



Technische Universität München

Fakultät für Medizin

**Untersuchung der adulten Neurogenese im rostralen Migrationsstrom
der Maus**

Kerstin Maria Schweyer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Günter Höglinger

2. Prof. Dr. Markus Ploner

Die Dissertation wurde am 10.7.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 6.11.2019 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	5
1.1. Historischer Rückblick zur Erforschung adulter Neurogenese	5
1.2. Anatomische Regionen adulter Neurogenese	6
1.2.1. SVZ-RMS-System	6
1.2.1.1. Subventrikuläre Zone (SVZ)	6
1.2.1.2. Rostraler Migrationsstrom (RMS)	9
1.2.1.3. Olfaktorischer Bulbus (OB)	11
1.2.2. Hippocampus	13
1.3. Stammzelldefinition und Definition neurogener Nischen	14
1.4. Adulte Neurogenese beim Menschen	16
1.5. Idiopathisches Parkinsonsyndrom (IPS) und Stammzellen	18
1.5.1. Idiopathisches Parkinsonsyndrom	18
1.5.2. Adulte Neurogenese beim idiopathischen Parkinsonsyndrom	18
1.5.3. Ansätze zur Stammzelltherapie beim idiopathischen Parkinsonsyndrom	19
2. Fragestellung dieser Arbeit	20
3. Methoden	21
3.1. Überblick zur Methodik des Nachweises adulter neuronaler Stammzellen	21
3.1.1. Nachweis von proliferierenden Zellen	21
3.1.2. Nestin	22
3.1.3. GFAP (<i>glial fibrillary acid protein</i>)	22
3.1.4. PSA-NCAM (<i>polysialylated-neural cell adhesion molecule</i>)	23
3.1.5. Pax6 (<i>paired type hombox 6</i>)	23
3.1.6. Überblick über die immunhistologischen Stammzellmarker	24
3.2. Verwendete Geräte und Materialien	24
3.3. Chemikalien, Puffer und Lösungen	26
3.4. Versuchstiere	28
3.5. Versuchsaufbau und zeitlicher Ablauf	29
3.5.1. Implantation der physikalischen Barriere	29

3.5.2. Implantation der osmotischen Pumpe und Ara-C-Behandlung	31
3.5.3. Verabreichung von BrdU	32
3.5.4. Perfusion, Gewebeaufbereitung und Herstellung von Gewebsschnitten	34
3.6. Immunhistochemische Färbungen	35
3.6.1. Verwendete Antikörper	35
3.6.1.1. Primäre Antikörper	35
3.6.1.2. Sekundäre Antikörper	36
3.6.2. APC-Methode und DAB-Färbung	37
3.6.2.1. Allgemeines Prinzip	37
3.6.2.2. Protokoll der DAB-Färbung mit BrdU	37
3.6.3. Immunfluoreszenzfärbung	39
3.6.3.1. Allgemeines Prinzip	39
3.6.3.2. Protokolle der durchgeführten Fluoreszenzfärbungen	39
3.7. Auswertung	44
3.7.1. Konfokalmikroskopie	44
3.7.2. Stereologie	45
3.8. Statistische Auswertung	45
4. Ergebnisse	46
4.1. Reduktion der proliferierenden Zellen in der SVZ durch Ara-C-Administration	46
4.2. Erhöhte Anzahl proliferierender Zellen im RMS auf Seite der physikalischen Barriere	49
4.3. Proliferierenden Zellen auf Seite der physikalischen Barriere	51
4.3.1. Erhöhte Nestin-Expression auf Seite der physikalischen Barriere	51
4.3.2. Expression von Nestin, GFAP und Pax6	53
5. Diskussion	56
5.1 Proliferation in der SVZ nach Ara-C-Behandlung	56
5.2. BrdU als Marker für die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen	59
5.3. Veränderung der Zellproliferation und Markereexpression im unterbrochenen RMS	61
5.3.1 Beurteilung der erhöhten Proliferation auf Seite der physikalischen Barriere	61
5.3.2. Expression von Stammzellmarker im unterbrochenen RMS	63
5.3.3. Pax6-Expression auf Seite der physikalischen Barriere	65

