

Aus dem Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der Ludwig-
Maximilians-Universität München

Leitung: Prof. Dr, Armin Giese

**Rekrutierung von adulten neuronalen Stammzellen aus
zirkumventrikulären Organen nach Gehirnfarkt**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwigs-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Veronika Sanin

Bozen

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Ulrich Schüller

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Rainer Glaß, Priv. Doz. Dr. Siegfried Kösel

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 15.05.2014

Meinen Eltern in Dankbarkeit!

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden publiziert unter:

Sanin V., Heeß C. Kretschmar H., Schüller U.

Recruitment of neural precursor cells from circumventricular organs of
patients with cerebral ischemia.

Neuropathol Appl Neurobiol, August 2013

| | |
|---|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | 5 |
| 1 Einleitung: Neuronale Stammzellen..... | 8 |
| 1.1 Die Entdeckung von adulten neuronalen Stammzellen (NSZ) | 8 |
| 1.2 Bekannte Regionen adulter Neurogenese | 9 |
| 1.3 Funktionen adulter Neurogenese | 10 |
| 1.4 Adulte neuronale Stammzellen..... | 12 |
| 1.5 Neuronale Stammzellen in zirkumventrikulären Organen | 13 |
| 1.6 Die zirkumventrikulären Organe: | 14 |
| 1.6.1 Area postrema..... | 16 |
| 1.6.2 Eminentia mediana | 17 |
| 1.6.3 Epiphyse | 18 |
| 1.6.4 Neurohypophyse | 19 |
| 1.6.5 Organum vasculosum der Lamina terminalis (OVLT) | 19 |
| 1.6.6 Organum subcommissurale | 20 |
| 1.6.7 Organum subfornicale..... | 20 |
| 1.7 Pathologie und Neurogenese nach Gehirnfarkt..... | 21 |
| 2 Erläuterung der Fragestellung | 23 |
| 3 Methodik: | 24 |
| 3.1 Patientenkollektiv | 24 |
| 3.2 Angewendete Schnittführung bei der Sektion | 25 |
| 3.3 Asservierung von Gewebe | 26 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.4 | Immunhistochemie | 26 |
| 3.4.1 | Allgemeines..... | 26 |
| 3.4.2 | Beschreibung der verwendeten Primärantikörper | 27 |
| 3.4.3 | Erläuterung des verwendeten Verfahrens der Einzelfärbung mittels 3,3'- Diaminobenzidin (DAB)- Markierung | 31 |
| 3.4.4 | Erläuterung des verwendeten Verfahrens der Doppelfärbung mittels Fluoreszenzmarkierung | 34 |
| 3.5 | Quantifikation und Statistik..... | 36 |
| 4 | Ergebnisse: Vergleich Gesund versus Infarkt | 37 |
| 4.1 | Einzelfärbungen | 37 |
| 4.1.1 | Area postrema..... | 38 |
| 4.1.2 | Eminentia mediana | 44 |
| 4.1.3 | Epiphyse | 51 |
| 4.1.4 | Neurohypophyse | 57 |
| 4.2 | Doppelfärbungen..... | 64 |
| 4.3 | Area postrema..... | 65 |
| 4.3.1 | Eminentia mediana | 66 |
| 4.3.2 | Epiphyse | 67 |
| 4.3.3 | Neurohypophyse | 68 |
| 4.4 | Statistische Auswertung | 69 |
| 5 | Diskussion | 73 |
| 5.1 | Diskussion der Methoden..... | 73 |

| | | |
|----------|-----------------------------------|-----------|
| 5.2 | Diskussion der Ergebnisse..... | 74 |
| 5.3 | Zusammenfassung..... | 80 |
| 6 | Anhang..... | 81 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 85 |
| 8 | Danksagung..... | 91 |

1 Einleitung: Neuronale Stammzellen

1.1 Die Entdeckung von adulten neuronalen Stammzellen (NSZ)

Lange Zeit nahm man an, dass im adulten Gehirn keine neuen Neuronen entstehen können und somit Neuronen nicht kontinuierlich ersetzt werden. Das menschliche Gehirn galt als nicht regeneratives Organ.

Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben jedoch gezeigt, dass auch im adulten Gehirn Stammzellen existieren, die proliferieren und sich in Neuronen und Gliazellen differenzieren können. Die Entdeckung der adulten Neurogenese, die Neubildung von Nervenzellen im erwachsenen Gehirn, überholt ein jahrhunderte - altes Dogma und zeigt neue Perspektiven der zerebralen Plastizität auf.

Die Erstbeschreibung potentieller Stammzellen erfolgte 1965 durch Joseph Altman, indem er mit radioaktiv markiertem Thymidin sich teilende Zellen im Gyrus dentatus des Hippocampus nachwies.[1] Diese Entdeckung widerlegte alle bis zu diesem Zeitpunkt bekannten Auffassungen. Demnach ist das menschliche Gehirn keine rein statische Struktur. Es generiert lebenslang neue Neuronen und Gliazellen. [1-4]

15 Jahre später wurde Altmans Pionierarbeit von Kaplan bestätigt. Mittels neuer elektronenmikroskopischer Techniken konnte Kaplan die radioaktiv markierten Zellen durch ultrastrukturell-morphologische Eigenschaften als Neuronen identifizieren. [5]

Die funktionelle Integration von neugebildeten Neuronen ins zentrale Nervensystem (ZNS) wurde erstmals von Paton und Nottebohm an Singvögeln gezeigt. [6]

Eine weitere fundamentale Veränderung im Hinblick auf die Regenerationsfähigkeit des Gehirns erfolgte, als die adulte Neurogenese in den frühen 1990er Jahren durch die Einführung der Bromdesoxyuridin (BrdU)-Kennzeichnung wiederentdeckt wurde. Damit konnten markierte Zellen immunhistochemisch typisiert werden. Mittels BrdU-Injektionen gelang Eriksson et al. 1998 der Nachweis von proliferierenden Zellen im adulten humanen Hippocampus [7]. Seither gilt die immunhistochemische Detektion von BrdU- positiven Zellen als Nachweis für zelluläre Proliferation.

Zahlreiche Studien konnten im Laufe der kommenden Jahre mehrere proliferative Zonen im ZNS identifizieren. Amygdala [8], Neocortex [9, 10] oder Striatum [11] werden als mögliche Stammzellnischen diskutiert. Dennoch handelt es sich bei der subventrikulären Zone (SVZ) des lateralen Ventrikels und der Subgranularzone (SGZ) des Gyrus dentatus im Hippocampus um die zwei prominentesten und meist erforschten germinalen Zonen. [12]

Die Erforschung und Entdeckung von adulten neuronalen Stammzellen im humanen zentralen Nervensystem, veränderte die bisherige Auffassung über zerebrale Plastizität und bildet heute die Grundlage für die Erforschung neuer regenerativer Therapieverfahren.

1.2 Bekannte Regionen adulter Neurogenese

Die Selbsterneuerung von Stammzellen oder die Differenzierung von Vorläuferzellen wird durch eine charakteristische Mikroumgebung oder Nische reguliert. Diese Nischen zeichnen sich durch spezielle lösliche Faktoren, membrangebundene Proteine und extrazelluläre Matrix aus. [13] Stamm- oder Vorläuferzellen besitzen zwar das Potential, sich in Neurone oder Gliazellen zu differenzieren, zur Umsetzung bedarf es allerdings Signale aus der zellulären Umgebung. Stammzellnischen beherbergen Vorläuferzellen, steuern ihre Differenzierung und werden durch zahlreiche Triggerfaktoren beeinflusst.

Heterotope Transplantationsexperimente implizieren, dass die neurogene Aktivität von adulten Stammzellen weitgehend von ihrer extrazellulären Umgebung abhängt. [14] Im adulten humanen Gehirn wurden insbesondere zwei Nischen erforscht und als neurogene Stammzellnischen identifiziert: die Subventrikularzone des lateralen Ventrikels (SVZ) und die Subgranularzone des Gyrus dentatus im Hippocampus (SGZ). In diesen zwei neurogenen Regionen werden von lokalen Stammzellen physiologischerweise neue Neuronen gebildet.

Die neu generierten Neuroblasten wandern von der SVZ des lateralen Ventrikels oder der SGZ des Gyrus dentatus über die rostrale Migrationszone (rostral migratory Stream, RMS) in den Bulbus olfactorius, wo sie als Interneurone das olfaktorische Netzwerk komplettieren. [15, 16] Zudem fügen sich Neurone aus der SGZ in die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus im Hippocampus ein und tragen zum Erhalt von Gedächtnisleistung und Lernfähigkeit bei. [2, 16]

Durch endogene Neurogenese werden bestimmte Zellgruppen zeitlebens ersetzt. Dadurch wird die Aufrechterhaltung eines funktionell gesunden Gehirns gewährleistet.

1.3 Funktionen adulter Neurogenese

Adulte Neurogenese ist ein lebenslanger Prozess, bei dem funktionelle Neuronen aus adulten Vorläuferzellen generiert werden.[17]

Es handelt sich um einen mehrstufigen Prozess, der sich in Proliferation, Differenzierung, Migration, Bestimmung des Zielortes und Synapsenausbildung gliedert und mit der Formation eines postmitotischen, funktionell integrierten Neurons endet. [18]

Adulte Neurogenese beschreibt einen dynamischen Prozess, der durch physiologische, pathologische und pharmakologische Stimuli gesteuert wird. So wird z. B. in der SVZ die Zellproliferation durch physische Aktivität gesteigert. [19] Im Kontrast dazu lässt sich im Alter eine deutliche Reduzierung neuronaler Teilungsaktivität nachweisen. [20]

Neuronale Stammzellen befinden sich in spezialisierten germinalen Zellschichten, wo sie mit anderen Zelltypen über zytochemische Signalwege interagieren und somit die Neuro- und Gliogenese steuern. Klassische Entwicklungssignale wie Notch, BMPs (Bone Morphogenetic Protein), Eph/ephrins, Noggin und Shh (Sonic hedgehog) scheinen eine wesentliche Rolle in der Aufrechterhaltung neurogener Nischen zu spielen. [13] Neurogene Nischen werden von einem dichten Gefäßnetz durchzogen, wodurch Signale wie Zytokine oder Wachstumsfaktoren aus dem Blutstrom die Vorläuferzellen erreichen können.

Die gute Vaskularisierung ermöglicht, beispielsweise nach einem Hirninfarkt, die Migration von neugebildeten Neuronen in das Striatum. [21] Zudem formen Astrozyten einen strukturellen Teil der neurogenen Nischen und exprimieren Moleküle, die wesentlich für die adulte Neurogenese in vivo sind. [22]

Bisher beschränkte sich die Erforschung von adulter Neurogenese auf die zwei bekannten Vorderhirnregionen: die SVZ im lateralen Ventrikel und die SGZ im Hippocampus. In anderen Hirnregionen erscheint sie unter physiologischen Bedingungen limitiert, kann aber durch Pathologien, wie beispielsweise ein Infarktgeschehen, induziert werden. [3] Fokale oder globale Ischämien gelten als potente Induktoren der Neuro- und Gliogenese. [23]

Jede einzelne Phase der Neurogenese kann über externe und interne Stimuli reguliert werden. Jeder Stimulus verfolgt ein spezielles Ziel und wird wiederum von anderen Faktoren beeinflusst. Das komplexe Wechselspiel verschiedenster Faktoren beeinflusst die neurogene Aktivität und letztendlich das Ausmaß adulter Neurogenese. Durch weitere spezielle molekulare Studien ließe sich die funktionelle Neurogenese entschlüsseln und möglicherweise für regenerative Therapieverfahren nutzbar machen.

1.4 Adulte neuronale Stammzellen

Eine Stammzelle ist noch nicht darauf festgelegt, sich in einen spezifischen Zelltyp mit genau definierter Funktion zu entwickeln. Stammzellen teilen sich kontinuierlich und produzieren dabei entweder zwei neue Stammzellen (symmetrische Teilung) oder aber eine Tochterzelle (asymmetrische Teilung), die sich in verschiedenste Zelltypen differenzieren kann. Eine neuronale Stammzelle wird als multipotent bezeichnet, da aus einer einzigen Stammzelle viele verschiedene Zellpopulationen hervorgehen können.

Stammzellen definieren sich funktionell über zwei spezifische Charakteristika: die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und die Fähigkeit, sich zu neuen spezialisierten Zelltypen zu differenzieren.

Neuronale Stammzellen sind multipotent und bilden das Fundament menschlicher Gehirnentwicklung. Multipotent bedeutet in diesem Zusammenhang die Fähigkeit, Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten hervorbringen zu können. Eine Vorläuferzelle bezeichnet jenen Zelltyp, der aus einer multipotenten Stammzelle hervorgegangen ist. Vorläuferzellen sind unipotent, aber dennoch teilungsfähig und werden häufig als Blasten bezeichnet. Durch zahlreiche Studien konnte gezeigt werden, dass auch postnatal neuronale Stammzellen in speziellen Nischen persistieren und das Potential zur Selbsterneuerung beibehalten. Radiale Gliazellen des Gyrus dentatus und Subpopulationen von Astrogliazellen der SVZ im lateralen Ventrikel wurden als multipotente Stammzellen identifiziert. [24-27]

Bei den erforschten adulten neuronalen Stammzellen handelt es sich um eine heterogene Gruppe. So generieren radiale Gliazellen aus der SVZ, abhängig von ihrer rostrokaudalen Lokalisation, verschiedene Subtypen von Interneuronen, die für den Bulbus olfaktorius bestimmt sind. [28] Jedoch gibt es auch andere Hirnregionen mit proliferierenden Vorläuferzellen, die sich zu Oligodendrozyten oder Astrozyten differenzieren. [29]

Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre zeigen, dass radiale Gliazellen als Vorläufer für Neuronen fungieren und strukturelle sowie funktionelle Eigenschaften von Astrozyten aufweisen, wodurch sie auch als germinale Astrozyten bezeichnet werden. [30] Diese Zellen zeichnen sich immunhistochemisch durch die Expression von speziellen Intermediärfilamenten wie z. B. Nestin, GFAP, Vimentin und nukleären Faktoren wie Ki67, OLIG2 oder PSA-NCAM aus.

Die Heterogenität und das Fehlen von validen Stammzellmarkern erschwert ihre Detektion und sollte bei der kritischen Beurteilung von Forschungsergebnissen mit berücksichtigt werden.

1.5 Neuronale Stammzellen in zirkumventrikulären Organen

2009 wurden in den zirkumventrikulären Organen von erwachsenen Nagetieren Zellen identifiziert, die Eigenschaften von neuronalen Stammzellen aufweisen. Ein direkter Vergleich mit Zellen aus der SVZ bestätigte, dass auch in den ZVO potentielle Vorläuferzellen vorhanden sind. Zudem wurde mittels in vitro Studien an Zellkulturen gezeigt, dass die soeben genannten Zellen proliferatives Potential besitzen und sich in Neuronen und Gliazellen differenzieren können. [31]

2010 wurden am Mausmodell potentielle neuronale Stammzellen aus zirkumventrikulären Organen entnommen und in die SVZ transplantiert. Die entnommenen Zellen entwickelten sich in vivo zu Zellen mit neuronalem Phänotyp und migrierten mit SVZ-Zellen in den Bulbus olfaktorius. Bei den isolierten Zellen handelte es sich in situ um Astrozyten. Sobald diese in eine neurogene Nische platziert wurden, fungierten sie als Vorläuferzellen und begannen, neuronale Zelltypen zu generieren. [32] Damit wurden erstmals potentielle neuronale Stammzellen aus ZVO von adulten Mäusen isoliert und identifiziert.

1.6 Die zirkumventrikulären Organe:

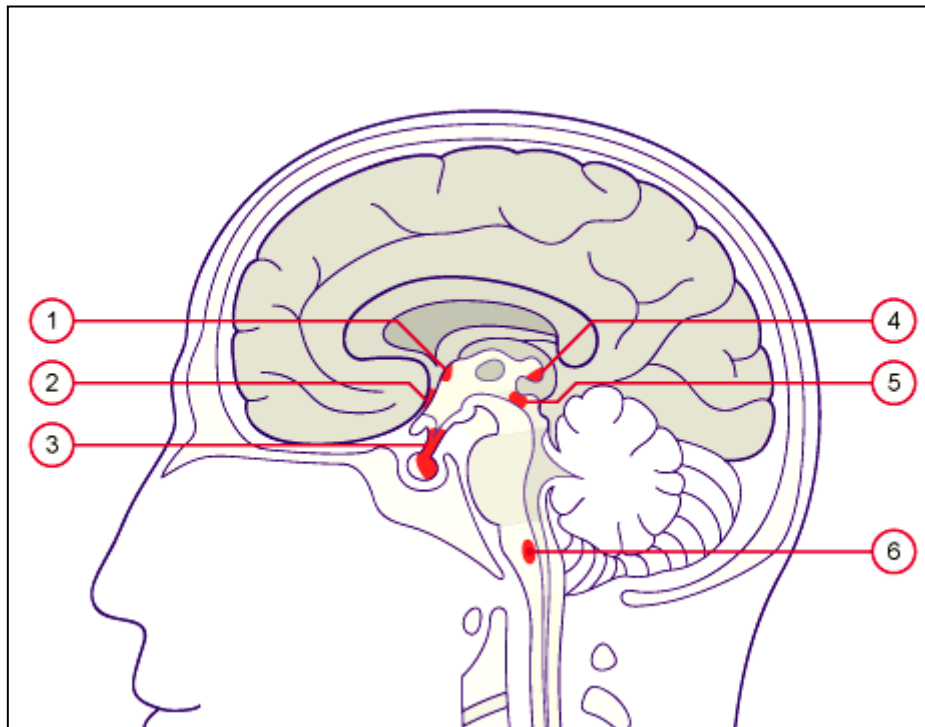


Abbildung 1: Lokalisation der ZVO [34]

1: Organum subfornicale; 2: Organum vasculosum der Lamina terminalis; 3: Eminentia mediana + Neurohypophyse; 4: Epiphyse; 5: Organum subcommissurale; 6: Area postrema

Zu den zirkumventrikulären Organen zählen: Organum subfornicale, Organum vasculosum der Lamina terminalis, Eminentia mediana, Neurohypophyse, Organum subcommissurale, Area postrema und Plexus choroideus.

Zirkumventrikuläre Organe (ZVO) sind spezialisierte Hirnstrukturen, welche in der zerebralen Medianebene um den dritten und vierten Ventrikel lokalisiert sind.

Sie unterscheiden sich vom restlichen Hirnparenchym durch eine besonders starke Vaskularisierung, die keine Blut-Hirnschranke aufweist, und werden deshalb als „Fenster des Gehirns“ bezeichnet. [35]

Neurone und Gliazellen der ZVO besitzen spezielle Rezeptoren und Ionenkanäle, wodurch sie chemische Signale aus dem Blutfluss erhalten und durch Interaktionen mit Hypothalamus und Hirnstamm Prozesse wie Natrium-Wasserhaushalt, kardiovaskuläre-Regulationsmechanismen, Energiehaushalt und Immunmodulation steuern.

Auf potentiell toxische oder hirnschädigende Stimuli antworten die ZVO mit Fieber oder Erbrechen. [36, 37] Strukturell werden die ZVO in zwei Gruppen eingeteilt: paraependymale (Epiphyse, Neurohypophyse, Organum subfornicale, Organum vasculosum der Lamina terminalis, Area postrema) und ependymale (Plexus choroideus, Organum subcomissurale) ZVO. Die paraependymalen ZVO werden weiter durch sekretorische (Epiphyse, Neurohypophyse) und sensorische (Organum subfornicale, Organum vasculosum der Lamina terminalis, Area postrema) Eigenschaften charakterisiert. Sensorische zirkumventrikuläre Organe erhalten chemische Signale aus dem Blutstrom und stellen wichtige Kommunikationspunkte zwischen Blut, Hirnparenchym und Liquor cerebrospinalis dar. [38]

Allen gemein ist eine einzigartige neuronale und vaskuläre Architektur. Sie werden von einem dichten Kapillarnetz durchzogen, das sich durch fenestrierte Endothelien und weite perivaskuläre Zwischenräumen auszeichnet. Dadurch gelangen periphere Signale in Form von Peptiden und polaren Substanzen ins Gehirn. Das Ependym der ZVO besteht aus Ependymozyten und Tanyzyten. Die abgeflachten Ependymozyten sind über tight junctions verbunden und bilden eine Barriere zwischen Blut und Liquor aus. Die Tanyzyten kennzeichnen sich durch zahlreiche Mikrovilli oder Zilien, die in Kontakt mit dem Liquor cerebrospinalis stehen und einen möglichen Einfluss auf dessen Zusammensetzung haben. [38]

1.6.1 Area postrema

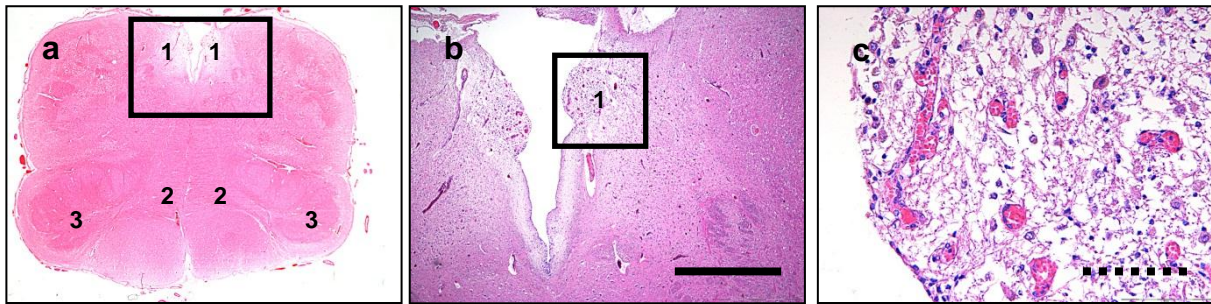


Abbildung 2: Area Postrema; HE Färbung; a: Horizontaler Schnitt durch medulla oblongata; 1= Area postrema; 2 = Lemniscus medialis; 3= Nucleus olivarius inferior; b: Maßstabskala = 1 mm; c: Maßstabskala = 100 µm

Die Area postrema befindet sich bilateral angelegt in der dorsomedialen Medulla oblongata und imponiert als konvexe Prominenz am kaudalen Ende des vierten Ventrikels. Sie befindet sich in unmittelbarer Nähe zum Nucleus tractus solitarius. [39]

Morphologisch handelt es sich um ein gut vaskularisiertes Organ mit einem dichten neuroglialen Netzwerk. Durch die hohe Dichte an serotonergen 5-HT₃ Rezeptoren gilt die Area postrema als Chemorezeptor-Triggerzone für Übelkeit und Erbrechen. [40] Die Blockade dieser Rezeptoren ist Angriffspunkt verschiedener Antiemetika und wird in der Tumorchemotherapie ausgenutzt. Weiter wird ihr als Bestandteil des dorsalen vagalen motorischen Komplexes eine Beteiligung an der Regulierung des Kreislaufs und Wasserhaushaltes [41] sowie des Sättigungs- bzw. Hungergefühls zugewiesen [42, 43].

1.6.2 Eminentia mediana

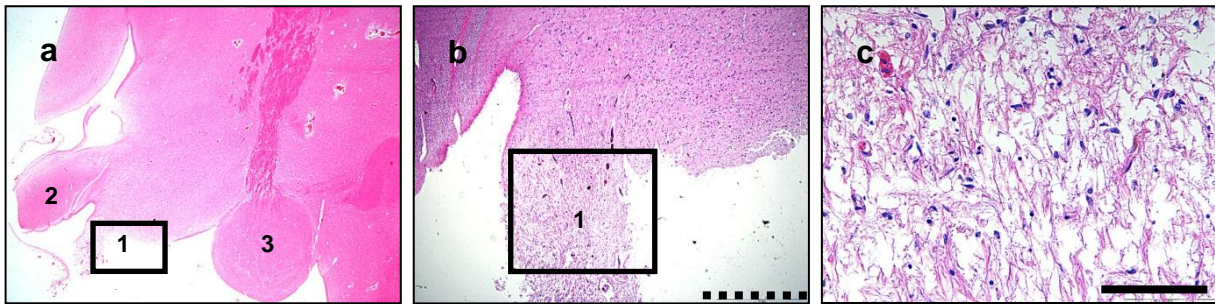


Abbildung 3: Eminentia mediana; HE Färbung; a: 1 = Eminentia mediana; 2 = Chiasma opticum, 3 = Corpus mamillare; b: Maßstabskala = 1 mm; c: Maßstabskala= 100 µm

Die Eminentia mediana bildet an der Basis des Hypothalamus einen proximalen Teil des Infundibulums und gilt als wichtigste Verbindungsstelle zwischen Nerven- und Hormonsystem. Sie liegt unmittelbar kaudal des Chiasma opticums und rostral der Corpora mamillaria. Es handelt sich um eine gefäßreiche Region, die sich aus Ependymzellen, den Tanyzyten und Axonen, die zur Neurohypophyse verlaufen, zusammensetzt. Die Eminentia mediana enthält Axone aus Hypothalamuskerngebieten, die Hormone wie Oxytocin und Vasopressin zur Neurohypophyse transportieren und die von dort ins periphere Blut sezerniert werden. Des Weiteren wird sie von hypophysiotropen Nervenfasern durchzogen. Diese geben über das Portalvenensystem Hormone wie GHRH, TRH, Somatostatin etc. in die Blutbahn ab.

