, welche das absorbierte Licht in anderer, längerer Wellenlänge wiederspiegeln (Stokes-Verschiebung). So ist es möglich, Kollokalisierungen von unterschiedlichen Zellmarkern zu untersuchen.

Die Konfokalmikroskopie wurde mit dem Mikroskop Leica TCS SP5 unter verblindeten Bedingungen durchgeführt, auch hier wurde zur Zellquantifizierung

immunhistochemisch-positiver Zellen die Software StereoInvestigator mit der Optical Fractionator-Methode eingesetzt. Das Zählraster zur Quantifizierung betrug sowohl in der SVZ als auch im BO 300 x 300 μm bei einer Zählrahmengröße von 100 x 100 μm . Zur Definition der anatomischen Bereiche wurde der Stereotaxie-Mausatlas von Paxinos und Franklin benutzt.

Zur Auswertung der BrdU-Immunhistochemie wurden BrdU+-Zellen in der SVZ (0,1 mm bis 1,0 mm relativ zu Bregma) sowie in der PGL und der GCL des BO (3,74 mm bis 6,86 mm relativ zu Bregma) quantifiziert.

Zur Untersuchung der Dreifachfärbung (BrdU, NeuN, TH) wurden 50 BrdU+-Zellen der PGL des BO (3,74 mm bis 6,86 mm relativ zu Bregma) nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und die jeweilige Koexpression von BrdU mit NeuN oder TH unter einer 63-fachen Vergrößerung mit Hilfe einer 3D-Analysesoftware untersucht und quantifiziert. Die untersuchten Schnitte hatten eine Schichtdicke von 1 μm . Für einige Zellen wurde zusätzlich eine 3D-Rekonstruktion durchgeführt.

Die Auswertung der TUNEL-Färbung erfolgte ebenfalls mittels Konfokalmikroskopie. Dazu wurden TUNEL+-Zellen, welche sich in Apoptose befinden, in der PGL des BO (3,74 mm bis 6,86 mm relativ zu Bregma) quantitativ ausgewertet. Es wurden vier anatomisch identische, zuvor festgelegte ROIs dieser Zellschicht in jedem fünften Schnitt des BO mit 20-facher Vergrößerung analysiert.

2.2.12 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm SPSS für Windows (IBM SPSS Version 25). Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm SEM (Standard Error of the Mean) angegeben. Eine zweifaktorielle Varianzanalyse (Seite * Gruppe), Two-Way ANOVA (Analysis of Variances), mit einem Post-hoc-Tukey-Test wurde durchgeführt. Ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde als signifikant, $p < 0,01$ als statistisch hochsignifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 BrdU+-Zellen in der SVZ

Zur Untersuchung des Abwanderungsverhaltens der neu entstandenen Zellen wurden die BrdU+-Zellen der jeweiligen SVZ zu den unterschiedlichen Zeitpunkten immunhistochemisch ermittelt. Der rechte RMS der Experimentalgruppen (Tag 55 und Tag 105) wurde jeweils mit Hilfe einer PB mechanisch unterbrochen, anschließend erfolgte in den Experimentalgruppen eine Behandlung mit dem Zytostatikum AraC. Die Kontrollgruppe wurde keinem dieser beiden Eingriffe unterzogen. Die Abbildung der Werte erfolgte jeweils als prozentuale Darstellung (%-Werte jeweils in Klammern angegeben). Als 100%-Referenzwert wurde die linke SVZ der Kontrollgruppe definiert. Die mittlere absolute Anzahl BrdU+-Zellen in der experimentellen Gruppe an Tag 55 betrug $614,0 \pm 85,6$ Zellen ($586,6\% \pm 81,8\%$) rechts und $396,0 \pm 37,6$ Zellen ($378,3\% \pm 35,9\%$) links. Der rechtsseitige Zellgehalt war somit im Vergleich zur linken Seite an Tag 55 signifikant erhöht ($p < 0,01$). An Tag 105 sank der mittlere Zellgehalt durch die Abwanderung der neu entstandenen Zellen beidseits signifikant auf $253,5 \pm 25,9$ ($242,2\% \pm 24,8\%$) in der rechten und $144,5 \pm 7,2$ ($138,1\% \pm 6,9\%$) in der linken Gehirnhälfte ab. Im Vergleich beider Seiten an Tag 105 der Experimentalgruppe lag kein signifikanter Unterschied bezüglich des Zellgehaltes mehr vor. In der Kontrollgruppe betrug die absolute Zellzahl in der rechten SVZ $160,7 \pm 11,3$ ($153,5\% \pm 10,8\%$), in der linken SVZ $104,7 \pm 6,5$ ($100\% \pm 6,2\%$) links.

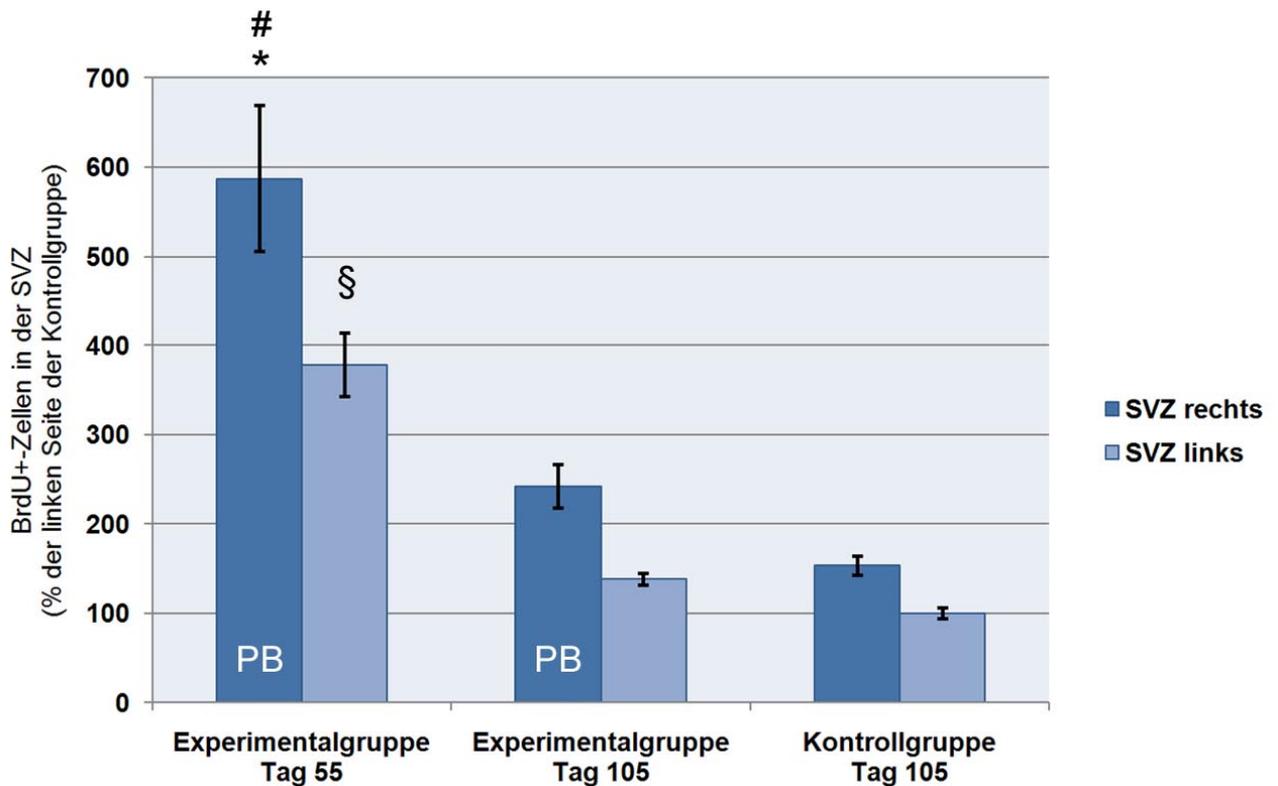


Abbildung 11: Prozentuale Darstellung der BrdU+-Zellen in der SVZ bezogen auf die linke Seite der Kontrolltiergruppe Tag 105 als 100%-Referenz.

Es zeigt sich in der Experimentalgruppe eine abnehmende Zellzahl von Tag 55 zu Tag 105 auf beiden Seiten. An Tag 105 der Experimentalgruppe nähert sich die Anzahl BrdU+-Zellen dem Niveau der Kontrollgruppe Tag 105 an.

Rechtsseitig lässt sich am Tag 55 der Experimentalgruppe eine signifikant vermehrte Anzahl an BrdU+-Zellen im Vergleich mit der linken SVZ derselben Gruppe feststellen (* $p < 0,01$ verglichen mit Experimentalgruppe Tag 55 links, Two-Way ANOVA mit Post-hoc-Tukey-Test). Ebenso besteht eine signifikant vermehrte Zellzahl in der rechten SVZ Tag 55 der Experimentalgruppe im Vergleich zur rechten SVZ der Experimentalgruppe Tag 105 und Kontrollgruppe Tag 105 (# $p < 0,01$ verglichen mit Experimentalgruppe Tag 105 rechts und Kontrollgruppe Tag 105 rechts, Two-Way ANOVA mit Post-hoc-Tukey-Test).

Linksseitig besteht eine signifikant erhöhte Anzahl BrdU+-Zellen in der Experimentalgruppe Tag 55 im Vergleich zur linken Seite der Experimentalgruppe Tag 105 und Kontrollgruppe Tag 105 (§ $p < 0,01$ verglichen mit Experimentalgruppe Tag 105 links und Kontrollgruppe Tag 105 links, Two-Way ANOVA mit Post-hoc-Tukey-Test).

Anmerkung: PB bedeutet, dass der RMS mittels PB unterbrochen wurde. Dies gilt auch für alle folgenden Abbildungen.

3.2 BrdU+-Zellen im BO

Zur Analyse des Migrationsverhaltens BrdU+-Zellen wurde deren Anzahl im BO in der PGL und der GCL immunhistochemisch untersucht.

3.2.1 BrdU+-Zellen in der PGL des BO

Bei der Auswertung der BrdU+-Zellen in der PGL des BO zeigten sich in beiden experimentellen Gruppen verminderte Zellzahlen im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der experimentellen Gruppe am Tag 55 in der rechten PGL ließen sich $771,3 \pm 24,0$ Zellen ($57,1\% \pm 1,8\%$) nachweisen, auf der Gegenseite waren es $871,3 \pm 48,6$ Zellen ($64,5\% \pm 3,6\%$). In der Experimentalgruppe Tag 105 zeigte sich in der rechten PGL eine absolute Zellzahl von $711,0 \pm 33,3$ ($52,6\% \pm 2,5\%$), in der linken PGL von $791,5 \pm 32,2$ Zellen ($58,6\% \pm 2,4\%$). Der mittlere Zellgehalt in der Kontrollgruppe betrug auf der rechten Seite $1438,0 \pm 30,8$ ($106,4\% \pm 2,3\%$), auf der linken Seite $1351,7 \pm 35,1$ ($100\% \pm 2,6\%$). Es zeigten sich weder signifikante Unterschiede in der Anzahl BrdU+-Neurone zwischen rechter und linker PGL in beiden experimentellen Gruppen noch in der Kontrollgruppe. Es bestand jedoch ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) jeweils beider Gehirnhälften der beiden experimentellen Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

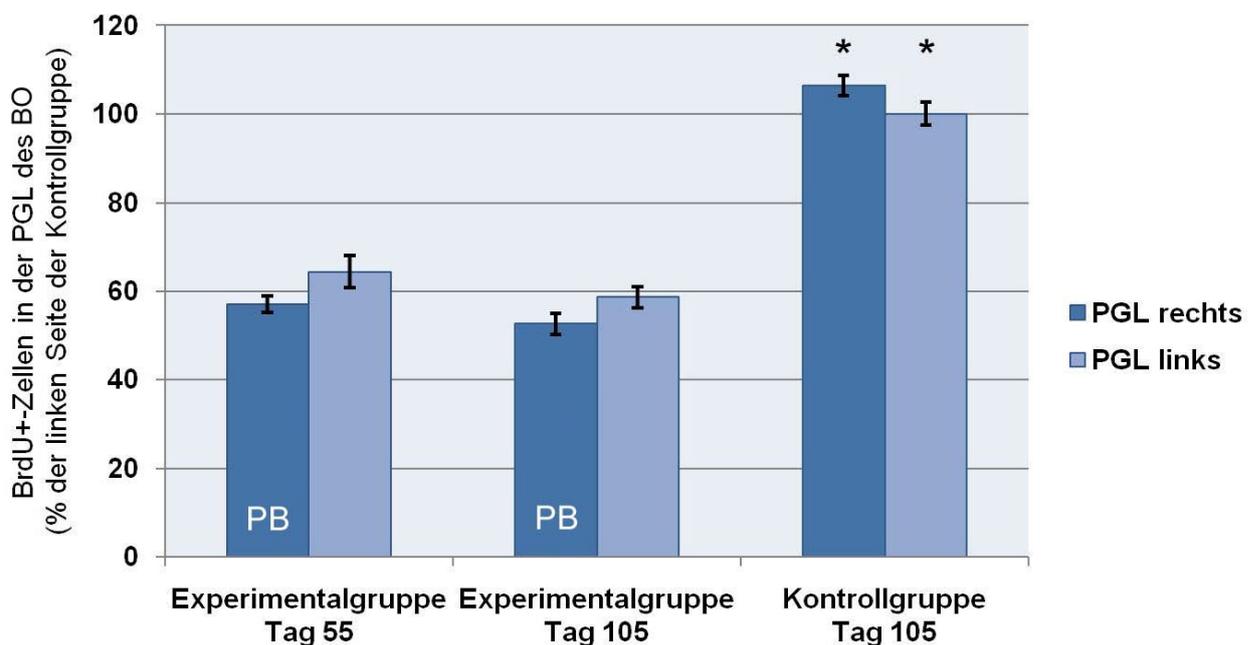


Abbildung 12: Prozentuale Darstellung der BrdU+-Zellen in der PGL des BO bezogen auf die linke Seite der Kontrolltiergruppe Tag 105 als 100%-Referenz.

Keine signifikanten Unterschiede zwischen der Anzahl BrdU+-Zellen der rechten und linken PGL in beiden Experimentalgruppen. Jedoch lassen sich signifikant niedrigere Zellzahlen auf beiden Seiten der jeweiligen Experimentalgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen (* $p < 0,01$ verglichen mit Experimentalgruppe Tag 55 und Tag 105 der jeweiligen Seite, Two-Way ANOVA mit Post-hoc-Tukey-Test).

3.2.2 BrdU+-Zellen in der GCL des BO

Die Bestimmung BrdU+-Zellen in der GCL des BO ergab in der Experimentalgruppe an Tag 55 in der rechten GCL eine Zellzahl von $1809,0 \pm 64,9$ (24,2% \pm 0,9%), in der linken GCL waren $5105,0 \pm 53,1$ (68,4% \pm 0,7%) nachweisbar. Somit lag in der Experimentalgruppe an Tag 55 ein signifikanter Unterschied zwischen rechter und linker GCL vor ($p < 0,01$). In der Auswertung der experimentellen Gruppe Tag 105 ergab sich auf der rechten Seite ein mittlerer Zellgehalt von $1135,0 \pm 59,2$ (15,2% \pm 0,8%), links betrug die Zellzahl $3930,5 \pm 91,9$ (52,7 \pm 1,2%). Somit war der rechtsseitige Zellgehalt auch in dieser Gruppe im Vergleich zur Gegenseite signifikant reduziert ($p < 0,01$). In der Kontrollgruppe waren rechts $7638,3 \pm 121,9$ Zellen (102,4% \pm 1,6%), links $7461,0 \pm 59,8$ Zellen (100% \pm 0,8%) nachweisbar. Hier konnte eine signifikant verminderte Zellzahl der Kontrollgruppe Tag 105 beider Gehirnhälften gegenüber beiden Experimentalgruppen Tag 55 und Tag 105 festgestellt werden ($p < 0,01$).

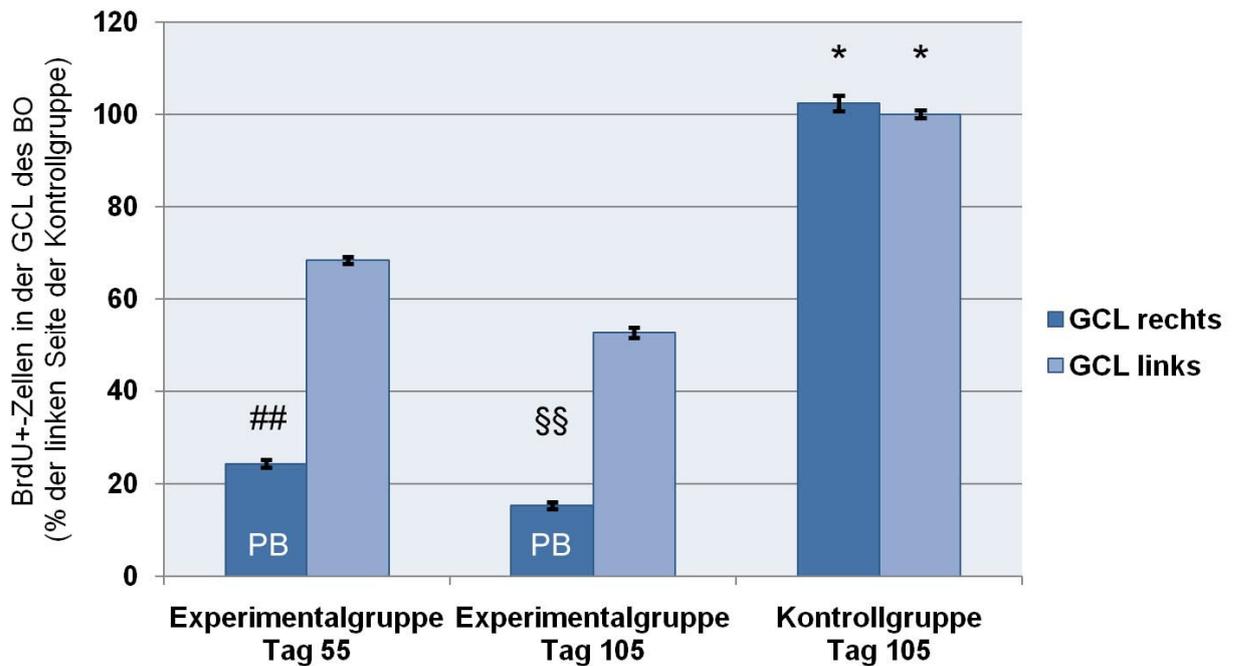


Abbildung 13: Prozentuale Darstellung BrdU+-Zellen in der GCL des BO bezogen auf die linke Seite der Kontrolltiergruppe Tag 105 als 100%-Referenz.

In der Experimentalgruppe zeigt sich auf der rechten Seite an Tag 55 und Tag 105 eine jeweils signifikant reduzierte Anzahl BrdU+-Zellen im Vergleich zur linken Seite (## $p < 0,01$ gegenüber GCL links Experimentalgruppe Tag 55, §§ $p < 0,01$ gegenüber GCL links Experimentalgruppe Tag 105, Two-Way ANOVA mit Post-hoc-Tukey-Test).

Im Vergleich von beiden Experimentalgruppen zur Kontrollgruppe ist eine signifikant reduzierte Zellzahl auf beiden Seiten festzustellen (* $p < 0,01$ verglichen mit Experimentalgruppe Tag 55 und Tag 105 der jeweiligen Seite, Two-Way ANOVA mit Post-hoc-Tukey-Test).

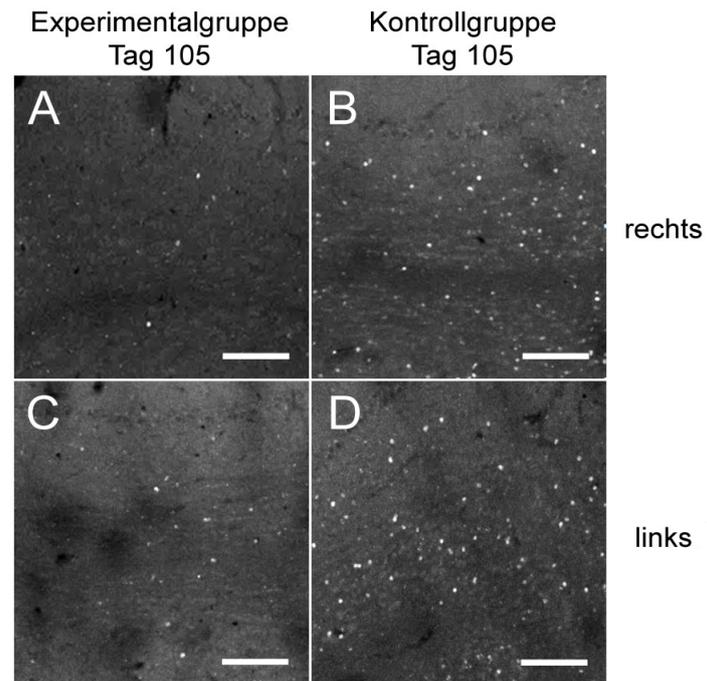


Abbildung 14: Darstellung BrdU+-Neurone in einer Immunfluoreszenzfärbung der GCL des BO der Experimentalgruppe Tag 105 und Kontrollgruppe Tag 105.