Mit Hilfe von genetischen Zellschicksalsuntersuchungen an adulten Mäusen wurden in den letzten Jahren neugebildete Neurone in der Eminentia mediana detektiert. [44]

1.6.3 Epiphyse

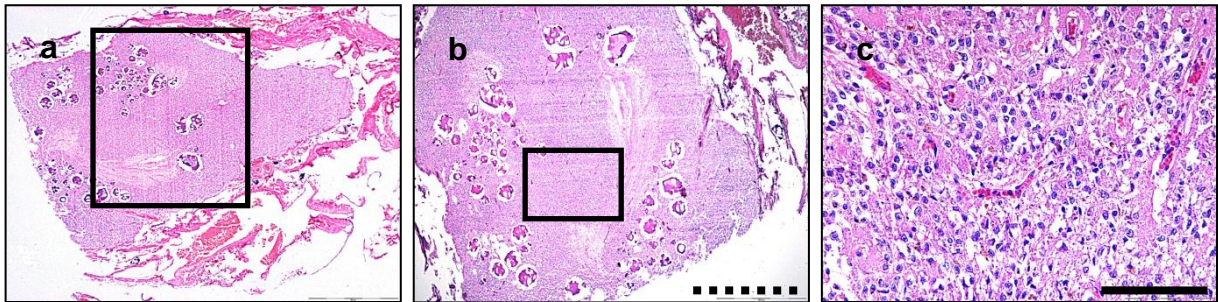


Abbildung 4: Epiphyse; HE Färbung; a: Epiphyse im Querschnitt; b: Maßstabskala = 1 mm; c: Maßstabskala = 100 µm

Die erbsengroße Epiphyse liegt an der Hinterwand des dritten Ventrikels oberhalb der Vierhügelplatte und ist über zwei Zügel (Habenulae) mit dem Thalamus verbunden. Umhüllt von der Pia mater (Kapsel) gliedert sich das Parenchym der Drüse in Septen und Lobuli. Zum größten Teil besteht die Epiphyse aus sekretorisch aktiven Pinealozyten und Neurogliazellen. Pinealozyten sind große, blasse Zellen mit ovalem Kern, prominentem Nukleolus und langen Fortsätzen. [39] Sie stammen phylogenetisch von Photorezeptorzellen ab und produzieren bzw. speichern abhängig vom hell-dunkel-Zyklus das Schlafhormon Melatonin. Durch die neuronale Verschaltung mit Netzhaut und Hypothalamus reguliert die Epiphyse über Melatoninfreisetzung den Schlaf-Wach-Rhythmus und somit die „innere biologische Uhr“.

Mit zunehmendem Alter lassen sich vermehrt kalkartige, röntgendichte Konkremente (acervoli) nachweisen.

1.6.4 Neurohypophyse

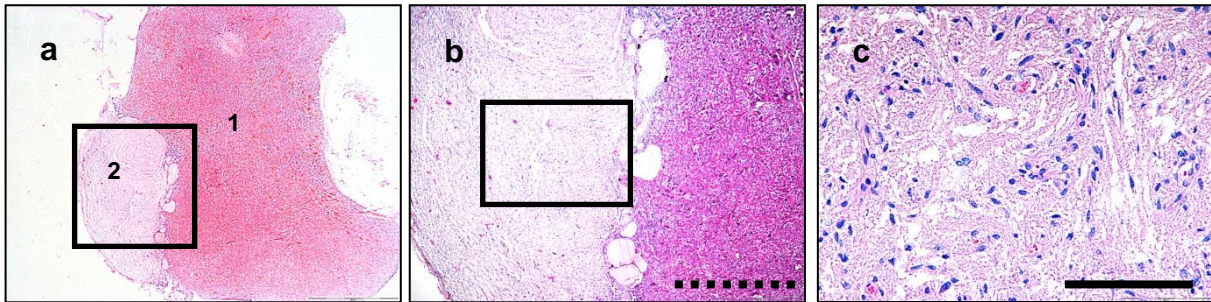


Abbildung 5: Neurohypophyse; HE Färbung; a: 1 = Adenohypophyse; 2 = Neurohypophyse;
b: Maßstabskala = 1 mm; c: Maßstabskala

Die Neurohypophyse bildet den dorsalen Anteil der Hypophyse, welche sich in der Sella turcica des Os sphenoidale befindet. Im Gegensatz zur ventral gelegenen Adenohypophyse, bei der es sich um eine endokrine Drüse handelt, entspricht die Neurohypophyse einer neuroepithelialen Ausstülpung des Diencephalons und dient als Speicher- und Freisetzungsort für die Hormone Oxytocin und Vasopressin. Sie besteht aus besonderen Gliazellen, den Pituizyten, Kapillaren, Fibrozyten, aber hauptsächlich aus marklosen Axonen, die von Perikarien im Nucleus supraopticus und paraventricularis des Hypothalamus stammen. Lichtmikroskopisch imponieren eosinophile Flecken als Herring- Körper (Anhäufungen von Hormongranula).

1.6.5 Organum vasculosum der Lamina terminalis (OVLT)

Das Organum vasculosum der Lamina terminalis hat seine größte Ausdehnung auf halber Höhe zwischen Commissura anterior und Chiasma opticum und ist Teil der Lamina terminalis.

Mikroskopisch dominiert ein dichter Kapillarplexus mit sinusoidalen Gefäßen und zahlreichen Gliazellen, die dem Ependym anliegen.

Das OVLT ist an der Entstehung und Regulation von Fieber beteiligt [45]. Zudem regulieren Neurone, die als Osmorezeptoren fungieren, über Mediatoren wie AT-II, Vasopressin, Somatostatin und Atriales natriuretisches Peptid (ANP) den Flüssigkeitshaushalt, Blutdruck und Osmolarität. [39, 46]

1.6.6 Organum subcommissurale

Das Organum subcommissurale befindet sich im Dach des dritten Ventrikels, wo es die Commissura posterior überzieht. Im menschlichen Gehirn ist es nur im Fötus und bei Neugeborenen bis zum 2. Lebensjahr nachweisbar. Bis zum Erwachsenenalter hat es sich vollständig zurückgebildet.

Die Ependymzellen des SCO sezernieren ein Glykoprotein (SCO-Spondin) in den Liquor cerebrospinalis, das auch als Reissner-Substanz bekannt ist und sich zum Reissner-Faden zusammenlagert, der beim erwachsenen Menschen nicht mehr vorhanden ist. [47]

In der Embryonalentwicklung scheint das SCO eine Rolle bei der Entstehung eines Hydrozephalus zu spielen. [48, 49]

1.6.7 Organum subfornicale

Das Organum subfornicale liegt am Dach des dritten Ventrikels unterhalb des Fornix und wird vom Plexus choroideus verdeckt. Es besteht aus einem lockeren Netzwerk von Neuronen und Gliazellen. Neben Oligodendrozyten und Mikroglia finden sich besonders zahlreiche Astrozyten bevorzugt in der Nähe von Blutgefäßen.

Das Organum subfornicale beteiligt sich an der Regulation des Wasser- und Salzhaushaltes und ist damit besonders sensibel für das Hormon Angiotensin II.

1.7 Pathologie und Neurogenese nach Gehirnfarkt

Bei einer zerebralen Ischämie, Hirnfarkt oder Schlaganfall, handelt es sich um eine Form der zerebralen Durchblutungsstörung. Durch Okklusion einer Hirnarterie kommt es zu einer Minderperfusion des betroffenen Hirnareals. Je nach Ausmaß der hierdurch bedingten Gewebsläsion können neurologische Ausfälle resultieren, die entweder transitorisch oder permanent sind. [50]

Bei länger als etwa 60 Minuten dauernden Energiemangelzuständen sind Nerven- und Gliazellen irreversibel geschädigt. Die resultierende Kolliquationsnekrose wird durch eine Proliferation von Astrozyten und Kapillaren ausgebessert. [51]

Histopathologisch kann man den Gehirnfarkt in drei Stadien einteilen. Das Infarktstadium I (akuter Hirnfarkt) ist gekennzeichnet durch den Untergang von Nervenzellen mit deutlich ödematöser Auflockerung und Abblassung der Matrix sowie einer scharfen Demarkation zum gesunden Gewebe. Das Stadium II (subakuter Hirnfarkt) zeichnet sich durch eine dichte Makrophageninfiltration, Mikrogliaaktivierung und reaktive Kapillarinduktion aus. Das Stadium III (alter Hirnfarkt) entspricht dem Endzustand eines Hirnfarktes. Hierbei kommt es zu einer Narbenbildung mit pseudozystischer Umwandlung des geschädigten Gewebes. Typisch ist ein Substanzdefekt und eine Glianarbe.

Die Inzidenz der zerebrovaskulären Erkrankungen beträgt in den meisten Industrieländern 150-200/100000 Einwohner. Die Prävalenz wird auf 700-800/100000 Einwohner geschätzt. Zerebrale Durchblutungsstörungen liegen hinter den kardiovaskulären und tumorösen Erkrankungen an dritter Stelle der Mortalitätsstatistik westlicher Länder.[52]

Die häufigsten Ursachen einer Ischämie sind eine Blockade der arteriellen Blutzufuhr durch arteriosklerotische Gefäßstenosen (Makro-Mikroangiopathie) oder embolische Ereignisse (arterio-arterielle sowie kardiogene Embolien). [50]

Zentralnervöse ischämische Infarkte führen zu einem permanenten Neuronenverlust und sind eine wichtige Todesursache in modernen Industrieländern. Die funktionelle Restitution nach einem Gehirnfarkt ist limitiert. Zahlreiche Studien demonstrieren das reparative Potential des ZNS in Form einer Aktivierung der endogenen Neurogenese nach einem ischämischen Insult. [3, 9, 14, 37, 53-55] Insbesondere die ependymalen Zellen der Ventrikel gelten als wesentliches Stammzellreservoir, das nach Infarkt rekrutiert wird. [54, 56]. Zudem zeigen zahlreiche weitere Studien zu globalen und fokalen cerebralen Ischämien an Mausmodellen einen signifikanten Anstieg von Vorläuferzellen im adulten Gehirn. [57-59] Eine Studie demonstriert an Mäusen, dass SVZ-Zellen nach Okklusion der mittleren Gehirnarterie in das ischämische Hirnareal migrieren. [21]

2 Erläuterung der Fragestellung

Bereits im Vorfeld wurden innerhalb der ZVO Zellen mit Eigenschaften von neuronalen Progenitor- bzw. Stammzellen identifiziert. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich nun in einem zweiten Schritt mit einem Vergleich zwischen Gehirnen ohne neuropathologischen Befund und Infarktgehirnen.

Als erstes Ziel sollen bisherige Ergebnisse reproduziert werden, um die Anwesenheit von möglichen neuronalen Stammzellen (NSZ) in ZVO zu bestätigen.

Als zweites Ziel werden gesunde Gehirne und Infarktgehirne miteinander verglichen, um einen Anstieg und somit eine mögliche Rekrutierung von NSZ nach pathologischem Ereignis zu detektieren.

Die Arbeit umfasst die Untersuchung von jeweils 16 Gewebeproben ohne neuropathologischen Befund und 16 Gewebeproben nach ischämischen Insult.

In Anlehnung an die Arbeit von Bennett et al. [31], die NSZ in ZVO erwachsener Nagetieren nachwies, sollen nun erstmals NSZ in humanen ZVOs erforscht werden.

Mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen werden entsprechende Zellen identifiziert und quantifiziert. Da bis dato keine eindeutig validen Antikörper für Stammzellen existieren, soll mittels einer Zusammenschau mehrerer Einzel- und Doppelfärbung der Nachweis potentieller NSZ erhärtet werden.

Diese Arbeit soll zum Verständnis adulter Neurogenese beitragen und als Grundlage für weitere Forschungen an Tiermodellen dienen.

3 Methodik:

3.1 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden während der neuropathologischen Untersuchung Gehirne von 32 Leichnamen untersucht. Davon wurden die ZVO von 16 Gehirnen nach akutem Gehirnfarkt und 16 Gehirnen mit altersentsprechendem Normalbefund entnommen. Die Altersverteilung erstreckt sich von 41,6 bis 92,7 Jahre (Durchschnittsalter = 71,95 Jahre). Zwischen den beiden untersuchten Patientengruppen gibt es keinen signifikanten Altersunterschied.

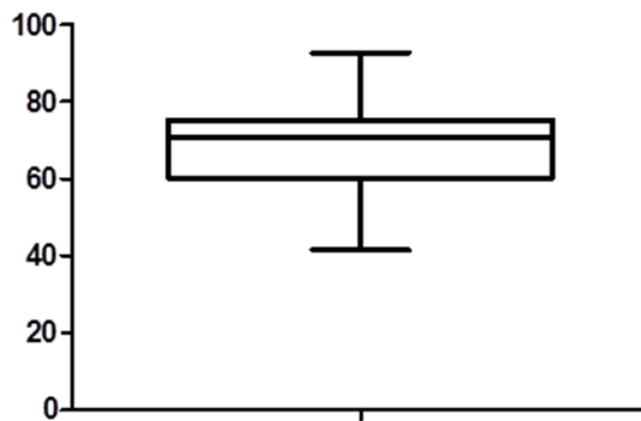


Abbildung 6: Altersverteilung aller untersuchten Patienten in Jahren. Mittelwert: 71,95; Standardabweichung: 10,29; Standardfehler: 1.82;

Eine genaue Auflistung der Patientendaten ist aus Tabelle 1 im Anhang zu entnehmen. Nicht bei jedem Patienten konnten alle zu untersuchenden ZVO entnommen werden, da es bereits bei Entnahme des Gehirnes aus der Schädelgrube zu Gewebeschädigung kommen kann.

Alle Patienten haben vor ihrem Tod der Gewebeverwendung zu wissenschaftlichen Forschungszwecken zugestimmt.

3.2 Angewendete Schnittführung bei der Sektion

Die ZVO sind in der sagittalen Mittellinie des Gehirns lokalisiert, wodurch sich eine Schnittführung in sagittaler Richtung anbot, um optimalen Zugang zu den gesuchten Organen zu erhalten.

Zuerst wurden die Gehirne auf äußere pathologische Auffälligkeiten inspiziert. Als nächstes wurden die arteriellen und venösen hirnversorgenden Gefäße abpräpariert und auf makroskopische Verkalkungen untersucht, um bereits erste Hinweise auf ein mögliches Infarktgeschehen zu erhalten. Dann wurde der Hirnstamm auf Höhe der Crura cerebri abgesetzt und in axiale Scheiben lamelliert. Dabei wurde die Area postrema auf Ebene des Rautengrubenbodens entnommen und konserviert.

Ausgehend von einem mediosagittalen Schnitt entlang der Fissura longitudinalis, welcher die beiden Gehirnhälften voneinander trennt, wurde das Gehirn in 1 cm dicke Scheiben in sagittaler Ausrichtung lamelliert.

Im Idealfall konnte nun von den medialen Scheiben ein Gewebeblock entnommen werden, in dem Epiphyse und die Eminentia mediana enthalten waren.

Die Hypophyse wurde aufgrund ihrer Lage innerhalb der Fossa hypophysialis des Os sphenoidale bereits während der Gehirnentnahme aus der Schädelgrube separat aufbewahrt.

Zudem gehörten zur neuropathologische Allgemeinuntersuchung Beschreibung, Dokumentation und Interpretation von makroskopisch sichtbaren Gewebe- bzw. Organveränderungen sowie die Entnahme repräsentativer Gewebeproben für die mikroskopische Untersuchung.

3.3 Asservierung von Gewebe

Das entnommene Gehirngewebe wurde durch Fixation mit 4%iger Formalinlösung asserviert. Zur Einbettung wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, in Xylol von Alkohol befreit, mit verflüssigtem Paraffin durchtränkt und anschließend in einen Paraffinwachsblock eingegossen, der nach Erkaltung aushärtet. Mit einem Mikrotoms wurden 5 µm dicke Gewebeschnitte hergestellt, die anschließend im Wasserbad auf Objektträger aufgezogen wurden.

3.4 Immunhistochemie

3.4.1 Allgemeines

Die Immunhistochemie ist eine Methode, mit der Proteine mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht werden können. Damit kann bestimmt werden, ob das Protein im untersuchten Gewebe vorhanden ist und in welchem Kompartiment der Zelle es lokalisiert ist.

Im Wesentlichen unterscheidet man eine direkte Methode von einer indirekten Methode. Bei der direkten Methode reagiert ein enzymmarkierter Primärantikörper mit dem Gewebeanigen. Diese Methode ist rasch durchführbar. Da an der Reaktion nur ein markierter Antikörper beteiligt ist, kommt es nur zu einer geringen Signalverstärkung.

Die indirekte Methode ist deutlich sensitiver. Dabei bindet zuerst ein unkonjugierter Primärantikörper an das Antigen, anschließend wird ein zweiter enzymmarkierter Sekundärantikörper aufgetragen, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Zur Visualisierung des Primärantikörpers folgt eine Substrat- Chromogenreaktion. Dabei bildet das Enzym Peroxidase in Anwesenheit eines Elektronendonors (Chromogene wie z. B. 3, 3'- Diaminobenzidin, DAB) ein Enzym-Substratkomplex. DAB wird vom Enzym Peroxidase oxidiert und bildet ein braunes Endprodukt, das den verwendeten Primärantikörper und damit das gesuchte Protein innerhalb der Zelle markiert.

3.4.2 Beschreibung der verwendeten Primärantikörper

Anti- Ki67

Das Ki67 Antigen ist ein nukleärer Proliferationsmarker und wird ausschließlich während der Interphase (umfasst alle aktiven Phasen der Zellteilung, mit Ausnahme der Kernteilungsphase) hauptsächlich in den Kernkörperchen (Nukleoli; Orte der rRNA-Transkription) exprimiert. Während der Kernteilungsphase (Mitose) ist Ki-67 dagegen auf der Oberfläche der kondensierten Chromosomen nachweisbar.

Während der Zellzyklusphasen wird es in der G1-, in der S-, in der G2- und in der M-Phase exprimiert. In ruhenden Zellen, also Zellen, die sich in der G0-Phase befinden, ist das Ki67-Antigen nicht vorhanden. [60, 61]

Die immunohistochemische Färbung mit Ki67-Antikörpern, findet vor allem in der Tumordiagnostik Verwendung, da sie Aufschluss über die Wachstumsgeschwindigkeit und damit dem Malignitätsgrad der Neoplasie gibt. [62]

Anti- OLIG2

OLIG2 steht für „Oligodendrocyte lineage transcription factor 2“ und wird fast ausschließlich im ZNS, von glialen Vorläuferzellen und unreifen Astrozyten exprimiert. Dieser Transkriptionsfaktor ist essentiell für die Differenzierung von subventrikulären Vorläuferzellen zu reifen Oligo- und Astrozyten. [63, 64] Insbesondere in NG2 Gliazellen, die als Vorläuferzellen der Oligodendro- und Neurogenese gelten, und eine bedeutende Rolle in Reparationsprozessen nach Hirnschädigung spielen, ist OLIG2 in hohem Maße nachweisbar. [65]

In der neuropathologischen Praxis dient OLIG2 der Identifikation von oligodendroglialen Tumoren und deren Abgrenzung von Tumoren anderen Ursprunges. [66]

Anti- PSA-NCAM

PSA-NCAM steht für "Poly Sialated Neural Adhesion Molecule" und wird vor allem während der Gehirnentwicklung auf der Oberfläche von Vorläuferzellen und von neuronalen Stammzellen exprimiert. [18] Im adulten Gehirn ist PSA-NCAM ein wesentlicher Regulator der Migration, der Entwicklung und des Überlebens von neu generierten Neuronen im Rahmen von adulter Neurogenese. [18, 67] Zudem spielt es eine wichtige Rolle in verschiedenen Formen der Neuroplastizität, sowie bei zerebralen Reparationsprozessen. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass PSA-NCAM positive neuronale Vorläuferzellen in Tumorgewebe akkumulieren. [68] PSA-NCAM steuert über Zellinteraktionen Prozesse wie Synaptogenese, axonales Wachstum oder Zellmigration und trägt somit wesentlich zu funktioneller Plastizität bei. [69, 70]

Anti- GFAP

GFAP steht für „Glial fibrillary acidic protein“. Es handelt sich um ein zytoplasmatisches Protein, das zur Gruppe der Intermediärfilamente der Klasse III (Desmine) gehört.

GFAP gilt im menschlichen Gehirn als Marker für reife Astrozyten. [18] Im Kontext adulter Neurogenese stammen neu gebildete Neuronen von astrozytären Vorläuferzellen ab, die GFAP exprimieren. [71, 72]

GFAP wird zudem als Tumormarker bei der Diagnostik von Hirntumoren bestimmt. Es findet sich typischerweise in Gliomen, z. B. in Astrozytomen, Glioblastomen, Oligodendrogliomen und Ependymomen.

Anti- Nestin

1990 wurde Nestin als Intermediärfilament der Klasse XI in neuronalen Vorläuferzellen entdeckt. [73] Während der Gehirnentwicklung wird Nestin insbesondere von Astrozyten und radialen Gliazellen exprimiert und gilt als Marker für multipotente Stammzellen. Während der Embryogenese ist Nestin vorwiegend in proliferierenden und migrierenden Zellen nachweisbar. Im adulten Gehirn findet sich das zytoplasmatische Intermediärfilament besonders in Regenerationsarealen. [74] Insbesondere in den frühen Phasen adulter Neurogenese exprimieren neuronale Vorläuferzellen Nestin und GFAP. [75] Mit zunehmender Differenzierung wird Nestin herunterreguliert und durch andere Intermediärfilamente ersetzt. Interessanterweise kommt es während pathologischer Veränderungen, wie Verletzungen oder Infarkten, zu einer erneut induzierten Expression von Nestin. [76]

Anti- Vimentin

Vimentin zählt genauso wie GFAP zu den Intermediärfilamenten der Klasse III und kommt im Zytoplasma aller Zellen mit mesodermaler Herkunft vor.

Generell ist Vimentin als zytoskelettales Protein für die Erhaltung der Zellintegrität verantwortlich. [77] Während der frühen Gehirnentwicklung wird Vimentin von radialen Gliazellen und unreifen Astrozyten exprimiert und nach der Gestation zunehmend durch GFAP ersetzt. Nach Gehirnschädigung lässt sich ein Anstieg von Vimentin- und GFAP-positiven Zellen verzeichnen. [78] Untersuchungen an Mausmodellen zeigen eine vermehrte Expression von Vimentin und Nestin in der ipsilateralen Subventrikularzone sowie im Striatum und im Kortex ungefähr etwa drei bis sieben Tage nach Mediainfarkt. Diese reaktive Astrozytose scheint neuronale Differenzierung von astrozytären Vorläuferzellen zu induzieren. [78]

In der pathologischen Diagnostik wird Vimentin als Marker für Weichgewebstumoren eingesetzt.

Anti- CD68

CD68 steht für „Cluster of Differentiation 68“. Es handelt sich um ein Transmembran-Antigen, das hauptsächlich in Lysosomen lokalisiert ist. CD68 gehört zur Familie der Glykoproteine und ist am lysosomalen Transport bzw. der Endozytose beteiligt. Eine intrazelluläre Expression von CD68 findet sich bei Makrophagen, Monozyten, Mikroglia, Langerhanszellen und dendritischen Zellen. Eine geringgradige Reaktivität wird auch bei einer Subpopulation von B- Lymphozyten und aktivierten T- Lymphozyten beobachtet.

Der Antikörper wurde in der vorliegenden Forschungsarbeit als Doppelfärbung mit Ki67 eingesetzt, um auszuschließen, dass es sich bei den proliferierenden Zellen (Ki67 positive Zellen) ausschließlich um Makrophagen oder Mikroglia handelt.

3.4.3 Erläuterung des verwendeten Verfahrens der Einzelfärbung mittels 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)- Markierung

Das Verfahren der Einzelfärbung mittels 3,3'- Diaminobenzidin ist ein Beispiel für die indirekte Methode, bei der das Enzym Peroxidase den Farbstoff 3,3'-Diaminobenzidin oxidiert und somit das gesuchte Protein als braunes Endprodukt innerhalb der Zelle markiert.

Die immunhistologische Einzelfärbung lässt sich in fünf Schritte gliedern:

1. Entparaffinierung
2. Demaskierung der Antigene
3. Behandlung mit einem Primärantikörper gegen das gesuchte Antigen
4. Behandlung mit einem Sekundärantikörper gegen den Primärantikörper
5. Sichtbarmachen des Primär- Sekundärantikörper- Komplexes mit einem Chromogen

1. *Entparaffinierung* :

Die Entparaffinierung erfolgt durch eine absteigende Alkoholreihe. Hierzu werden die Objektträger mit

Xylol (20 Minuten),
100% Ethanol (2 x 5 Minuten),
96% Ethanol (5 Minuten),
70% Ethanol (5 Minuten)
und destilliertem Wasser

behandelt.

2. Demaskierung der Antigene

Durch die Formalinfixierung entstehen Methylenbrücken, welche durch Quervernetzung zu Strukturveränderungen von Proteinen führen können. Dadurch kann es passieren, dass ein Antikörper das gesuchte Antigen nicht erkennt. Um dies zu vermeiden, werden die Schnitte in Citratpuffer (pH 6) mehrmals in der Mikrowelle bei 600 Watt aufgeköcht. Dieser Reaktionsschritt dient der Antigendemaskierung sowie dem Aufbrechen von gesuchten Epitopen.

3. Behandlung mit einem Primärantikörper gegen das gesuchte Antigen

Zur Vorbehandlung werden die Objektträger in verschiedene Lösungen getaucht, um die gesuchten Proteine für den Primärantikörper zugänglich zu machen:

Lösungsgemisch aus 1 Teil H_2O_2 und 5 Teilen Methanol (15-20 Minuten)

Leitungswasser (5 Minuten)

destilliertes Wasser (eingetaucht)

PBS-Puffer (= Phosphate Buffered Saline) und Brij (= nichtionisches Tensid) (5 Minuten)

Blocking-Lösung aus 2% FCS im PBS (5 Minuten)

Anschließend werden die Schnitte mit dem Primärantikörper in der entsprechenden Konzentration über Nacht im Kühlschrank bei 4° Celsius inkubiert.