An Tag 105 der Experimentalgruppe lassen sich auf der rechten Seite (A) weniger BrdU+-Zellen (weiße Punkte) als auf linken Seite (C) abgrenzen. In der Kontrollgruppe Tag 105 findet sich auf beiden Seiten (B, D) eine nahezu identische Anzahl BrdU+-Zellen. Im Vergleich von Kontroll- zu Experimentalgruppe zeigt sich beidseits in der Experimentalgruppe eine verminderte Zellzahl.

Standardisierte Auswertung mit dem Programm StereoInvestigator. Maßstab = 0,05 mm.

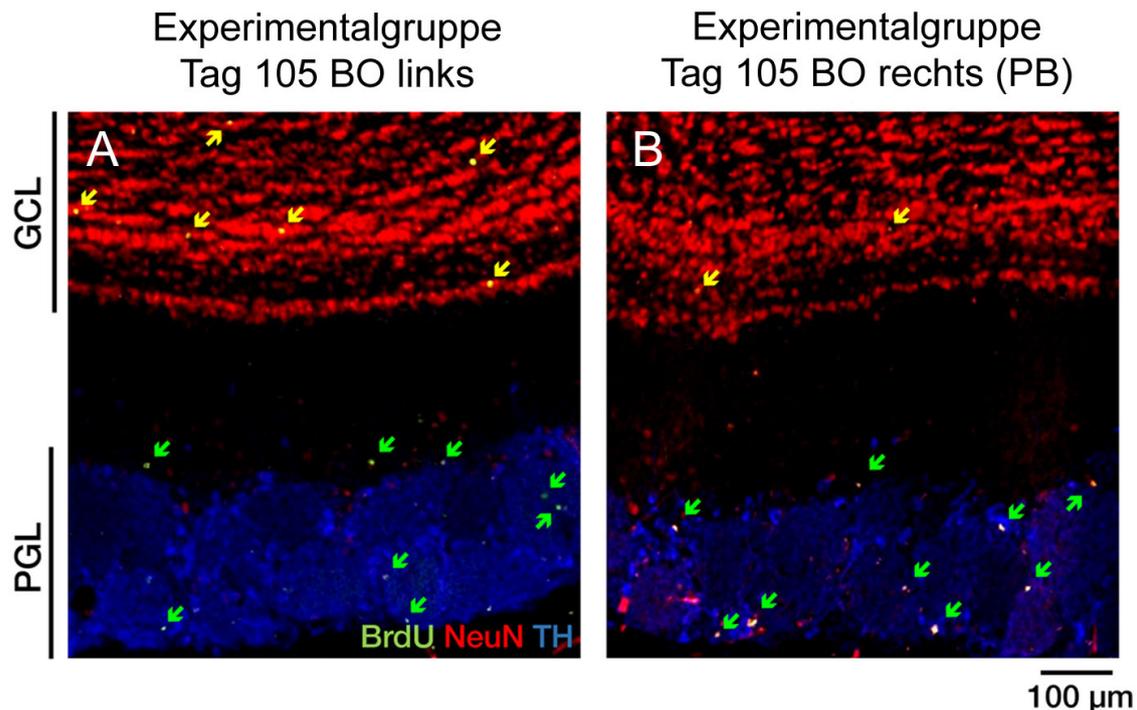


Abbildung 15: Dreifach-Immunfluoreszenzfärbung (TH, BrdU, NeuN) der PGL und GCL des BO der Experimentalgruppe Tag 105.

In der rechten GCL (B, rot dargestellter Bereich) ist eine deutliche Abnahme BrdU+-Zellen (mit Pfeilen markierte Punkte) im Vergleich zur linken GCL (A, rot dargestellter Bereich) sichtbar. In der PGL beider Seiten (A und B, jeweils blau dargestellter Bereich) zeigt sich eine weitgehend identische Anzahl BrdU+-Zellen (mit Pfeilen markierte Punkte). Maßstab = 0,1 mm.

3.3 Phänotypisierung BrdU+-Zellen in der PGL des BO

3.3.1 Koexpression von NeuN in BrdU+-Zellen der PGL des BO

Wir untersuchten 50 BrdU+-Zellen in der PGL des BO, welche nach dem Zufallsprinzip ausgewählt wurden, auf ihre zusätzliche Expression des neuronalen Markers NeuN. Die in Klammern abgegebenen Prozentwerte entsprechen dem Anteil koexprimierender BrdU+/NeuN+-Zellen an der Gesamtheit aller BrdU+-Zellen. In der rechten PGL der Experimentalgruppe am Tag 105 fanden sich $45,7 \pm 0,9$ Zellen BrdU+/NeuN+-Zellen ($91,3\% \pm 1,8\%$), in der linken PGL waren es $48,0 \pm 0,6$ Zellen ($96,0\% \pm 1,2\%$). In der Kontrollgruppe an Tag 105 betrug die mittlere Zellzahl BrdU+/NeuN+-Zellen rechts $48,7 \pm 0,9$ ($97,3\% \pm 1,8\%$), links $47,7 \pm 0,3$ ($95,3\% \pm 0,7\%$). Es ließen sich signifikante Unterschiede sowohl zwischen rechter und linker Gehirnhälfte innerhalb der Experimentalgruppe ($p < 0,05$) als auch im Vergleich zwischen Experimental- und Kontrollgruppe der jeweils rechten Seite ($p < 0,05$) feststellen.

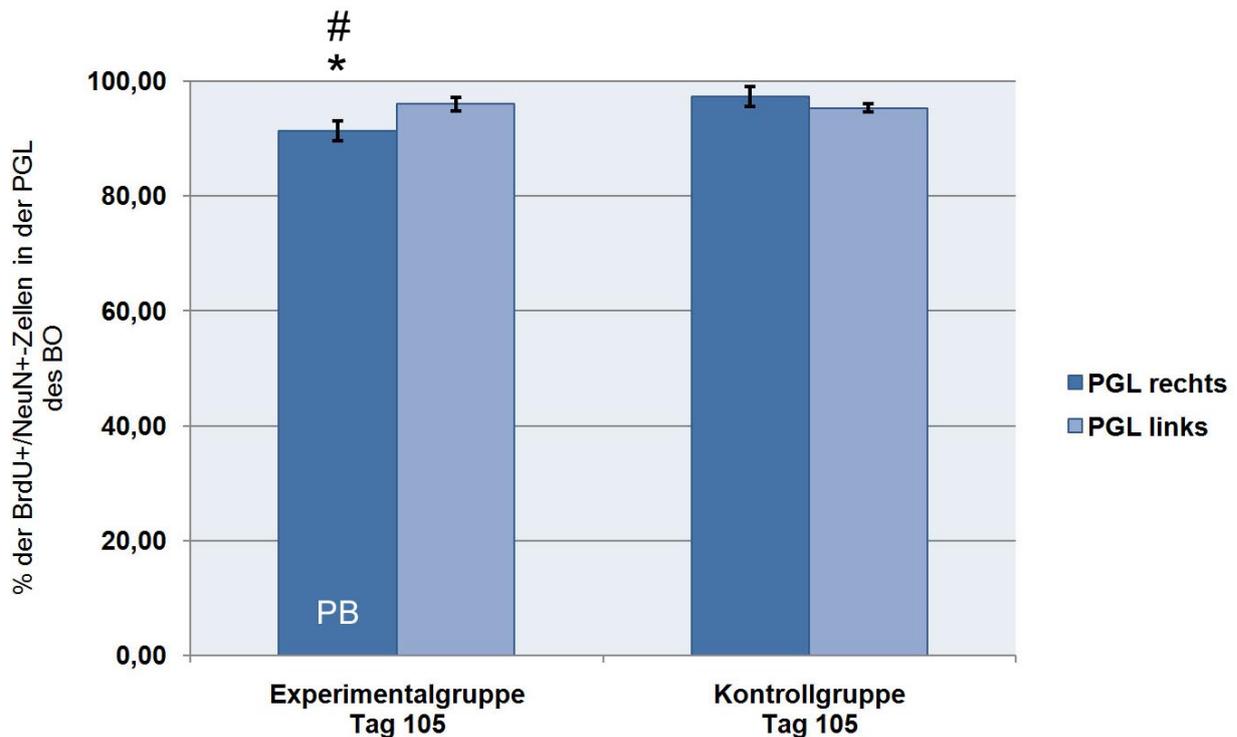


Abbildung 16: Prozentualer Anteil der BrdU+-Zellen mit einer Koexpression von NeuN in der PGL des BO der Experimentalgruppe Tag 105 und Kontrollgruppe Tag 105.

Es lässt sich ein signifikant niedrigerer Anteil an Zellen mit einer BrdU+/NeuN+-Koexpression im Vergleich der rechten mit der linken Seite der Experimentalgruppe Tag 105 feststellen (* $p < 0,05$ gegenüber PGL links Experimentalgruppe Tag 105, Two-Way ANOVA mit Post-hoc-Tukey-Test). Außerdem ist eine signifikant geringere Koexpression im Vergleich der rechten Seite der Experimentalgruppe Tag 105 mit der rechten Seite der Kontrollgruppe Tag 105 vorhanden (# $p < 0,05$ verglichen mit rechter Seite der Kontrollgruppe Tag 105, Two-Way ANOVA mit Post-hoc-Tukey-Test).

3.3.2 Koexpression von TH in BrdU+-Zellen der PGL des BO

Erneut wurden 50 zufällig ausgewählte BrdU+-Zellen in der PGL des BO untersucht, diesmal auf die zusätzliche Expression des für dopaminerge Neurone typischen Markers TH. In der rechten PGL der Experimentalgruppe an Tag 105 fanden sich $12,3 \pm 0,9$ Zellen BrdU+/TH+-Zellen ($24,7\% \pm 1,8\%$), in der linken PGL waren es $9,3 \pm 0,3$ Zellen ($18,7\% \pm 0,7\%$). In der Kontrollgruppe an Tag 105 betrug die mittlere Zellzahl BrdU+/TH+-Zellen rechts $8,7 \pm 0,7$ ($17,3\% \pm 1,3\%$), links $8,7 \pm 0,3$ ($17,3\% \pm 0,7\%$). Somit war ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) zwischen rechter und linker Gehirnhälfte der Experimentalgruppe nachweisbar. Ebenso bestand ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) zwischen der rechten PGL der Experimentalgruppe Tag 105 verglichen mit der rechten PGL der Kontrollgruppe. Zwischen linker PGL der Experimentalgruppe an Tag 105 bestand im Vergleich zur linken Seite der Kontrollgruppe Tag 105 kein

signifikanter Unterschied. Auch in der Kontrollgruppe selbst fanden sich zwischen rechter und linker Seite keinerlei Unterschiede.

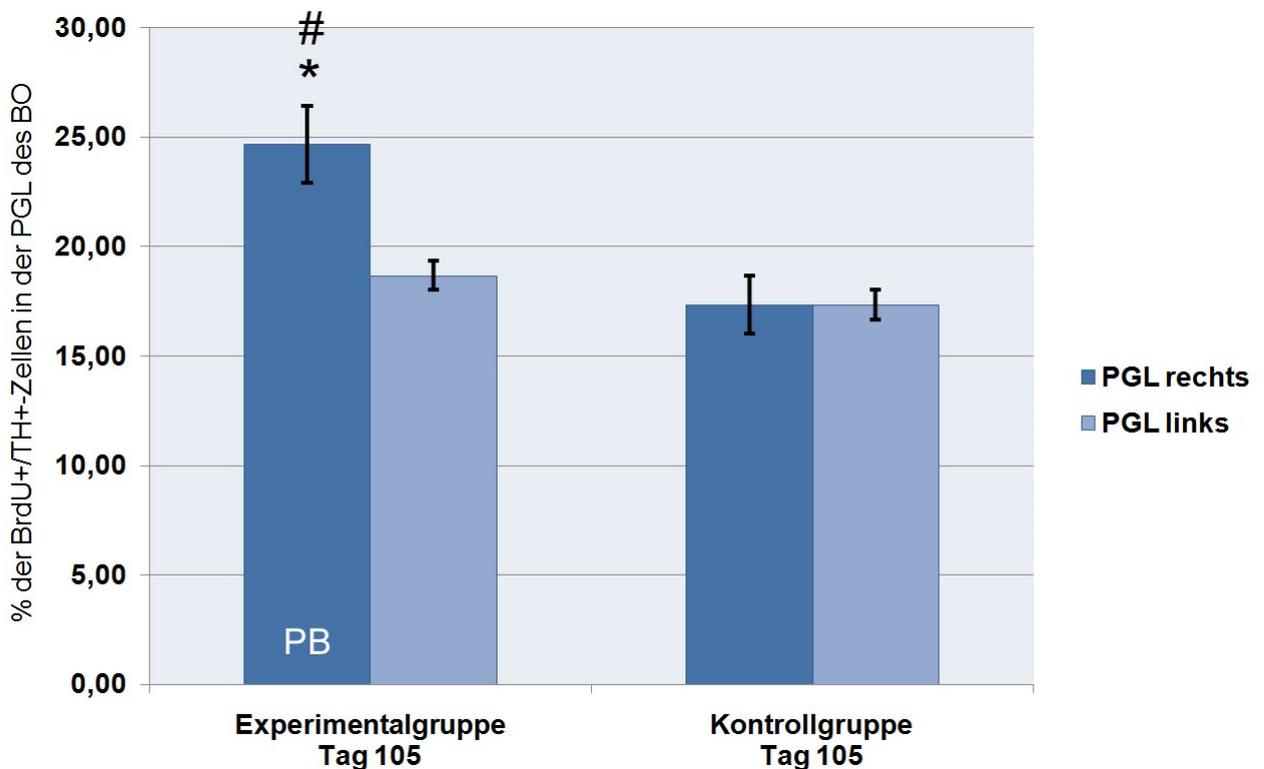


Abbildung 17: Anteil der BrdU+-Zellen mit Koexpression von TH in der PGL des BO.

Es zeigt sich ein signifikant höherer Anteil an Zellen mit einer TH+/BrdU+-Koexpression im Vergleich der rechten mit der linken Seite der Experimentalgruppe Tag 105 (* $p < 0,01$ gegenüber PGL links Experimentalgruppe Tag 105, Two-Way ANOVA mit Post-hoc-Tukey-Test). Zusätzlich lässt sich eine signifikante Abnahme der Koexpression rechtsseitig zwischen Experimentalgruppe Tag 105 und Kontrollgruppe feststellen (# $p < 0,01$ verglichen mit rechter Seite der Kontrollgruppe Tag 105, Two-Way ANOVA mit Post-hoc-Tukey-Test).

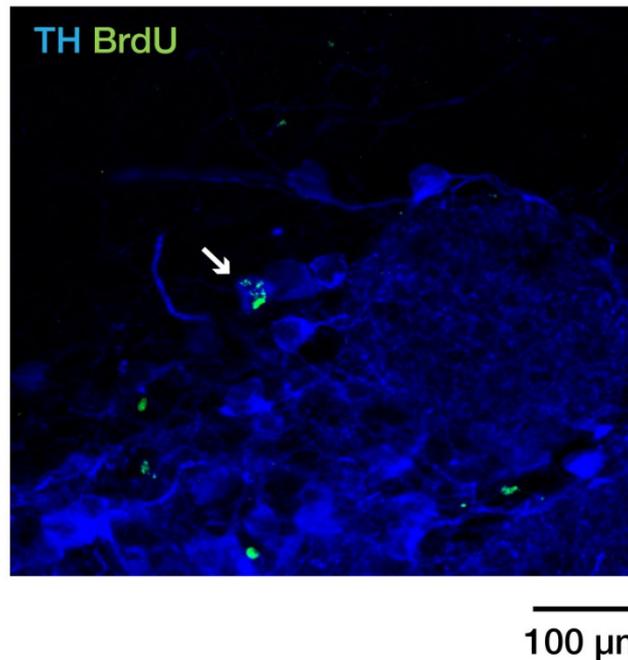


Abbildung 18: Dreifach-Immunfluoreszenzfärbung (TH, BrdU, NeuN) der PGL des rechten BO der Experimentalgruppe Tag 105.

Darstellung eines Neurons mit einer TH-BrdU-Koexpression (Pfeil). Maßstab = 0,1 mm.

3.4 Apoptoserate in der PGL des BO

Bei der Analyse der TUNEL-Färbung zur Bestimmung der Apoptoserate in der PGL des BO zeigte sich in der Experimentalgruppe an Tag 105 auf der behandelten rechten Seite eine absolute mittlere Zellzahl von $31,0 \pm 4,6$ ($169,1\% \pm 25,0\%$), auf der linken Seite eine Anzahl von $21,7 \pm 2,7$ ($118,2\% \pm 14,9\%$) apoptotischen Zellen. In der Kontrollgruppe waren rechts $19,3 \pm 1,8$ Zellen ($105,5\% \pm 9,6\%$), links $18,3 \pm 0,9$ ($100\% \pm 4,8\%$) in Apoptose befindliche Zellen nachweisbar. Der linke BO der Kontrollgruppe diente als 100%-Referenzwert. In der rechten PGL der Experimentalgruppe Tag 105 war eine signifikant erhöhte Apoptoserate im Vergleich zur linken Seite erkennbar ($p < 0,05$). Ebenso ließ sich eine signifikant erhöhte Anzahl an TUNEL+-Zellen der rechten PGL der Experimentalgruppe Tag 105 im Vergleich zur identischen Seite der Kontrollgruppe Tag 105 feststellen ($p < 0,05$).

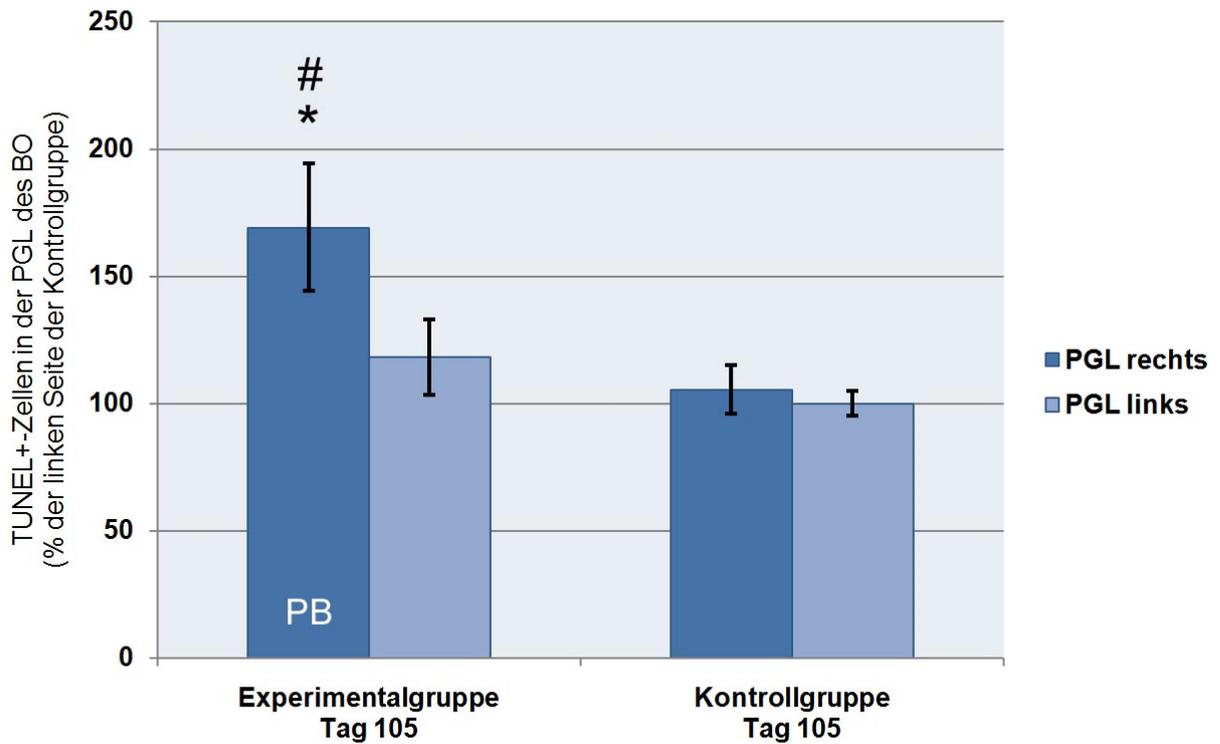


Abbildung 19: Prozentuale Darstellung TUNEL+-Zellen in der PGL des BO mit 100%-Referenz der linken Seite der Kontrollgruppe.

Es lässt sich eine signifikant erhöhte Apoptoserate im Vergleich beider Seiten der Experimentalgruppe Tag 105 feststellen (* $p < 0,05$ gegenüber PGL links Experimentalgruppe Tag 105, Two-Way ANOVA mit Post-hoc-Tukey-Test). Ebenso ist ein signifikanter Unterschied zwischen den TUNEL+-Zellen der rechten PGL der Experimental- und der rechten Seite der Kontrollgruppe nachzuweisen (# $p < 0,05$ verglichen mit der gleichen Seite der Kontrollgruppe Tag 105, Two-Way ANOVA mit Post-hoc-Tukey-Test).

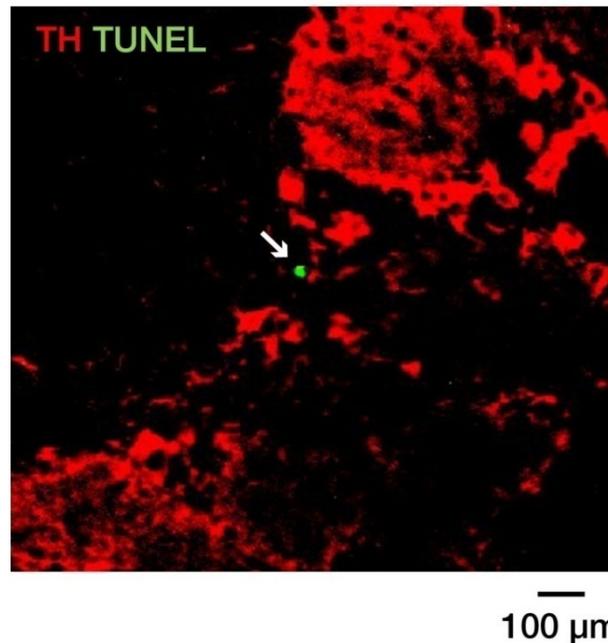


Abbildung 20: TUNEL-Immunfluoreszenzfärbung der PGL des rechten BO der Experimentalgruppe Tag 105.

Repräsentative Darstellung einer TUNEL+-Zelle (Pfeil). Maßstab = 0,1 mm.

3.5 TH-Färbung in der PGL des BO

3.5.1 TH+-Neurone in der PGL des BO

Bei der Auszählung der TH-positiven Neurone zeigten sich in der Experimentalgruppe am Tag 55 in der rechten PGL $13.365,0 \pm 282,2$ ($97,0\% \pm 2,0\%$) und in der linken PGL $13.910,0 \pm 246,2$ Zellen ($100,9\% \pm 1,8\%$). Der mittlere Zellgehalt an Tag 105 betrug auf der rechten Seite $14.043,3 \pm 441,8$ ($101,9\% \pm 3,2\%$), linksseitig $14.693,3 \pm 78,8$ ($106,6\% \pm 0,6\%$). In der Kontrollgruppe Tag 105 zeigte sich rechts eine absolute Zellzahl von $13.950,0 \pm 349,5$ ($101,2\% \pm 2,5\%$) und in der linken Gehirnhälfte von $13.785,3 \pm 566,4$ Zellen ($100\% \pm 4,1\%$).

Die Zellzahlen der TH+-Neurone in der PGL des BO blieben in der Experimental- sowie Kontrollgruppe nahezu konstant. Es ließen sich keinerlei signifikante Unterschiede feststellen.

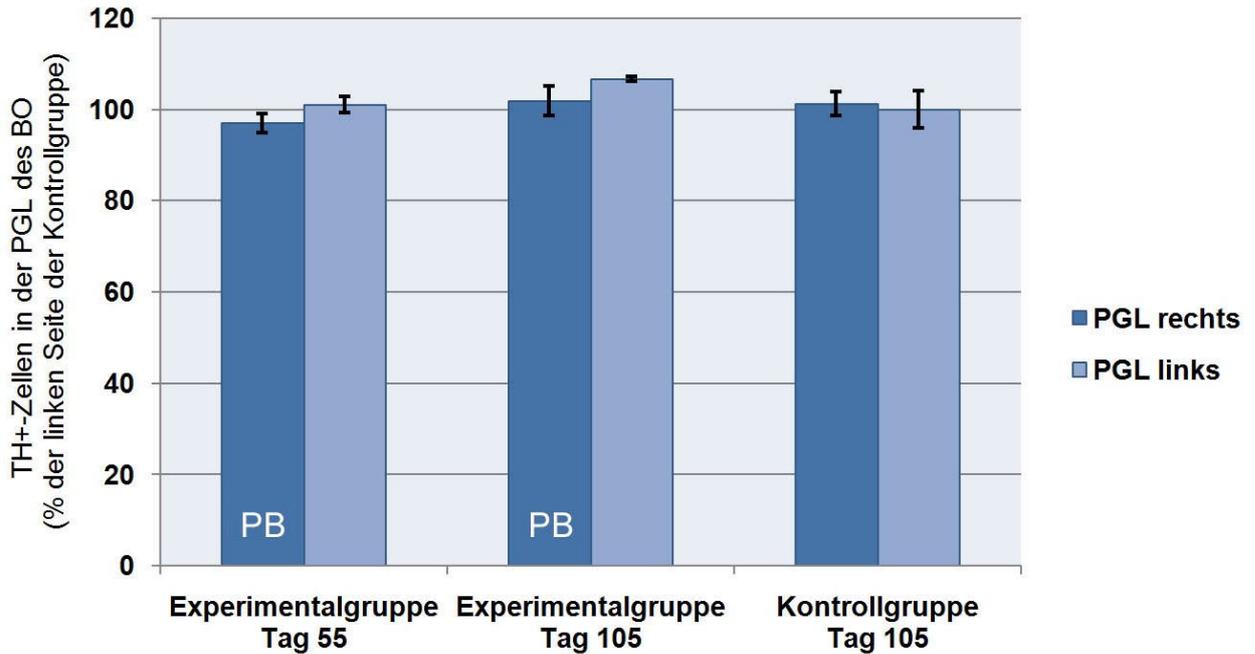


Abbildung 21: Prozentuale Darstellung TH+-Zellen der PGL des BO bezogen auf die linke Seite der Kontrollgruppe Tag 105 als 100%-Referenz.

Weder innerhalb noch zwischen den Gruppen lassen sich signifikante Unterschiede feststellen (Two-Way ANOVA mit Post-hoc-Tukey-Test).

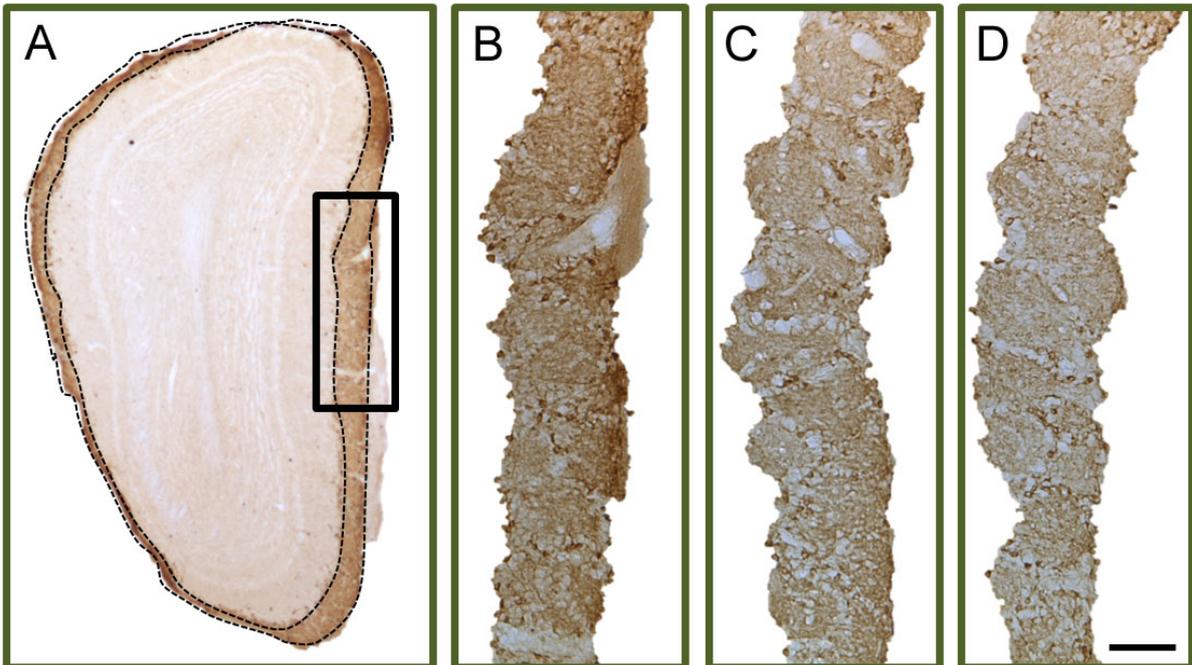


Abbildung 22: Lichtmikroskopische Darstellung einer immunhistochemischen TH-Färbung (DAB-IHC) der PGL des rechten BO.

Koronarschnitt eines rechtsseitigen BO mit TH-Färbung zur Übersicht (A). Es zeigt sich histomorphologisch eine weitgehend konstante Anzahl an TH-positiven Neuronen (dunkelbraune Punkte) in der Kontrollgruppe (B) und in der Experimentalgruppe Tag 55 (C) sowie Tag 105 (D). Maßstab = 0,1 mm.

4 Diskussion

Die zentrale Frage der vorliegenden Arbeit war, wo genau im SVZ-RMS-BO-System die dopaminergen NSCs lokalisiert sind. Diese Fragestellung wurde in bisherigen wissenschaftlichen Arbeiten kontrovers diskutiert. Einige Arbeitsgruppen beschrieben, dass sich die Vorläufer dopaminergere Interneurone des BO in der an die Seitenventrikel angrenzenden SVZ befinden (Doetsch et al., 1999a; Gross, 2000; Alvarez-Buylla and Lim, 2004). Andere Autoren postulierten den RMS des Vorderhirns als Ursprungsort dopaminergere Nervenzellen (Fukushima et al., 2002; Gritti et al., 2002; Hack et al., 2005; Merkle et al., 2007; Mendoza-Torreblanca et al., 2008).

Zur Klärung der oben genannten Fragestellung wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Mausmodell entwickelt, in welchem der RMS mit Hilfe einer sogenannten PB mechanisch unterbrochen wurde. BO und SVZ wurden so voneinander getrennt. Proliferierende Stammzellen in der SVZ wurden zunächst mit Hilfe des Zytostatikums AraC eliminiert, die sich regenerierenden Zellen anschließend mit BrdU markiert und immunhistochemisch an unterschiedlichen Stellen im SVZ-RMS-BO-System untersucht.

4.1 Blockierung der Abwanderung von Neuroblasten aus der SVZ

In einem ersten Schritt wurde eine immunhistochemische BrdU-Färbung der SVZ analysiert. Generell konnte damit gezeigt werden, dass nach Ablation von Neuroblasten (A-Zellen) und sich schnell teilenden C-Zellen durch das Zytostatikum AraC die Neurogenese in der SVZ ausgehend von den persistierenden B-Zellen wieder aufgenommen wurde. Auch konnte nachgewiesen werden, dass die neu entstandenen Zellen die SVZ in Richtung BO verließen, wobei die Zellmigration auf der rechten (behandelten) Seite im Vergleich zur Gegenseite beeinträchtigt zu sein schien. Dies ist insbesondere an Tag 55 am hochsignifikanten Unterschied der Zellzahlen zwischen rechter und linker SVZ sichtbar. Die verlangsamte Abwanderung der Zellen aus der rechten SVZ beider Experimentalgruppen (Tag 55 und Tag 105) war sehr wahrscheinlich durch die Wirkung der PB zu erklären, welche die Zellmigration im RMS blockierte und einen Rückstau der Zellen in die SVZ verursachte. Aus der linken SVZ der behandelten Tiere konnten die Neuroblasten hingegen

ungehindert abwandern, da die PB nur in die rechte Gehirnhälfte implantiert wurde (siehe Abbildung 11). Diese Beobachtung lieferte einen Beweis für die Funktion der PB. Ein weiteres Erklärungsmodell für die in den experimentellen Gruppen beobachteten erhöhten Zellzahlen in der rechten SVZ wäre eine rechtsseitig lokal erhöhte Zellproliferation, welche durch den operativen Eingriff in dieser Hirnregion induziert worden sein könnte. Unklar bleibt, warum auch die Kontrollgruppe, welche keine Intervention in Form von einer PB-Implantation oder einer AraC-Behandlung erhielt, rechtsseitig ebenfalls leicht erhöhte Zellzahlen in der SVZ aufweist. Da die Differenz beider Seiten jedoch nicht signifikant ist, schreiben wir diese Beobachtung am ehesten einem Zufallsbefund, insbesondere bei limitierter Gruppengröße, zu. Bisher wurde die Methode der Unterbrechung des RMS mittels einer PB erst von einer Arbeitsgruppe beschrieben. Die von Mendoza-Torreblanca et al. im Jahr 2008 durchgeführten Experimente wurden an Ratten vorgenommen. In einem Mausmodell kam eine PB nach unserem Kenntnisstand erstmals in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz. Eine Analyse der SVZ wurde in der Publikation von Mendoza-Torreblanca und Kollegen nicht beschrieben, jedoch wurde im proximalen RMS kaudal der PB ebenfalls ein Aufstau proliferierender Neuroblasten festgestellt (Mendoza-Torreblanca et al., 2008). Eine weitere Studie, in welcher der RMS durch eine mechanische Läsion vollständig durchtrennt wurde zeigte ebenfalls, dass BrdU-markierte Neuroblasten kaudal der Läsion kumulierten. Die Bildung neuer Nervenzellen in der SVZ beziehungsweise im proximalen RMS blieb durch eine solche Läsion unbeeinträchtigt (Alonso et al., 1999). Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese der vorliegenden Arbeit, dass ein Rückstau von Zellen in die rechte SVZ der Experimentalgruppe durch die PB die in dieser Region vorliegende erhöhte Anzahl BrdU+-Zellen im Vergleich zur Gegenseite erklärt. Damit wurde die adäquate Funktion der PB nachgewiesen und somit die technische Grundlage für das Gelingen des weiteren Experiments gelegt.

4.2 Lokalisation dopaminerger Stammzellen im RMS

Als Nächstes wurden GCL und PGL des BO mittels verschiedener immunhistochemischer Marker untersucht.

Dazu wurde zunächst eine BrdU-Färbung des BO ausgewertet. Es zeigte sich in den Experimentalgruppen an Tag 55 sowie 105 eine hochsignifikante Reduktion von neugebildeten BrdU+-Neuronen auf der rechten Seite der GCL (siehe Abbildung 13). Bei Betrachtung der PGL konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl BrdU+-Zellen zwischen behandelter und unbehandelter Seite in den Experimentalgruppen Tag 55 und Tag 105 festgestellt werden (siehe Abbildung 12). Aufgrund des hochsignifikanten Unterschiedes in der Anzahl BrdU+-Neurone in der GCL beider Experimentalgruppen konnte gezeigt werden, dass NSCs, welche granuläre Interneurone hervorbringen, in der SVZ liegen müssen. NSCs, aus denen periglomeruläre Interneurone und als ein Subtyp dieser Gruppe dopaminerge Neurone entstehen, müssen hingegen im RMS lokalisiert sein. Dies war dadurch zu erklären, dass die Durchtrennung und Blockade des RMS durch die PB die GC an ihrer Migration in den BO hinderte und sich ihre Anzahl infolgedessen in der GCL bedeutend dezimierte. Die PGC konnten hingegen auf der rechten Seite aus dem rostralen Teil des RMS ungehindert in die PGL des rechten BO einwandern und ihre Anzahl blieb somit trotz implantierter PB im Vergleich zur Gegenseite nahezu konstant (siehe Abbildung 12). Aus diesen Beobachtungen ließ sich ableiten, dass granuläre und periglomeruläre Interneurone des BO einer Regionalisierung unterliegen und unterschiedliche Entstehungsorte aufweisen.

Autoren verschiedener Studien unterstützen diese Hypothese. Fukushima et al. nahmen im Jahr 2002 in ihren Experimenten an Ratten eine lokale Zerstörung des RMS vor. Anschließend untersuchten sie nach Durchführung einer immunhistochemischen BrdU-Färbung sowohl die PGL als auch die GCL des BO. Insbesondere in der GCL nahm die Anzahl BrdU+-Zellen verhältnismäßig stark ab. In der PGL war eine deutlich weniger stark ausgeprägte Veränderung der Zelldichte BrdU+-Zellen nachzuweisen. Um sicherzustellen, dass es sich bei den BrdU-markierten Zellen tatsächlich um Neurone handelte, wurde in dieser Studie eine Doppelimmunhistochemie für BrdU und NeuN durchgeführt. Hier zeigten sich in beiden Zellschichten BrdU+/NeuN+-Zellen, sodass die Autoren postulierten, dass neben der SVZ noch eine weitere Stammzellnische im RMS oder im BO vorliegen musste. Diese Arbeitsgruppe plädierte eher für die Existenz dieser zusätzlichen Stammzellnische im BO, sodass in dieser

Studie der RMS nicht weitergehend untersucht wurde (Fukushima et al., 2002). Einschränkend muss jedoch festgehalten werden, dass die Grenzen zwischen distalem RMS und Übergang in den BO fließend sind und eine strikte Trennung somit nur schwierig vorzunehmen ist.

Gritti und Kollegen zeigten im selben Jahr mittels Zellkulturversuchen, dass der RMS eine primäre Stammzellquelle darstellt, in der kontinuierlich Neurogenese stattfindet. Dabei konnte ausgeschlossen werden, dass die in RMS und BO nachgewiesenen Vorläuferzellen lediglich Abkömmlinge von migrierenden A-Zellen aus der SVZ waren (Gritti et al., 2002). Diese Arbeitsgruppe kam als eine der Ersten zu dem Ergebnis, dass Neurogenese nicht nur in der SVZ, sondern zusätzlich auch im gesamten RMS stattfindet.

Auch Hack et al. konnten in einer Studie mit Hilfe von viralen Vektoren bestätigen, dass ein Großteil der periglomerulären Neurone aus dem RMS hervorgeht und dieser somit eine eigenständige neurogene Nische darstellt (Hack et al., 2005).

Die Arbeitsgruppe um Mendoza-Torreblanca et al. beschrieb erstmals eine mechanische Unterbrechung des RMS mit Hilfe einer PB. Die Versuche dieser Arbeitsgruppe wurden an Ratten vorgenommen. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Verfahren auf Mäuse übertragen und analog durchgeführt. Auch Mendoza-Torreblanca und Kollegen konnten mittels einer BrdU-Färbung nachweisen, dass die NSCs, aus denen die für die BO bestimmten PGC hervorgehen, überwiegend im RMS lokalisiert sein müssen (Mendoza-Torreblanca et al., 2008).

Als Nächstes konnte in der hier vorliegenden Arbeit mit Hilfe einer BrdU/NeuN-Doppelfärbung sichergestellt werden, dass es sich bei den neugebildeten BrdU-markierten Zellen tatsächlich um Neurone und nicht um Gliazellen handelte. Dies gelang durch die immunhistochemische Färbung des Proteins NeuN. Dieses wurde im Jahr 1992 von Mullen entdeckt und wird von maturierten Nervenzellen nach Beendigung ihrer Migration und Ausdifferenzierung gebildet (Mullen et al., 1992; Doetsch et al., 1997; Sarnat et al., 1998). Die Auszählung der Zellen mit vorliegender BrdU+/NeuN+-Koexpression in der PGL des BO in der Experimentalgruppe an Tag 105 zeigte eine knapp signifikante Reduktion neu entstandener Zellen auf der rechten Seite, wobei dieser Unterschied zur Gegenseite sowie zur rechten Seite der Kontrollgruppe nicht sehr stark

ausgeprägt war (siehe Abbildung 16). In erster Linie konnte die Abnahme der BrdU+/NeuN+-Zellen auf der rechten Seite der Experimentalgruppe auf die Implantation der PB zurückgeführt werden, da operative Eingriffe die Proliferation von Gliazellen induzieren können. Dieses Ergebnis bestätigte, dass die Neurogenese auf der rechten Seite der Experimentalgruppe trotz implantierter Barriere nahezu unbeeinträchtigt blieb und junge Neurone aus dem RMS in die PGL einwanderten.

Zusätzlich wurde der Anteil dopaminergere TH+-Zellen unter den neu entstandenen BrdU+-Zellen der PGL des BO analysiert. Dabei konnte ein hochsignifikant erhöhter Anteil dopaminergere Zellen auf der behandelten rechten Seite in der Experimentalgruppe an Tag 105 festgestellt werden (siehe Abbildung 17). Dies suggerierte, dass neugebildete Neurone aus dem RMS insbesondere einen dopaminergen Phänotyp annehmen. Eine daraufhin durchgeführte Auszählung der Gesamtzahl aller (vorbestehender und neugebildeter) dopaminergere Zellen der PGL im BO erbrachte keine Unterschiede in den absoluten Zellzahlen (siehe Abbildungen 21 und 22). Gleichzeitig ließ sich eine signifikant gesteigerte Apoptoserate mit Hilfe einer TUNEL-Färbung auf der rechten Seite der PGL nachweisen (siehe Abbildung 19). Diese Daten legten zum einen nahe, dass sich dopaminerge Stammzellen im RMS befinden und zum anderen, dass die Anzahl dopaminergere Zellen einer intrinsischen Regulation zu unterliegen scheint, welche zum Ziel hat, die Anzahl dopaminergere Zellen im BO über die Zeit hinweg konstant zu halten.

Dieses Ergebnis unterstützt die Resultate einer der wenigen Arbeiten, die sich mit dopaminergere Stammzellen im SVZ-RMS-BO-System beschäftigte. Hack et al. stellten mit Hilfe der Verwendung von viralen Vektoren fest, dass der RMS zum einen einer eigenständigen neurogenen Nische entspricht, in der dopaminerge Stammzellen zu finden sind und zum anderen, dass der größte Anteil dopaminergere Interneurone des BO aus dem RMS entspringt. Ferner zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass der Transkriptionsfaktor Pax 6 (Paired Box 6) an der Entstehung dopaminergere Interneurone im RMS entscheidend beteiligt ist und deren Entwicklung voranzutreiben scheint, wobei das Zellschicksal dopaminergere Interneurone generell deutlich weiter distal im RMS entschieden wird als jenes von granulären Interneuronen. Granuläre Interneurone werden gemäß der Arbeitsgruppe um Hack in der SVZ gebildet

(Hack et al., 2005). Auch Kohwi et al. kamen ebenso wie die Arbeitsgruppe um Roybon et al. zu dem Ergebnis, dass der von einer Subpopulation von Typ A- und C-Zellen gebildete Transkriptionsfaktor Pax 6 essentiell für die Entwicklung dopaminergener Interneurone der PGL des BO ist (Kohwi et al., 2005; Roybon et al., 2009).