Primärantikörper:

| Antikörper | Spezies | Firma | Verdünnung |
|---------------|-------------------------|----------------------------|------------|
| Anti Ki67 | Monoklonal Maus | Dako | 1:400 |
| Anti Ki67 | Polyklonal Kaninchen | Abcam | 1:25 |
| Anti OLIG2 | Polyklonal Kaninchen | Millipore- Life Science | 1:100 |
| Anti Nestin | Polyklonal Kaninchen | Millipore | 1:200 |
| Anti Vimentin | Monoklonal Maus | Dako | 1:400 |
| Anti GFAP | Monoklonal Maus | Dako | 1:200 |
| Anti CD68 | Monoklonal Maus | Dako | 1:50 |
| Anti PSA-NCAM | Monoklonal Maus | Millipore | 1:100 |

4. Behandlung mit einem Sekundärantikörper gegen den Primärantikörper

Um Kontrast und Intensität der Färbung zu optimieren, wird am darauf folgenden Tag ein Reagenz, bestehend aus Superenhancer und PBS (Mischverhältnis1:1), aufgetragen.

Dann folgt ein weiterer Waschgang mit PBS für 5 Minuten.

Nun werden die Schnitte mit einem Reagenz aus Poly-HRP (= Horseradish peroxidase) und PBS im Verhältnis von 1:1 für 30 Minuten behandelt. Dabei bindet die dem Sekundärantikörper angelagerte Peroxidase an die Fc- Region des Primärantikörpers.

5. Sichtbarmachen des Primär- Sekundärantikörper- Komplexes mit einem Chromogen

Nach einem erneuten Waschgang mit PBS (5 Minuten) werden im nächsten Schritt 38 µl DAB-Lösung vermischt mit 1 ml Substratpuffer aufgetropft. Durch die Reaktion der Peroxidase mit dem in der DAB-Lösung befindlichen H₂O₂, kommt es zur Farbentwicklung.

Es folgt ein Waschgang in destilliertem Wasser (2 mal 2 Minuten).

Nun werden die Schnitte zur Gegenfärbung der Zellkerne für 30 Sekunden in Hämalaun eingetaucht und in Leitungswasser gebläut.

Zum Abschluss der Färbung werden die Objektträger einer aufsteigenden Alkoholreihe nach folgendem Schema zugeführt:

70% Alkohol (eingetaucht)

96% Alkohol (eingetaucht)

100% Alkohol (5 Minuten)

100% Alkohol (5 Minuten)

Xylol (5 Minuten)

Xylol (5 Minuten)

Anschließend werden die Schnitte eingedeckelt und unter einem Olympus BX50 Lichtmikroskop mit 40x/(0,75) Objektiv untersucht. Digitale Bilder werden mit einer Olympus U-TV1Y Kamera angefertigt.

3.4.4 Erläuterung des verwendeten Verfahrens der Doppelfärbung mittels Fluoreszenzmarkierung

Das Prinzip der Immunfluoreszenz (IF)- Färbung beruht, wie das der immunhistochemischen Verfahren, auf der Markierung des gesuchten Antigens mit einem Antigen- Antikörper- Komplex.

Im Unterschied zur Immunhistochemie, bei der durch Präzipitation eines Farbkomplexes der Antigen- Antikörper- Komplex sichtbar gemacht wird, erfolgt diese Reaktion bei der Immunfluoreszenz durch Lumineszenz des Sekundärantikörpers.

Die beiden Marker fluoreszieren bei unterschiedlicher Wellenlänge, wodurch jede einzelne Zelle auf zwei Merkmale untersucht werden kann. Dabei gilt zu beachten, dass die zwei Primärantikörper aus einer unterschiedlichen Spezies stammen, z. B. ein Antikörper aus der Maus und einer aus dem Kaninchen, da ansonsten die Farbstoffe nicht einem bestimmten Primärantikörper zuzuordnen wären.

Dementsprechend ergeben sich folgende Antikörperkombinationen:

Ki67 und Nestin

Ki67 und OLIG2

Ki67 und PSA-Ncam

Ki67 und CD68

Fluorochrom beladene Sekundärantikörper:

| Antikörper | Spezies | Farbe | Verdünnung |
|-----------------|----------------------|-------|------------|
| Alexa Flour 488 | Ziege-anti-Kaninchen | Rot | 1:200 |
| Alexa Flour 546 | Ziege-anti-Maus | Grün | 1:200 |

Die vorbereitenden Maßnahmen (Entparaffinieren, Aufkochen etc.) entsprechen denen der Einzelfärbung.

Dann werden die Schnitte über Nacht im Kühlschrank bei 4° Celsius mit den beiden Primärantikörpern in geeigneter Verdünnung inkubiert.

Am darauf folgenden Tag werden die Schnitte zunächst zwei bis dreimal für fünf Minuten mit PBS-Puffer gespült, wonach dann der fluorochrom- beladene Sekundärantikörper aufgetragen wird und für maximal 45 Minuten in feuchter Kammer im Dunkeln inkubiert.

Nach erneutem Spülen mit PBS-Puffer erfolgt die Kernfärbung mit 4'6- Diamidin-2-phenylindol (DAPI). Anders als bei der DAB- Färbung erfolgt keine aufsteigende Alkoholreihe. Die Schnitte werden mit wasserlöslichem Eindeckmittel für Fluoreszenzpräparate eingedeckelt und unter einem Olympus LUCPlan FLN mit 40x/(0,60) Fluoreszenzmikroskop mit 40x/(0,60) PhZ Objektiv untersucht.

3.5 Quantifikation und Statistik

Ki67 und OLIG2 positive Zellen wurden mittels ImageJ software (U.S National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) in repräsentativen Schnitten der Area postrema, Eminentia mediana, Neurohypophyse und Epiphyse manuell ausgezählt. Für jedes Organ wurden mindestens 1100 Zellen ausgezählt. Der Anteil positiver Zellen wurde als Fraktion positiver Zellen zur totalen Zellzahl in Prozent angegeben. Um die statistische Signifikanz zu ermitteln, wurden die zwei untersuchten Gruppen (Infarktpatienten versus Normalbefund) mit Hilfe des Mann-Whitney U Tests in GraphPad Prism Software, Version 5.04, verglichen.

4 Ergebnisse: Vergleich Gesund versus Infarkt

Bereits im Vorfeld wurden in den ZVO erwachsener Mäuse Zellen mit Stammzellcharakteristiken detektiert. [31] Um die Übertragbarkeit bestehender Forschungsergebnisse auf humane ZVO zu prüfen, wurden immunhistochemische Einzel- und Doppelfärbungen zunächst an gesunden und anschließend an Infarktgehirnen angefertigt. Um das Potential und die Funktion potentieller Stammzellen im Kontext eines Infarktgeschehens zu analysieren, wurde ein quantitativer Vergleich zwischen den beiden untersuchten Gruppen gezogen.

Die Ergebnisse werden an jeweils zwei repräsentativen Beispielbildern veranschaulicht.

4.1 Einzelfärbungen

Nachdem zunächst eine Hämatoxylin-Eosin Färbung zur anatomischen Orientierung angefertigt wurde, gelang es, alle vier zu untersuchenden ZVO mit den jeweiligen Antikörpern (Ki67, OLIG2, PSA-NCAM, GFAP, Nestin, Vimentin) zu färben.

Positive Zellen erscheinen unter dem Lichtmikroskop braun. Negative Zellen erscheinen durch die Gegenfärbung blau.

4.1.1 Area postrema

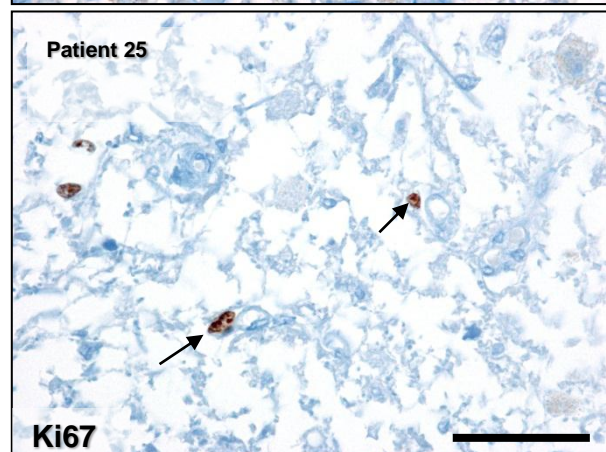
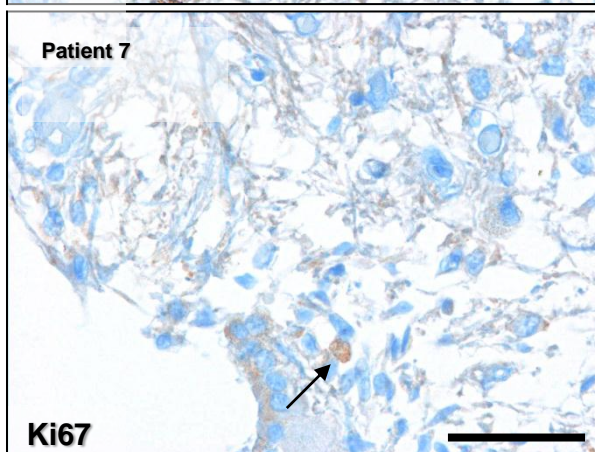
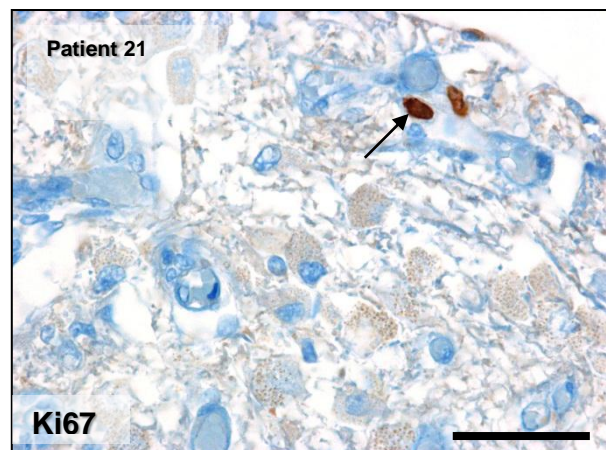
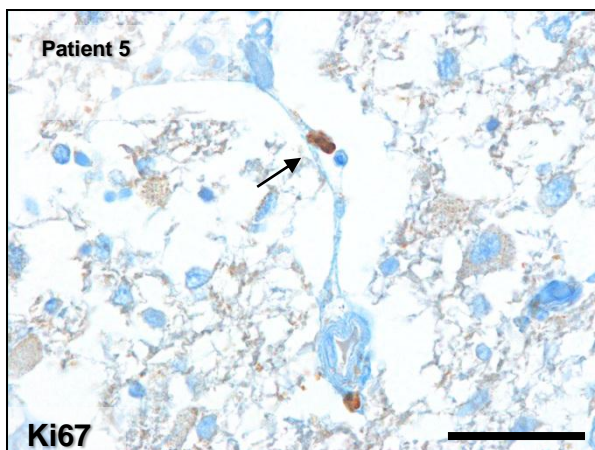
Die folgenden Abbildungen zeigen jeweils zwei Ausschnittsvergrößerungen der Area postrema aus Gehirnen mit altersentsprechendem Normalbefund und zwei Ausschnitte von Hirngewebe nach ischämischem Infarkt. Es handelt sich um DAB-Einzelfärbungen mit den Antikörpern Anti-Ki67, Anti-OLIG2, Anti-PSA-NCAM, Anti-GFAP, Anti-Nestin.

Die positiven Zellen wurden mit Pfeilen markiert. Die Maßstabskala beträgt 50 µm.

Anti- Ki67

Gesund

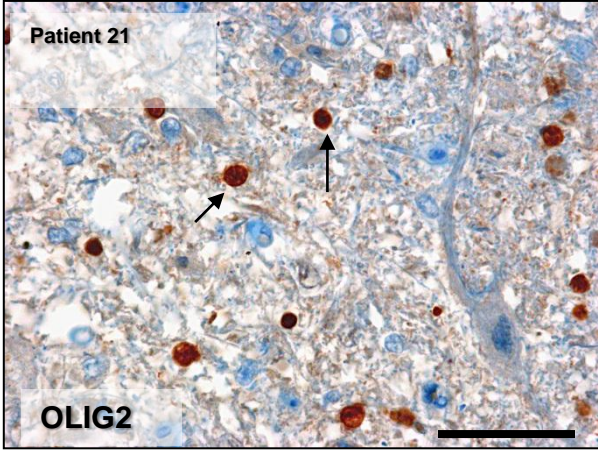
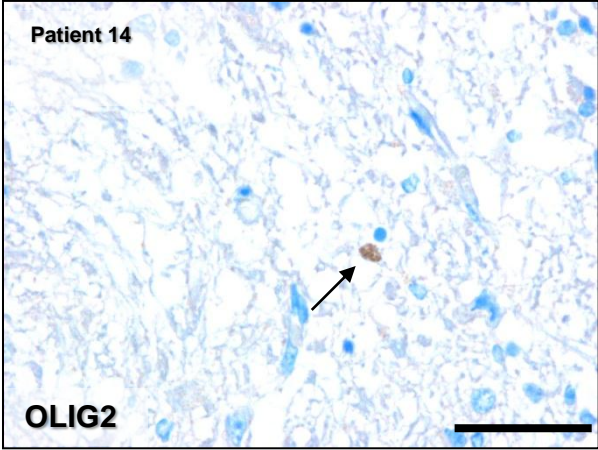
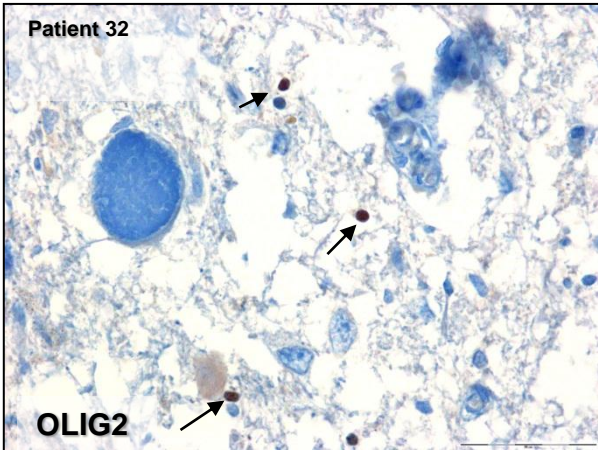
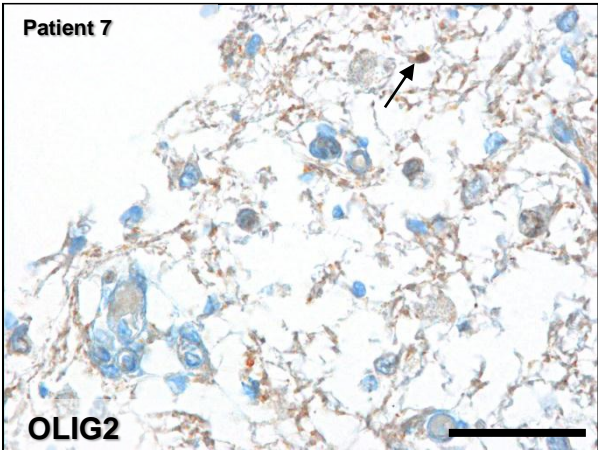
Infarkt



Anti- OLIG2

Gesund

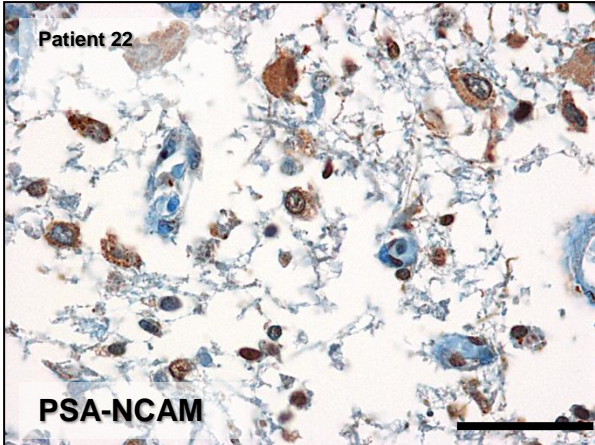
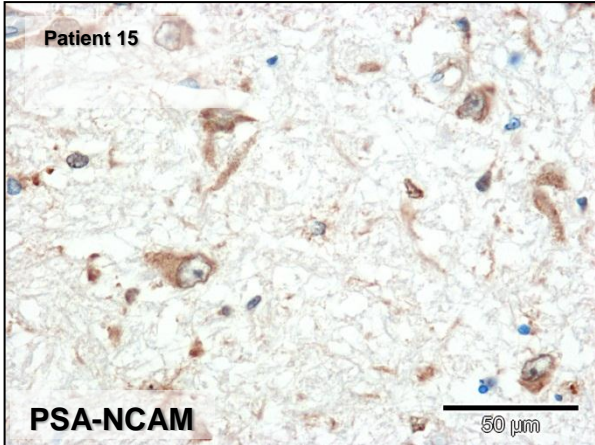
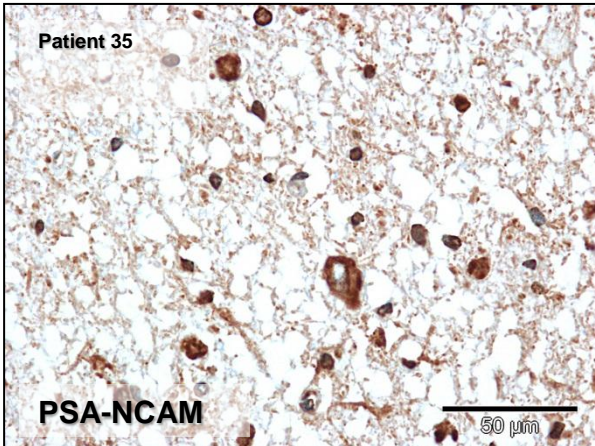
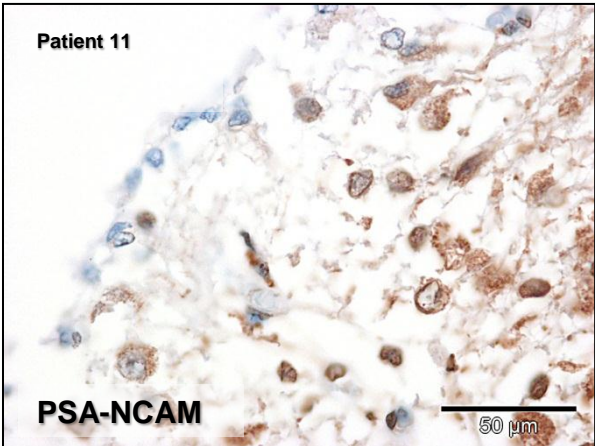
Infarkt



Anti- PSA-NCAM

Gesund

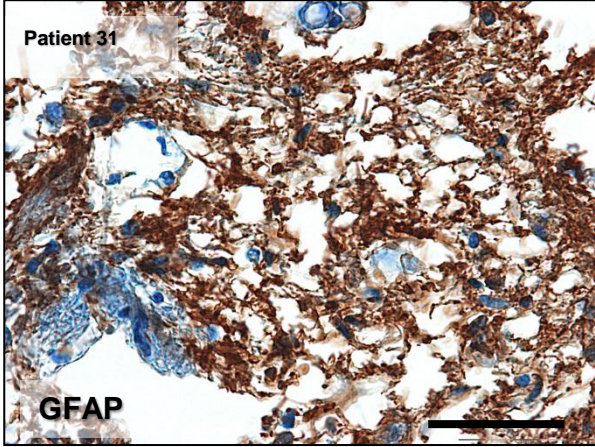
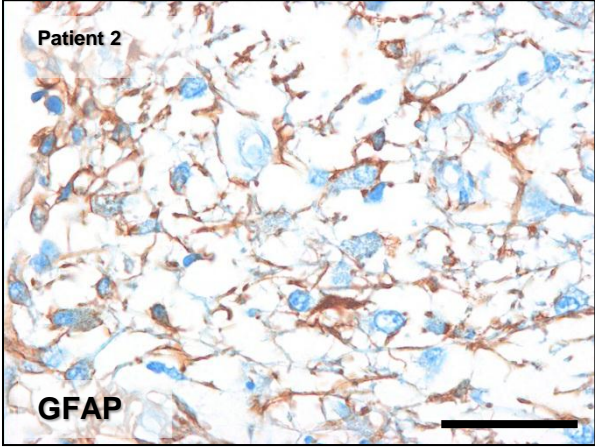
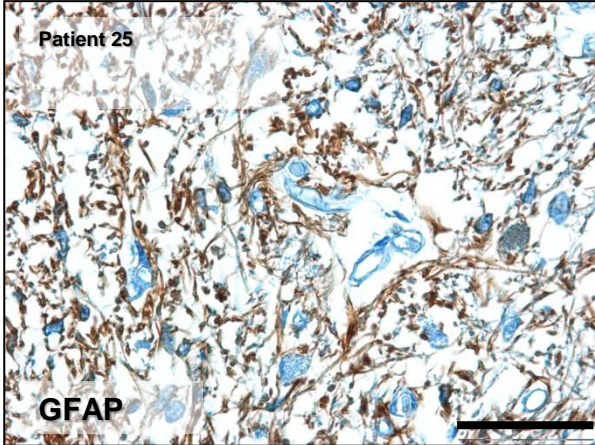
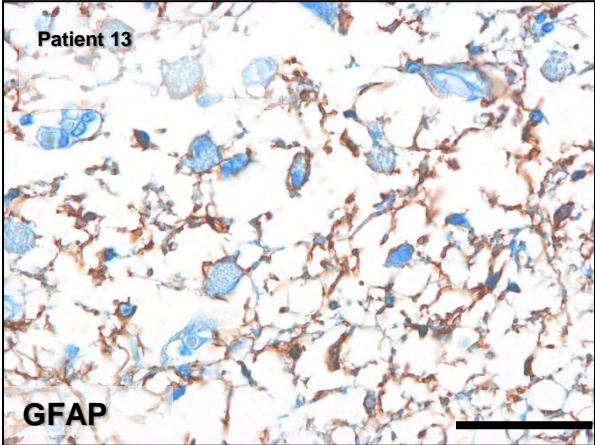
Infarkt



Anti- GFAP

Gesund

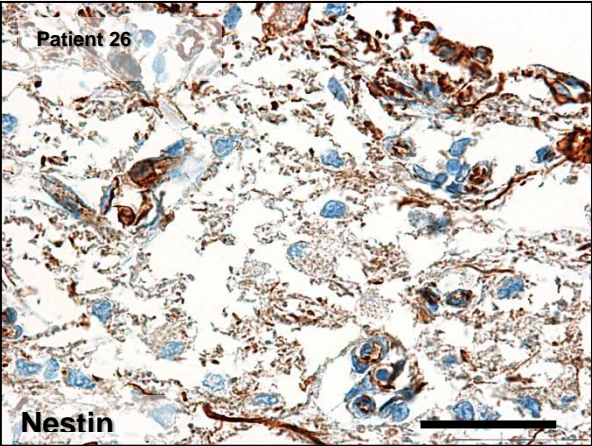
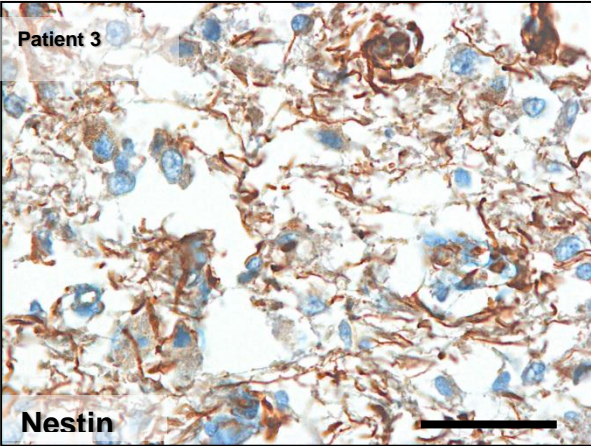
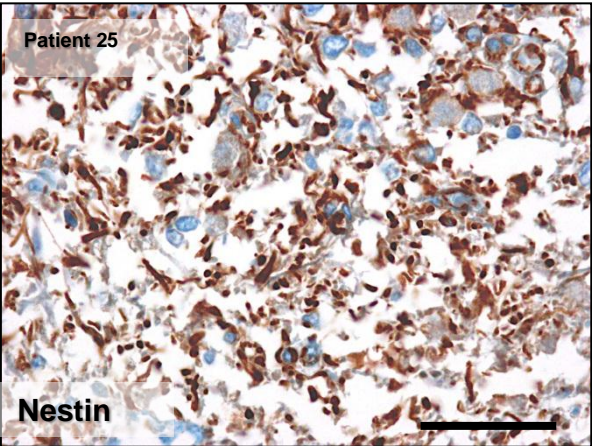
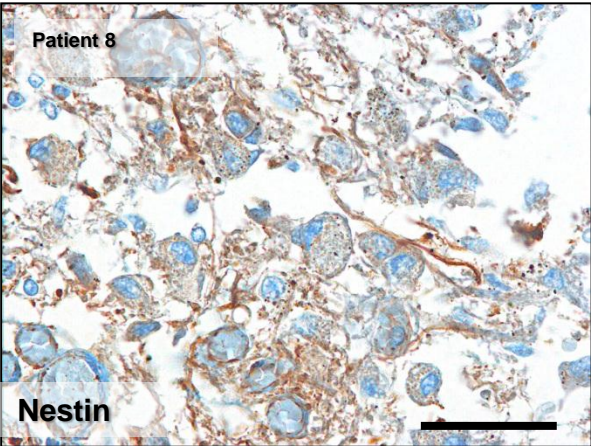
Infarkt



Anti- Nestin

Gesund

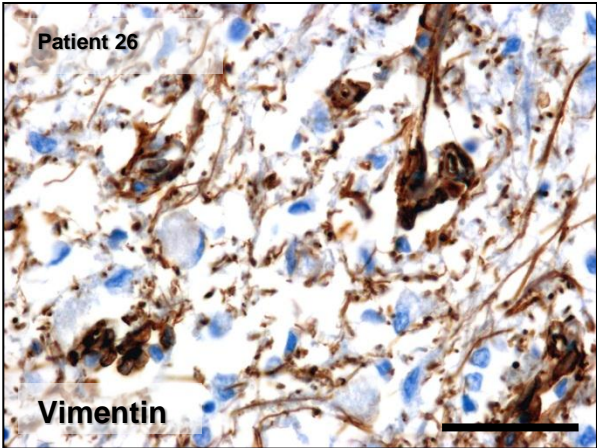
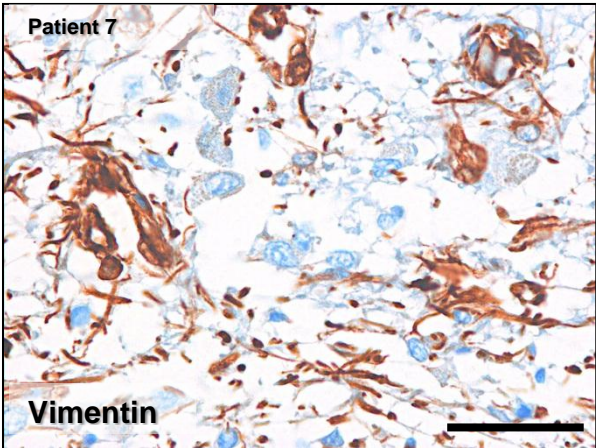
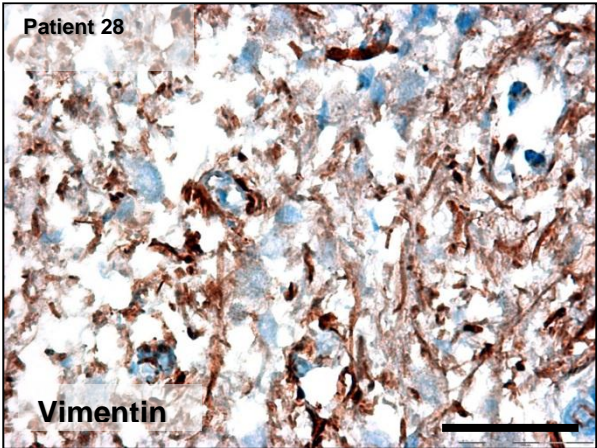
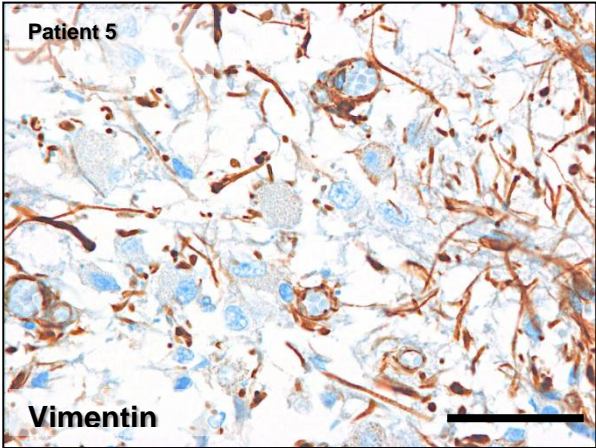
Infarkt



Anti- Vimentin

Gesund

Infarkt



4.1.2 Eminentia mediana

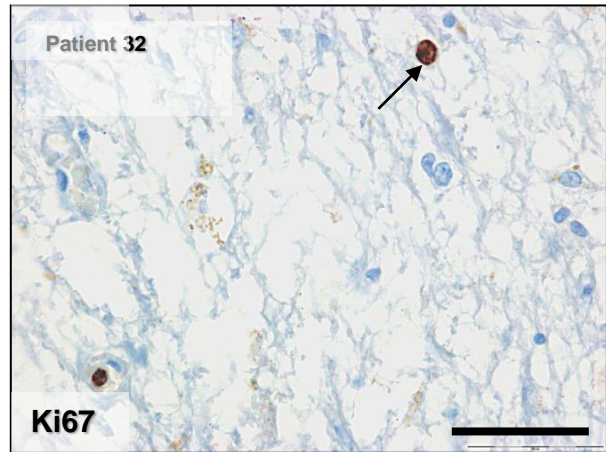
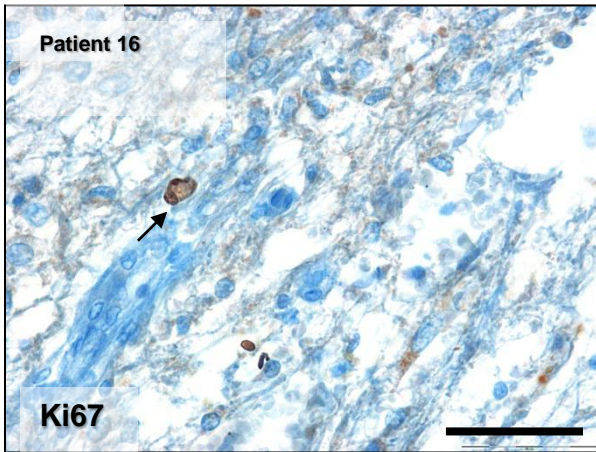
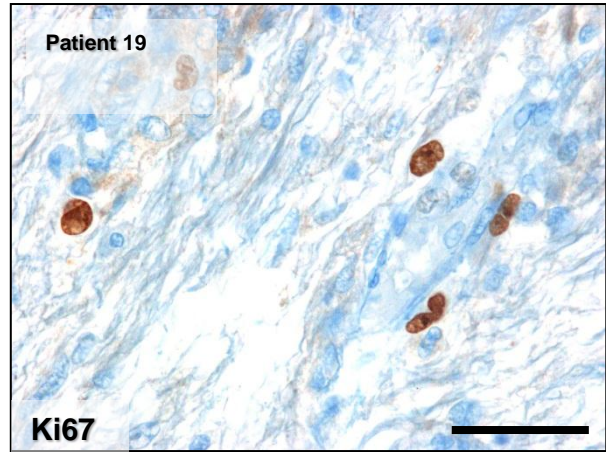
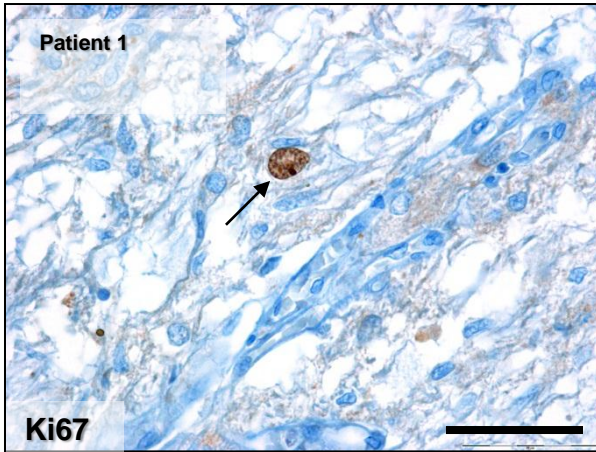
Die folgenden Abbildungen zeigen jeweils zwei Ausschnittsvergrößerungen der Eminentia mediana aus Gehirnen mit altersentsprechenden Normalbefund und zwei Ausschnitte von Hirngewebe nach ischämischen Infarkt. Es handelt sich um DAB-Einzelfärbungen mit den Antikörpern Anti-Ki67, Anti-OLIG2, Anti-PSA-NCAM, Anti-GFAP, Anti-Nestin.

Die positiven Zellen wurden mit Pfeilen markiert. Die Maßstabskala beträgt 50 µm.

Anti- Ki67

Gesund

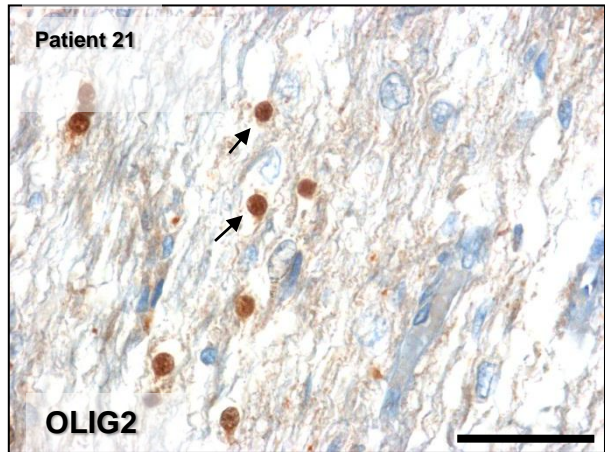
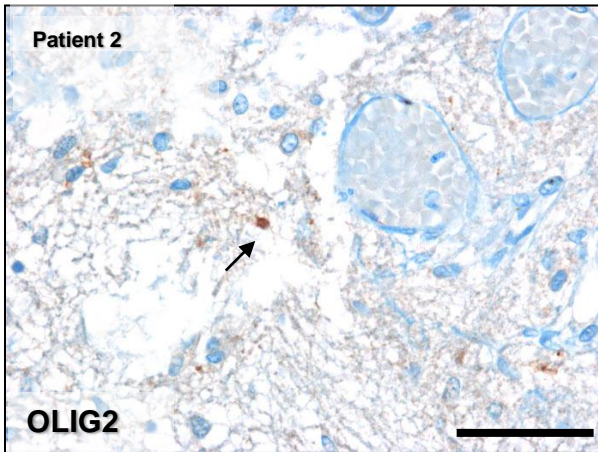
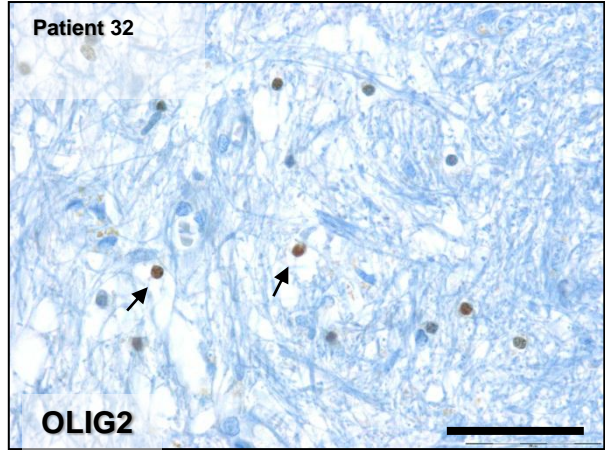
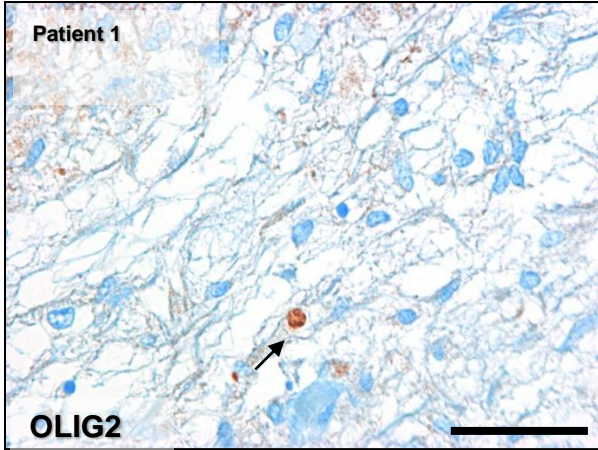
Infarkt



Anti- OLIG2

Gesund

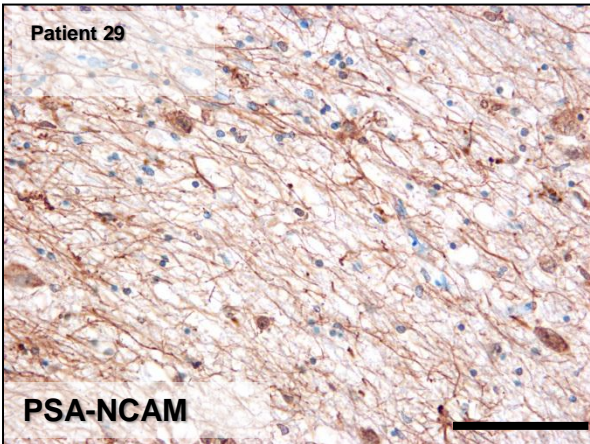
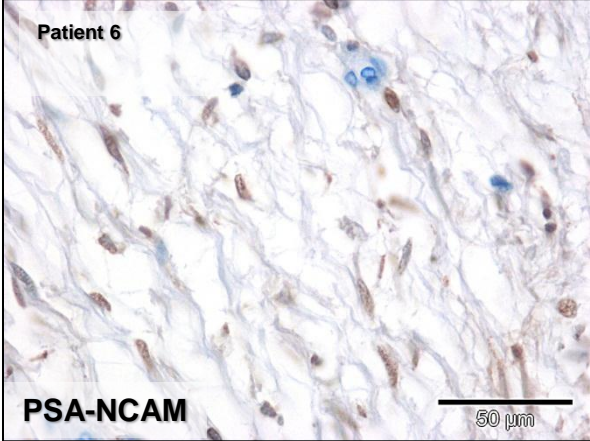
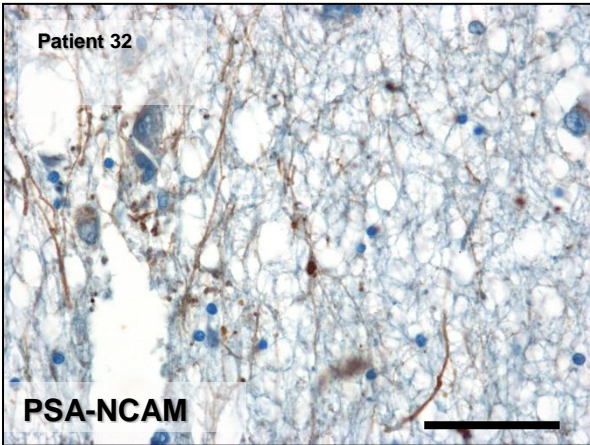
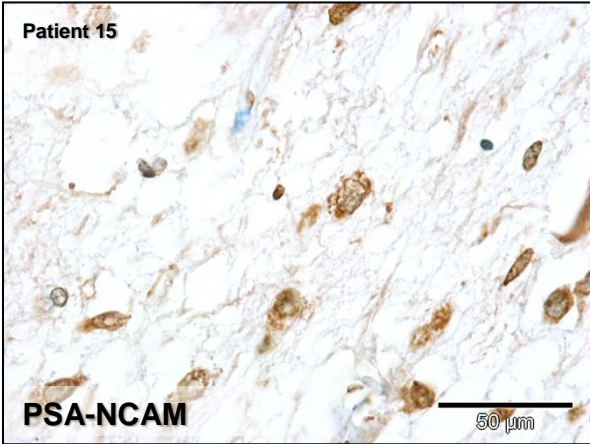
Infarkt



Anti- PSA-NCAM

Gesund

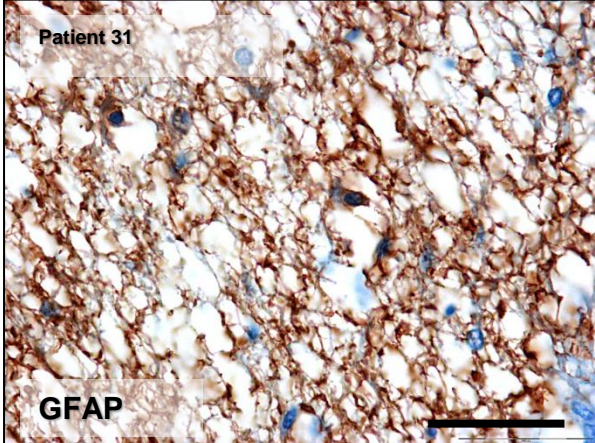
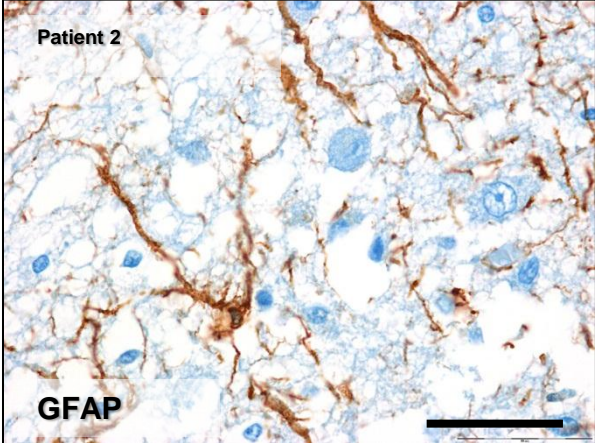
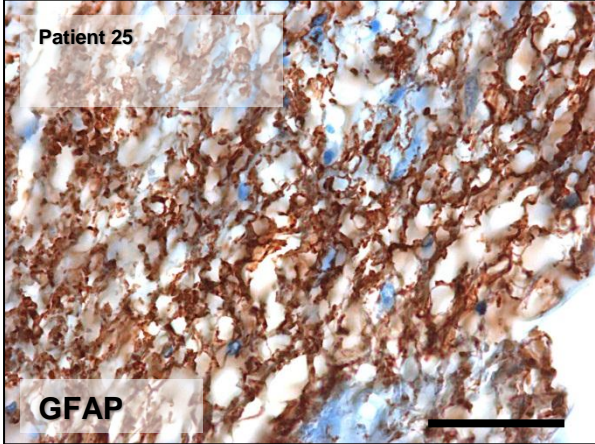
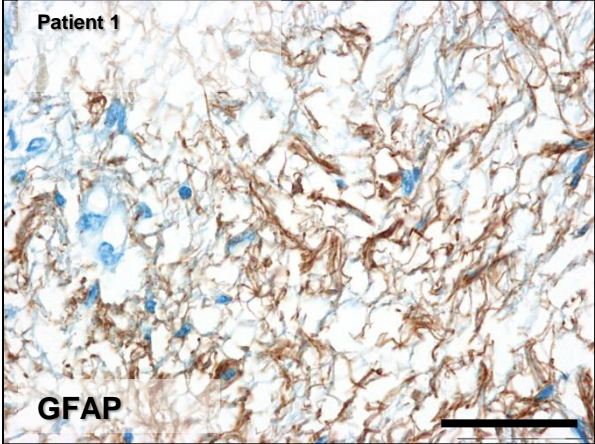
Infarkt



Anti- GFAP

Gesund

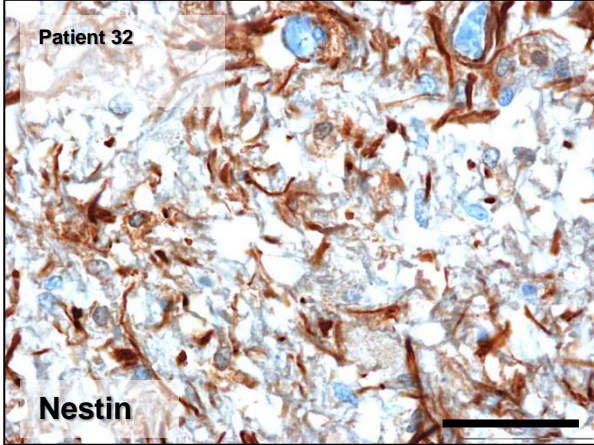
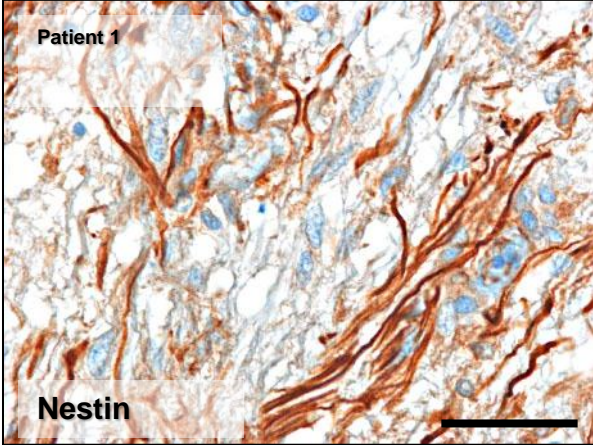
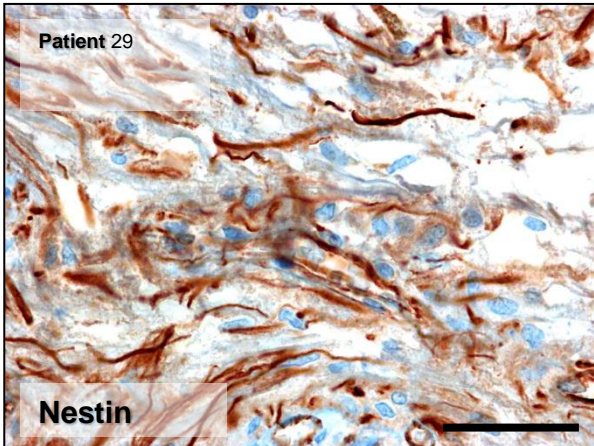
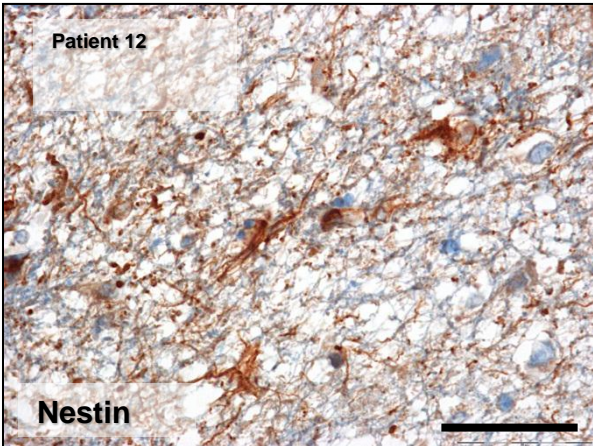
Infarkt



Anti- Nestin

Gesund

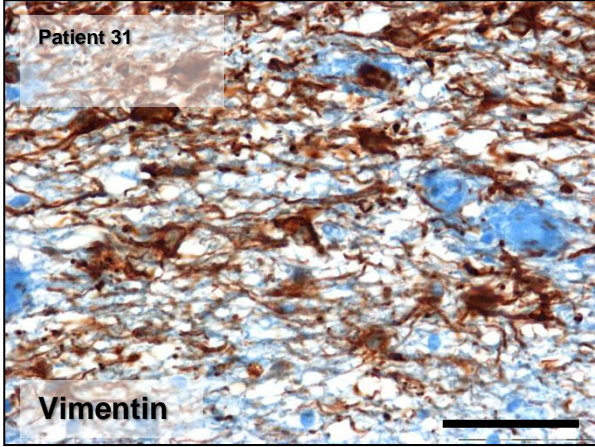
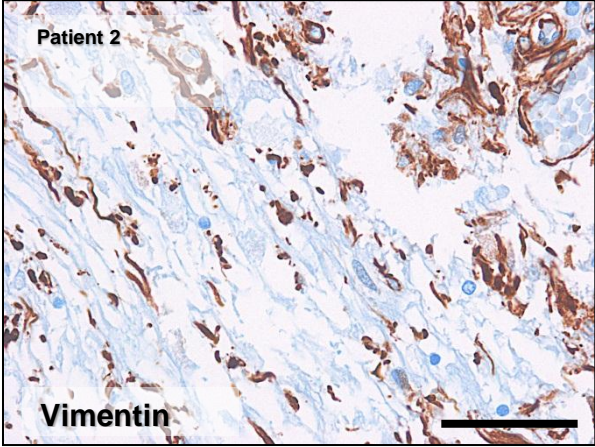
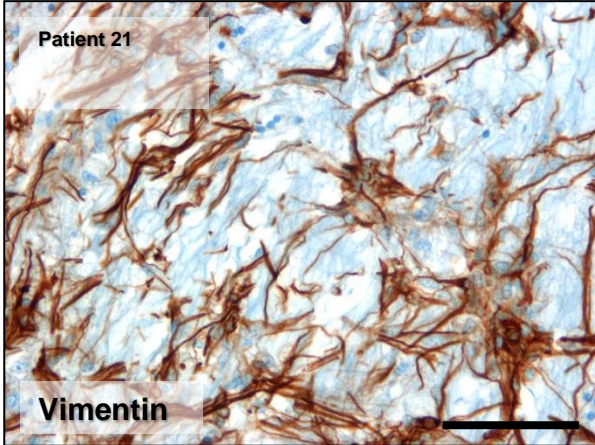
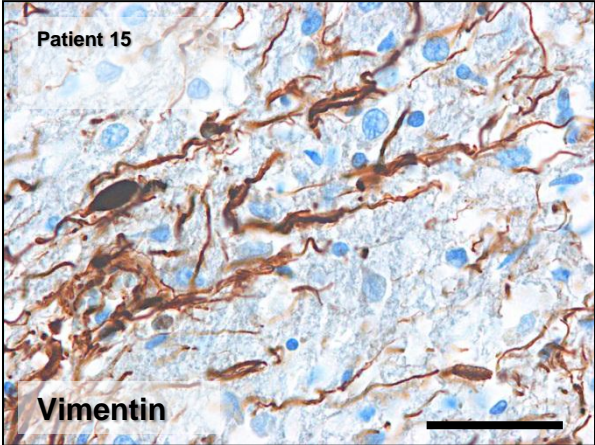
Infarkt



Anti- Vimentin

Gesund

Infarkt



4.1.3 Epiphyse

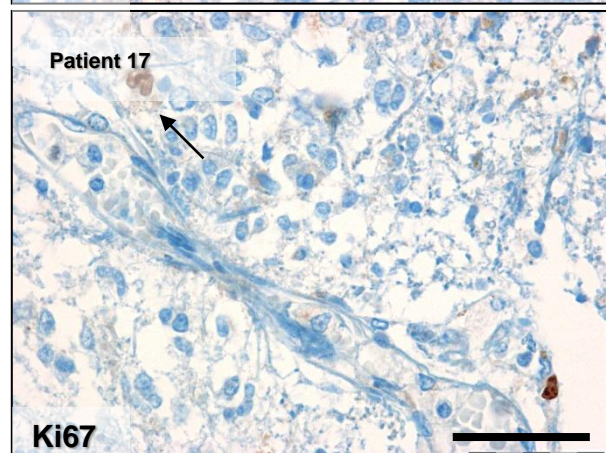
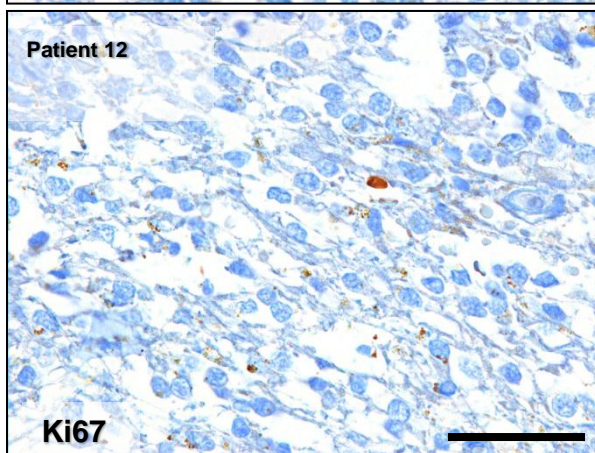
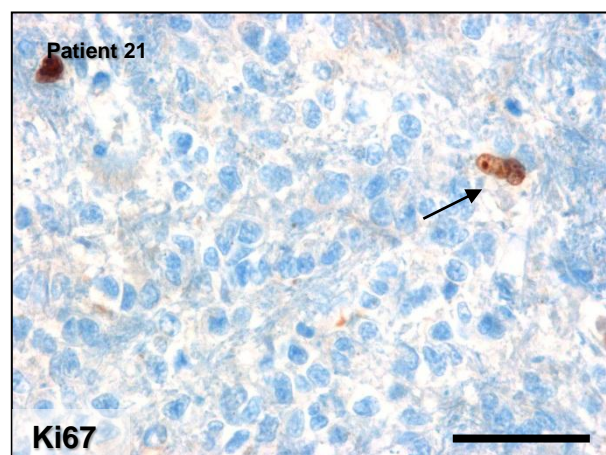
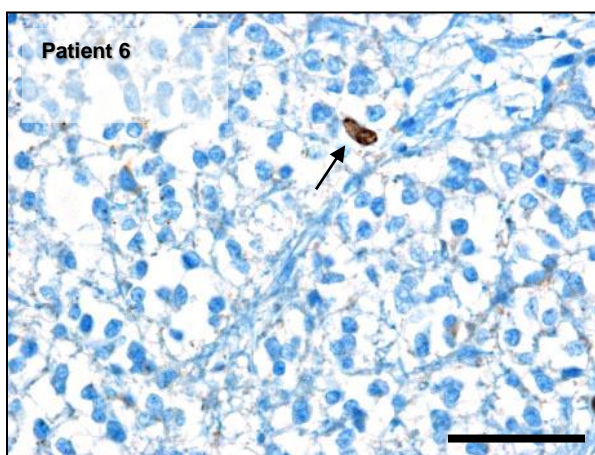
Die folgenden Abbildungen zeigen jeweils zwei Ausschnittsvergrößerungen von Epiphysen aus Gehirnen mit altersentsprechendem Normalbefund und zwei Ausschnitte von Hirngewebe nach ischämischem Infarkt. Es handelt sich um DAB-Einzelfärbungen mit den Antikörpern Anti-Ki67, Anti-OLIG2, Anti-PSA-NCAM, Anti-GFAP und Anti-Nestin.