In einer neueren Studie untermauerten Langenfurth und Kollegen die Hypothese der vorliegenden Arbeit, dass die Anzahl periglomerulärer Interneurone im BO kontinuierlich an den Bedarf angepasst wird und intrinsischen Regulationsmechanismen im RMS unterliegt. Die Autoren der Studie nahmen an, dass es zwischen BO und RMS eine Signalachse geben müsse, über welche diese Regulation vermittelt werden kann. Die Vermutung der Forscher war, dass diese Regulation auf ähnlich komplexen Mechanismen beruht wie sie für die hippocampale Neurogenese bereits seit vielen Jahren bekannt ist und in zahlreichen Studien gezeigt wurde (siehe „Regulation der Neurogenese“ in der Einleitung). Ihre Untersuchungen führte die Arbeitsgruppe an einem MT1-MMP (Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase)-Mausmodell durch, in welchem die Tiere neben einer verminderten sensorische Innervation des BO einen kleineren Bulbus und eine reduzierte Anzahl an olfaktorischen Glomeruli des BO aufwiesen. Der Bedarf an periglomerulären Zellen war somit in diesem Mausmodell reduziert und die Arbeitsgruppe zeigte, dass dieser verminderte Bedarf an periglomerulären Zellen durch eine gesteigerte Apoptoserate im distalen RMS, welche mit der TUNEL-Färbung nachgewiesen wurde, erreicht wird. Die Proliferationsraten in RMS und SVZ blieben hingegen unbeeinträchtigt. Die Arbeitsgruppe konnte somit nachweisen, dass die Anzahl von PGC im RMS über die Apoptoserate stetig an den Bedarf angepasst wird und intrinsischen Regulationsmechanismen unterliegt. Somit ist der RMS direkt an der Regulation von PGC beteiligt (Langenfurth et al., 2016).

Zusammenfassend ist die vorliegende Arbeit nach unserem heutigen Kenntnisstand die erste, in der in einem Mausmodell mit Hilfe einer mechanischen Unterbrechung des RMS mittels einer PB die Lokalisation dopaminergener Stammzellen eindeutig dem RMS zugeordnet werden konnte.

4.3 Regionalisierung von NSCs

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass unterschiedliche Typen von Interneuronen des BO von NSCs aus verschiedenen Regionen des SVZ-RMS-BO-Systems hervorgehen. Daraus lässt sich ableiten, dass es sich bei NSCs nicht, wie lange angenommen, um eine homogene Zellpopulation handelt, aus der alle Subtypen von Neuronen gleichermaßen hervorgehen können. Vielmehr ist davon auszugehen, dass nur definierte Zelltypen aus den NSCs einer spezifischen Region entstehen und deren zelluläres Schicksal schon mit der Entstehung aus einer bestimmten Stammzelle vorbestimmt ist (Lledo et al., 2008).

In der Tat konnten verschiedene Arbeiten in den letzten Jahren zeigen, dass die in der SVZ angesiedelten NSCs einer heterogenen Zellpopulation entsprechen, die eine lokale Unterteilung aufweist (Hack et al., 2005; Kohwi et al., 2005).

Am ausführlichsten wurde dieses als Regionalisierung bezeichnete Phänomen von Merkle et al. im Jahr 2007 beschrieben. Dazu wurden 15 neurale Stammzellregionen von SVZ und RMS stereotaktisch mit Hilfe eines Cre-Rekombinase exprimierenden Adenovirus bei neonatalen und adulten Mäusen markiert. Die entstandenen Interneurone des BO wurden vier Wochen nach deren Markierung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass aus jeder Stammzellregion nur eine ganz spezifische Untergruppe von Interneuronen des BO hervorgeht. Gemäß dieser Arbeit liegen die Stammzellregionen, aus denen die dopaminergen TH+-Interneurone der PGL des BO hervorgehen insbesondere in der dorsalen Region der SVZ sowie im RMS (Merkle et al., 2007).

Eine Übersicht zur Illustration der Regionalisierung von NSCs ist in Abbildung 23 zu sehen.

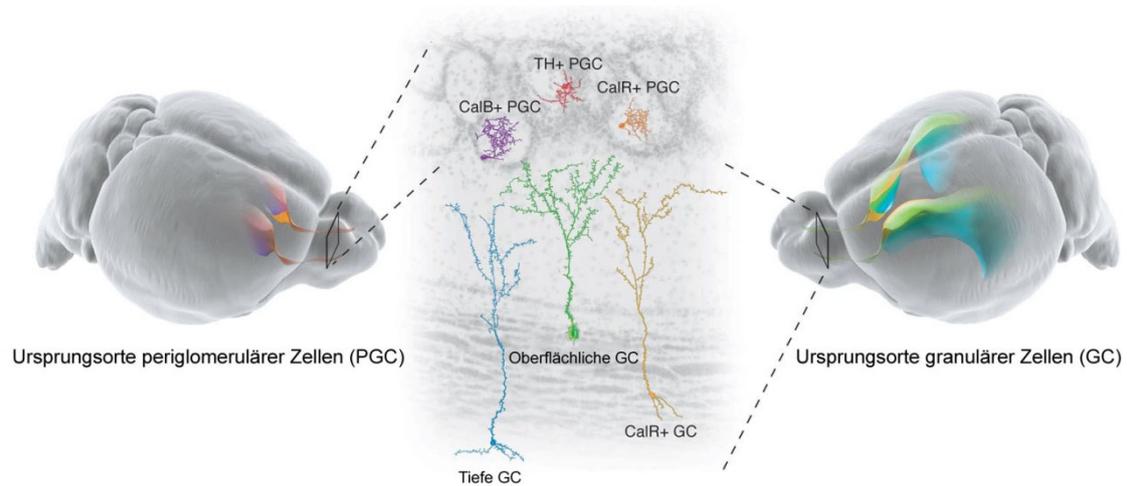


Abbildung 23: Herkunft granulärer und periglomerulärer Interneurone des BO.

Illustration der unterschiedlichen Entstehungsorte granulärer und periglomerulärer Interneurone des Gehirns einer Maus. PGC entstehen im RMS und wandern als Calbindin (CalB+, violett)-, Tyrosinhydroxylase (TH+, rot)- oder Calretinin (CalR+, orange)-positive Interneurone in die PGL des BO ein. Granuläre Zellen (GC) stammen mehrheitlich aus der SVZ. Sie wandern in tiefer (tiefe GC, blau) oder oberflächlich (oberflächliche GC, grün) gelegene Schichten oder als Calretinin (CalR+, gelb)-positive Neurone in die GCL des BO ein (modifiziert nach Merkle et al., 2007; Lim and Alvarez-Buylla, 2014).

4.4 Ausblick: Neue Quellen für die Stammzelltherapie des Morbus Parkinson

Adulte endogene NSCs könnten in Zukunft als alternative Gewebequelle zu Transplantationszwecken im Rahmen der zellbasierten Therapie zur Verfügung stehen. Sowohl bei neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Parkinson als auch bei anderen neurologischen Erkrankungen wie beispielsweise bei Gehirntumoren könnte die Therapie mit Stammzellen von großem Nutzen sein (Aboody et al., 2000; Ourednik et al., 2000). Auf die Entstehung und Lokalisation von NSCs wurde bereits in der Einleitung dieser Arbeit detailliert eingegangen. Bisher ist es der regenerativen Medizin trotz intensiver Forschungsarbeit noch nicht gelungen, eine adäquate Gewebequelle für die Zellersatztherapie bei neurodegenerativen Erkrankungen wie dem IPS zu finden. Es wurden diesbezüglich, wie in der Einleitung dargestellt, bereits zahlreiche Gewebequellen zu Transplantationszwecken untersucht. In klinischen Studien beim IPS war die Transplantation fetaler Stammzellen am weitesten fortgeschritten. Diese Therapieform ist jedoch mit ethischen Implikationen und im Einzelfall mit gravierenden Nebenwirkungen wie unter

anderem schwerwiegenden Dyskinesien behaftet. Vor etwas mehr als zehn Jahren gelang mit der Entdeckung von iPSCs ein Durchbruch in der Generierung dopaminerger Zellen zu Therapie Zwecken, wobei bis dato erst wenige Studien zur Anwendung am Menschen angelaufen sind. Neben der Angst, unreife Zellen zu implantieren und damit Neoplasien (insbesondere Teratome) und andere Nebenwirkungen herbeizuführen, ist die Anwendung in größeren Patientenstudien durch die sehr zeitintensive und aufwendige Herstellung von iPSCs limitiert. An der zurückhaltenden Anwendung in Patientenstudien hat auch die Entdeckung von diDNs aus Hautfibroblasten im Jahr 2011 wenig geändert.

Zellimplantate, welche in Studien am Menschen zum Einsatz kommen, gelten primär als Arzneimittel. *In vitro* hergestellte Zellen wie zum Beispiel iPSCs tragen, je nach Herstellungsverfahren, zusätzlich genetische Veränderungen in sich, welche auf ihre Herstellung durch Reprogrammierungsverfahren zurückzuführen sind. Diese Zellen werden somit unter Umständen zusätzlich als Gentherapeutika klassifiziert. Daher müssen Zellimplantate zahlreichen Sicherheitsanforderungen und medizinisch-ethischen Ansprüchen genügen. Generell sollte die Gewinnung von Stammzellen wenig invasiv und ethisch unbedenklich sein. Daneben sind eine lange Lebensdauer der Zellen sowie deren einfache Aufarbeitung wünschenswert. Es ist notwendig, die Entartungstendenz von Zelltransplantaten so gering wie möglich zu halten und Autoimmunphänomene zu vermeiden, was mit autologen Zellen im Allgemeinen besser gelingt als mit allogenen Transplantationspräparaten (Sundberg and Isacson, 2014).

Einen weiteren vielversprechenden Ansatz stellt die Gewinnung von dopaminergen Stammzellen aus dem BO dar.

Bereits in einer im Jahr 2007 erschienenen Studie konnte gezeigt werden, dass sich auch bei Mäusen mit zuvor durch das Neurotoxin 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) hervorgerufenen Parkinsonsymptomen noch NSCs aus dem BO gewinnen ließen, obgleich Höglinger et al. einen allgemeinen Rückgang der Proliferation von NSCs in SVZ und BO in einem MPTP-Mausmodell nachgewiesen hatten (Höglinger et al., 2004; Hayakawa et al., 2007).

Pagano et al. gelang im Verlauf auch die Gewinnung von NSCs aus dem BO beim Menschen (Pagano et al., 2000). Diese aus dem menschlichen BO isolierten Stammzellen werden in der Literatur als humane adulte neurale Progenitorzellen des Riechepithels (Human Adult Olfactory Epithelial-Derived Neural Progenitors, hONPs) bezeichnet. Erste Publikationen beschreiben inzwischen bereits erfolgreiche Transplantationen von hONPs in das Gehirn von Ratten mit induziertem Morbus Parkinson:

Wang et al. transplantierten aus dem menschlichen BO gewonnene Stammzellen in das Striatum von zuvor mit 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) behandelten Ratten. 6-OHDA ist ein Neurotoxin, welches durch die Schädigung von dopaminergen und noradrenergen Neuronen Parkinsonsymptome auslöst. Es zeigte sich bei 35% der mit hONPs behandelten Tiere ein signifikant verbessertes Ergebnis in behavioralen Tests nach 24 Wochen. In der histologischen Untersuchung konnte ein regelrechtes Anwachsen sowie eine dopaminerge Ausdifferenzierung des Zelltransplantats im Striatum nachgewiesen werden. In der Nachbeobachtungsphase zeigten sich histologisch keine Anhaltspunkte für eine neoplastische Entartung des Gewebes. Die Autoren gingen davon aus, dass der positive Effekt der Zelltransplantation nicht nur durch die Produktion von DA, sondern zusätzlich durch die Sekretion von neurotrophen Faktoren durch die implantierten Zellen hervorgerufen worden sein könnte (Wang et al., 2012).

Auch Marei et al. isolierten und transplantierten Stammzellen aus dem menschlichen BO in mit 6-OHDA vorbehandelte Ratten. Zusätzlich wurden die Zellen mit hNGF (Human Nerve Growth Factor) und GFP (Green Fluorescent Protein) transfiziert. In den Verhaltensuntersuchungen zeigten die Tiere signifikante Verbesserungen in kognitiven und behavioralen Tests. In der histologischen Aufarbeitung des Gewebes zeigte sich, dass die implantierten Zellen nach einer Dauer von 8 Wochen weiterhin vital waren und keine Anzeichen einer Entartung aufwiesen. Allerdings konnte unter den implantierten Zellen immunhistochemisch keine dopaminerge Ausdifferenzierung im Sinne des Vorliegens von TH⁺-Zellen nachgewiesen werden. Somit vermuteten die Autoren der Studie, dass hier die klinisch beobachteten positiven Effekte nur indirekt durch die Sekretion von hNGF hervorgerufen worden sein könnten (Marei et al., 2015).

Insgesamt erscheint die Gewinnung von dopaminergen Stammzellen sowohl aus dem BO als auch aus dem RMS vielversprechend. Die Vorteile im Vergleich zu den bisher bekannten Stammzellquellen liegen auf der Hand. So bestehen keine grundsätzlichen ethischen Vorbehalte, außerdem ist der Zugang minimalinvasiv und ohne größere zu erwartende Nebenwirkungen möglich. Da es sich um autologe Zellen handelt, bedarf es im Verlauf nach einer Transplantation keiner immunsuppressiven Therapie, was für den Patienten einen großen Vorteil darstellt. In bisherigen Studien konnte keine Entartungstendenz der implantierten Zellen nachgewiesen werden, die in vorherigen Studien insbesondere bei der Transplantation von fNSCs und iPSCs in Form von Teratomen beschrieben wurde (Arnhold et al., 2004; Chang et al., 2012). Insbesondere dieser für die Patientensicherheit relevante Aspekt erscheint für die klinische Umsetzbarkeit von Transplantationsstudien von größter Wichtigkeit.

Weitere Untersuchungen, insbesondere Ex- und Implantationen von dopaminergen Stammzellen im Parkinson-Tiermodell sowie in klinischen Studien bei Parkinson-Patienten werden in Zukunft notwendig sein, um den interessanten und vielversprechenden Ansatz der stammzellbasierten Therapieformen sowohl zur Behandlung des Morbus Parkinson als auch anderer neurodegenerativer Krankheiten weiter zu verfolgen.

5 Zusammenfassung

Ursache des idiopathischen Parkinson-Syndroms (IPS) ist ein fortschreitender Verlust dopaminergener Neurone der Substantia nigra pars compacta (SNpc), welcher im Gehirn betroffener Patienten zu einem Dopaminmangel führt. Heutige Therapieoptionen sind rein symptomatisch und zumeist auf den medikamentösen Ersatz des Neurotransmitters Dopamin (DA) beschränkt. Da die medikamentöse Therapie mit zahlreichen Nebenwirkungen assoziiert ist und ihre Wirksamkeit mit der Zeit nachlässt, wird seit Jahren nach alternativen Therapieoptionen gesucht. Unter anderem stellt die Implantation von körpereigenen oder körperfremden dopaminergen Stammzellen einen möglichen kurativen und somit interessanten Therapieansatz dar.

Im Gehirn adulter Säugetiere bleiben nur zwei Hirnregionen lebenslang zur Neubildung von Neuronen (Neurogenese) fähig. Dies ist neben der Subgranulärzone (SGZ) des Gyrus dentatus des Hippocampus die Subventrikulärzone (SVZ) der Seitenventrikel des Telencephalons. Die in der SVZ neugebildeten Neurone gehen aus neuralen Stammzellen (NSCs) hervor und wandern entlang des rostralen Migrationsstroms (RMS) in den olfaktorischen Bulbus (BO) ein. Im BO kommt es zur Ausdifferenzierung und Integration der jungen Neurone entweder in die granuläre Zellschicht (GCL) oder periglomeruläre Zellschicht (PGL), wobei circa 40% der neu eingewanderten Neurone der PGL einen dopaminergen Phänotyp annehmen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifikation dopaminergener Stammzellen im SVZ-RMS-BO-System, da diese in zukünftigen klinischen Studien zu Transplantationszwecken eingesetzt werden könnten. Zur Klärung dieser Fragestellung diente ein Mausmodell bestehend aus 11 Tieren, bei dem der RMS der Versuchsgruppe mittels einer physikalischen Barriere (PB) mechanisch unterbrochen wurde. Teilungsaktive Vorläuferzellen konnten mit Hilfe einer kontinuierlichen einwöchigen Infusion des Zytostatikums AraC (Cytarabin) aus der SVZ und dem RMS eliminiert werden. Anschließend wurden die durch Regeneration des Systems neugebildete Nervenzellen durch Applikation des Thymidin-Analogons BrdU (Bromodeoxyuridin) markiert. Die Versuchstiere wurden 55 (n=4) beziehungsweise 105 Tage (n=4) nach Beendigung der AraC-Infusion geopfert. Die mitgeführten, nichtbehandelten Tiere der Kontrollgruppe (n=3) erhielten nur BrdU-Applikationen und wurden

ebenfalls an Tag 105 geopfert. *Post mortem* erfolgte die Gehirnentnahme und Gewebeaufarbeitung. Mit Hilfe einer immunhistochemischen BrdU-Färbung konnten die neugebildeten Neurone nachgewiesen werden. Die Funktionstüchtigkeit der PB als Grundlage des Versuchsaufbaus konnte anhand der Untersuchung der SVZ bestätigt werden. Es zeigte sich erwartungsgemäß, dass nach Ablation der Neuroblasten die Neurogenese in der SVZ wieder aufgenommen wurde. Ebenso ließ sich ein vermehrter Rückstau an neugebildeten Neuronen auf der unterbrochenen Seite in die SVZ feststellen, wodurch die gewünschte Funktion der PB gezeigt werden konnte. Anhand der immunhistochemischen Untersuchungen der GCL und PGL des BO ließ sich eine signifikante Reduktion von neugebildeten Neuronen auf der unterbrochenen Seite in der GCL, nicht jedoch in der PGL, feststellen. Damit konnte gezeigt werden, dass diejenigen NSCs, welche Interneurone der GCL hervorbringen, in der SVZ liegen, während NSCs, welche Interneurone (inklusive dopaminergere Interneurone) für die PGL produzieren, im RMS rostral der PB lokalisiert sein müssen. Mit Hilfe einer BrdU/NeuN-Doppelfärbung der PGL konnte sichergestellt werden, dass es sich bei den neugebildeten Zellen tatsächlich um Neurone und nicht etwa um reaktive Gliazellen handelte. Anhand zusätzlicher Färbungen, speziell der dopaminergen Zellen in der PGL, ließ sich eine gleichbleibende Anzahl an dopaminergen Neuronen bestätigen. In der vorliegenden Arbeit konnte somit erstmals mit Hilfe einer mechanischen Unterbrechung des RMS in einem Mausmodell die Lokalisation dopaminergere Stammzellen im RMS nachgewiesen werden. Die Ergebnisse stimmen mit denjenigen von verschiedenen Arbeitsgruppen überein und stützen die Hypothese, dass es sich beim SVZ-RMS-BO-System um eine komplexe proliferative Zone handelt. Es wird deutlich, dass NSCs eine inhomogene Zellpopulation darstellen und somit abhängig von ihrer Regionalisierung unterschiedliche Typen von Neuronen hervorbringen. Therapeutisch stellt die Stammzelltherapie des zentralen Nervensystems (ZNS) einen neuen Ansatz zur Behandlung des IPS sowie anderer neurodegenerativer Erkrankungen dar. Da bisherige Quellen von dopaminergen NSCs unterschiedliche klinische und ethische Einschränkungen aufweisen, stellt die Gewinnung dieser Zellen aus dem RMS einen vielversprechenden neuen Therapieansatz dar, der in Zukunft sowohl am Nagetier als auch am Menschen genauer untersucht werden sollte.

6 Summary

Parkinson's disease (PD) is caused by a progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc), which results in dopamine (DA) depletion in the brain of affected patients. Today's therapy options are mostly symptomatic and limited to pharmacological replacement therapy of DA. Because medication is associated with several side-effects and efficacy of the treatment subsides with time, alternative therapy options are studied since many years. Especially transplantation of endogenous and exogenous dopaminergic stem cells as a possible cure for PD is increasingly under investigation.

The adult mammalian brain contains only two regions that maintain the lifelong capacity to generate new neurons, a process which is called neurogenesis. The first region is the subgranular layer (SGZ) which is located in the dentate gyrus of the hippocampus. The second region is the subventricular zone (SVZ) adjacent to the walls of the lateral ventricles of the telencephalon. Neurons deriving from neural stem cells (NSCs) of the SVZ migrate along the rostral migratory stream (RMS) towards the olfactory bulb (BO). After reaching the BO these neurons differentiate into mature interneurons before integrating into the granular (GCL) or periglomerular cell layer (PGL). Approximately 40% of the newly integrated neurons of the PGL show a dopaminergic phenotype.

The aim of the present study was to investigate the localization of the dopaminergic NSCs in the SVZ-RMS-BO-system. It is of special interest to find the exact position of these neurons because they could be used for transplantation projects in clinical studies.

To elucidate this question we used a mouse model consisting of 11 animals and implanted a physical barrier (PB) to mechanically interrupt the RMS. Depletion of neural progenitors in the SVZ and RMS was achieved by a continuous infusion of AraC (cytosine β -D-arabinofuranoside) administered for one week. Subsequently newly proliferating neurons were labeled by BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine), an analogue of thymidine. The experimental group consisted of 8 animals which were sacrificed 55 (n=4) and 105 days (n=4) after stopping the AraC application. The three animals of the control group received neither a surgery for PB implantation nor AraC treatment. They only obtained BrdU injections and were sacrificed on day 105. For further analysis the mouse brains

were removed from the skull. The brain tissue was processed and immunohistochemically stained.

The proper function of the PB, as required for the experiment, was confirmed by investigation of the SVZ. As expected after depletion of the neuroblasts neurogenesis was regenerating after treatment, which was confirmed by BrdU immunostaining. Furthermore a distinct accumulation of neuroblasts in the SVZ on the interrupted side indicated a proper function of the PB. Interestingly, the BrdU staining of the BO on the interrupted side showed a significant reduction of new born neurons in the GCL, but not in the PGL. This result clearly implies that NSCs, which produce interneurons destined for the GCL are located in the SVZ, whereas NSCs which provide interneurons for the PGL (including dopaminergic interneurons) must be located in the RMS. With the help of a BrdU/NeuN-double staining of the PGL it was confirmed that the cell type of the new born cells were mainly neurons instead of reactive glial cells. Furthermore, various stainings, especially the TH-staining of the PGL validated a constant level of dopaminergic neurons.

To the best of our knowledge, this is the first work detecting dopaminergic stem cells in the RMS of a mouse model by mechanical interruption of the RMS.

These findings are congruent with the results of different scientific groups and support the hypothesis that the SVZ-RMS-BO system is a complex proliferative zone. In addition, it becomes obvious that NSCs are an inhomogenous cell population in which NSCs of distinct regions produce different subtypes of neurons. This diverse character of NSCs is described as regionalization by different authors.

Stem cell therapy of the central nervous system is a promising new approach for the treatment of PD as well as for other neurodegenerative and neurooncological diseases. Previously described sources of dopaminergic stem cells comprise several disadvantages and clinical limitations. The extraction of dopaminergic NSCs from the RMS could be a promising alternative to overcome current objections. First preliminary studies on rodents and humans were already successfully accomplished.

Literaturverzeichnis

1970. Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology. The Boulder Committee. *Anat Rec* 166:257-261.
1997. Entacapone improves motor fluctuations in levodopa-treated Parkinson's disease patients. Parkinson Study Group. *Ann Neurol* 42:747-755.
- Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilic J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boue S, Izpisua Belmonte JC. 2008. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 26:1276-1284.
- Abdullah R, Basak I, Patil KS, Alves G, Larsen JP, Moller SG. 2015. Parkinson's disease and age: The obvious but largely unexplored link. *Exp Gerontol* 68:33-38.
- Aboody KS, Brown A, Rainov NG, Bower KA, Liu S, Yang W, Small JE, Herrlinger U, Ourednik V, Black PM, Breakefield XO, Snyder EY. 2000. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:12846-12851.
- Adler CH, Stern MB, Vernon G, Hurtig HI. 1997. Amantadine in advanced Parkinson's disease: good use of an old drug. *J Neurol* 244:336-337.
- Agasse F, Bernardino L, Kristiansen H, Christiansen SH, Ferreira R, Silva B, Grade S, Woldbye DP, Malva JO. 2008. Neuropeptide Y promotes neurogenesis in murine subventricular zone. *Stem Cells* 26:1636-1645.
- Aguirre A, Gallo V. 2004. Postnatal neurogenesis and gliogenesis in the olfactory bulb from NG2-expressing progenitors of the subventricular zone. *J Neurosci* 24:10530-10541.
- Allam MF, Del Castillo AS, Navajas RF. 2005. Parkinson's disease risk factors: genetic, environmental, or both? *Neurol Res* 27:206-208.
- Alonso G, Prieto M, Chauvet N. 1999. Tangential migration of young neurons arising from the subventricular zone of adult rats is impaired by surgical lesions passing through their natural migratory pathway. *J Comp Neurol* 405:508-528.
- Alonso L, Fuchs E. 2003. Stem cells in the skin: waste not, Wnt not. *Genes Dev* 17:1189-1200.
- Altman J. 1962. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135:1127-1128.
- Altman J. 1969a. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. 3. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. *J Comp Neurol* 136:269-293.
- Altman J. 1969b. 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. *J Comp Neurol* 137:433-457.
- Altman J, Bayer SA. 1995. *Atlas of Prenatal Rat Brain Development*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Altman J, Das GD. 1965a. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319-335.
- Altman J, Das GD. 1965b. Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature* 207:953-956.

- Altman J, Das GD. 1967. Postnatal neurogenesis in the guinea-pig. *Nature* 214:1098-1101.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. 2002. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22:629-634.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Tramontin AD. 2001. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 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-Buylla A, Temple S. 1998. Stem cells in the developing and adult nervous system. *J Neurobiol* 36:105-110.
- Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JL. 1997. Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. *Science* 278:474-476.
- Annett LE, Torres EM, Clarke DJ, Ishida Y, Barker RA, Ridley RM, Baker HF, Dunnett SB. 1997. Survival of nigral grafts within the striatum of marmosets with 6-OHDA lesions depends critically on donor embryo age. *Cell Transplant* 6:557-569.
- Arnhold S, Klein H, Semkova I, Addicks K, Schraermeyer U. 2004. Neurally selected embryonic stem cells induce tumor formation after long-term survival following engraftment into the subretinal space. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:4251-4255.
- Ascherio A, Weisskopf MG, O'Reilly EJ, McCullough ML, Calle EE, Rodriguez C, Thun MJ. 2004. Coffee consumption, gender, and Parkinson's disease mortality in the cancer prevention study II cohort: the modifying effects of estrogen. *Am J Epidemiol* 160:977-984.
- Balenci L, Saoudi Y, Grunwald D, Deloulme JC, Bouron A, Bernards A, Baudier J. 2007. IQGAP1 regulates adult neural progenitors in vivo and vascular endothelial growth factor-triggered neural progenitor migration in vitro. *J Neurosci* 27:4716-4724.
- 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.
- Barbeau A, Roy M, Bernier G, Campanella G, Paris S. 1987. Ecogenetics of Parkinson's disease: prevalence and environmental aspects in rural areas. *Can J Neurol Sci* 14:36-41.
- Bayer SA, Zhang X, Russo RJ, Altman J. 1994. Three-dimensional reconstructions of the developing forebrain in rat embryos. *Neuroimage* 1:296-307.
- Belluzzi O, Benedusi M, Ackman J, LoTurco JJ. 2003. Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 23:10411-10418.
- Berendse HW, Roos DS, Raijmakers P, Doty RL. 2011. Motor and non-motor correlates of olfactory dysfunction in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 310:21-24.
- Bernier PJ, Bedard A, Vinet J, Levesque M, Parent A. 2002. Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:11464-11469.

- Bernier PJ, Vinet J, Cossette M, Parent A. 2000. Characterization of the subventricular zone of the adult human brain: evidence for the involvement of Bcl-2. *Neurosci Res* 37:67-78.
- Betarbet R, Zigova T, Bakay RA, Luskin MB. 1996. Dopaminergic and GABAergic interneurons of the olfactory bulb are derived from the neonatal subventricular zone. *Int J Dev Neurosci* 14:921-930.
- Bhardwaj RD, Curtis MA, Spalding KL, Buchholz BA, Fink D, Bjork-Eriksson T, Nordborg C, Gage FH, Druid H, Eriksson PS, Frisen J. 2006. Neocortical neurogenesis in humans is restricted to development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:12564-12568.
- Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG. 2000. Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 291:17-20.
- Bjorklund A, Stenevi U. 1979. Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. *Brain Res* 177:555-560.
- Bolteus AJ, Bordey A. 2004. GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. *J Neurosci* 24:7623-7631.
- 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.
- Bovetti S, Hsieh YC, Bovolin P, Perroteau I, Kazunori T, Puche AC. 2007. Blood vessels form a scaffold for neuroblast migration in the adult olfactory bulb. *J Neurosci* 27:5976-5980.
- Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24:197-211.
- Brazel CY, Nunez JL, Yang Z, Levison SW. 2005. Glutamate enhances survival and proliferation of neural progenitors derived from the subventricular zone. *Neuroscience* 131:55-65.
- Brezun JM, Daszuta A. 1999. Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience* 89:999-1002.
- Brichta L, Greengard P, Flajolet M. 2013. Advances in the pharmacological treatment of Parkinson's disease: targeting neurotransmitter systems. *Trends Neurosci* 36:543-554.
- Bruel-Jungerman E, Laroche S, Rampon C. 2005. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur J Neurosci* 21:513-521.
- Brundin P, Strecker RE, Lindvall O, Isacson O, Nilsson OG, Barbin G, Prochiantz A, Forni C, Nieoullon A, Widner H, et al. 1987. Intracerebral grafting of dopamine neurons. Experimental basis for clinical trials in patients with Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 495:473-496.
- Burns KA, Kuan CY. 2005. Low doses of bromo- and iododeoxyuridine produce near-saturation labeling of adult proliferative populations in the dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 21:803-807.
- Cai J, Donaldson A, Yang M, German MS, Enikolopov G, Iacovitti L. 2009. The role of Lmx1a in the differentiation of human embryonic stem cells into

- midbrain dopamine neurons in culture and after transplantation into a Parkinson's disease model. *Stem Cells* 27:220-229.
- Caiazzo M, Dell'Anno MT, Dvoretzkova E, Lazarevic D, Taverna S, Leo D, Sotnikova TD, Menegon A, Roncaglia P, Colciago G, Russo G, Carninci P, Pezzoli G, Gainetdinov RR, Gustincich S, Dityatev A, Broccoli V. 2011. Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature* 476:224-227.
- Cajal. 1913-14. Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso. Moya. [Reprint and 2nd edn with additional translations by J DeFelipe and EG Jones (1991) *Cajal's Degeneration and Regeneration of the Nervous System*, pp 375-392, 429f, 616, 672-677 and 747-750, Oxford University Press].
- Cakmak YO. 2016. Coffee consumption, smoking, and Parkinson's disease? The beneficial role of hydrogen sulfide. *Mov Disord* 31:429.
- Cameron HA, Gould E. 1994. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience* 61:203-209.
- Capela A, Temple S. 2002. LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron* 35:865-875.
- 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.
- Cavaco S, Goncalves A, Mendes A, Vila-Cha N, Moreira I, Fernandes J, Damasio J, Teixeira-Pinto A, Bastos Lima A. 2015. Abnormal Olfaction in Parkinson's Disease Is Related to Faster Disease Progression. *Behav Neurol* 2015:976589.
- Cavaleri F, Scholer HR. 2003. Nanog: a new recruit to the embryonic stem cell orchestra. *Cell* 113:551-552.
- Chang YL, Chen SJ, Kao CL, Hung SC, Ding DC, Yu CC, Chen YJ, Ku HH, Lin CP, Lee KH, Chen YC, Wang JJ, Hsu CC, Chen LK, Li HY, Chiou SH. 2012. Docosahexaenoic acid promotes dopaminergic differentiation in induced pluripotent stem cells and inhibits teratoma formation in rats with Parkinson-like pathology. *Cell Transplant* 21:313-332.
- Chaudhuri KR, Schapira AH. 2009. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurol* 8:464-474.
- Chazal G, Durbec P, Jankovski A, Rougon G, Cremer H. 2000. Consequences of neural cell adhesion molecule deficiency on cell migration in the rostral migratory stream of the mouse. *J Neurosci* 20:1446-1457.
- Chiasson BJ, Tropepe V, Morshead CM, van der Kooy D. 1999. Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J Neurosci* 19:4462-4471.
- Codega P, Silva-Vargas V, Paul A, Maldonado-Soto AR, Deleo AM, Pastrana E, Doetsch F. 2014. Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche. *Neuron* 82:545-559.
- Cooper O, Hargus G, Deleidi M, Blak A, Osborn T, Marlow E, Lee K, Levy A, Perez-Torres E, Yow A, Isacson O. 2010. Differentiation of human ES and Parkinson's disease iPS cells into ventral midbrain dopaminergic neurons requires a high activity form of SHH, FGF8a and specific regionalization by retinoic acid. *Mol Cell Neurosci* 45:258-266.

- Corotto FS, Henegar JA, Maruniak JA. 1993. Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain. *Neurosci Lett* 149:111-114.
- Corotto FS, Henegar JR, Maruniak JA. 1994. Odor deprivation leads to reduced neurogenesis and reduced neuronal survival in the olfactory bulb of the adult mouse. *Neuroscience* 61:739-744.
- Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R. 1969. Modification of Parkinsonism--chronic treatment with L-dopa. *N Engl J Med* 280:337-345.
- Cotzias GC, Van Woert MH, Schiffer LM. 1967. Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. *N Engl J Med* 276:374-379.
- Cowan. 1989. in his foreword to Ramón y Cajal, S. (1901-17) *Recuerdos de mi vida*. [Translated and edited by Craigie, E.H. and Cano, J. (1989) *Recollections of my Life*, p. vi, MIT Press].
- Cremer H, Lange R, Christoph A, Plomann M, Vopper G, Roes J, Brown R, Baldwin S, Kraemer P, Scheff S, et al. 1994. Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* 367:455-459.
- Curtis MA, Kam M, Nannmark U, Anderson MF, Axell MZ, Wikkelso C, Holtas S, van Roon-Mom WM, Bjork-Eriksson T, Nordborg C, Frisen J, Dragunow M, Faull RL, Eriksson PS. 2007. Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science* 315:1243-1249.
- Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM. 1999. The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain* 122 (Pt 8):1437-1448.
- Dauer W, Przedborski S. 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889-909.
- de Almeida PE, Meyer EH, Kooreman NG, Diecke S, Dey D, Sanchez-Freire V, Hu S, Ebert A, Odegaard J, Mordwinkin NM, Brouwer TP, Lo D, Montoro DT, Longaker MT, Negrin RS, Wu JC. 2014. Transplanted terminally differentiated induced pluripotent stem cells are accepted by immune mechanisms similar to self-tolerance. *Nat Commun* 5:3903.
- de Carlos JA, Lopez-Mascaraque L, Valverde F. 1996. Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J Neurosci* 16:6146-6156.
- de Lau LM, Giesbergen PC, de Rijk MC, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. 2004. Incidence of parkinsonism and Parkinson disease in a general population: the Rotterdam Study. *Neurology* 63:1240-1244.
- de Rijk MC, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, Baldereschi M, Fratiglioni L, Lobo A, Martinez-Lage J, Trenkwalder C, Hofman A. 2000. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Neurology* 54:S21-23.
- Dempsey RJ, Sailor KA, Bowen KK, Tureyen K, Vemuganti R. 2003. Stroke-induced progenitor cell proliferation in adult spontaneously hypertensive rat brain: effect of exogenous IGF-1 and GDNF. *J Neurochem* 87:586-597.
- Dexter DT, Jenner P. 2013. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radic Biol Med* 62:132-144.

- Di Monte DA. 2003. The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins? *Lancet Neurol* 2:531-538.
- Dickson DW, Fujishiro H, Orr C, DelleDonne A, Josephs KA, Frigerio R, Burnett M, Parisi JE, Klos KJ, Ahlskog JE. 2009. Neuropathology of non-motor features of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord* 15 Suppl 3:S1-5.
- Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K. 2008. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321:1218-1221.
- Doetsch F. 2003. A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 13:543-550.
- Doetsch F, Alvarez-Buylla A. 1996. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:14895-14900.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1999a. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703-716.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1997. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17:5046-5061.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1999b. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:11619-11624.
- Doi D, Samata B, Katsukawa M, Kikuchi T, Morizane A, Ono Y, Sekiguchi K, Nakagawa M, Parmar M, Takahashi J. 2014. Isolation of human induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitors by cell sorting for successful transplantation. *Stem Cell Reports* 2:337-350.
- Dua HS, Azuara-Blanco A. 2000. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv Ophthalmol* 44:415-425.
- Dunnett SB, Bjorklund A, Schmidt RH, Stenevi U, Iversen SD. 1983. Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. V. Behavioural recovery in rats with bilateral 6-OHDA lesions following implantation of nigral cell suspensions. *Acta Physiol Scand Suppl* 522:39-47.
- Dziasko MA, Daniels JT. 2016. Anatomical Features and Cell-Cell Interactions in the Human Limbal Epithelial Stem Cell Niche. *Ocul Surf* 14:322-330.
- Ebert AD, Yu J, Rose FF, Jr., Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, Svendsen CN. 2009. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457:277-280.
- Eisch AJ, Barrot M, Schad CA, Self DW, Nestler EJ. 2000. Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:7579-7584.
- Elbaz A, Carcaillon L, Kab S, Moisan F. 2016. Epidemiology of Parkinson's disease. *Rev Neurol (Paris)* 172:14-26.
- Emsley JG, Hagg T. 2003. Endogenous and exogenous ciliary neurotrophic factor enhances forebrain neurogenesis in adult mice. *Exp Neurol* 183:298-310.

- Emsley JG, Mitchell BD, Kempermann G, Macklis JD. 2005. Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. *Prog Neurobiol* 75:321-341.
- Enwere E, Shingo T, Gregg C, Fujikawa H, Ohta S, Weiss S. 2004. Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *J Neurosci* 24:8354-8365.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313-1317.
- Ernst A, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Perl S, Tisdale J, Possnert G, Druid H, Frisen J. 2014. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell* 156:1072-1083.
- Evans MJ, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156.
- Fahn S. 1992. Adverse effects of levodopa. *The Scientific Basis for the Treatment of Parkinson's Disease* Carnforth, England Parthenon Publishing Group 1992;89- 112.
- Fahn S. 1996. Is levodopa toxic? *Neurology* 47:S184-195.
- Fahn S. 1999. Parkinson disease, the effect of levodopa, and the ELLDOPA trial. Earlier vs Later L-DOPA. *Arch Neurol* 56:529-535.
- Fahn S. 2003. Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 991:1-14.
- Falcao AM, Marques F, Novais A, Sousa N, Palha JA, Sousa JC. 2012. The path from the choroid plexus to the subventricular zone: go with the flow! *Front Cell Neurosci* 6:34.
- Fallon J, Reid S, Kinyamu R, Opole I, Opole R, Baratta J, Korc M, Endo TL, Duong A, Nguyen G, Karkehabadhi M, Twardzik D, Patel S, Loughlin S. 2000. In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:14686-14691.
- Fasano CA, Chambers SM, Lee G, Tomishima MJ, Studer L. 2010. Efficient derivation of functional floor plate tissue from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 6:336-347.
- Fearnley JM, Lees AJ. 1991. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114 (Pt 5):2283-2301.
- Fernandez M, Pirondi S, Manservigi M, Giardino L, Calza L. 2004. Thyroid hormone participates in the regulation of neural stem cells and oligodendrocyte precursor cells in the central nervous system of adult rat. *Eur J Neurosci* 20:2059-2070.
- Fernando RN, Eleuteri B, Abdelhady S, Nussenzweig A, Andang M, Ernfors P. 2011. Cell cycle restriction by histone H2AX limits proliferation of adult neural stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:5837-5842.
- Fiske BK, Brunjes PC. 2001. Cell death in the developing and sensory-deprived rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 431:311-319.
- Forno LS. 1996. Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:259-272.
- Fox SH, Katzenschlager R, Lim SY, Ravina B, Seppi K, Coelho M, Poewe W, Rascol O, Goetz CG, Sampaio C. 2011. The Movement Disorder Society

- Evidence-Based Medicine Review Update: Treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease. *Mov Disord* 26 Suppl 3:S2-41.
- Frederiksen K, Jat PS, Valtz N, Levy D, McKay R. 1988. Immortalization of precursor cells from the mammalian CNS. *Neuron* 1:439-448.
- Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JQ, Eidelberg D, Fahn S. 2001. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 344:710-719.
- Freund TF, Bolam JP, Bjorklund A, Stenevi U, Dunnett SB, Powell JF, Smith AD. 1985. Efferent synaptic connections of grafted dopaminergic neurons reinnervating the host neostriatum: a tyrosine hydroxylase immunocytochemical study. *J Neurosci* 5:603-616.
- Fuchs E, Segre JA. 2000. Stem cells: a new lease on life. *Cell* 100:143-155.
- Fuentealba LC, Obernier K, Alvarez-Buylla A. 2012. Adult neural stem cells bridge their niche. *Cell Stem Cell* 10:698-708.
- Fuentealba LC, Rompani SB, Parraguez JI, Obernier K, Romero R, Cepko CL, Alvarez-Buylla A. 2015. Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Cell* 161:1644-1655.
- Fukushima N, Yokouchi K, Kawagishi K, Moriizumi T. 2002. Differential neurogenesis and gliogenesis by local and migrating neural stem cells in the olfactory bulb. *Neurosci Res* 44:467-473.
- Gage FH. 2000. Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433-1438.
- Galvao RP, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 2008. Brain-derived neurotrophic factor signaling does not stimulate subventricular zone neurogenesis in adult mice and rats. *J Neurosci* 28:13368-13383.
- Garber K. 2015. RIKEN suspends first clinical trial involving induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 33:890-891.
- Garcia-Verdugo JM, Ferron S, Flames N, Collado L, Desfilis E, Font E. 2002. The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Res Bull* 57:765-775.
- Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV. 2004. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nature neuroscience* 7:1233-1241.
- Gatto EM, Melcon C, Parisi VL, Bartoloni L, Gonzalez CD. 2015. Inverse association between yerba mate consumption and idiopathic Parkinson's disease. A case-control study. *J Neurol Sci* 356:163-167.
- Gibb WR, Lees AJ. 1988. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 51:745-752.
- Gigante AF, Defazio G, Niccoli Asabella A, Superbo M, Ferrari C, Liuzzi D, Iliceto G, Livrea P, Rubini G. 2016. Smoking in Patients with Parkinson's Disease: preliminary striatal DaT-SPECT findings. *Acta Neurol Scand* 134:265-270.
- Giladi N, McMahon D, Przedborski S, Flaster E, Guillory S, Kostic V, Fahn S. 1992. Motor blocks in Parkinson's disease. *Neurology* 42:333-339.
- Giorgetti A, Montserrat N, Aasen T, Gonzalez F, Rodriguez-Piza I, Vassena R, Raya A, Boue S, Barrero MJ, Corbella BA, Torrabadella M, Veiga A, Izpisua Belmonte JC. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell Stem Cell* 5:353-357.