Die positiven Zellen wurden mit Pfeilen markiert.

Anti- Ki67

Gesund

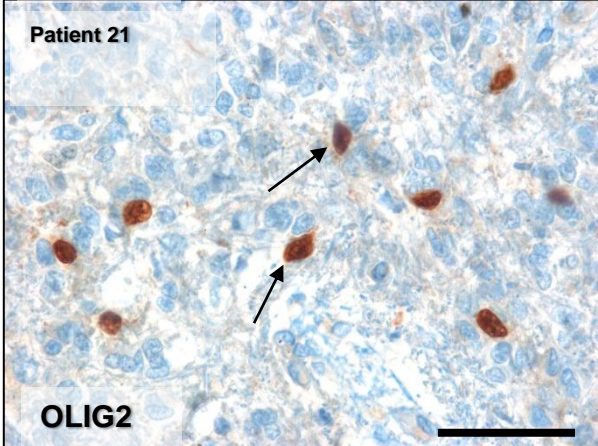
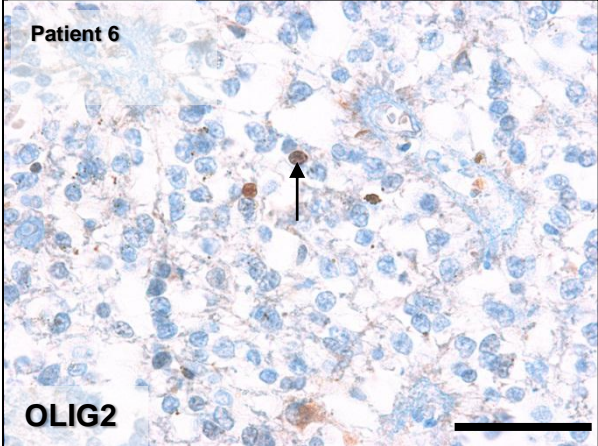
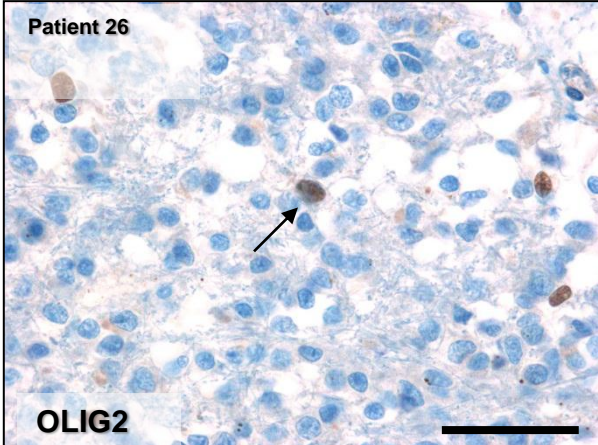
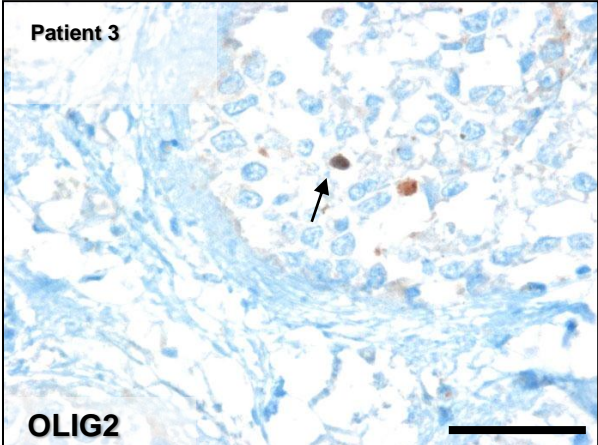
Infarkt



Anti- OLIG2

Gesund

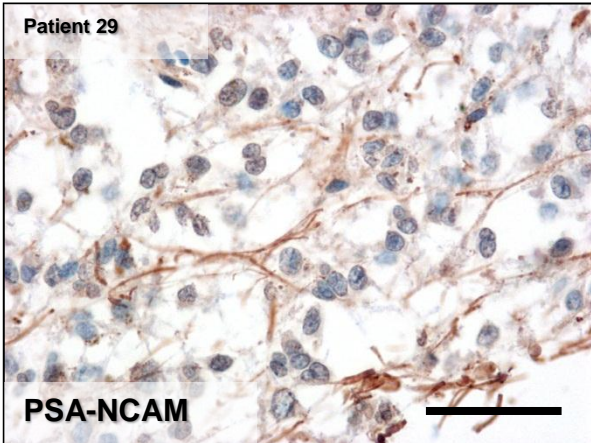
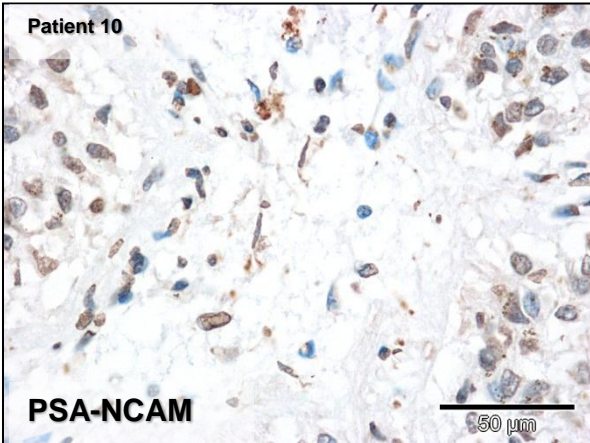
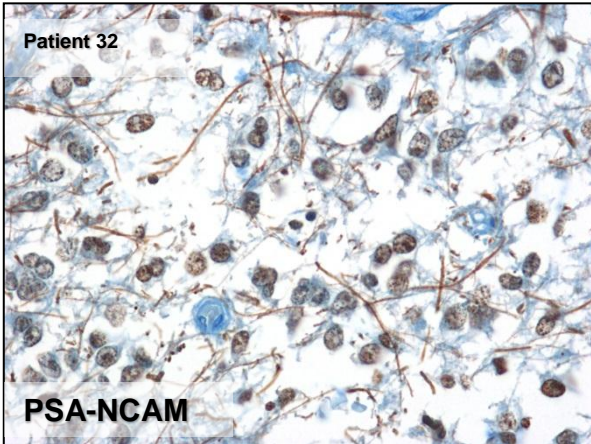
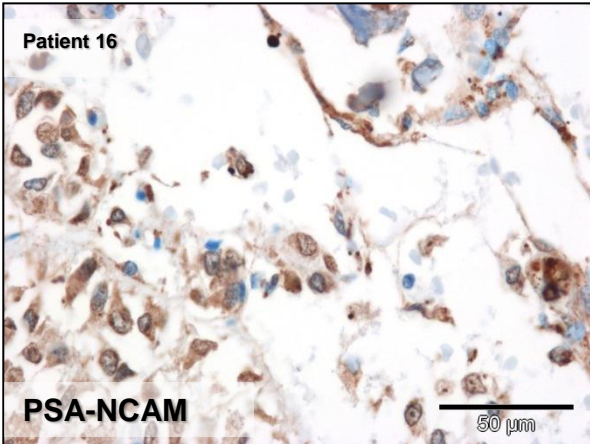
Infarkt



Anti- PSA-NCAM

Gesund

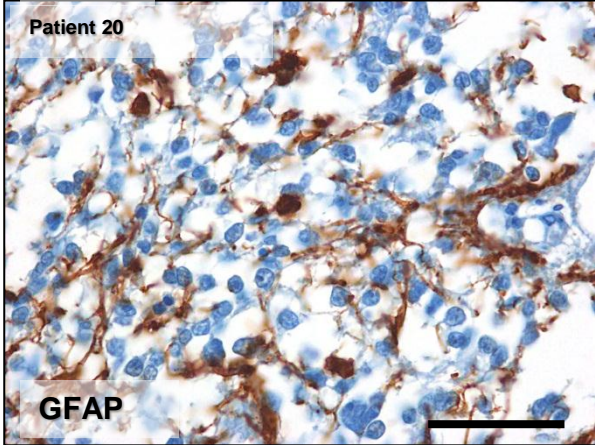
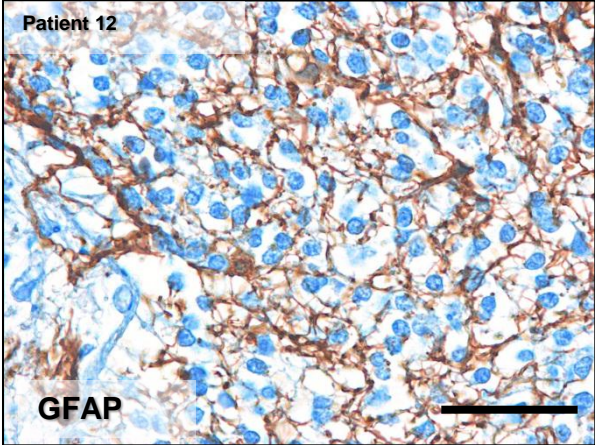
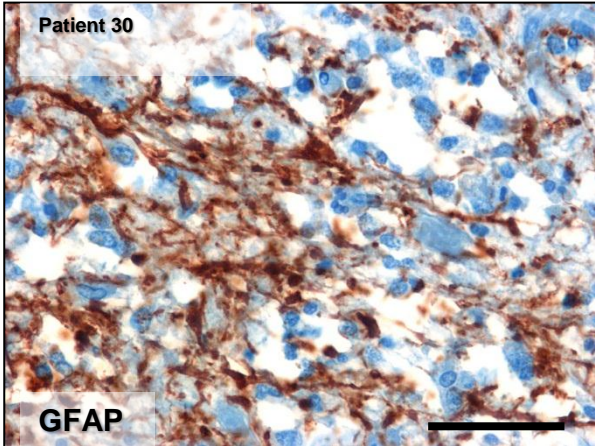
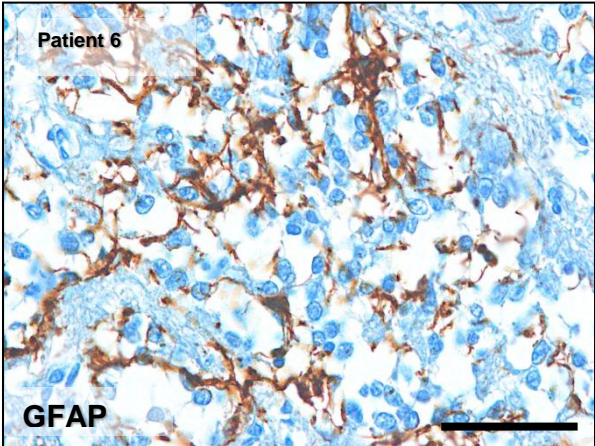
Infarkt



Anti- GFAP

Gesund

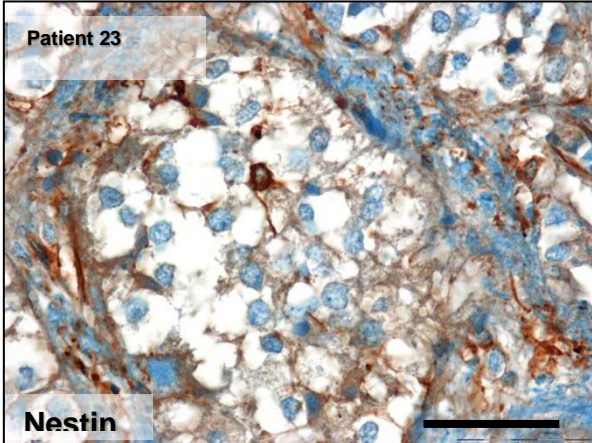
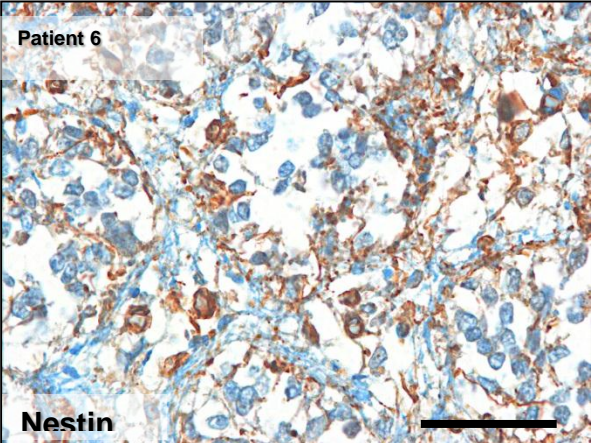
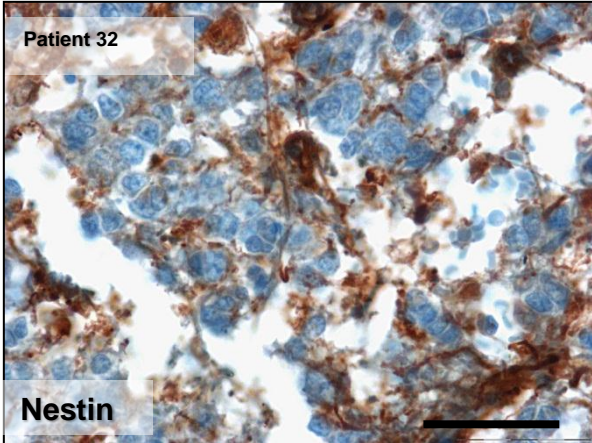
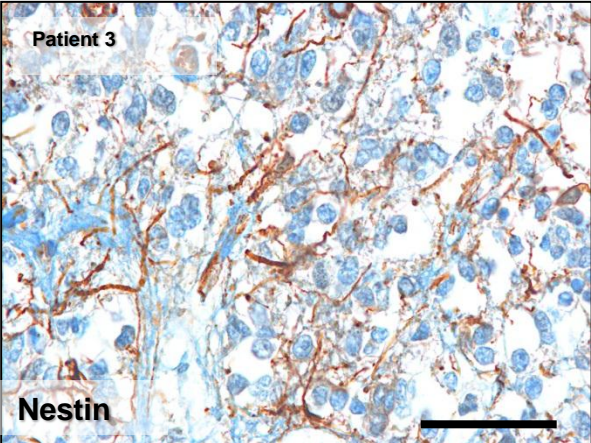
Infarkt



Anti- Nestin

Gesund

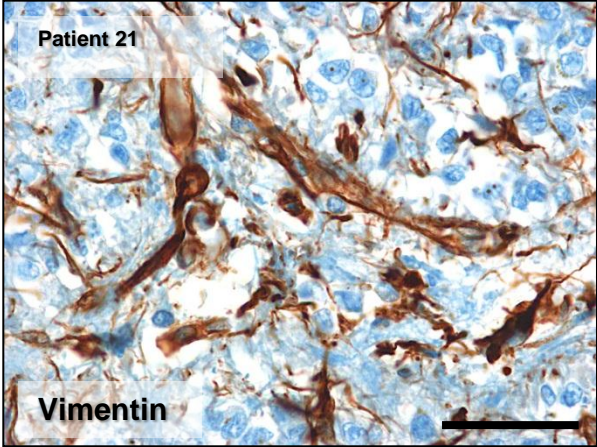
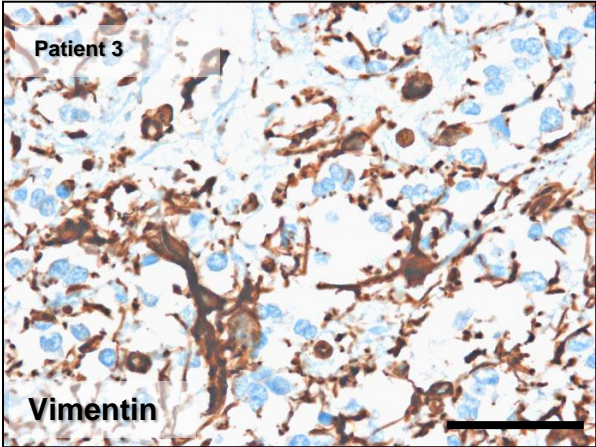
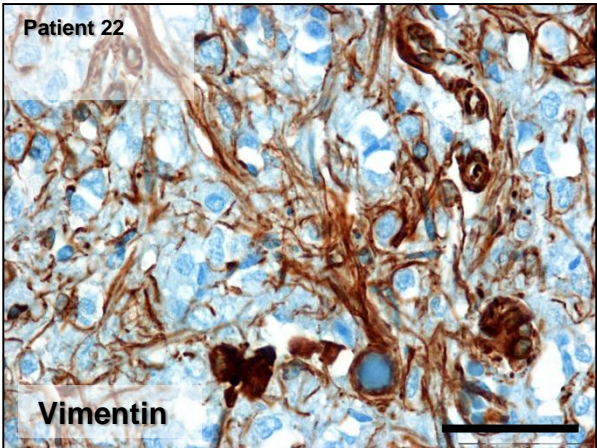
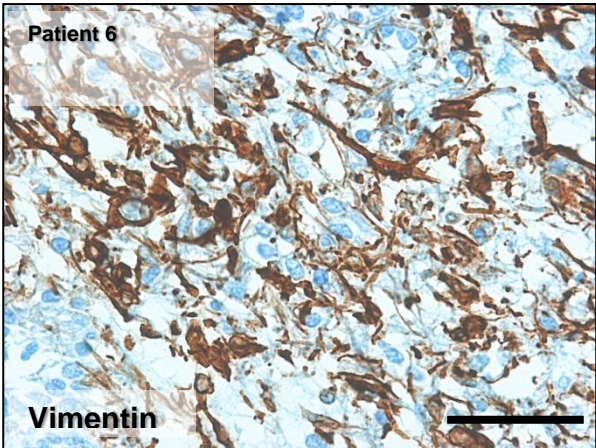
Infarkt



Anti- Vimentin

Gesund

Infarkt



4.1.4 Neurohypophyse

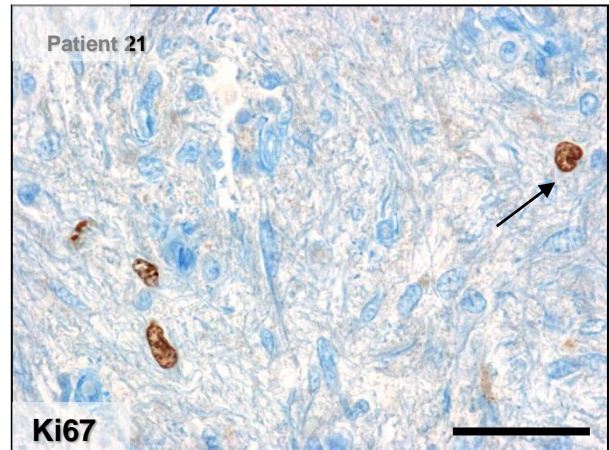
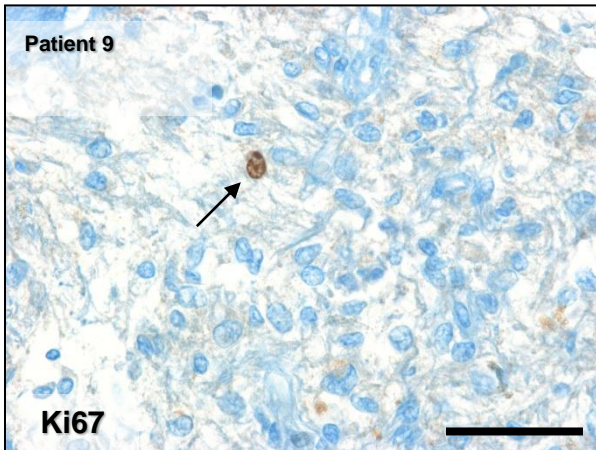
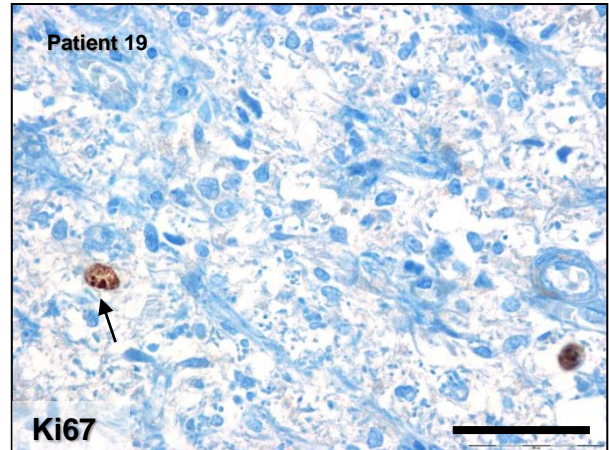
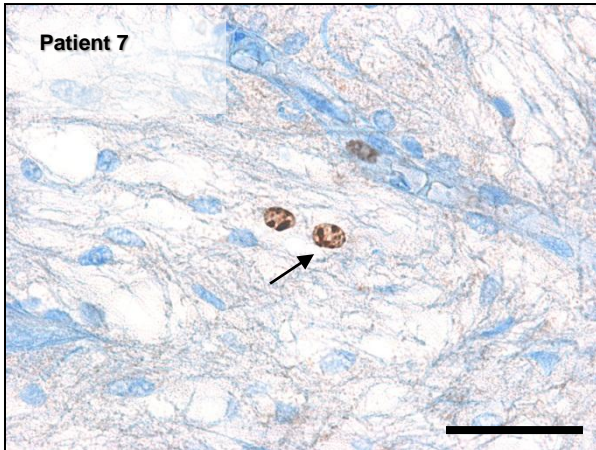
Die folgenden Abbildungen zeigen jeweils zwei Ausschnittsvergrößerungen Epiphysen aus Gehirnen mit altersentsprechendem Normalbefund und zwei Ausschnitte von Hirngewebe nach ischämischem Infarkt. Es handelt sich um DAB-Einzelfärbungen mit den Antikörpern Anti-Ki67, Anti-OLIG2, Anti-PSA-NCAM, Anti-FAP und Anti-Nestin.

Die positiven Zellen wurden mit Pfeilen markiert.

Anti- Ki67

Gesund

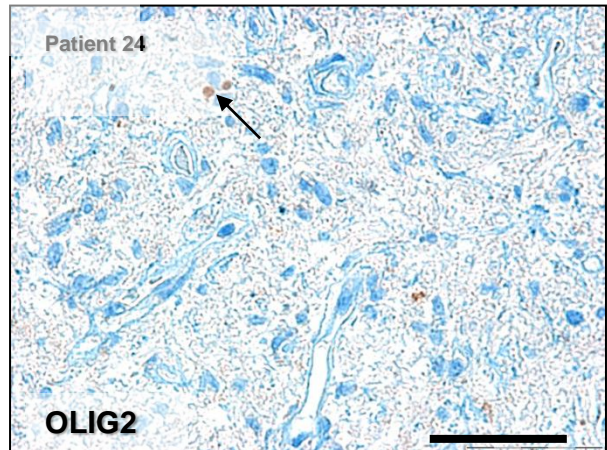
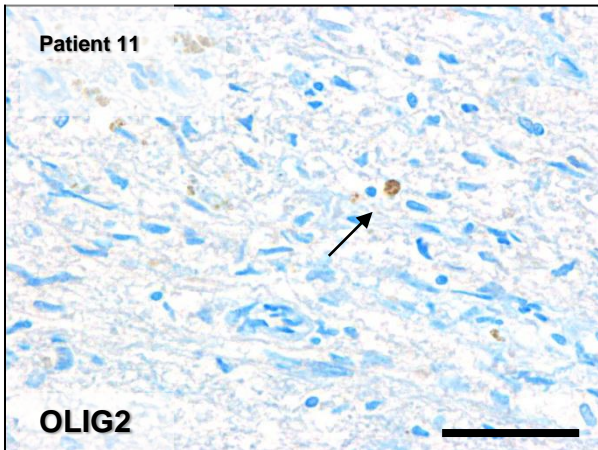
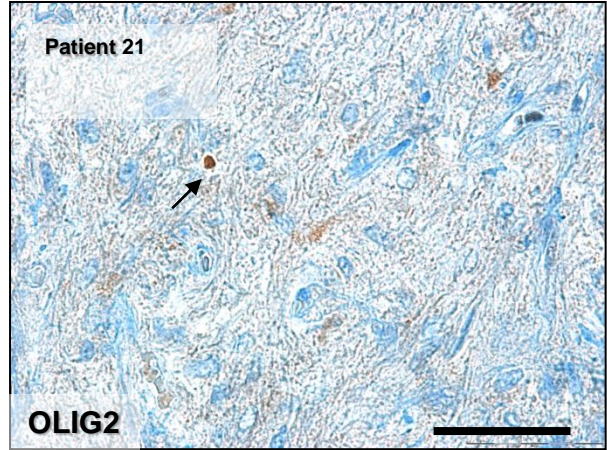
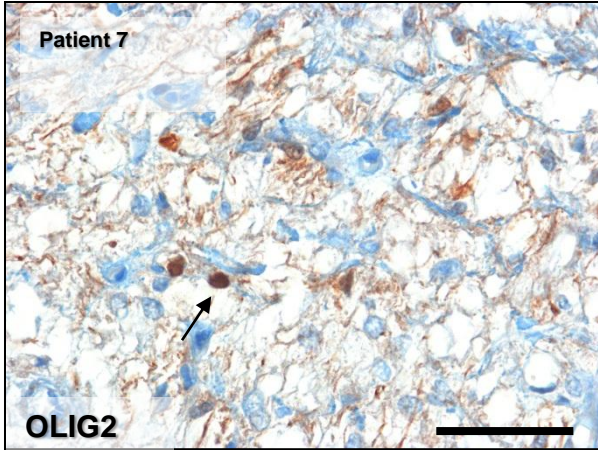
Infarkt



Anti- OLIG2

Gesund

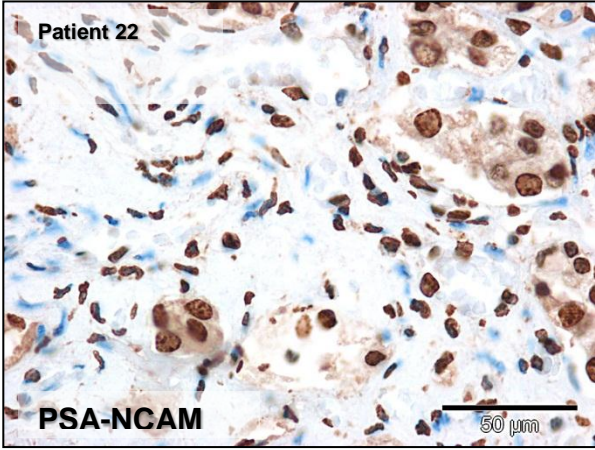
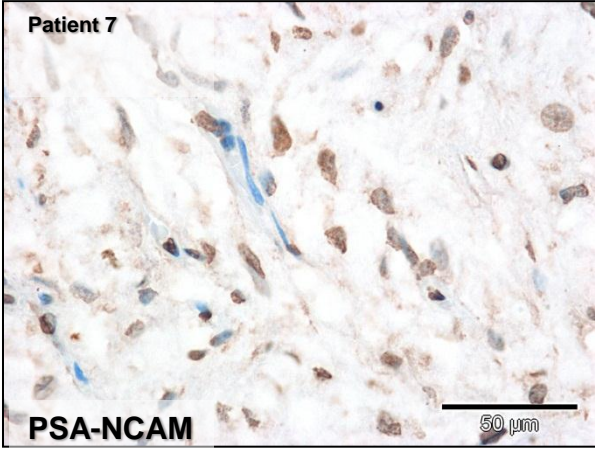
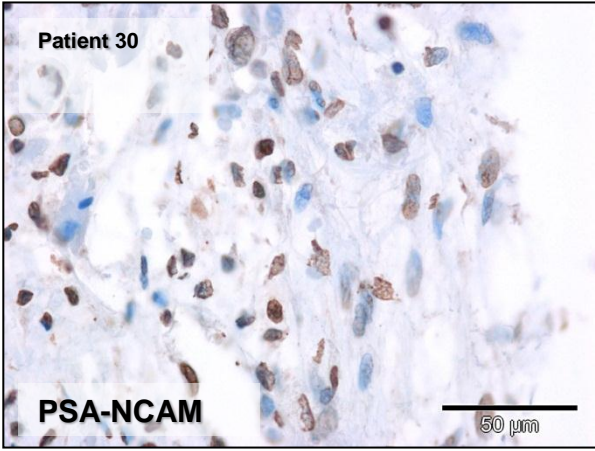
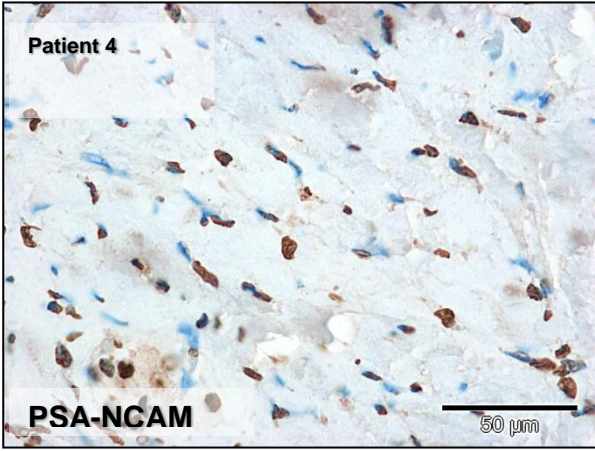
Infarkt



Anti- PSA-NCAM

Gesund

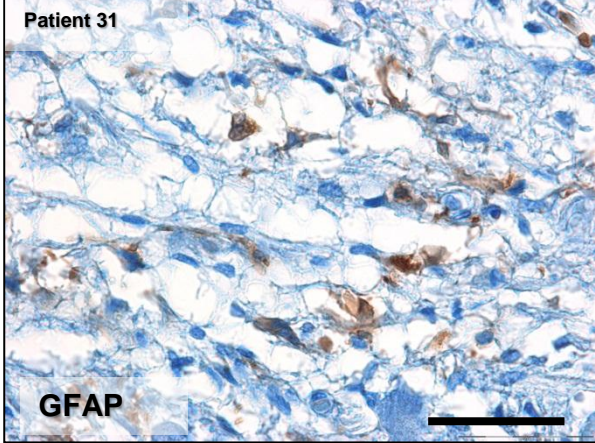
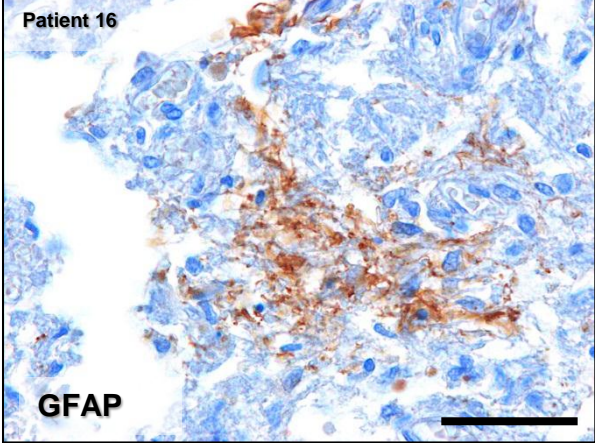
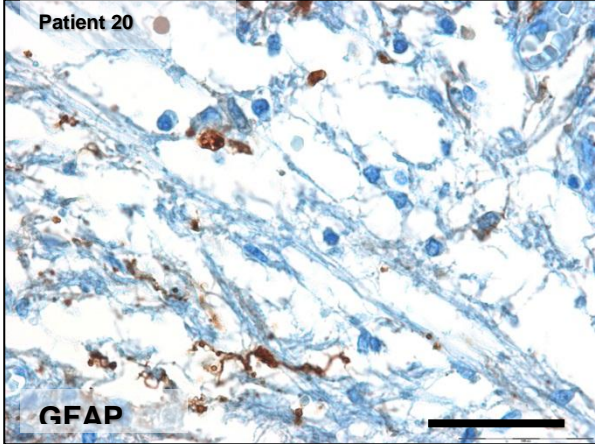
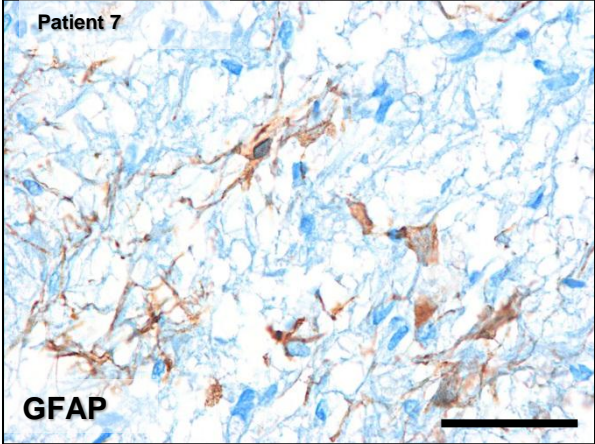
Infarkt



Anti- GFAP

Gesund

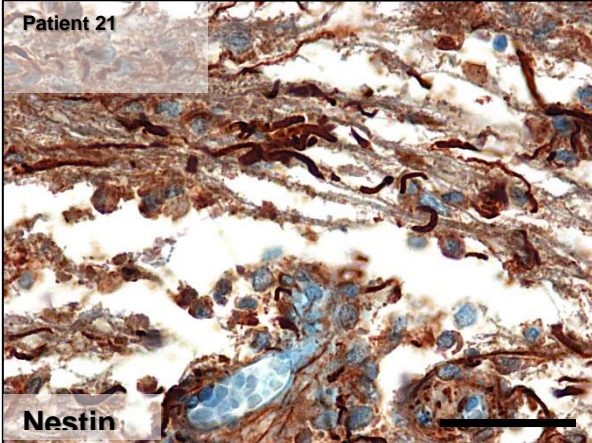
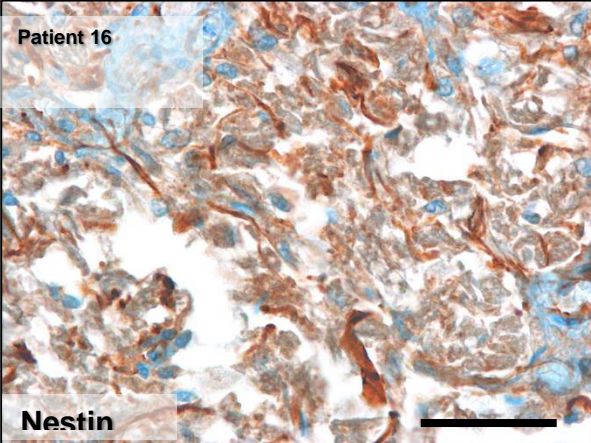
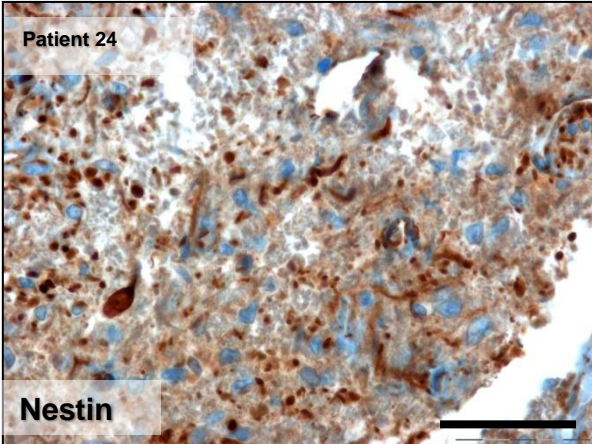
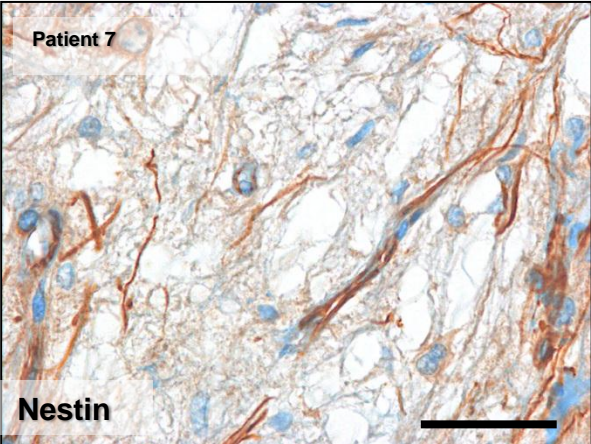
Infarkt



Anti- Nestin

Gesund

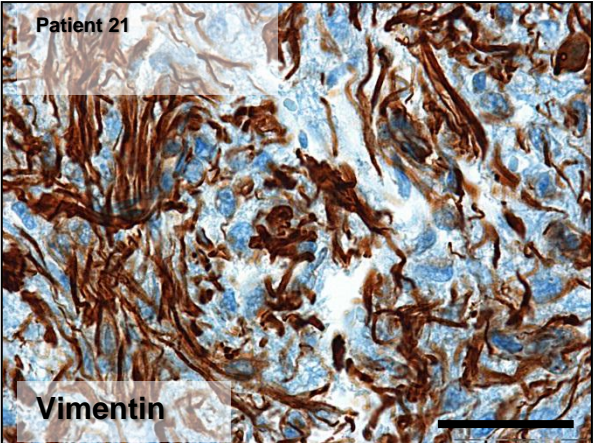
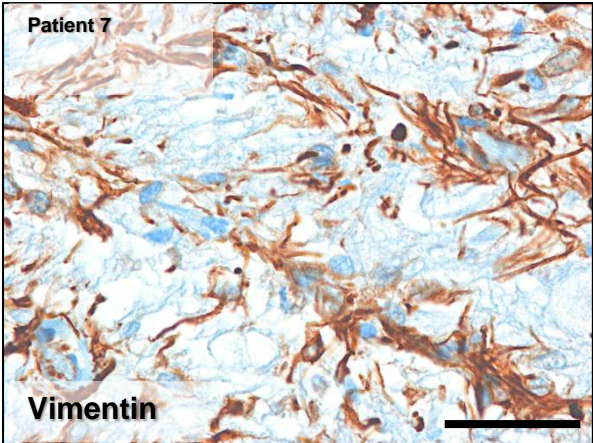
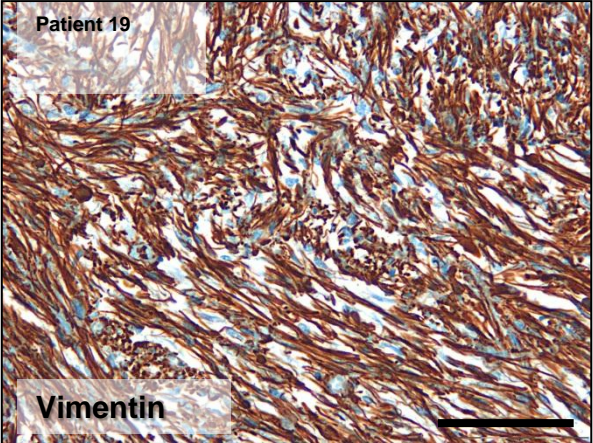
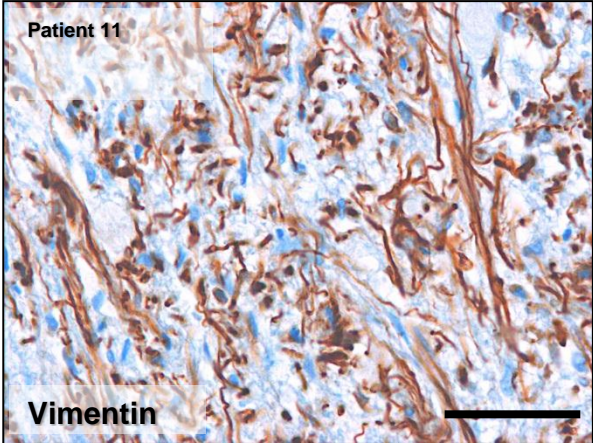
Infarkt



Anti- Vimentin

Gesund

Infarkt



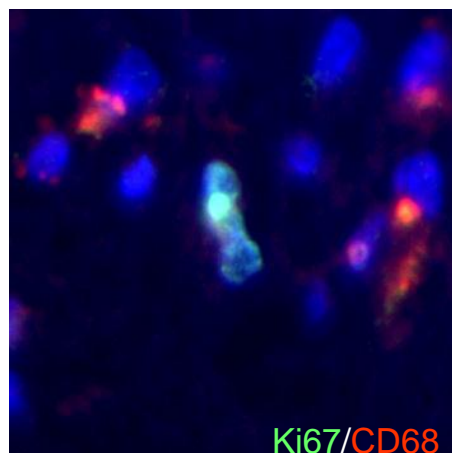
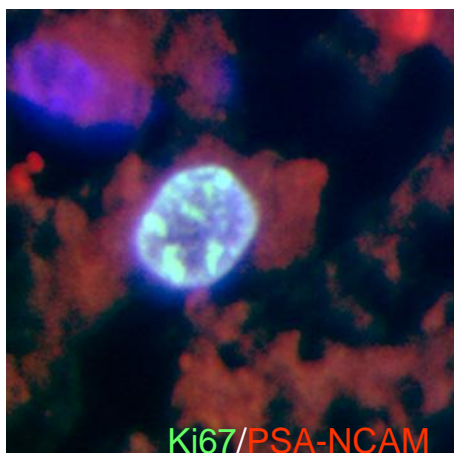
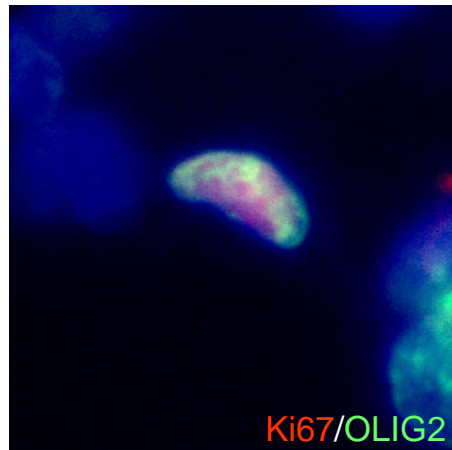
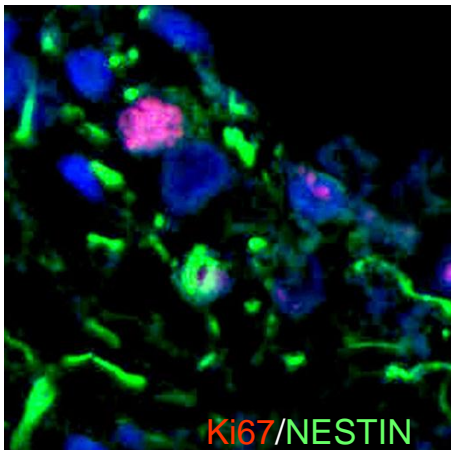
4.2 Doppelfärbungen

In Hinblick darauf, dass Marker wie Nestin, OLIG2 und PSA-NCAM nicht ausschließlich von neuronalen Stammzellen exprimiert werden, wurden nun Doppelfärbungen mit Ki67 durchgeführt. Denn Ki67, ein Proliferationsmarker, wird bekanntermaßen nicht von differenzierten Glia- oder Nervenzellen exprimiert. Die Tatsache, dass es innerhalb der ZVO proliferierende Zellen gibt, die charakteristische Stammzellmarker exprimieren, erhärtet den Verdacht, dass es sich bei den entsprechenden Zellen um NSZ handelt.

Um auszuschließen, dass es sich bei dem deutlich höheren Anteil von proliferierenden Zellen in Infarktgehirnen lediglich um Mikroglia oder Makrophagen handelt, wurden Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen CD68 angefertigt. Die meisten Ki67 positiven Zellen co-exprimieren jedoch kein CD68, wodurch eine reine Entzündungsreaktion nicht für das Vorhandensein proliferierender Zellen verantwortlich sein kann.

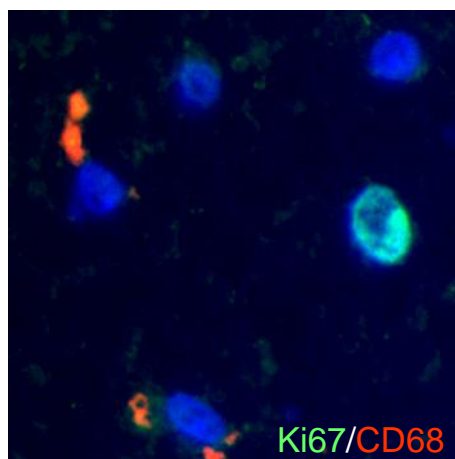
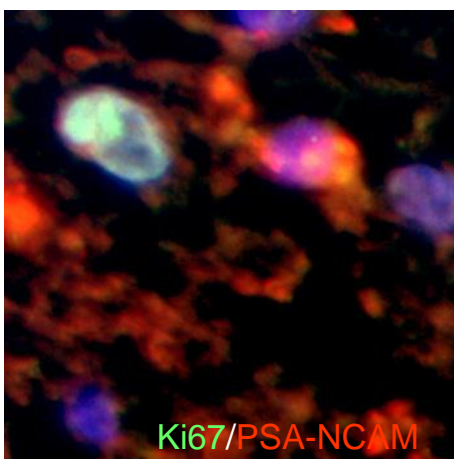
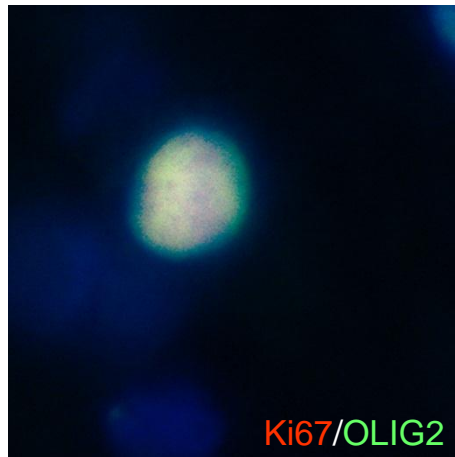
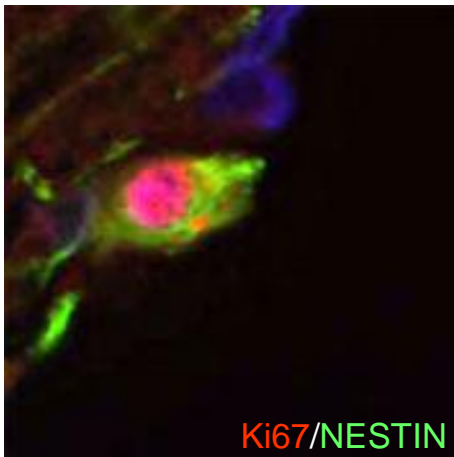
4.3 Area postrema

Die folgenden Abbildungen zeigen Ausschnittsvergrößerungen der Area postrema in Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen.



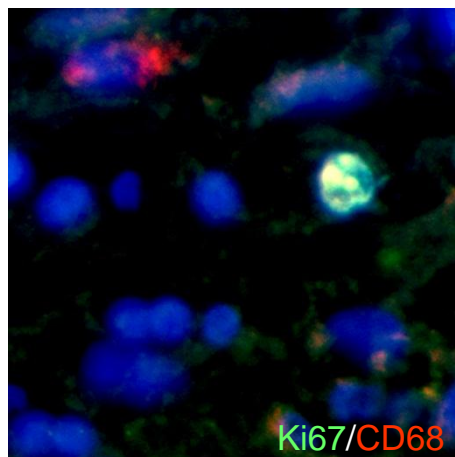
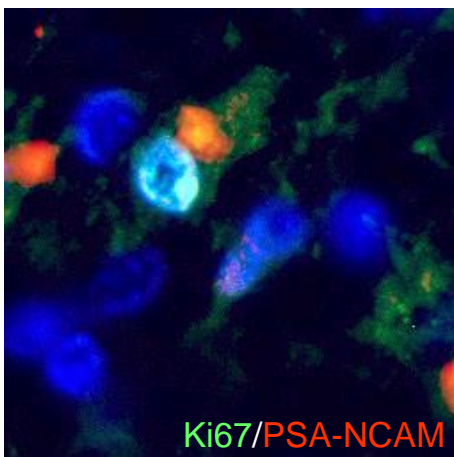
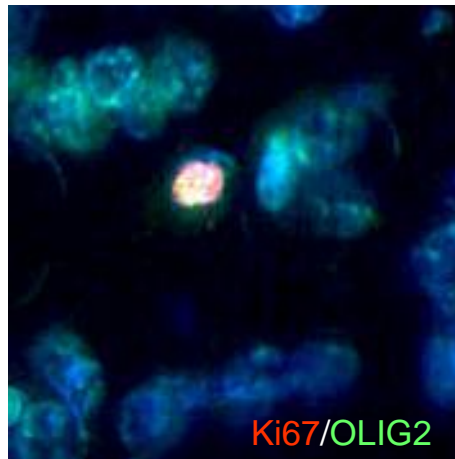
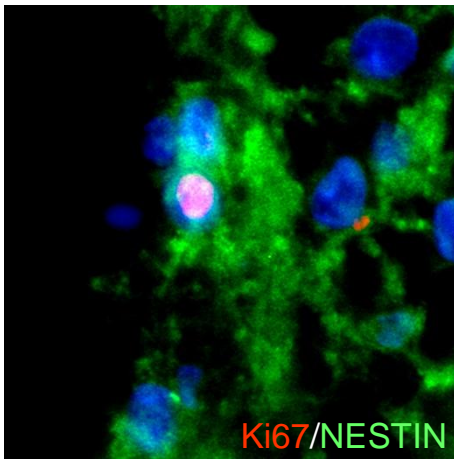
4.3.1 Eminentia mediana

Die folgenden Abbildungen zeigen Ausschnittsvergrößerungen der Eminentia mediana in Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen.