- Giorgetti A, Montserrat N, Rodriguez-Piza I, Azqueta C, Veiga A, Izpisua Belmonte JC. 2010. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood cells with only two factors: Oct4 and Sox2. *Nat Protoc* 5:811-820.
- Giuffrida R, Vingerhoets FJ, Bogousslavsky J, Ghika J. 2005. [Pain in Parkinson's disease]. *Rev Neurol (Paris)* 161:407-418.
- Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA. 1999. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* 23:257-271.
- Goetz CG. 2011. The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1:a008862.
- Goldman JE. 1995. Lineage, migration, and fate determination of postnatal subventricular zone cells in the mammalian CNS. *J Neurooncol* 24:61-64.
- 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 of the United States of America* 80:2390-2394.
- Gould E. 2007. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci* 8:481-488.
- Gould E, Cameron HA. 1996. Regulation of neuronal birth, migration and death in the rat dentate gyrus. *Dev Neurosci* 18:22-35.
- 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 of the United States of America* 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. 1999. Stress and hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry* 46:1472-1479.
- Grealish S, Diguët E, Kirkeby A, Mattsson B, Heuer A, Bramoulle Y, Van Camp N, Perrier AL, Hantraye P, Bjorklund A, Parmar M. 2014. Human ESC-derived dopamine neurons show similar preclinical efficacy and potency to fetal neurons when grafted in a rat model of Parkinson's disease. *Cell Stem Cell* 15:653-665.
- Greenberg DA, Jin K. 2005. From angiogenesis to neuropathology. *Nature* 438:954-959.
- Greffard S, Verny M, Bonnet AM, Beinis JY, Gallinari C, Meaume S, Piette F, Hauw JJ, Duyckaerts C. 2006. Motor score of the Unified Parkinson Disease Rating Scale as a good predictor of Lewy body-associated neuronal loss in the substantia nigra. *Arch Neurol* 63:584-588.
- Greulich W, Fenger E. 1995. Amantadine in Parkinson's disease: pro and contra. *J Neural Transm Suppl* 46:415-421.
- Grimbergen YA, Langston JW, Roos RA, Bloem BR. 2009. Postural instability in Parkinson's disease: the adrenergic hypothesis and the locus coeruleus. *Expert Rev Neurother* 9:279-290.
- Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F, Caille I, Alvarez-Buylla A, Lim DA, Galli R, Verdugo JM, Herrera DG, Vescovi AL. 2002. Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci* 22:437-445.

- Gritti A, Frolichsthal-Schoeller P, Galli R, Parati EA, Cova L, Pagano SF, Bjornson CR, Vescovi AL. 1999. Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *J Neurosci* 19:3287-3297.
- Grosch J, Winkler J, Kohl Z. 2016. Early Degeneration of Both Dopaminergic and Serotonergic Axons - A Common Mechanism in Parkinson's Disease. *Front Cell Neurosci* 10:293.
- Gross CG. 2000. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci* 1:67-73.
- Ha AD, Jankovic J. 2012. Pain in Parkinson's disease. *Mov Disord* 27:485-491.
- Haase A, Olmer R, Schwanke K, Wunderlich S, Merkert S, Hess C, Zweigerdt R, Gruh I, Meyer J, Wagner S, Maier LS, Han DW, Glage S, Miller K, Fischer P, Scholer HR, Martin U. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. *Cell Stem Cell* 5:434-441.
- Hack I, Bancila M, Loulier K, Carroll P, Cremer H. 2002. Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis. *Nature neuroscience* 5:939-945.
- Hack MA, Saghatelian A, de Chevigny A, Pfeifer A, Ashery-Padan R, Lledo PM, Gotz M. 2005. Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nature neuroscience* 8:865-872.
- Hadjantonakis A, Papaioannou V. 2001. The stem cells of early embryos. *Differentiation* 68:159-166.
- 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. *Mov Disord* 22:839-842.
- Hagell P, Piccini P, Bjorklund A, Brundin P, Rehncrona S, Widner H, Crabb L, Pavese N, Oertel WH, Quinn N, Brooks DJ, Lindvall O. 2002. Dyskinesias following neural transplantation in Parkinson's disease. *Nature neuroscience* 5:627-628.
- Haglin L. 2015. High serum phosphate concentration as the result of smoking might underlie the lower risk of Parkinson's disease. *Med Hypotheses* 85:287-290.
- Halasz N, Ljungdahl A, Hokfelt T, Johansson O, Goldstein M, Park D, Biberfeld P. 1977. Transmitter histochemistry of the rat olfactory bulb. I. Immunohistochemical localization of monoamine synthesizing enzymes. Support for intrabulbar, periglomerular dopamine neurons. *Brain Res* 126:455-474.
- Halliday GM, Stevens CH. 2011. Glia: initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease. *Mov Disord* 26:6-17.
- Han DW, Tapia N, Hermann A, Hemmer K, Hoing S, Arauzo-Bravo MJ, Zaehres H, Wu G, Frank S, Moritz S, Greber B, Yang JH, Lee HT, Schwamborn JC, Storch A, Scholer HR. 2012. Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by defined factors. *Cell Stem Cell* 10:465-472.
- Han F, Baremberg D, Gao J, Duan J, Lu X, Zhang N, Chen Q. 2015a. Development of stem cell-based therapy for Parkinson's disease. *Transl Neurodegener* 4:16.
- Han F, Wang W, Chen B, Chen C, Li S, Lu X, Duan J, Zhang Y, Zhang YA, Guo W, Li G. 2015b. Human induced pluripotent stem cell-derived neurons improve motor asymmetry in a 6-hydroxydopamine-induced rat model of Parkinson's disease. *Cytotherapy* 17:665-679.

- Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R. 2007. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 318:1920-1923.
- Hansel DE, Eipper BA, Ronnett GV. 2001. Neuropeptide Y functions as a neuroproliferative factor. *Nature* 410:940-944.
- Hansen L, Salmon D, Galasko D, Masliah E, Katzman R, DeTeresa R, Thal L, Pay MM, Hofstetter R, Klauber M, et al. 1990. The Lewy body variant of Alzheimer's disease: a clinical and pathologic entity. *Neurology* 40:1-8.
- Hashimoto A, Naito AT, Lee JK, Kitazume-Taneike R, Ito M, Yamaguchi T, Nakata R, Sumida T, Okada K, Nakagawa A, Higo T, Kuramoto Y, Sakai T, Tominaga K, Okinaga T, Kogaki S, Ozono K, Miyagawa S, Sawa Y, Sakata Y, Morita H, Umezawa A, Komuro I. 2016. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells From Patients With Duchenne Muscular Dystrophy and Their Induction to Cardiomyocytes. *Int Heart J* 57:112-117.
- Hayakawa H, Hayashita-Kinoh H, Nihira T, Seki T, Mizuno Y, Mochizuki H. 2007. The isolation of neural stem cells from the olfactory bulb of Parkinson's disease model. *Neurosci Res* 57:393-398.
- Hilker R, Antonini A, Odin P. 2011. What is the best treatment for fluctuating Parkinson's disease: continuous drug delivery or deep brain stimulation of the subthalamic nucleus? *J Neural Transm (Vienna)* 118:907-914.
- Hitoshi S, Maruta N, Higashi M, Kumar A, Kato N, Ikenaka K. 2007. Antidepressant drugs reverse the loss of adult neural stem cells following chronic stress. *J Neurosci Res* 85:3574-3585.
- Hoglinger GU, Alvarez-Fischer D, Arias-Carrion O, Djufri M, Windolph A, Keber U, Borta A, Ries V, Schwarting RK, Scheller D, Oertel WH. 2015. A new dopaminergic nigro-olfactory projection. *Acta Neuropathol* 130:333-348.
- Hoglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I, Hirsch EC. 2004. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nature neuroscience* 7:726-735.
- Hong S, Chung S, Leung K, Hwang I, Moon J, Kim KS. 2014. Functional roles of Nurr1, Pitx3, and Lmx1a in neurogenesis and phenotype specification of dopamine neurons during in vitro differentiation of embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 23:477-487.
- Hou P, Li Y, Zhang X, Liu C, Guan J, Li H, Zhao T, Ye J, Yang W, Liu K, Ge J, Xu J, Zhang Q, Zhao Y, Deng H. 2013. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science* 341:651-654.
- Howell OW, Doyle K, Goodman JH, Scharfman HE, Herzog H, Pringle A, Beck-Sickinger AG, Gray WP. 2005. Neuropeptide Y stimulates neuronal precursor proliferation in the post-natal and adult dentate gyrus. *J Neurochem* 93:560-570.
- Hu H, Tomasiewicz H, Magnuson T, Rutishauser U. 1996. The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone. *Neuron* 16:735-743.
- Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, Muhlestein W, Melton DA. 2008. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 26:1269-1275.

- Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, Wood J, Strauss JF, 3rd, Boiani M, Scholer HR. 2003. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 300:1251-1256.
- Huisman E, Uylings HB, Hoogland PV. 2004. A 100% increase of dopaminergic cells in the olfactory bulb may explain hyposmia in Parkinson's disease. *Mov Disord* 19:687-692.
- Ilic D, Devito L, Miere C, Codognotto S. 2015. Human embryonic and induced pluripotent stem cells in clinical trials. *Br Med Bull* 116:19-27.
- Ilic D, Ogilvie C. 2017. Concise Review: Human Embryonic Stem Cells-What Have We Done? What Are We Doing? Where Are We Going? *Stem Cells* 35:17-25.
- Jackson EL, Alvarez-Buylla A. 2008. Characterization of adult neural stem cells and their relation to brain tumors. *Cells Tissues Organs* 188:212-224.
- Jang J, Quan Z, Yum YJ, Song HS, Paek S, Kang HC. 2014. Induced pluripotent stem cells for modeling of pediatric neurological disorders. *Biotechnol J* 9:871-881.
- Jankovski A, Sotelo C. 1996. Subventricular zone-olfactory bulb migratory pathway in the adult mouse: cellular composition and specificity as determined by heterochronic and heterotopic transplantation. *J Comp Neurol* 371:376-396.
- Jellinger KA. 2003. Alpha-synuclein pathology in Parkinson's and Alzheimer's disease brain: incidence and topographic distribution--a pilot study. *Acta Neuropathol* 106:191-201.
- Jenner P, Olanow CW. 1998. Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 44:S72-84.
- Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Bateur S, Simon RP, Greenberg DA. 2001. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:4710-4715.
- Jin K, Sun Y, Xie L, Bateur S, Mao XO, Smelick C, Logvinova A, Greenberg DA. 2003a. Neurogenesis and aging: FGF-2 and HB-EGF restore neurogenesis in hippocampus and subventricular zone of aged mice. *Aging Cell* 2:175-183.
- Jin K, Xie L, Childs J, Sun Y, Mao XO, Logvinova A, Greenberg DA. 2003b. Cerebral neurogenesis is induced by intranasal administration of growth factors. *Ann Neurol* 53:405-409.
- 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 of the United States of America* 99:11946-11950.
- Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J. 1999. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96:25-34.
- Jost WH. 2003. Autonomic dysfunctions in idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol* 250 Suppl 1:I28-30.
- Kannangara TS, Lucero MJ, Gil-Mohapel J, Drapala RJ, Simpson JM, Christie BR, van Praag H. 2011. Running reduces stress and enhances cell genesis in aged mice. *Neurobiol Aging* 32:2279-2286.
- Kaplan MS, Bell DH. 1984. Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. *J Neurosci* 4:1429-1441.

- Kaplan MS, Hinds JW. 1977. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197:1092-1094.
- Kaplan MS, McNelly NA, Hinds JW. 1985. Population dynamics of adult-formed granule neurons of the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 239:117-125.
- Karow T, Lang-Roth R. 2011. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*: Karow.
- Kasabova-Angelova A, Tzankova D, Mitkov J, Georgieva M, Tzankova V, Zlatkov A, Kondeva-Burdina M. 2018. Xanthine derivatives as agents affecting non-dopaminergic neuroprotection in Parkinson's disease. *Curr Med Chem*.
- Kefalopoulou Z, Politis M, Piccini P, Mencacci N, Bhatia K, Jahanshahi M, Widner H, Rehncrona S, Brundin P, Bjorklund A, Lindvall O, Limousin P, Quinn N, Foltynie T. 2014. Long-term clinical outcome of fetal cell transplantation for Parkinson disease: two case reports. *JAMA Neurol* 71:83-87.
- Kempermann G, Gage FH. 1999. New nerve cells for the adult brain. *Sci Am* 280:48-53.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493-495.
- Keshavarzian A, Green SJ, Engen PA, Voigt RM, Naqib A, Forsyth CB, Mutlu E, Shannon KM. 2015. Colonic bacterial composition in Parkinson's disease. *Mov Disord* 30:1351-1360.
- Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, Kim KS. 2009a. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4:472-476.
- Kim HS, Kim J, Jo Y, Jeon D, Cho YS. 2014. Direct lineage reprogramming of mouse fibroblasts to functional midbrain dopaminergic neuronal progenitors. *Stem Cell Res* 12:60-68.
- Kim J, Su SC, Wang H, Cheng AW, Cassady JP, Lodato MA, Lengner CJ, Chung CY, Dawlaty MM, Tsai LH, Jaenisch R. 2011. Functional integration of dopaminergic neurons directly converted from mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 9:413-419.
- Kim JB, Greber B, Arauzo-Bravo MJ, Meyer J, Park KI, Zaehres H, Scholer HR. 2009b. Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 461:649-643.
- Kirschenbaum B, Doetsch F, Lois C, Alvarez-Buylla A. 1999. Adult subventricular zone neuronal precursors continue to proliferate and migrate in the absence of the olfactory bulb. *J Neurosci* 19:2171-2180.
- Kirschenbaum B, Goldman SA. 1995. Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival of neurons arising from the adult rat forebrain subependymal zone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:210-214.
- Kirschenbaum B, Nedergaard M, Preuss A, Barami K, Fraser RA, Goldman SA. 1994. In vitro neuronal production and differentiation by precursor cells derived from the adult human forebrain. *Cereb Cortex* 4:576-589.
- Klein C, Schlossmacher MG. 2007. Parkinson disease, 10 years after its genetic revolution: multiple clues to a complex disorder. *Neurology* 69:2093-2104.

- Knudsen K, Krogh K, Ostergaard K, Borghammer P. 2016. Constipation in parkinson's disease: Subjective symptoms, objective markers, and new perspectives. *Mov Disord*.
- Kobilo T, Liu QR, Gandhi K, Mughal M, Shaham Y, van Praag H. 2011. Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment. *Learn Mem* 18:605-609.
- Kohwi M, Osumi N, Rubenstein JL, Alvarez-Buylla A. 2005. Pax6 is required for making specific subpopulations of granule and periglomerular neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 25:6997-7003.
- Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, Freeman TB, Olanow CW. 2008. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med* 14:504-506.
- Kordower JH, Freeman TB, Snow BJ, Vingerhoets FJ, Mufson EJ, Sanberg PR, Hauser RA, Smith DA, Nauert GM, Perl DP, et al. 1995. Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease. *N Engl J Med* 332:1118-1124.
- Kordower JH, Goetz CG, Chu Y, Halliday GM, Nicholson DA, Musial TF, Marmion DJ, Stoessl AJ, Sossi V, Freeman TB, Olanow CW. 2017. Robust graft survival and normalized dopaminergic innervation do not obligate recovery in a Parkinson disease patient. *Ann Neurol* 81:46-57.
- Kosaka K, Aika Y, Toida K, Heizmann CW, Hunziker W, Jacobowitz DM, Nagatsu I, Streit P, Visser TJ, Kosaka T. 1995. Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb. *Neurosci Res* 23:73-88.
- Kosaka K, Toida K, Aika Y, Kosaka T. 1998. How simple is the organization of the olfactory glomerulus?: the heterogeneity of so-called periglomerular cells. *Neurosci Res* 30:101-110.
- Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 32:149-184.
- Kriks S, Shim JW, Piao J, Ganat YM, Wakeman DR, Xie Z, Carrillo-Reid L, Auyeung G, Antonacci C, Buch A, Yang L, Beal MF, Surmeier DJ, Kordower JH, Tabar V, Studer L. 2011. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* 480:547-551.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. 1996. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 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. *J Neurosci* 17:5820-5829.
- Kulisevsky J, Lopez-Villegas D. 1997. [Initial treatment of Parkinson's disease]. *Rev Neurol* 25 Suppl 2:S163-169.
- Kurth MC, Adler CH, Hilaire MS, Singer C, Waters C, LeWitt P, Chernik DA, Dorflinger EE, Yoo K. 1997. Tolcapone improves motor function and reduces levodopa requirement in patients with Parkinson's disease experiencing motor fluctuations: a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. Tolcapone Fluctuator Study Group I. *Neurology* 48:81-87.
- LaDage LD. 2015. Environmental Change, the Stress Response, and Neurogenesis. *Integr Comp Biol* 55:372-383.

- Lang AE, Lozano AM. 1998. Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med* 339:1130-1143.
- Langenfurth A, Gu S, Bautze V, Zhang C, Neumann JE, Schuller U, Stock K, Wolf SA, Maier AM, Mastrella G, Pak A, Cheng H, Kalin RE, Holmbeck K, Strotmann J, Kettenmann H, Glass R. 2016. Decreased demand for olfactory periglomerular cells impacts on neural precursor cell viability in the rostral migratory stream. *Sci Rep* 6:32203.
- Lavker RM, Sun TT. 2000. Epidermal stem cells: properties, markers, and location. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:13473-13475.
- Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, Holland EC, Steindler DA. 2000. Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:13883-13888.
- Lee M, McGeer EG, McGeer PL. 2016. Quercetin, not caffeine, is a major neuroprotective component in coffee. *Neurobiol Aging* 46:113-123.
- Lerou PH, Daley GQ. 2005. Therapeutic potential of embryonic stem cells. *Blood Rev* 19:321-331.
- Leuner B, Glasper ER, Gould E. 2010. Sexual experience promotes adult neurogenesis in the hippocampus despite an initial elevation in stress hormones. *PLoS One* 5:e11597.
- Leuner B, Kozorovitskiy Y, Gross CG, Gould E. 2007. Diminished adult neurogenesis in the marmoset brain precedes old age. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:17169-17173.
- Li W, Englund E, Widner H, Mattsson B, van Westen D, Latt J, Rehncrona S, Brundin P, Bjorklund A, Lindvall O, Li JY. 2016. Extensive graft-derived dopaminergic innervation is maintained 24 years after transplantation in the degenerating parkinsonian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113:6544-6549.
- Li X, Li W, Liu G, Shen X, Tang Y. 2015. Association between cigarette smoking and Parkinson's disease: A meta-analysis. *Arch Gerontol Geriatr* 61:510-516.
- Lie DC, Dziejczapolski G, Willhoite AR, Kaspar BK, Shults CW, Gage FH. 2002. The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *J Neurosci* 22:6639-6649.
- Lie DC, Song H, Colamarino SA, Ming GL, Gage FH. 2004. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:399-421.
- Lim DA, Alvarez-Buylla A. 1999. Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:7526-7531.
- Lim DA, Alvarez-Buylla A. 2014. Adult neural stem cells stake their ground. *Trends Neurosci* 37:563-571.
- Lim DA, Alvarez-Buylla A. 2016. The Adult Ventricular-Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8.
- Limousin P, Pollak P, Benazzouz A, Hoffmann D, Le Bas JF, Broussolle E, Perret JE, Benabid AL. 1995. Effect of parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation. *Lancet* 345:91-95.

- Lindvall O, Brundin P, Widner H, Rehnström S, Gustavii B, Frackowiak R, Leenders KL, Sawle G, Rothwell JC, Marsden CD, et al. 1990. Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science* 247:574-577.
- Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR. 1998. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci* 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, Alonso M, Grubb MS. 2006. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 7:179-193.
- Lledo PM, Merkle FT, Alvarez-Buylla A. 2008. Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends Neurosci* 31:392-400.
- Llorens-Bobadilla E, Zhao S, Baser A, Saiz-Castro G, Zwadlo K, Martin-Villalba A. 2015. Single-Cell Transcriptomics Reveals a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury. *Cell Stem Cell* 17:329-340.
- Loh YH, Agarwal S, Park IH, Urbach A, Huo H, Heffner GC, Kim K, Miller JD, Ng K, Daley GQ. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* 113:5476-5479.
- 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 of the United States of America* 90:2074-2077.
- Lois C, Alvarez-Buylla A. 1994. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145-1148.
- Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1996. Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271:978-981.
- Louissaint A, Jr., Rao S, Leventhal C, Goldman SA. 2002. Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. *Neuron* 34:945-960.
- Luo J, Daniels SB, Lenington JB, Notti RQ, Conover JC. 2006. The aging neurogenic subventricular zone. *Aging Cell* 5:139-152.
- Luskin MB. 1993. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11:173-189.
- Luskin MB, Boone MS. 1994. Rate and pattern of migration of lineally-related olfactory bulb interneurons generated postnatally in the subventricular zone of the rat. *Chem Senses* 19:695-714.
- Ma CL, Ma XT, Wang JJ, Liu H, Chen YF, Yang Y. 2017. Physical exercise induces hippocampal neurogenesis and prevents cognitive decline. *Behav Brain Res* 317:332-339.
- Ma DK, Ming GL, Song H. 2005. Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 15:514-520.
- Ma SY, Roytta M, Rinne JO, Collan Y, Rinne UK. 1997. Correlation between neuromorphometry in the substantia nigra and clinical features in Parkinson's disease using disector counts. *J Neurol Sci* 151:83-87.