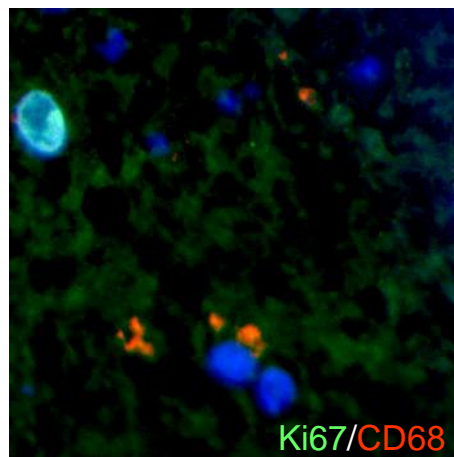
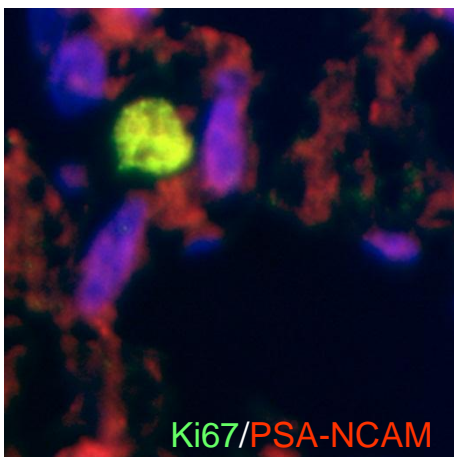
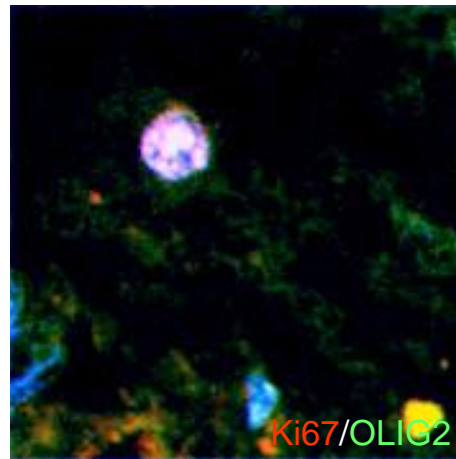
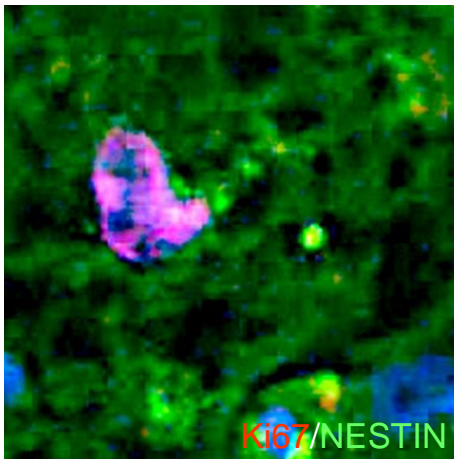
4.3.2 Epiphyse

Die folgenden Abbildungen zeigen Ausschnittsvergrößerungen der Epiphyse in Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen.



4.3.3 Neurohypophyse

Die folgenden Abbildungen zeigen Ausschnittsvergrößerungen der Neurohypophyse in Immunfluoreszenz- Doppelfärbungen.

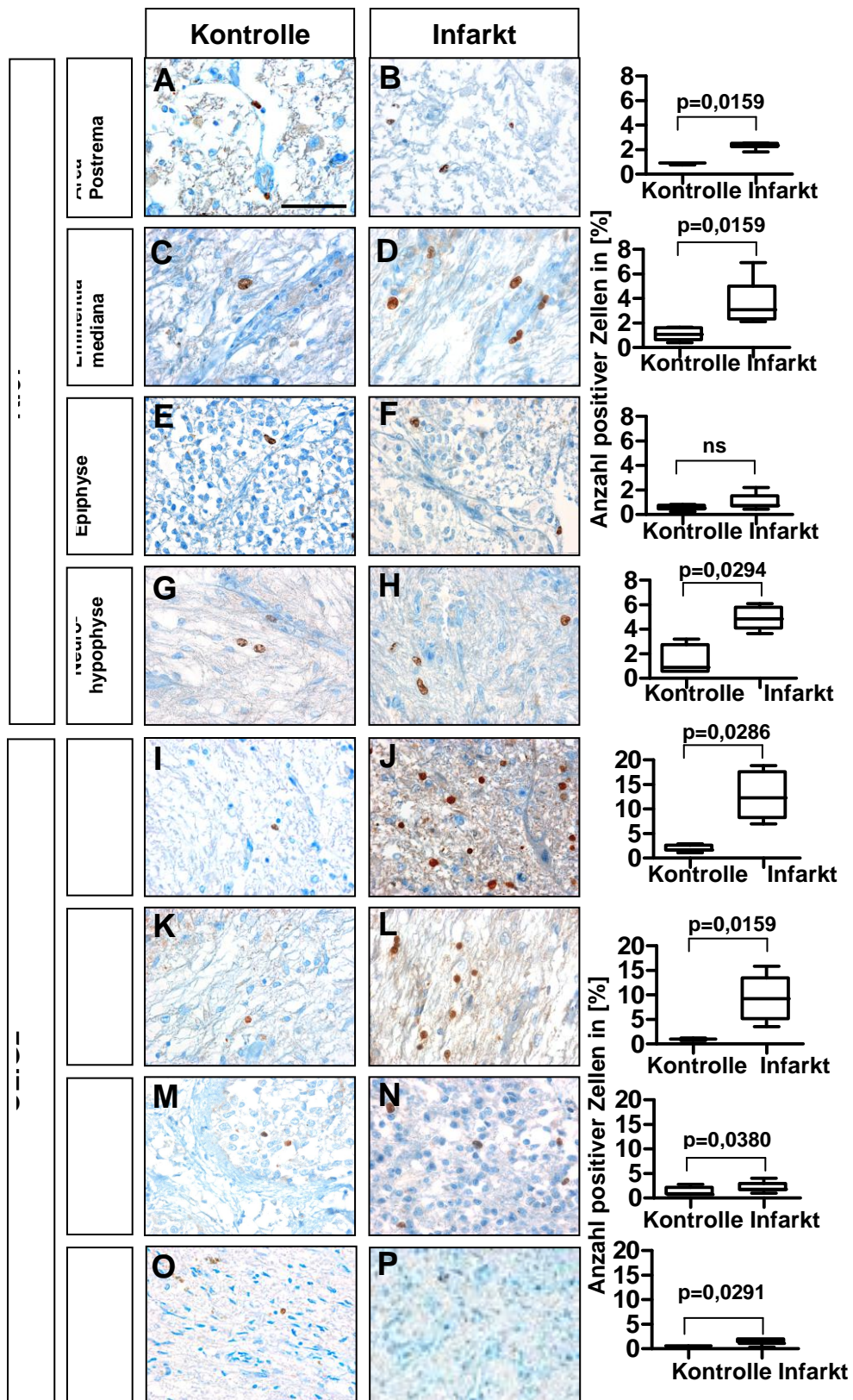


4.4 Statistische Auswertung

Um Unterschiede zwischen Gehirnen mit Gehirnfarkt und Gehirnen mit altersentsprechendem Normalbefund zu ermitteln, wurden Ki67 und OLIG2 positive Zellen mittels ImageJ software in repräsentativen histologischen Schnitten der Area postrema, Eminentia mediana, Neurohypophyse und Epiphyse manuell ausgezählt. Für jedes Organ wurden mindestens 1100 Zellen ausgezählt. Das Ergebnis wurde als Fraktion von positiven Zellen zur totalen Zellzahl in Prozent angegeben. Um die statistische Signifikanz der Ergebnisse zu prüfen, wurden die zwei untersuchten Gruppen (Infarktpatienten versus Normalbefund) mit Hilfe des Mann-Whitney U Tests in GraphPad Prism Software verglichen.

Die Abbildung 6 zeigt die quantitative Analyse von Ki67 (A-L) und OLIG2 (M-X) – positiven Zellen in ZVO von gesunden Gehirnen (linke Spalte) im Vergleich zu Infarktgehirnen (rechte Spalte). Die Maßstabskala beträgt 50 µm.

Abbildung 6: Quantitative- und statistische Auswertung von gesunden - versus Infarktgehirne



Aus Tabelle 2 sind die genauen Zellzahlen der untersuchten Gehirne (n) und der prozentuale Anteil von Ki67 und OLIG2-positiven Zellen zu entnehmen.

Tabelle 2:

| ZVO \ AK | Ki67 | | OLIG2 | |
|-------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| | Kontrolle | Infarkt | Kontrolle | Infarkt |
| Area postrema | n=4 14/1587 0,89% | n=5 37/1557 2,38% | n=4 34/1683 2,02% | n=4 149/1191 12,51% |
| Eminentia mediana | n=4 40/3819 1,05% | n=5 91/2159 4,21% | n=4 35/3592 0,97% | n=5 150/1783 8,41% |
| Epiphyse | n=4 32/6000 0,53% | n=5 42/4779 0,88% | n=4 46/4000 1,15% | n=4 83/2955 2,80% |
| Neurohypophyse | n=4 53/3756 1,41% | n=4 109/2412 4,52% | n=4 24/3683 0,65% | n=4 21/1642 1,29% |

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

Für die Studie wurden insgesamt 32 Gehirne wie im Methodenteil beschrieben prozessiert und neuropathologisch untersucht. Dabei wurde versucht, Area postrema, Eminentia mediana, Epiphyse und Neurohypophyse zu entnehmen. Nicht bei jedem Gehirn gelang die vollständige Entnahme aller vier ZVO. Für die statistische Auswertung wurden dennoch pro Organ mindestens vier verschiedene Gehirne untersucht.

Um die Stammzellmarker Nestin, GFAP, OLIG2, PSA-NCAM und Vimentin in Zellen innerhalb der ZVO nachzuweisen, wurden immunhistochemische Einzel- und Doppelfärbungen angefertigt. Dabei ist zu erwähnen, dass die Qualität der Färbung von der unterschiedlich langen Postmortem-Zeit und der sorgfältigen Konservierung des Hirngewebes abhängt. Aufgrund der zum Teil schlechten Gewebequalität des Autopsiematerials konnten nicht in allen Gewebeschnitten auswertbare Antikörperfärbungen durchgeführt werden. Für den Erhalt von repräsentablen Ergebnissen wurden für jeden Antikörper Positivkontrollen hinzugezogen und negative Gewebeproben aus der Analyse entfernt.

Nicht in jedem Gehirn konnten in den entsprechenden ZVO positive Zellen nachgewiesen werden. Dies kann verschiedenste Ursachen haben. Meist war die schlechte Gewebequalität für die unzureichende Färbung verantwortlich. In einigen Gehirnen waren dennoch keine positiven Zellen zu finden. Dabei gilt es zu beachten, dass es sich um Gewebeschnitte von maximal 5 µm Dicke handelt und eine Zelle einen Durchmesser von 4-20 µm hat. Diese Tatsache erklärt, dass nicht in allen ZVO positive Zellen identifiziert werden konnten, da je nach Serienschnitt zufällig unterschiedlich viele Zellen angeschnitten wurden.

Bisher gibt es keinen spezifischen Antikörper, um neuronale Stammzellen nachzuweisen. Deshalb wurden mehrere Antikörper ausgewählt und kombiniert.

Um die Häufigkeit von potentiellen Vorläuferzellen innerhalb der ZVO zu bestimmen, wurden Ki67- und OLIG2- positive Zellen quantifiziert. Da es sich bei den zwei genannten Antikörpern um nukleäre Marker handelt, konnten positive Zellen zuverlässig und valide ausgezählt werden. Wie in den Ergebnissen ersichtlich, erlauben andere Antikörper wie beispielsweise Nestin oder GFAP keine eindeutige Quantifizierung. Die Anzahl der ausgezählten Zellen reichte von 1032 bis ca. 6000 Zellen. Die breite Differenz zwischen den Zellzahlen lässt sich durch die anatomischen und morphologischen Unterschiede zwischen den einzelnen ZVO erklären. Zudem konnte es bei Entnahme, im Anschnitt oder während des histologischen Prozessierens zu erheblichen Größenunterschieden kommen. Dennoch konnten durch die hohe Mindest-Gesamtzellzahl (1000) und durch das Auszählen von mindestens vier verschiedenen Fällen valide Ergebnisse erzielt werden.

Außerdem wurden einige Stichproben ausgewählt und von einer unabhängigen Person verblindet ausgewertet. Die Ergebnisse korrespondierten in allen Fällen.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Zirkumventrikuläre Organe besitzen Zellen, die charakteristische Stammzellmarker exprimieren und proliferieren können.

Hierfür wurden 16 Gehirne mit altersentsprechendem Normalbefund untersucht. Dabei wurden in den vier ausgewählten ZVO Zellen detektiert, die positiv für Stammzellmarker wie GFAP, Nestin, Vimentin, PSA-NCAM, OLIG2 waren. Um ihre Proliferationsfähigkeit zu ermitteln, wurden immunhistochemische Färbungen mit Anti-Ki67 durchgeführt. In allen untersuchten ZVO wurde eine geringe Anzahl von teilungsfähigen Zellen nachgewiesen. Um auszuschließen, dass es sich bei den gefundenen Zellen um Mikroglia oder Makrophagen handelt, wurden Doppelfärbungen mit Ki67 und CD68 durchgeführt. Die Mehrheit Ki-67 positiver Zellen exprimierte jedoch kein CD68..

In Hinblick darauf, dass Nestin, OLIG2 und PSA-NCAM nicht nur von neuronalen Stammzellen exprimiert werden, wurde eine Co-Lokalisation der genannten Marker mit Ki67 untersucht. In den untersuchten ZVO wurden Zellen detektiert, die Ki67 positiv waren und gleichzeitig Nestin, OLIG2 oder PSA-NCAM exprimierten. Die Zusammenfassung der immunhistochemischen Einzel- und Doppelfärbungen erhärten den Verdacht, dass es sich bei den entdeckten Zellen um potentielle neuronale Stammzellen handelt.

Ein Gehirnfarkt induziert Rekrutierung und Proliferation von Zellen, die Stammzellmarker exprimieren.

Um die Frage zu klären, welche NSZ in humanen ZVO das Potential besitzen, auf pathologische Ereignisse zu reagieren und adulte Neurogenese zu induzieren, wurden weitere 16 Gehirne mit Gehirnfarkt untersucht. Im Einzelnen wurden dabei Zellen gesucht, die positiv für die Markerproteine Ki67 oder OLIG2 waren. Anschließend wurde die Anzahl positiv markierter Zellen quantifiziert und mit den gesunden Kontrollgehirnen verglichen (siehe Quantifikation und Statistik). Mit Ausnahme der Epiphyse zeigten alle untersuchten ZVO von Infarktgehirnen einen signifikanten Anstieg von Ki67 - positiven Zellen im Vergleich zu den Kontrollgehirnen. Ähnlich verhielt es sich mit der Anzahl von OLIG2- positiven Zellen. In allen ZVO von Infarktgehirnen wurde ein signifikanter Anstieg verzeichnet. Detaillierte Ergebnisangaben sind aus Tabelle 2 zu entnehmen. Zudem wurden auch in den ZVO von Infarktgehirnen Ki67-positive Zellen gefunden, die gleichzeitig Nestin, OLIG2 oder PSA-NCAM exprimierten und negativ für CD68 waren. Schlussfolgernd scheint ein Gehirnfarkt mit einem signifikanten Anstieg von Zellen, die Stammzellmarker exprimieren, einherzugehen.

Die Ergebnisse suggerieren, dass es in der Area postrema, Eminentia mediana, Epiphyse und Neurohypophyse NSZ gibt, die sich nach pathologischem Infarktgeschehen aktiv teilen, um möglicherweise Zellverluste auszugleichen und Reparationsvorgänge einzuleiten. Die Ergebnisse dieser Studie korrespondieren mit jenen der Forschungsgruppe Benett et al. [31], die bereits 2009 neuronale Stammzellen mit einem ähnlichen Markerprofil in den ZVO von gesunden adulten Nagetieren nachgewiesen hat. Zudem stellt diese Arbeit eine Erweiterung von früheren Studien dar, die ihr Augenmerk auf einzelne ZVO in Nagetieren legten. Beispielsweise wurden Nestin- und GFAP- positive Zellen in der Eminentia mediana sowie in der Area postrema von Mäusen nachgewiesen. [79] Eine andere Studie entdeckte in der Neurohypophyse von Nagetieren eine Gruppe von Zellen, die Transkriptionsfaktoren exprimierten, welche mit Stammzeleigenschaften assoziiert sind. [80]

Ob es in adulten humanen ZVO neuronale Vorläuferzellen gibt und welche davon auf pathologische Veränderungen reagieren, wurde bis dato in keiner anderen vorherigen Studie erforscht.

Seit Beginn der Erforschung adulter Neurogenese stellte sich zunehmend die Frage, ob das menschliche Gehirn auf pathologische Stimuli mit einer Rekrutierung von NSZ reagiert. Im Tiermodell wurden bereits evidente Hinweise auf eine beschleunigte Neurogenese nach induziertem Gehirnfarkt gefunden. [9] Obwohl die funktionelle Regeneration nach Gehirnfarkt limitiert ist, haben zahlreiche Studien gezeigt, dass das menschliche Gehirn durchaus ein reparatives Potential besitzt und durch die Aktivierung der endogenen Neurogenese auf Schädigungen im Rahmen einer zerebralen Ischämie antwortet. [9, 37, 57]

In dieser Forschungsarbeit zeigte sich ein signifikanter Anstieg von Ki67- und OLIG2-positiven Zellen in ZVO von adulten humanen Infarktgehirnen. Die Mehrheit von Ki67-positiven Zellen wies keine Co- Expression mit CD68 auf. Deshalb kann eine vermehrte Existenz von Mikroglia oder Makrophagen infolge eines Infarktgeschehens nicht als hinreichende Erklärung für den Anstieg von proliferierenden Zellen herangezogen werden.

Es erscheint naheliegend, dass die Zunahme der Anzahl von neuronalen Vorläuferzellen, welches bereits ein bekanntes Phänomen der SVZ und SGZ in Gehirnen nach ischämischem Infarkt darstellt [9, 53], ebenso in den ZVO erfolgt.

Als Reaktion auf einen ischämischen Gehirnschaden kommt es zu einer vermehrten Ausbildung von neuen Kapillaren und Blutgefäßen. [81] Dieser Prozess ist maßgeblich für Neovaskularisierung, Regeneration und Neurogenese nach einem Gehirnfarkt. Dabei scheinen die neu entstandenen Blutgefäße als Leitstruktur für die Migration von neuronalen Vorläuferzellen zu fungieren. [21, 81]

Auch in dieser Arbeit wurden Zellen, die Stammzellmarker exprimieren, vermehrt in unmittelbarer Nähe zu Blutgefäßen gefunden. (siehe unter 4.1.1.1 Anti Ki67, Patient 5 und Patient 21 sowie unter 4.1.3.1 Anti Ki67 Patient 17) Dieser Befund entspricht jenem, wie er bereits in der SVZ von Ratten festgestellt wurde. In der SVZ wurden NSZ in Nachbarschaft zu Blutgefäßen gefunden. Diese bilden eine vaskuläre Nische und erhalten somit die proliferative Aktivität von NSZ. [82, 83] Gleichwohl induziert ein Gehirnfarkt die endogene Neurogenese in der SVZ von adulten Nagetieren und führt zudem zu einer Migration der NSZ ins geschädigte Striatum. [84-86] Die Frage, ob Zellen aus ZVO möglicherweise zum Ort des Infarktgeschehens migrieren, um vor Ort den Zellverlust zu ersetzen, sollte durch weitere Studien, die Tiermodelle mit einschließen, geklärt werden. Dennoch erscheinen die ZVO durch ihre besonders gute Vaskularisierung und das Fehlen einer Blut-Hirnschranke geradezu ideal für Interaktionen zwischen Vorläuferzellen, Blutgefäßen und Signalen aus dem Körperkreislauf.

Es gibt außer dem ischämischen Hirnfarkt viele weitere Situationen, in denen adulte Neurogenese der SVZ und SGZ beschrieben wurde. In autoptischem Hirngewebe von Patienten mit Gehirnfarkt, Hirnblutung oder Multipler Sklerose wurden evidente Hinweise für proliferative Reaktionen von neuronalen Zellen im Rahmen der endogenen Neurogenese gefunden. [87, 88] So haben mechanische Traumen oder Epileptische Krampfleiden einen steigernden Effekt auf adulte Neurogenese. [89] Der Effekt auf die Demenz vom Alzheimerotyp scheint jedoch weiter ungeklärt. [4] Einige Studien beobachteten einen Abfall im Langzeit-Überleben von Mäusegehirnen, die an Alzheimer erkrankt waren [90], die meisten Forschungen zeigten jedoch eine deutliche Steigerung der Neurogenese in der SGZ. [91, 92]

Man vermutet, dass eine überschießende Neurogenese, wie sie auf einen pathologischen Reiz hin erfolgen kann, zu verschiedenen neurologischen Erkrankungen beitragen kann. Dazu gehören Epilepsie, Gliome, Depression und Demenzen. [93]

Eine bislang nicht bewiesene Hypothese besagt, dass es sich bei der sogenannten reaktiven Gliose, der Narbenbildung, um eine Antwort auf Stammzellebene handelt. Die daran beteiligten Astrozyten gehören zu den Gliazellen und reagieren auf ischämische Veränderungen mit Zellhypertrophie und einer Hochregulierung von GFAP und Vimentin. [94, 95] Es gibt einige Thesen, die nahe legen, dass es sich bei reaktiven Astrozyten um Stammzellen handelt. Dafür spricht, dass beispielsweise im Hippocampus aus astrozytenartigen Zellen neue Neurone generiert werden. [25] Zudem exprimieren reaktive Astrozyten charakteristische Stammzellmarker wie Nestin oder Vimentin. [95]

Es ist noch nicht vollständig geklärt, ob es sich bei den Vorläuferzellen tatsächlich um reaktive Astrozyten handelt. Reife Astrozyten sind normalerweise nicht teilungsfähig. Eine Forschungsarbeit [94] zeigte durch genetisches fate mapping, dass Astrozyten infolge einer zerebralen Verletzung aktiv proliferierten und reaktive Gliose induzierten. Diese erste fate-mapping Analyse von Astrozyten im zerebralen Kortex von adulten Mäusen zeigte, dass einige Astrozyten Stammzeleigenschaften erlangen und Reparationsprozesse nach Gehirnverletzung einleiten. [94] Zudem agieren proliferierende Astrozyten in bestimmten Hirnregionen als adulte neuronale Stammzellen. [24, 25]

In Experimenten am Mausmodell [57] wurde durch Okklusion der mittleren Hirnarterie ein Gehirninfrakt induziert. Bei der Untersuchung des Infarktareals wurden zahlreiche reaktive Astrozyten nachgewiesen. Interessanterweise befanden sich diese an denselben Stellen wie Nestin-positive Zellen. Die Forscher beobachteten, dass Nestin-positive Zellen kontinuierlich durch reaktive Astrozyten ersetzt wurden.[96]

Astrozyten besitzen Endfüße, die mit der Basalmembran von Blutgefäßen in Kontakt stehen. Dieser Kontakt fungiert als Sensor für eine Gehirnschädigung, indem er alle Programme zur reaktiven Gliose aktiviert.[97]

Nach ischämischem Gehirnfarkt erlangen oder reaktivieren Gliazellen, die sich außerhalb der bekannten Stammzellnischen befinden, im Rahmen einer reaktiven Gliose Stammzelleigenschaften und proliferieren. [95]

Astrozyten besitzen das Potential, funktionelle Neurone zu generieren. Eine Arbeitsgruppe isolierte postnatale Astrozyten aus zerebralen Mäusecortices. Durch Einschleusung von neurogenen Transkriptionsfaktoren (z. B. Neurog2) gelang die Konversion isolierter Astrozyten zu funktionellen Neuronen. [98]

Neuerdings wurden erstmals neuroprotektive Effekte von Astrozyten im Rahmen von Zelltherapieversuchen nachgewiesen. Dabei wurde eine spezielle Subpopulation von Astrogliazellen (OLIG2- positive Vorläuferastrozyten) in ischämisches Hirngewebe eingebracht. Die eingebrachten Zellen zeigten neuroregeneratives Potential und könnten in zukünftigen therapeutischen Interventionen nach Hirnschädigung, von Nutzen sein. [99]

Die bestehenden Forschungsergebnisse rechtfertigen die Annahme, dass es Stammzellen mit astrozytären Eigenschaften gibt, die Vorläuferpopulationen hervorbringen, die ihrerseits neue Neurone produzieren. [93] Radiale Gliazellen stellen eine Subpopulation von Astrozyten dar. Während der Embryogenese nehmen radiale Gliazellen eine Schlüsselfunktion für die Migration von unreifen Neuronen ein.

Im erwachsenen Gehirn kleiden radiale Gliazellen die Ventrikelwände aus und wurden als potentielle Stammzellen identifiziert. [95] Interessanterweise gleichen NSZ morphologisch gesehen den radialen Gliazellen oder Tanyzyten. [95] Tanyzyten sind charakteristische Zellen der ZVO. Dieser Befund spricht wiederum für das Vorkommen potentieller NSZ in ZVO.

Das therapeutische Wissen zur Nutzung von Stammzellen als Grundlage zukünftiger neurologischer Therapien stammt zurzeit noch nahezu ausschließlich aus Tierversuchen. [100, 101] Im Sinne einer zukünftig gezielten und effizienten therapeutischen Anwendung von neuronalen Stammzellen, sollten weitere noch ausstehende Fragen in Bezug auf Funktion, Potential und Lokalisation geklärt werden.

5.3 Zusammenfassung

Das Phänomen der adulten Neurogenese wurde in den letzten Jahrzehnten in der subventrikulären Zone des lateralen Ventrikels und in der subgranulären Zone des Gyrus dentatus im Hippocampus erforscht und mehrmals reproduzierbar nachgewiesen. Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass auch andere Hirnregionen das Potential besitzen, neue Neuronen zu generieren und als Reaktion auf pathologische Veränderungen, wie beispielsweise einen Gehirnfarkt, adulte Neurogenese induzieren können.

Bereits 2009 wurden in den zirkumventrikulären Organen von adulten Nagetieren, Zellen mit Stammzeleigenschaften nachgewiesen. [31] Um die Übertragbarkeit dieser Forschungsergebnisse auf das menschliche Gehirn zu prüfen, wurden Area postrema, Eminentia mediana, Epiphyse und Neurohypophyse von insgesamt 32 Gehirnen entnommen und auf potentielle neuronale Stammzellen untersucht. Dabei entsprachen 16 Gehirne einem altersentsprechenden Normalbefund ohne pathologische Veränderungen, und 16 Gehirne zeigten einen akuten Gehirnfarkt. Mittels immunhistochemischer Einzel- und Doppelfärbungen konnten Zellen, die charakteristische Stammzellzellmarker wie GFAP, Nestin, Vimentin, OLIG2 und PSA-NCAM exprimierten, in humanen ZVO identifiziert werden. Zudem wurde in Infarktgehirnen ein bis zu fünffacher Anstieg von proliferierenden Zellen mittels Ki67 nachgewiesen.

Dieser Vergleich zeigt, dass das menschliche Gehirn keineswegs ein rein statisches postmitotisches Gebilde darstellt, sondern möglicherweise auf pathologische Einflüsse durch Rekrutierung von Vorläuferzellen reagiert.

Die Untersuchungen von humanen ZVO und der Vergleich von gesundem versus Infarktgewebe geben evidente Hinweise darauf, dass ZVO eine weitere Stammzellnische darstellen und somit einen wesentlichen Beitrag zur Erhaltung und Rekrutierung adulter neuronaler Stammzellen liefern.

6 Anhang

| Patient | Geschlecht | Alter [Jahre] | Todesursache | Gehirngewicht [Gramm] | Neuropathologische Diagnose(n) |
|-----------|------------|------------------|---|--------------------------|---|
| Patient 1 | M | 54,4 | V.a. fulminante Lungenembolie mit konsekutivem Multiorganversagen. | 1140 | Gehirn mit altersentsprechendem Normalbefund. |
| Patient 2 | M | 77,1 | Kardiale Dekompensation mit Lungenödem. | 1260 | Gehirn mit altersentsprechendem Normalbefund. |
| Patient 3 | M | 77,7 | Kardiogener Schock | 1250 | Gehirn mit altersentsprechendem Normalbefund. |
| Patient 4 | W | 69,9 | Septisches Kreislaufversagen | 1220 | Gehirn mit altersentsprechendem Normalbefund |
| Patient 5 | M | 64,3 | V.a. akutes Koronarsyndrom | 1560 | Gehirn mit altersentsprechendem Normalbefund. |
| Patient 6 | M | 70,3 | Unstillbare Blutung | 1550 | Gehirn mit altersentsprechendem Normalbefund |
| Patient 7 | M | 77,3 | Aspiration nach Erbrechen als Folge eines Ulcus ventriculi. | 1270 | Gehirn mit altersentsprechendem Normalbefund. |
| Patient 8 | M | 56,4 | Kardiales Pumpversagen. | 1190 | Gehirn mit altersentsprechendem Normalbefund. |
| Patient 9 | M | 71 | Keine Angabe. | 1400 | Gehirn mit altersentsprechendem Normalbefund. |

| | | | | | |
|-------------------|---|------|---|------|--|
| Patient 10 | M | 73,2 | Multiorganversagen bei fortgeschrittenem Tumorleiden. | 1320 | Gehirn mit altersentsprechendem Normalbefund. |
| Patient 11 | M | 70,8 | Tracheo-Ösophageale Fistel als Folge von Ösophaguskarzinom. | 1380 | Gehirn mit altersentsprechendem Normalbefund. |
| Patient 12 | M | 55,7 | V.a.Herzinfarkt oder Lungenembolie | 1290 | Gehirn mit makroskopisch altersentsprechendem Normalbefund. |
| Patient 13 | M | 69,8 | Multiorganversagen als Folge von respiratorischer Globalinsuffizienz. | 1380 | Gehirn mit altersentsprechendem Normalbefund. |
| Patient 14 | W | 73,8 | Rechtsherzversagen. | 1130 | Gehirn mit altersentsprechendem Normalbefund. |
| Patient 15 | M | 64,7 | Sepsis bei V. a. Pneumonie. | 1270 | Gehirn mit altersentsprechendem Normalbefund. |
| Patient 16 | M | 61 | Prolongiertes Kreislaufversagen im septischen Schock. | 1400 | Gehirn mit altersentsprechendem Normalbefund |
| Patient 17 | W | 77,1 | Basilaristhrombose unbekannter Ätiologie. | 1250 | FrISChe Infarkte (Stadium I) im Versorgungsgebiet beider |
| Patient 18 | M | 79 | Kardiales Pumpversagen. | 1040 | FrISChe Infarkte frontal und parietal rechts im sich überlappenden Versorgungsgebiet von A. cerebri anterior und A. cerebri media (Stadium II) |
| Patient 19 | M | 55,7 | Septischer Schock mit Multiorganversagen. | 1600 | FrISCher Infarkt von 1,5 cm Größe (Stadium 1) rechts occipital, . |

| | | | | | |
|-------------------|---|------|---|---------------|--|
| Patient 20 | W | 80,6 | Multiorganversagen | 1200 | Gehirninfarkt (Stadium II, insulär links, 6 x 2 x 2 cm). |
| Patient 21 | M | 92,7 | Sepsis, Akutes Abdomen | 1050 | Mehrere Gehirninfarkte im Stadium 2 im Versorgungsgebiet der li A. cerebri media |
| Patient 22 | W | 58,9 | Septisches Multiorganversagen in Folge von thyreotoxischer Krise. | Keine Angaben | Gehirninfarkt (temporal rechts bis 4,5 x 2,5 x 2 cm, Stadium III), |
| Patient 23 | W | 73,5 | V. a. Lungenarterienthrombembolie. | 1190 | Gehirninfarkt Stadium II im Bereich des occipitalen Pols rechts von ca. 0,7 cm Durchmesser. |
| Patient 24 | M | 73,9 | Respiratorische Dekompensation. | 1165 | Lakunäre Infarkte in den Basalganglien beidseits. |
| Patient 25 | M | 75,7 | Multiorganversagen. | 1350 | Multiple, frische Gehirninfarkte, frontal, Basalganglien, Hippocampus sowie okzipital beiderseits |
| Patient 26 | W | 74,8 | Pneumonie | 1260 | Multiple Infarkte Stadium III, rechts, frontal, Basalganglien, okzipital |
| Patient 27 | M | 72,9 | Hypoxischer Hirnschaden nach Asystolie bei dilatativer Kardiomyopathie. | 1460 | Zwei kleine, frische Infarkte (Stadium I) von je 0,2 cm Durchmesser im Stromgebiet der Arteria cerebri anterior. |
| Patient 28 | M | 41,6 | Maligner Mediainfarkt. | 1570 | Frischer Gehirninfarkt beidseits in den Stromgebieten der Arteriae cerebri mediae und Zeichen des Hirndrucks |

| | | | | | |
|-------------------|---|------|------------------------------|------|---|
| Patient 29 | M | 75,9 | Rezidivierter Myokardinfarkt | 1380 | Gehirninfarkt Stadium II, Basalganglien links, Status lacunaris |
| Patient 30 | M | 60 | Hirneinklemmung | 1680 | mehrere Infarkte, Hirnschwellung |
| Patient 31 | W | 80 | Hirnödem | 1260 | Mediainfarkt links |
| Patient 32 | M | 60 | Multiorganversagen. | 1250 | Multiple frische Infarkte (im Ammonshorn rechts, Kleinhirn rechts, im Bereich des Nucleus dentatus, im temporalen Cortex rechts, im occipitalen Cortex links und im okzipitalen Cortex rechts). |

7 Literaturverzeichnis

1. Altman, J. and Das, G.D., *Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats*. The Journal of Comparative Neurology, 1965. **124**(3): p. 319-335.
2. Bedard, A. and A. Parent, *Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb*. Brain Res Dev Brain Res, 2004. **151**(1-2): p. 159-68.
3. Gould, E., *How widespread is adult neurogenesis in mammals?* Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(6): p. 481-8.
4. Zhao, C., W. Deng, and F.H. Gage, *Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis*. Cell, 2008. **132**(4): p. 645-60.
5. Kaplan, M.S. and J.W. Hinds, *Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs*. Science, 1977. **197**(4308): p. 1092-4.
6. Paton, J.A. and F.N. Nottebohm, *Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits*. Science, 1984. **225**(4666): p. 1046-8.
7. Eriksson, P.S., et al., *Neurogenesis in the adult human hippocampus*. Nat Med, 1998. **4**(11): p. 1313-7.
8. Bernier, P.J., et al., *Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(17): p. 11464-9.
9. Nakayama, D., et al., *Injury-induced neural stem/progenitor cells in post-stroke human cerebral cortex*. Eur J Neurosci, 2010. **31**(1): p. 90-8.
10. Simon, C., M. Gotz, and L. Dimou, *Progenitors in the adult cerebral cortex: Cell cycle properties and regulation by physiological stimuli and injury*. Glia, 2011. **59**(6): p. 869-81.
11. Dayer, A.G., et al., *New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors*. J Cell Biol, 2005. **168**(3): p. 415-27.
12. Lie, D.C., et al., *NEUROGENESIS IN THE ADULT BRAIN: New Strategies for Central Nervous System Diseases*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2004. **44**(1): p. 399-421.
13. Alvarez-Buylla, A. and D.A. Lim, *For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain*. Neuron, 2004. **41**(5): p. 683-6.
14. Goritz, C. and J. Frisen, *Neural stem cells and neurogenesis in the adult*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(6): p. 657-9.
15. Gage, F.H., *Mammalian neural stem cells*. Science, 2000. **287**(5457): p. 1433-8.
16. Curtis, M.A., et al., *Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension*. Science, 2007. **315**(5816): p. 1243-9.
17. Ming, G.L. and H. Song, *Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions*. Neuron, 2011. **70**(4): p. 687-702.
18. von Bohlen und Halbach, O., *Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus*. Cell and Tissue Research, 2011. **345**(1): p. 1-19.

19. van Praag, H., G. Kempermann, and F.H. Gage, *Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus*. *Nat Neurosci*, 1999. **2**(3): p. 266-70.
20. Rossi, D.J., C.H. Jamieson, and I.L. Weissman, *Stem cells and the pathways to aging and cancer*. *Cell*, 2008. **132**(4): p. 681-96.
21. Kojima, T., et al., *Subventricular zone-derived neural progenitor cells migrate along a blood vessel scaffold toward the post-stroke striatum*. *Stem Cells*, 2010. **28**(3): p. 545-54.
22. Doetsch, F., J.M. Garcia-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla, *Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain*. *J Neurosci*, 1997. **17**(13): p. 5046-61.
23. Kokaia, Z., et al., *Regulation of stroke-induced neurogenesis in adult brain--recent scientific progress*. *Cereb Cortex*, 2006. **16 Suppl 1**: p. i162-7.
24. Doetsch, F., et al., *Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain*. *Cell*, 1999. **97**(6): p. 703-16.
25. Seri, B., et al., *Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus*. *J Neurosci*, 2001. **21**(18): p. 7153-60.
26. Sofroniew, M.V., *Reactive astrocytes in neural repair and protection*. *Neuroscientist*, 2005. **11**(5): p. 400-7.
27. Mori, T., et al., *Inducible gene deletion in astroglia and radial glia--a valuable tool for functional and lineage analysis*. *Glia*, 2006. **54**(1): p. 21-34.
28. Merkle, F.T., Z. Mirzadeh, and A. Alvarez-Buylla, *Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain*. *Science*, 2007. **317**(5836): p. 381-4.
29. Barnabe-Heider, F., et al., *Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord*. *Cell Stem Cell*, 2010. **7**(4): p. 470-82.
30. Ihrie, R.A. and A. Alvarez-Buylla, *Cells in the astroglial lineage are neural stem cells*. *Cell Tissue Res*, 2008. **331**(1): p. 179-91.
31. Bennett, L., et al., *Circumventricular organs: a novel site of neural stem cells in the adult brain*. *Mol Cell Neurosci*, 2009. **41**(3): p. 337-47.
32. Bennett, L.B., et al., *Heterotopically transplanted CVO neural stem cells generate neurons and migrate with SVZ cells in the adult mouse brain*. *Neurosci Lett*, 2010. **475**(1): p. 1-6.
33. Bermingham, N.A., et al., *Proprioceptor pathway development is dependent on MATH1*. *Neuron*, 2001. **30**(2): p. 411-422.
34. *Entwicklung von Diencephalon (2. Hirnbläschen) und Hypophyse*. *Humanembryologie* [cited 2012 05.11.2012]; Available from: <http://www.embryology.ch/allemand/vcns/dienceph02.html>.
35. Johnson, A.K. and P.M. Gross, *Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways*. *FASEB J*, 1993. **7**(8): p. 678-86.
36. Benarroch, E.E., *Circumventricular organs: receptive and homeostatic functions and clinical implications*. *Neurology*, 2011. **77**(12): p. 1198-204.
37. Arvidsson, A., et al., *Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke*. *Nat Med*, 2002. **8**(9): p. 963-970.
38. Siso, S., M. Jeffrey, and L. Gonzalez, *Sensory circumventricular organs in health and disease*. *Acta Neuropathol*, 2010. **120**(6): p. 689-705.

39. Paxinos, G. and J.K. Mai, *The Human Nervous System*. 2 ed. Vol. 1. 2004: Academic Press. 1366.
40. Miller, A.D. and R.A. Leslie, *The area postrema and vomiting*. *Front Neuroendocrinol*, 1994. **15**(4): p. 301-20.
41. Cox, B.F., M. Hay, and V.S. Bishop, *Neurons in area postrema mediate vasopressin-induced enhancement of the baroreflex*. *Am J Physiol*, 1990. **258**(6 Pt 2): p. H1943-6.
42. Michel, S., et al., *Diet-derived nutrients modulate the effects of amylin on c-Fos expression in the area postrema and on food intake*. *Neuroendocrinology*, 2007. **86**(2): p. 124-35.
43. Li, Y., et al., *Ghrelin acts on the dorsal vagal complex to stimulate pancreatic protein secretion*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006. **290**(6): p. G1350-8.
44. Lee, D.A., et al., *Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche*. *Nat Neurosci*, 2012.
45. Romanovsky, A.A., et al., *The organum vasculosum laminae terminalis in immune-to-brain febrigenic signaling: a reappraisal of lesion experiments*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003. **285**(2): p. R420-8.
46. Shi, P., S.D. Stocker, and G.M. Toney, *Organum vasculosum laminae terminalis contributes to increased sympathetic nerve activity induced by central hyperosmolality*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007. **293**(6): p. R2279-89.
47. Nualart, F. and S. Hein, *Biosynthesis and molecular biology of the secretory proteins of the subcommissural organ*. *Microsc Res Tech*, 2001. **52**(5): p. 468-83.
48. Huh, M.S., M.A. Todd, and D.J. Picketts, *SCO-ping out the mechanisms underlying the etiology of hydrocephalus*. *Physiology (Bethesda)*, 2009. **24**: p. 117-26.
49. Galarza, M., *Evidence of the subcommissural organ in humans and its association with hydrocephalus*. *Neurosurg Rev*, 2002. **25**(4): p. 205-15.
50. Mumenthaler, M.M., Heinrich, *Kurzlehrbuch Neurologie* G.T. Verlag, Editor 2010. p. 455.
51. Riede U.N., Schäfer, H.E., Werner., M., *Allgemeine und spezielle Pathologie*, G.T. Verlag, Editor 2004. p. 1265.
52. Mashur K.F., Neuman, M., *Duale Reihe, Neurologie*, G.T. Verlag, Editor 2007. p. 612.
53. Macas, J., et al., *Increased generation of neuronal progenitors after ischemic injury in the aged adult human forebrain*. *J Neurosci*, 2006. **26**(50): p. 13114-9.
54. Carlen, M., et al., *Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke*. *Nat Neurosci*, 2009. **12**(3): p. 259-67.
55. Marti-Fabregas, J., et al., *Proliferation in the human ipsilateral subventricular zone after ischemic stroke*. *Neurology*, 2010. **74**(5): p. 357-65.
56. Coskun, V., et al., *CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(3): p. 1026-31.
57. Shen, C.C., et al., *Characterization of endogenous neural progenitor cells after experimental ischemic stroke*. *Curr Neurovasc Res*, 2010. **7**(1): p. 6-14.
58. Jiang, W., et al., *Cortical neurogenesis in adult rats after transient middle cerebral artery occlusion*. *Stroke*, 2001. **32**(5): p. 1201-7.

59. Ernst, C. and B.R. Christie, *Temporally specific proliferation events are induced in the hippocampus following acute focal injury*. J Neurosci Res, 2006. **83**(3): p. 349-61.
60. Zacchetti, A., et al., *Validation of the use of proliferation markers in canine neoplastic and non-neoplastic tissues: comparison of Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression versus in vivo bromodeoxyuridine labelling by immunohistochemistry*. APMIS, 2003. **111**(3): p. 430-8.
61. Gerdes, J., et al., *Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67*. Am J Pathol, 1991. **138**(4): p. 867-73.
62. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: From the known and the unknown*. J Cell Physiol, 2000. **182**(3): p. 311-322.
63. Marshall, C.A., B.G. Novitch, and J.E. Goldman, *Olig2 directs astrocyte and oligodendrocyte formation in postnatal subventricular zone cells*. J Neurosci, 2005. **25**(32): p. 7289-98.
64. Jakovcevski, I. and N. Zecevic, *Olig transcription factors are expressed in oligodendrocyte and neuronal cells in human fetal CNS*. J Neurosci, 2005. **25**(44): p. 10064-73.
65. Ligon, K.L., et al., *Development of NG2 neural progenitor cells requires Olig gene function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(20): p. 7853-8.
66. Durand, K.S., et al., *1p19q LOH patterns and expression of p53 and Olig2 in gliomas: relation with histological types and prognosis*. Mod Pathol, 2010. **23**(4): p. 619-28.
67. Gascon, E., L. Vutskits, and J.Z. Kiss, *The Role of PSA-NCAM in Adult Neurogenesis*
Structure and Function of the Neural Cell Adhesion Molecule NCAM, V. Berezin, Editor 2010, Springer New York. p. 127-136.
68. Macas, J., et al., *Generation of neuronal progenitor cells in response to tumors in the human brain*. Stem Cells, 2013.
69. Bonfanti, L., *PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis*. Prog Neurobiol, 2006. **80**(3): p. 129-64.
70. Gascon, E., L. Vutskits, and J.Z. Kiss, *Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: from synapses to integration of new neurons*. Brain Res Rev, 2007. **56**(1): p. 101-18.
71. Liu, Y., et al., *Glial fibrillary acidic protein-expressing neural progenitors give rise to immature neurons via early intermediate progenitors expressing both glial fibrillary acidic protein and neuronal markers in the adult hippocampus*. Neuroscience, 2010. **166**(1): p. 241-51.
72. Marshall, C.A., S.O. Suzuki, and J.E. Goldman, *Gliogenic and neurogenic progenitors of the subventricular zone: who are they, where did they come from, and where are they going?* Glia, 2003. **43**(1): p. 52-61.
73. Lendahl, U., L.B. Zimmerman, and R.D. McKay, *CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein*. Cell, 1990. **60**(4): p. 585-95.
74. Wiese, C., et al., *Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells?* Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(19-20): p. 2510-22.
75. Filippov, V., et al., *Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes*. Mol Cell Neurosci, 2003. **23**(3): p. 373-82.

76. Michalczyk, K. and M. Ziman, *Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation*. *Histol Histopathol*, 2005. **20**(2): p. 665-71.
77. Goldman, R.D., et al., *The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity*. *J Cell Biol*, 1996. **134**(4): p. 971-83.
78. Bramanti, V., et al., *Biomarkers of glial cell proliferation and differentiation in culture*. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2010. **2**: p. 558-70.
79. Wei, L.C., et al., *Nestin-containing cells express glial fibrillary acidic protein in the proliferative regions of central nervous system of postnatal developing and adult mice*. *Brain Res Dev Brain Res*, 2002. **139**(1): p. 9-17.
80. Garcia-Lavandeira, M., et al., *A GRFa2/Prop1/stem (GPS) cell niche in the pituitary*. *PLoS One*, 2009. **4**(3): p. e4815.
81. Font, M.A., A. Arboix, and J. Krupinski, *Angiogenesis, neurogenesis and neuroplasticity in ischemic stroke*. *Curr Cardiol Rev*, 2010. **6**(3): p. 238-44.
82. Taupin, P., *BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation*. *Brain Res Rev*, 2007. **53**(1): p. 198-214.
83. Shen, Q., et al., *Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions*. *Cell Stem Cell*, 2008. **3**(3): p. 289-300.
84. Parent, J.M., et al., *Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke*. *Ann Neurol*, 2002. **52**(6): p. 802-13.
85. Zhang, R., et al., *Activated neural stem cells contribute to stroke-induced neurogenesis and neuroblast migration toward the infarct boundary in adult rats*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004. **24**(4): p. 441-8.
86. Yamashita, T., et al., *Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum*. *J Neurosci*, 2006. **26**(24): p. 6627-36.
87. Chang, A., et al., *Neurogenesis in the chronic lesions of multiple sclerosis*. *Brain*, 2008. **131**(Pt 9): p. 2366-75.
88. Minger, S.L., et al., *Endogenous neurogenesis in the human brain following cerebral infarction*. *Regen Med*, 2007. **2**(1): p. 69-74.
89. Parent, J.M., *Injury-induced neurogenesis in the adult mammalian brain*. *Neuroscientist*, 2003. **9**(4): p. 261-72.
90. Verret, L., et al., *Alzheimer's-type amyloidosis in transgenic mice impairs survival of newborn neurons derived from adult hippocampal neurogenesis*. *J Neurosci*, 2007. **27**(25): p. 6771-80.
91. Rodriguez, J.J., et al., *Impaired adult neurogenesis in the dentate gyrus of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease*. *PLoS One*, 2008. **3**(8): p. e2935.
92. Haughey, N.J., et al., *Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease*. *J Neurochem*, 2002. **83**(6): p. 1509-24.
93. Kempermann, G., *Stammzellen und neue Nervenzellen im erwachsenen Gehirn*. *Humboldt-Spektrum* 2004. **1/2004**.
94. Buffo, A., et al., *Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(9): p. 3581-6.

95. Robel, S., B. Berninger, and M. Gotz, *The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis*. Nat Rev Neurosci, 2011. **12**(2): p. 88-104.
96. Pekny, M., et al., *The role of astrocytes and complement system in neural plasticity*. Int Rev Neurobiol, 2007. **82**: p. 95-111.
97. Robel, S., et al., *Conditional deletion of β 1-integrin in astroglia causes partial reactive gliosis*. Glia, 2009. **57**(15): p. 1630-1647.
98. Heinrich, C., et al., *Generation of subtype-specific neurons from postnatal astroglia of the mouse cerebral cortex*. Nat Protoc, 2011. **6**(2): p. 214-28.
99. Jiang, P., et al., *hESC-derived Olig2+ progenitors generate a subtype of astroglia with protective effects against ischaemic brain injury*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2196.
100. Kondziolka, D., et al., *Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke*. Neurology, 2000. **55**(4): p. 565-9.
101. Li, Y., et al., *Intraatrial transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice*. J Cereb Blood Flow Metab, 2000. **20**(9): p. 1311-9.

8 Danksagung

Ich möchte mich für die Überlassung des Themas und die außergewöhnliche Betreuung und Unterstützung bei meinem Doktorvater und Betreuer Herrn PD Dr. med. Ulrich Schüller herzlichst bedanken.

Ferner bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. H. Kretzschmar.

Danke Frau Angelika Henn, Frau Brigitte Kraft, Herr Michael Schmidt, Herr Johannes Lettenbauer für die tatkräftige technische Unterstützung und eure allseitige Hilfsbereitschaft.

Ein Dankeschön für die nette und herzliche Hilfe geht an Christoph Heeß, Dr. med. Dorostkar Mario und Frau Annegreth Dagtekin.

Danke Georg für deine Motivation und deine unerschöpfliche Geduld. Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meiner Schwester Dagmar und meiner Romy. Danke, dass ihr immer für mich da seid.

Eidesstattliche Versicherung

Veronika Sanin

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München 12.06.2014

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