- Macas J, Nern C, Plate KH, Momma S. 2006. Increased generation of neuronal progenitors after ischemic injury in the aged adult human forebrain. *J Neurosci* 26:13114-13119.
- Madeira MH, Boia R, Ambrosio AF, Santiago AR. 2017. Having a Coffee Break: The Impact of Caffeine Consumption on Microglia-Mediated Inflammation in Neurodegenerative Diseases. *Mediators Inflamm* 2017:4761081.
- Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD. 2000. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 405:951-955.
- Mandairon N, Sacquet J, Jourdan F, Didier A. 2006. Long-term fate and distribution of newborn cells in the adult mouse olfactory bulb: Influences of olfactory deprivation. *Neuroscience* 141:443-451.
- Marei HE, Lashen S, Farag A, Althani A, Afifi N, A AE, Rezk S, Pallini R, Casalbore P, Cenciarelli C. 2015. Human olfactory bulb neural stem cells mitigate movement disorders in a rat model of Parkinson's disease. *J Cell Physiol* 230:1614-1629.
- Marras C, Chaudhuri KR. 2016. Nonmotor features of Parkinson's disease subtypes. *Mov Disord* 31:1095-1102.
- Marsden CD. 1990. Parkinson's disease. *Lancet* 335:948-952.
- Marshman E, Booth C, Potten CS. 2002. The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* 24:91-98.
- Martin GR. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78:7634-7638.
- Mason HA, Ito S, Corfas G. 2001. Extracellular signals that regulate the tangential migration of olfactory bulb neuronal precursors: inducers, inhibitors, and repellents. *J Neurosci* 21:7654-7663.
- Matheoud D, Sugiura A, Bellemare-Pelletier A, Laplante A, Rondeau C, Chemali M, Fazel A, Bergeron JJ, Trudeau LE, Burelle Y, Gagnon E, McBride HM, Desjardins M. 2016. Parkinson's Disease-Related Proteins PINK1 and Parkin Repress Mitochondrial Antigen Presentation. *Cell* 166:314-327.
- Mathews EA, Morgenstern NA, Piatti VC, Zhao C, Jessberger S, Schinder AF, Gage FH. 2010. A distinctive layering pattern of mouse dentate granule cells is generated by developmental and adult neurogenesis. *J Comp Neurol* 518:4479-4490.
- Mattson MP. 2006. Neuronal life-and-death signaling, apoptosis, and neurodegenerative disorders. *Antioxid Redox Signal* 8:1997-2006.
- Maucksch C, McGregor AL, Yang M, Gordon RJ, Yang M, Connor B. 2013. IGF-I redirects doublecortin-positive cell migration in the normal adult rat brain. *Neuroscience* 241:106-115.
- Mayo W, Lemaire V, Malaterre J, Rodriguez JJ, Cayre M, Stewart MG, Kharouby M, Rougon G, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN. 2005. Pregnenolone sulfate enhances neurogenesis and PSA-NCAM in young and aged hippocampus. *Neurobiol Aging* 26:103-114.
- McKay R. 1997. Stem cells in the central nervous system. *Science* 276:66-71.
- Mehndiratta M, Garg RK, Pandey S. 2011. Nonmotor symptom complex of Parkinson's disease--an under-recognized entity. *J Assoc Physicians India* 59:302-308, 313.
- Mendez I, Sanchez-Pernaute R, Cooper O, Vinuela A, Ferrari D, Bjorklund L, Dagher A, Isacson O. 2005. Cell type analysis of functional fetal

- dopamine cell suspension transplants in the striatum and substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Brain* 128:1498-1510.
- Mendoza-Torreblanca JG, Martinez-Martinez E, Tapia-Rodriguez M, Ramirez-Hernandez R, Gutierrez-Ospina G. 2008. The rostral migratory stream is a neurogenic niche that predominantly engenders periglomerular cells: in vivo evidence in the adult rat brain. *Neurosci Res* 60:289-299.
- Menezes JR, Smith CM, Nelson KC, Luskin MB. 1995. The division of neuronal progenitor cells during migration in the neonatal mammalian forebrain. *Mol Cell Neurosci* 6:496-508.
- Mercer A, Ronnholm H, Holmberg J, Lundh H, Heidrich J, Zachrisson O, Ossoinak A, Frisen J, Patrone C. 2004. PACAP promotes neural stem cell proliferation in adult mouse brain. *J Neurosci Res* 76:205-215.
- Merkle FT, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A. 2007. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science* 317:381-384.
- Meyer S, Worsdorfer P, Gunther K, Thier M, Edenhofer F. 2015. Derivation of Adult Human Fibroblasts and their Direct Conversion into Expandable Neural Progenitor Cells. *J Vis Exp*:e52831.
- Mich JK, Signer RA, Nakada D, Pineda A, Burgess RJ, Vue TY, Johnson JE, Morrison SJ. 2014. Prospective identification of functionally distinct stem cells and neurosphere-initiating cells in adult mouse forebrain. *Elife* 3:e02669.
- Migaud M, Butruille L, Duittoz A, Pillon D, Batailler M. 2016. Adult neurogenesis and reproductive functions in mammals. *Theriogenology* 86:313-323.
- Miragall F, Kadmon G, Faissner A, Antonicek H, Schachner M. 1990. Retention of J1/tenascin and the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) in the adult olfactory bulb. *J Neurocytol* 19:899-914.
- Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 2008. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* 3:265-278.
- Miura K, Okada Y, Aoi T, Okada A, Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Ohnuki M, Ogawa D, Ikeda E, Okano H, Yamanaka S. 2009. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* 27:743-745.
- Moon HY, Becke A, Berron D, Becker B, Sah N, Benoni G, Janke E, Lubejko ST, Greig NH, Mattison JA, Duzel E, van Praag H. 2016. Running-Induced Systemic Cathepsin B Secretion Is Associated with Memory Function. *Cell Metab* 24:332-340.
- Moreno-Lopez B, Romero-Grimaldi C, Noval JA, Murillo-Carretero M, Matarredona ER, Estrada C. 2004. Nitric oxide is a physiological inhibitor of neurogenesis in the adult mouse subventricular zone and olfactory bulb. *J Neurosci* 24:85-95.
- Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, van der Kooy D. 1994. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13:1071-1082.
- Mulak A, Bonaz B. 2015. Brain-gut-microbiota axis in Parkinson's disease. *World J Gastroenterol* 21:10609-10620.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116:201-211.

- Muramatsu S, Okuno T, Suzuki Y, Nakayama T, Kakiuchi T, Takino N, Iida A, Ono F, Terao K, Inoue N, Nakano I, Kondo Y, Tsukada H. 2009. Multitracer assessment of dopamine function after transplantation of embryonic stem cell-derived neural stem cells in a primate model of Parkinson's disease. *Synapse* 63:541-548.
- Murase S, Horwitz AF. 2002. Deleted in colorectal carcinoma and differentially expressed integrins mediate the directional migration of neural precursors in the rostral migratory stream. *J Neurosci* 22:3568-3579.
- Murray P, Edgar D. 2001. The regulation of embryonic stem cell differentiation by leukaemia inhibitory factor (LIF). *Differentiation* 68:227-234.
- Nagatsu T, Sawada M. 2006. Molecular mechanism of the relation of monoamine oxidase B and its inhibitors to Parkinson's disease: possible implications of glial cells. *J Neural Transm Suppl*:53-65.
- Najbauer J, Leon M. 1995. Olfactory experience modulated apoptosis in the developing olfactory bulb. *Brain Res* 674:245-251.
- Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochizuki Y, Takizawa N, Yamanaka S. 2008. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26:101-106.
- Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M. 2002. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 110:429-441.
- Namba T, Mochizuki H, Onodera M, Mizuno Y, Namiki H, Seki T. 2005. The fate of neural progenitor cells expressing astrocytic and radial glial markers in the postnatal rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 22:1928-1941.
- Nandhagopal R, McKeown MJ, Stoessl AJ. 2008. Functional imaging in Parkinson disease. *Neurology* 70:1478-1488.
- Nandoe Tewarie RS, Hurtado A, Bartels RH, Grotenhuis A, Oudega M. 2009. Stem cell-based therapies for spinal cord injury. *J Spinal Cord Med* 32:105-114.
- Nguyen L, Malgrange B, Breuskin I, Bettendorff L, Moonen G, Belachew S, Rigo JM. 2003. Autocrine/paracrine activation of the GABA(A) receptor inhibits the proliferation of neurogenic polysialylated neural cell adhesion molecule-positive (PSA-NCAM+) precursor cells from postnatal striatum. *J Neurosci* 23:3278-3294.
- 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. *J Neurobiol* 39:569-578.
- Nottebohm F. 1989. From bird song to neurogenesis. *Sci Am* 260:74-79.
- Ocbina PJ, Dizon ML, Shin L, Szele FG. 2006. Doublecortin is necessary for the migration of adult subventricular zone cells from neurospheres. *Mol Cell Neurosci* 33:126-135.
- Oertel WH, Deuschl G, Poewe W, Bartsch T, Bösch S. 2011. Parkinson-Syndrom und andere Bewegungsstörungen: Thieme.
- Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, Hong H, Nakagawa M, Tanabe K, Tezuka K, Shibata T, Kunisada T, Takahashi M, Takahashi J, Saji H, Yamanaka S. 2011. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 8:409-412.

- Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. 2008. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322:949-953.
- Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, Stoessl AJ, Sossi V, Brin MF, Shannon KM, Nauert GM, Perl DP, Godbold J, Freeman TB. 2003. A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 54:403-414.
- Olanow CW, Gracies JM, Goetz CG, Stoessl AJ, Freeman T, Kordower JH, Godbold J, Obeso JA. 2009a. Clinical pattern and risk factors for dyskinesias following fetal nigral transplantation in Parkinson's disease: a double blind video-based analysis. *Mov Disord* 24:336-343.
- Olanow CW, Stern MB, Sethi K. 2009b. The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease (2009). *Neurology* 72:S1-136.
- Ourednik V, Ourednik J, Park KI, Teng YD, Aboody KA, Auguste KI, Taylor RM, Tate BA, Snyder EY. 2000. Neural stem cells are uniquely suited for cell replacement and gene therapy in the CNS. *Novartis Found Symp* 231:242-262; discussion 262-249, 302-246.
- Pagano SF, Impagnatiello F, Girelli M, Cova L, Grioni E, Onofri M, Cavallaro M, Etteri S, Vitello F, Giombini S, Solero CL, Parati EA. 2000. Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb. *Stem Cells* 18:295-300.
- 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. *J Neurosci* 19:8487-8497.
- Palmer TD, Ray J, Gage FH. 1995. FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci* 6:474-486.
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. 2000. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 425:479-494.
- Pappolla MA. 1986. Lewy bodies of Parkinson's disease. Immune electron microscopic demonstration of neurofilament antigens in constituent filaments. *Arch Pathol Lab Med* 110:1160-1163.
- Paredes MF, James D, Gil-Perotin S, Kim H, Cotter JA, Ng C, Sandoval K, Rowitch DH, Xu D, McQuillen PS, Garcia-Verdugo JM, Huang EJ, Alvarez-Buylla A. 2016. Extensive migration of young neurons into the infant human frontal lobe. *Science* 354.
- Parent JM, Valentin VV, Lowenstein DH. 2002. Prolonged seizures increase proliferating neuroblasts in the adult rat subventricular zone-olfactory bulb pathway. *J Neurosci* 22:3174-3188.
- 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. *J Neurosci* 17:3727-3738.
- Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch MW, Cowan C, Hochedlinger K, Daley GQ. 2008a. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134:877-886.
- Park IH, Lerou PH, Zhao R, Huo H, Daley GQ. 2008b. Generation of human-induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 3:1180-1186.
- Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ. 2008c. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451:141-146.

- Parkinson J. 1817. An essay on the shaking palsy. Whittingham and Rowland for Sherwood, Needly and Jones, London.
- Parmar M, Li M. 2007. Early specification of dopaminergic phenotype during ES cell differentiation. *BMC Dev Biol* 7:86.
- Parrish-Aungst S, Shipley MT, Erdelyi F, Szabo G, Puche AC. 2007. Quantitative analysis of neuronal diversity in the mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol* 501:825-836.
- Pereira M, Pfisterer U, Rylander D, Torper O, Lau S, Lundblad M, Grealish S, Parmar M. 2014. Highly efficient generation of induced neurons from human fibroblasts that survive transplantation into the adult rat brain. *Sci Rep* 4:6330.
- Peretto P, Merighi A, Fasolo A, Bonfanti L. 1997. Glial tubes in the rostral migratory stream of the adult rat. *Brain Res Bull* 42:9-21.
- Perlow MJ, Freed WJ, Hoffer BJ, Seiger A, Olson L, Wyatt RJ. 1979. Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science* 204:643-647.
- Peschanski M, Defer G, N'Guyen JP, Ricolfi F, Monfort JC, Remy P, Geny C, Samson Y, Hantraye P, Jeny R, et al. 1994. Bilateral motor improvement and alteration of L-dopa effect in two patients with Parkinson's disease following intrastriatal transplantation of foetal ventral mesencephalon. *Brain* 117 (Pt 3):487-499.
- Petreanu L, Alvarez-Buylla A. 2002. Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci* 22:6106-6113.
- Pfisterer U, Kirkeby A, Torper O, Wood J, Nelander J, Dufour A, Bjorklund A, Lindvall O, Jakobsson J, Parmar M. 2011. Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:10343-10348.
- Piccini P, Brooks DJ, Bjorklund A, Gunn RN, Grasby PM, Rimoldi O, Brundin P, Hagell P, Rehncrona S, Widner H, Lindvall O. 1999. Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nature neuroscience* 2:1137-1140.
- Pienaar IS, Chinnery PF. 2013. Existing and emerging mitochondrial-targeting therapies for altering Parkinson's disease severity and progression. *Pharmacol Ther* 137:1-21.
- Pincus DW, Keyoung HM, Harrison-Restelli C, Goodman RR, Fraser RA, Edgar M, Sakakibara S, Okano H, Nedergaard M, Goldman SA. 1998. Fibroblast growth factor-2/brain-derived neurotrophic factor-associated maturation of new neurons generated from adult human subependymal cells. *Ann Neurol* 43:576-585.
- Platel JC, Dave KA, Bordey A. 2008. Control of neuroblast production and migration by converging GABA and glutamate signals in the postnatal forebrain. *J Physiol* 586:3739-3743.
- Poeck K, Hacke W. 2001. *Neurologie*: Springer.
- Pomeroy SL, LaMantia AS, Purves D. 1990. Postnatal construction of neural circuitry in the mouse olfactory bulb. *J Neurosci* 10:1952-1966.
- Ponsen MM, Stoffers D, Booij J, van Eck-Smit BL, Wolters E, Berendse HW. 2004. Idiopathic hyposmia as a preclinical sign of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 56:173-181.
- Pont-Sunyer C, Hotter A, Gaig C, Seppi K, Compta Y, Katzenschlager R, Mas N, Hofeneder D, Brucke T, Bayes A, Wenzel K, Infante J, Zach H, Pirker

- W, Posada IJ, Alvarez R, Ispierto L, De Fabregues O, Callen A, Palasi A, Aguilar M, Marti MJ, Valdeoriola F, Salamero M, Poewe W, Tolosa E. 2015. The onset of nonmotor symptoms in Parkinson's disease (the ONSET PD study). *Mov Disord* 30:229-237.
- Ponti G, Obernier K, Alvarez-Buylla A. 2013. Lineage progression from stem cells to new neurons in the adult brain ventricular-subventricular zone. *Cell Cycle* 12:1649-1650.
- Portillo W, Unda N, Camacho FJ, Sanchez M, Corona R, Arzate DM, Diaz NF, Paredes RG. 2012. Sexual activity increases the number of newborn cells in the accessory olfactory bulb of male rats. *Front Neuroanat* 6:25.
- Postuma RB, Berg D. 2016. Advances in markers of prodromal Parkinson disease. *Nat Rev Neurol* 12:622-634.
- Postuma RB, Pelletier A, Berg D, Gagnon JF, Escudier F, Montplaisir J. 2016. Screening for prodromal Parkinson's disease in the general community: a sleep-based approach. *Sleep Med* 21:101-105.
- Potten CS, Loeffler M. 1990. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110:1001-1020.
- Power JH, Barnes OL, Chegini F. 2017. Lewy Bodies and the Mechanisms of Neuronal Cell Death in Parkinson's Disease and Dementia with Lewy Bodies. *Brain Pathol* 27:3-12.
- Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, Priyadarshi SS. 2001. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. *Environ Res* 86:122-127.
- Qian X, Goderie SK, Shen Q, Stern JH, Temple S. 1998. Intrinsic programs of patterned cell lineages in isolated vertebrate CNS ventricular zone cells. *Development* 125:3143-3152.
- Quandt SA, Walker FO, Talton JW, Summers P, Chen H, McLeod DK, Arcury TA. 2016. Olfactory Function in Latino Farmworkers: Subclinical Neurological Effects of Pesticide Exposure in a Vulnerable Population. *J Occup Environ Med* 58:248-253.
- Quinones-Hinojosa A, Sanai N, Soriano-Navarro M, Gonzalez-Perez O, Mirzadeh Z, Gil-Perotin S, Romero-Rodriguez R, Berger MS, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 2006. Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J Comp Neurol* 494:415-434.
- Rakic P. 1985a. DNA synthesis and cell division in the adult primate brain. *Ann N Y Acad Sci* 457:193-211.
- Rakic P. 1985b. Limits of neurogenesis in primates. *Science* 227:1054-1056.
- Rakic P. 2002. Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. *Nat Rev Neurosci* 3:65-71.
- Rakic P, Sidman RL. 1969. Telencephalic origin of pulvinar neurons in the fetal human brain. *Z Anat Entwicklungsgesch* 129:53-82.
- Ramirez-Castillejo C, Sanchez-Sanchez F, Andreu-Agullo C, Ferron SR, Aroca-Aguilar JD, Sanchez P, Mira H, Escribano J, Farinas I. 2006. Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nature neuroscience* 9:331-339.
- Rascol O, Lozano A, Stern M, Poewe W. 2011. Milestones in Parkinson's disease therapeutics. *Mov Disord* 26:1072-1082.

- Ravina B, Camicioli R, Como PG, Marsh L, Jankovic J, Weintraub D, Elm J. 2007. The impact of depressive symptoms in early Parkinson disease. *Neurology* 69:342-347.
- Raya A, Rodriguez-Piza I, Guenechea G, Vassena R, Navarro S, Barrero MJ, Consiglio A, Castella M, Rio P, Sleep E, Gonzalez F, Tiscornia G, Garreta E, Aasen T, Veiga A, Verma IM, Surralles J, Bueren J, Izpisua Belmonte JC. 2009. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 460:53-59.
- Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S. 1992. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* 12:4565-4574.
- Reynolds BA, Weiss S. 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-1710.
- Ribeiro Xavier AL, Kress BT, Goldman SA, Lacerda de Menezes JR, Nedergaard M. 2015. A Distinct Population of Microglia Supports Adult Neurogenesis in the Subventricular Zone. *J Neurosci* 35:11848-11861.
- Richards LJ, Kilpatrick TJ, Bartlett PF. 1992. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:8591-8595.
- Rochefort C, Gheusi G, Vincent JD, Lledo PM. 2002. Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *J Neurosci* 22:2679-2689.
- Romanko MJ, Rola R, Fike JR, Szele FG, Dizon ML, Felling RJ, Brazel CY, Levison SW. 2004. Roles of the mammalian subventricular zone in cell replacement after brain injury. *Prog Neurobiol* 74:77-99.
- 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. *J Comp Neurol* 351:51-61.
- Roybon L, Deierborg T, Brundin P, Li JY. 2009. Involvement of Ngn2, Tbr and NeuroD proteins during postnatal olfactory bulb neurogenesis. *Eur J Neurosci* 29:232-243.
- Saghatelian A, de Chevigny A, Schachner M, Lledo PM. 2004. Tenascin-R mediates activity-dependent recruitment of neuroblasts in the adult mouse forebrain. *Nature neuroscience* 7:347-356.
- Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Janssen S, Shastri GG, Ilhan ZE, Challis C, Schretter CE, Rocha S, Gradinaru V, Chesselet MF, Keshavarzian A, Shannon KM, Krajmalnik-Brown R, Wittung-Stafshede P, Knight R, Mazmanian SK. 2016. Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell* 167:1469-1480 e1412.
- Sanai N, Nguyen T, Ihrie RA, Mirzadeh Z, Tsai HH, Wong M, Gupta N, Berger MS, Huang E, Garcia-Verdugo JM, Rowitch DH, Alvarez-Buylla A. 2011. Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature* 478:382-386.
- Sanai N, Tramontin AD, Quinones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Manuel-Garcia Verdugo J, Berger MS, Alvarez-Buylla A. 2004. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427:740-744.

- Sarnat HB, Nochlin D, Born DE. 1998. Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in early human fetal nervous system. *Brain Dev* 20:88-94.
- Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH. 2004. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 10:55-63.
- Savica R, Grossardt BR, Bower JH, Ahlskog JE, Rocca WA. 2016. Time Trends in the Incidence of Parkinson Disease. *JAMA Neurol* 73:981-989.
- Savitt JM, Dawson VL, Dawson TM. 2006. Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine. *J Clin Invest* 116:1744-1754.
- Schapira AH. 2009. Etiology and pathogenesis of Parkinson disease. *Neurol Clin* 27:583-603, v.
- Scheperjans F. 2016. Gut microbiota, 1013 new pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Curr Opin Neurol* 29:773-780.
- Scheperjans F, Aho V, Pereira PA, Koskinen K, Paulin L, Pekkonen E, Haapaniemi E, Kaakkola S, Eerola-Rautio J, Pohja M, Kinnunen E, Murros K, Auvinen P. 2015. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord* 30:350-358.
- Scherfler C, Schwarz J, Antonini A, Grosset D, Valldeoriola F, Marek K, Oertel W, Tolosa E, Lees AJ, Poewe W. 2007. Role of DAT-SPECT in the diagnostic work up of parkinsonism. *Mov Disord* 22:1229-1238.
- Schiebler TH. 2005. *Anatomie*: Springer.
- Schlett K. 2006. Glutamate as a modulator of embryonic and adult neurogenesis. *Curr Top Med Chem* 6:949-960.
- Schmechel DE, Rakic P. 1979. A Golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: morphogenesis and transformation into astrocytes. *Anat Embryol (Berl)* 156:115-152.
- Schulz JB, Dichgans J. 1999. Molecular pathogenesis of movement disorders: are protein aggregates a common link in neuronal degeneration? *Curr Opin Neurol* 12:433-439.
- 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. *J Neurosci* 13:2351-2358.
- Semchuk KM, Love EJ, Lee RG. 1992. Parkinson's disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals. *Neurology* 42:1328-1335.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. 2001. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 21:7153-7160.
- Shannon KM, Goetz CG, Carroll VS, Tanner CM, Klawans HL. 1987. Amantadine and motor fluctuations in chronic Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol* 10:522-526.
- Shen Q, Wang Y, Kokovay E, Lin G, Chuang SM, Goderie SK, Roysam B, Temple S. 2008. Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell* 3:289-300.
- Shepherd GM, Chen WR, Willhite D, Migliore M, Greer CA. 2007. The olfactory granule cell: from classical enigma to central role in olfactory processing. *Brain Res Rev* 55:373-382.

- Shihabuddin LS, Ray J, Gage FH. 1997. FGF-2 is sufficient to isolate progenitors found in the adult mammalian spinal cord. *Exp Neurol* 148:577-586.
- Shimada H, Yoshimura N, Tsuji A, Kunisada T. 2009. Differentiation of dopaminergic neurons from human embryonic stem cells: modulation of differentiation by FGF-20. *J Biosci Bioeng* 107:447-454.
- 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.
- Sibbe M, Kulik A. 2016. GABAergic Regulation of Adult Hippocampal Neurogenesis. *Mol Neurobiol*.
- Singh VK, Kalsan M, Kumar N, Saini A, Chandra R. 2015. Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Front Cell Dev Biol* 3:2.
- Skogar O, Fall PA, Hallgren G, Bringer B, Carlsson M, Lennartsson U, Sandbjork H, Tornhage CJ, Lokk J. 2012. Parkinson's disease patients' subjective descriptions of characteristics of chronic pain, sleeping patterns and health-related quality of life. *Neuropsychiatr Dis Treat* 8:435-442.
- Snapyan M, Lemasson M, Brill MS, Blais M, Massouh M, Ninkovic J, Gravel C, Berthod F, Gotz M, Barker PA, Parent A, Saghatelian A. 2009. Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci* 29:4172-4188.
- Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, Hargus G, Blak A, Cooper O, Mitalipova M, Isacson O, Jaenisch R. 2009. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 136:964-977.
- Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 2005. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci* 25:10-18.
- Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. 1998. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:6469-6473.
- Spitalieri P, Talarico RV, Botta A, Murdocca M, D'Apice MR, Orlandi A, Giardina E, Santoro M, Brancati F, Novelli G, Sangiuolo F. 2015. Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells from Extraembryonic Tissues of Fetuses Affected by Monogenic Diseases. *Cell Reprogram* 17:275-287.
- Stahn AC, Gunga HC, Kohlberg E, Gallinat J, Dinges DF, Kuhn S. 2019. Brain Changes in Response to Long Antarctic Expeditions. *N Engl J Med* 381:2273-2275.
- Storch A, Ebersbach G, Fuchs G, Jost WH, Odin P, Reifschneider G, Bauer M. 2008. [Depression in Parkinson's disease. Part 1: epidemiology, signs and symptoms, pathophysiology and diagnosis]. *Fortschr Neurol Psychiatr* 76:715-724.
- Sturrock RR, Smart IH. 1980. A morphological study of the mouse subependymal layer from embryonic life to old age. *J Anat* 130:391-415.
- Sun N, Panetta NJ, Gupta DM, Wilson KD, Lee A, Jia F, Hu S, Cherry AM, Robbins RC, Longaker MT, Wu JC. 2009. Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106:15720-15725.
- Sundberg M, Isacson O. 2014. Advances in stem-cell--generated transplantation therapy for Parkinson's disease. *Expert Opin Biol Ther* 14:437-453.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861-872.
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676.
- Tanaka A, Watanabe Y, Kato H, Araki T. 2007. Immunohistochemical changes related to ageing in the mouse hippocampus and subventricular zone. *Mech Ageing Dev* 128:303-310.
- Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E. 1999. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci* 19:5792-5801.
- Tanner CM, Aston DA. 2000. Epidemiology of Parkinson's disease and akinetic syndromes. *Curr Opin Neurol* 13:427-430.
- Tatton WG, Ju WY, Holland DP, Tai C, Kwan M. 1994. (-)-Deprenyl reduces PC12 cell apoptosis by inducing new protein synthesis. *J Neurochem* 63:1572-1575.
- Taupin P, Gage FH. 2002. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res* 69:745-749.
- Taylor KS, Cook JA, Counsell CE. 2007. Heterogeneity in male to female risk for Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78:905-906.
- Temple S, Alvarez-Buylla A. 1999. Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 9:135-141.
- Thier M, Worsdorfer P, Lakes YB, Gorris R, Herms S, Opitz T, Seiferling D, Quandel T, Hoffmann P, Nothen MM, Brustle O, Edenhofer F. 2012. Direct conversion of fibroblasts into stably expandable neural stem cells. *Cell Stem Cell* 10:473-479.
- Thomas LB, Gates MA, Steindler DA. 1996. Young neurons from the adult subependymal zone proliferate and migrate along an astrocyte, extracellular matrix-rich pathway. *Glia* 17:1-14.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147.
- Tomasiewicz H, Ono K, Yee D, Thompson C, Goridis C, Rutishauser U, Magnuson T. 1993. Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system. *Neuron* 11:1163-1174.
- Torroglosa A, Murillo-Carretero M, Romero-Grimaldi C, Matarredona ER, Campos-Caro A, Estrada C. 2007. Nitric oxide decreases subventricular zone stem cell proliferation by inhibition of epidermal growth factor receptor and phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway. *Stem Cells* 25:88-97.
- Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, van der Kooy D. 2000. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 287:2032-2036.

- Trounson A, Shepard KA, DeWitt ND. 2012. Human disease modeling with induced pluripotent stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 22:509-516.
- Tsai SY, Clavel C, Kim S, Ang YS, Grisanti L, Lee DF, Kelley K, Rendl M. 2010. Oct4 and klf4 reprogram dermal papilla cells into induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 28:221-228.
- Uhl GR, Walther D, Mash D, Faucheux B, Javoy-Agid F. 1994. Dopamine transporter messenger RNA in Parkinson's disease and control substantia nigra neurons. *Ann Neurol* 35:494-498.
- Ulusoy A, Phillips RJ, Helwig M, Klinkenberg M, Powley TL, Di Monte DA. 2016. Brain-to-stomach transfer of alpha-synuclein via vagal preganglionic projections. *Acta Neuropathol*.
- Unger MM, Spiegel J, Dillmann KU, Grundmann D, Philippeit H, Burmann J, Fassbender K, Schwierz A, Schafer KH. 2016. Short chain fatty acids and gut microbiota differ between patients with Parkinson's disease and age-matched controls. *Parkinsonism Relat Disord* 32:66-72.
- Urban NN, Sakmann B. 2002. Reciprocal intraglomerular excitation and intra- and interglomerular lateral inhibition between mouse olfactory bulb mitral cells. *J Physiol* 542:355-367.
- Utikal J, Maherali N, Kulalert W, Hochedlinger K. 2009. Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci* 122:3502-3510.
- van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. 1999a. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:13427-13431.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH. 1999b. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature neuroscience* 2:266-270.
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. 2002. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030-1034.
- van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH. 2005. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 25:8680-8685.
- Verbaan D, Marinus J, Visser M, van Rooden SM, Stiggelbout AM, van Hilten JJ. 2007. Patient-reported autonomic symptoms in Parkinson disease. *Neurology* 69:333-341.
- Verhagen Metman L, Del Dotto P, van den Munckhof P, Fang J, Mouradian MM, Chase TN. 1998. Amantadine as treatment for dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. *Neurology* 50:1323-1326.
- Vives-Bauza C, Tocilescu M, Devries RL, Alessi DM, Jackson-Lewis V, Przedborski S. 2010. Control of mitochondrial integrity in Parkinson's disease. *Prog Brain Res* 183:99-113.
- Voigt T. 1989. Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. *J Comp Neurol* 289:74-88.
- von Campenhausen S, Bornschein B, Wick R, Botzel K, Sampaio C, Poewe W, Oertel W, Siebert U, Berger K, Dodel R. 2005. Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol* 15:473-490.

- Wang M, Lu C, Roisen F. 2012. Adult human olfactory epithelial-derived progenitors: a potential autologous source for cell-based treatment for Parkinson's disease. *Stem Cells Transl Med* 1:492-502.
- Warner-Schmidt JL, Duman RS. 2007. VEGF is an essential mediator of the neurogenic and behavioral actions of antidepressants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:4647-4652.
- Warner-Schmidt JL, Duman RS. 2008. VEGF as a potential target for therapeutic intervention in depression. *Curr Opin Pharmacol* 8:14-19.
- Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, Daley GQ, Brack AS, Collins JJ, Cowan C, Schlaeger TM, Rossi DJ. 2010. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7:618-630.
- Wasner G, Deuschl G. 2012. Pains in Parkinson disease--many syndromes under one umbrella. *Nat Rev Neurol* 8:284-294.
- Watt FM, Hogan BL. 2000. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 287:1427-1430.
- Weickert CS, Webster MJ, Colvin SM, Herman MM, Hyde TM, Weinberger DR, Kleinman JE. 2000. Localization of epidermal growth factor receptors and putative neuroblasts in human subependymal zone. *J Comp Neurol* 423:359-372.
- Weiner WJ. 2006. Levodopa--toxic or neuroprotective? *Nat Clin Pract Neurol* 2:518-519.
- Weintraub D, Comella CL, Horn S. 2008. Parkinson's disease--Part 1: Pathophysiology, symptoms, burden, diagnosis, and assessment. *Am J Manag Care* 14:S40-48.
- Weiss S, Reynolds BA, Vescovi AL, Morshead C, Craig CG, van der Kooy D. 1996. Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? *Trends Neurosci* 19:387-393.
- Weissman IL. 2000. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100:157-168.
- Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. 2001. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:387-403.
- Wenning GK, Odin P, Morrish P, Rehncrona S, Widner H, Brundin P, Rothwell JC, Brown R, Gustavii B, Hagell P, Jahanshahi M, Sawle G, Bjorklund A, Brooks DJ, Marsden CD, Quinn NP, Lindvall O. 1997. Short- and long-term survival and function of unilateral intrastriatal dopaminergic grafts in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 42:95-107.
- Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, Constantine-Paton M, Isacson O, Jaenisch R. 2008. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:5856-5861.
- Whitman MC, Fan W, Relat L, Rodriguez-Gil DJ, Greer CA. 2009. Blood vessels form a migratory scaffold in the rostral migratory stream. *J Comp Neurol* 516:94-104.

- Whitman MC, Greer CA. 2007. Synaptic integration of adult-generated olfactory bulb granule cells: basal axodendritic centrifugal input precedes apical dendrodendritic local circuits. *J Neurosci* 27:9951-9961.
- Wichterle H, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1997. Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron* 18:779-791.
- Widner H, Tetrad J, Rehncrona S, Snow B, Brundin P, Gustavii B, Bjorklund A, Lindvall O, Langston JW. 1992. Bilateral fetal mesencephalic grafting in two patients with parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *N Engl J Med* 327:1556-1563.
- Winner B, Cooper-Kuhn CM, Aigner R, Winkler J, Kuhn HG. 2002. Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 16:1681-1689.
- Wolters E. 2007. Deep brain stimulation and continuous dopaminergic stimulation in advanced Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 13 Suppl:S18-23.
- Wooten GF, Currie LJ, Bovbjerg VE, Lee JK, Patrie J. 2004. Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75:637-639.
- Xie Y, Meng X, Xiao J, Zhang J, Zhang J. 2016. Cognitive Changes following Bilateral Deep Brain Stimulation of Subthalamic Nucleus in Parkinson's Disease: A Meta-Analysis. *Biomed Res Int* 2016:3596415.
- Xiong R, Siegel D, Ross D. 2013. The activation sequence of cellular protein handling systems after proteasomal inhibition in dopaminergic cells. *Chem Biol Interact* 204:116-124.
- Yan Y, Yang D, Zarnowska ED, Du Z, Werbel B, Valliere C, Pearce RA, Thomson JA, Zhang SC. 2005. Directed differentiation of dopaminergic neuronal subtypes from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 23:781-790.
- Yau SY, Gil-Mohapel J, Christie BR, So KF. 2014. Physical exercise-induced adult neurogenesis: a good strategy to prevent cognitive decline in neurodegenerative diseases? *Biomed Res Int* 2014:403120.
- Yau SY, Lau BW, So KF. 2011. Adult hippocampal neurogenesis: a possible way how physical exercise counteracts stress. *Cell Transplant* 20:99-111.
- Yoo MS, Chun HS, Son JJ, DeGiorgio LA, Kim DJ, Peng C, Son JH. 2003. Oxidative stress regulated genes in nigral dopaminergic neuronal cells: correlation with the known pathology in Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 110:76-84.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin, II, Thomson JA. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318:1917-1920.
- Zhang R, Zhang Z, Wang L, Wang Y, Gousev A, Zhang L, Ho KL, Morshead C, Chopp M. 2004. Activated neural stem cells contribute to stroke-induced neurogenesis and neuroblast migration toward the infarct boundary in adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:441-448.
- Zhang TM, Yu SY, Guo P, Du Y, Hu Y, Piao YS, Zuo LJ, Lian TH, Wang RD, Yu QJ, Jin Z, Zhang W. 2016. Nonmotor symptoms in patients with Parkinson disease: A cross-sectional observational study. *Medicine (Baltimore)* 95:e5400.

- Zhao C, Deng W, Gage FH. 2008. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132:645-660.
- Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y. 2011. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* 474:212-215.
- Ziegler AN, Levison SW, Wood TL. 2015. Insulin and IGF receptor signalling in neural-stem-cell homeostasis. *Nat Rev Endocrinol* 11:161-170.
- Zigova T, Betarbet R, Soteres BJ, Brock S, Bakay RA, Luskin MB. 1996. A comparison of the patterns of migration and the destinations of homotopically transplanted neonatal subventricular zone cells and heterotopically transplanted telencephalic ventricular zone cells. *Dev Biol* 173:459-474.
- Zigova T, Pencea V, Wiegand SJ, Luskin MB. 1998. Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci* 11:234-245.

Anhang

a. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer während des Humanmedizinstudiums in Marburg und des praktischen Jahres in Fulda waren die nachfolgenden Damen und Herren Professoren und Privatdozenten, denen ich an dieser Stelle herzlich danke:

In Marburg:

Aigner, Albert, Aumüller, Arnold, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Baumann, Becker K., Becker S., Berger, Behr, Bien, Bolm, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Del Rey, Depboylu, Dietrich, Donner-Banzhoff, Eberhart, Eilers, Fendrich, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Geks, Gerdes, Glorius, Görg C., Görg K., Gotzen, Gress, Grimm, Grosse, Grundmann, Grzeschik, Gudermann, Hasilik, Hegele, Hertl, Höffken, Hofmann, Höglinger, Hoyer, Jacob, Jaques, Kalinowski, Kaufmann, Kill, Kircher, Klenk, Klose, Köhler, König, Koolman, Krieg, Kroll, Krones, Kühnert, Kuhlmann, Langer, Leonhardt, Lill, Liss, Lohoff, Löffler, Lüers, Maier, Maisch, Mandic, Mandrek, Miko, Mittag, Möller, Moll, Moosdorf, Morin, Mueller, Mutters, Neubauer, Neumann, Neumüller, Nimsky, Oertel, Olbert, Pagenstecher, Plant, Printz, Ramaswamy, Rausch, Renz, Richter, Röhm, Röper, Rolfes, Rosenow, Rothmund, Ruchholtz, Sahmland, Sattler, Schäfer, Schrader, Schlosser, Schmidt, Schneider, Schofer, Schu, Seitz, Sesterhenn, Sekundo, Sommer, Sönnichsen, Steiniger, Stiletto, Tackenberg, Teymoortash, Tebbe, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Waldegger, Weihe, Werner, Westermann, Wiegand, Wündisch, Wulf, Zemlin, Ziring, Zoremba.

In Fulda:

Höffkes, Jaspersen, Neumann-Haefelin, Spätling

b. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Günter Höglinger für die vertrauensvolle Annahme als Doktorandin und die Überlassung des interessanten Promotionsthemas. Ich bedanke mich für seine hilfreiche und freundliche Begleitung, das stetige Interesse an dieser Arbeit und die konstruktive Kritik.

Herrn Dr. Oscar Arias-Carrión möchte ich für die kompetente fachliche Begleitung im Labor und die praktische Anleitung bei der Versuchsdurchführung meinen Dank aussprechen.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei den medizinisch-technischen Assistentinnen der Arbeitsgruppe „Experimentelle Neurologie“, Frau Silke Caspari und Frau Sabine Anfimov, die mir bei allen praktischen Fragen und Problemen im Labor stets mit Rat und Tat zur Seite standen und mich an ihrem umfangreichen Wissen teilhaben ließen.

Allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe „Experimentelle Neurologie“ danke ich für die angenehme, engagierte und freundschaftliche Zusammenarbeit im Labor sowie entspannte Kaffeepausen.

Großer Dank gebührt meinen Eltern Roswitha und Bernd Steiner, die mir trotz aller Mühen und Entbehrungen meinen Traum des Medizinstudiums ermöglicht und mich auf meinem Weg begleitet haben. Für alles, was ihr für mich getan habt, danke ich Euch von ganzem Herzen.

Meinem Bruder Dominik Steiner danke ich für seine Unterstützung, motivierende Gespräche und mentalen Support auch in schwierigen Zeiten.

Last but not least möchte ich mich bei meinem Ehemann Jan Hendrik Rüschoff bedanken, der alle Höhen und Tiefen bei der Erstellung dieser Doktorarbeit mit mir durchlebt hat. Danke für Deine Geduld, Dein stetiges Interesse, Deinen Glauben an mich und die Tatsache, dass Du immer an meiner Seite bist.

c. Publikation

Die Ergebnisse dieser Dissertation waren Teil der folgenden Veröffentlichung in der Fachzeitschrift Scientific Reports aus dem Jahr 2019.

Neuronal precursor cells with dopaminergic commitment in the rostral migratory stream of the mouse

Kerstin Schweyer, Corinna Rüschoff-Steiner, Oscar Arias-Carrión, Wolfgang H. Oertel, Thomas W. Rösler and Günter U. Höglinger

Abstract

Neuroblasts born in the subventricular zone of adult mammals migrate via the rostral migratory stream into the granular cell layer or periglomerular layer of the olfactory bulb to differentiate into interneurons. To analyze if new neurons in the granular cell layer or periglomerular layer have different origins, we inserted a physical barrier into the rostral migratory stream, depleted cell proliferation with cytarabine infusions, labeled newborn cells with bromodeoxyuridine, and sacrificed mice after short-term (0, 2, or 14 days) or long-term (55 or 105 days) intervals. After short-term survival, the subventricular zone and rostral migratory stream rapidly repopulated with bromodeoxyuridine+ cells after cytarabine-induced depletion. Nestin, glial fibrillary acidic protein and the PAX6 were expressed in bromodeoxyuridine+ cells within the rostral migratory stream downstream of the physical barrier. After long-term survival after physical barrier implantation, bromodeoxyuridine+ neurons were significantly reduced in the granular cell layer, but bromodeoxyuridine+ and dopaminergic neurons in the periglomerular layer remained unaffected by the physical barrier. Thus, newborn neurons for the granular cell layer are mainly recruited from neural stem cells located in the subventricular zone, but new neurons for the periglomerular layer with dopaminergic predisposition can rise as well from neuronal stem or precursor cells in the rostral migratory stream.

Sci Rep. 2019 Sep 16;9(1):13359. doi: 10.1038/s41598-019-49920-5.