6. Zusammenfassung und Ausblick	67
7. Abkürzungsverzeichnis	69
8. Danksagung	71
9. Literaturverzeichnis	73

1. Einleitung

1.1. Historischer Rückblick zur Erforschung adulter Neurogenese

Bis zur Hälfte des letzten Jahrhunderts galt das Dogma des Wissenschaftlers Santiago Ramón y Cajal von 1928 als unumstritten: nach der embryonalen Entwicklung werden keine neuen Neuronen im Gehirn gebildet. Häufig zitiert wurde dementsprechend folgende Aussage (Ramon y Cajal 1928, Kempermann 2011): *“Once development was ended, the fonts of growth and regeneration of the axons and dendrites dried up irrevocably. In adult centres the nerve paths are something fixed, ended, immutable. Everything may die, nothing may be regenerated.”*, was als Konsequenz die Irreversibilität neuronaler Schäden und neurodegenerativer Erkrankungen in sich trägt. 1949 entdeckte Donald Hebb die Fähigkeit der Neurone, aktivitätsabhängig die Funktion ihrer Synapsen zu verändern, was als neuronale Plastizität bezeichnet wird (Welsch 2014). Den ersten Hinweis auf sich teilende Zellen im adulten Gehirn erbrachte jedoch Altman im Jahr 1962, indem er durch eine autoradiographische Studie nach intrathekaler Injektion von radioaktiv markiertem Thymidin die postnatale Existenz von sich teilenden Zellen nach Verletzung im Hippocampus der Ratte aufzeigte und diese in seiner Arbeit *„Are there dividing cells in the adult brain?“* veröffentlichte (Altman 1962). Einige Jahre später entdeckte erneut Altman die subventrikuläre Zone (SVZ) als anatomischen Ursprung sich teilender Zellen. Kurze Zeit später wurde der rostrale Migrationsstrom (RMS) beschrieben, in welchem die neugeborenen Zellen im Frontallappen nach rostral in den olfaktorischen Bulbus (OB) wandern. Zusätzlich wurde die subgranuläre Zone (SGZ) des Hippocampus als weitere anatomische Region adulter Neurogenese entdeckt (Altman und Das 1965, Altman 1969). Für diese frühen Beschreibungen wurde durchgehend die autoradiographische Methode der Detektion sich teilender Zellen angewandt, die keine Darstellung des Phänotyps oder der exakten anatomischen Lokalisation der radioaktiv markierten Zellen erlaubte.

Erst fünfzehn Jahre später untersuchte der Neurowissenschaftler Kaplan den Hippocampus und die SVZ elektronenmikroskopisch und konnte die neuronalen Eigenschaften der dort ansässigen Zellen beweisen (Kaplan und Bell 1984). Im selben Jahr wurden im Gehirn adulter Singvögel proliferierende Zellen nachgewiesen (Paton und Nottebohm 1984). Ab diesem Zeitpunkt erhielt die Forschung an neuronalen Stammzellen einen Aufschwung, der auch durch die Entdeckung des Thymidinanalogons Bromodesoxyuridin (BrdU) als *in vivo* Marker für sich teilende Zellen gefördert wurde. Im Jahr 1988 untersuchten Miller und Nowakowski mit

zweifacher histologischer Markierung durch BrdU und neuronale Marker die entdeckten Zellen; eine Methode, auf welche heute noch zurückgegriffen wird und welche auch in dieser Arbeit durchgeführt wurde (Nowakowski, Lewin et al. 1989). Reynolds und Weiss studierten und bewiesen 1992 endgültig die SVZ als Stammzellreservoir im Nagergehirn durch Isolation und *in vitro* Kultivierung entnommener Stammzellen (Reynolds, Tetzlaff et al. 1992), was 1993 durch Corotto und Luskin bestätigt wurde. Diese konnten einen Migrationsstrom im Frontalhirn - dem RMS entsprechend - nachweisen (Corotto, Henegar et al. 1993, Luskin, Parnavelas et al. 1993). Im Verlauf wurde als zweite Region mit persistierender Neurogenese 1996 der Hippocampus bestätigt (Kuhn, Dickinson-Anson et al. 1996). Weitere bahnbrechende Arbeiten wurden durch Alvarez-Buylla und Doetsch in den folgenden Jahren angefertigt. Zu beachten ist, dass alle genannten Studien lediglich den Nachweis der Existenz adulter Neurogenese im Tiermodell erbrachten, während die Existenz und Relevanz der adulten Neurogenese im humanen ZNS noch umstritten ist (Sorrells, Paredes et al. 2018).

1.2. Anatomische Regionen adulter Neurogenese

Aus der jahrzehntelangen Forschung konnten oben genannte Regionen persistierender Neurogenese im adulten Gehirn nachgewiesen werden, welche im Folgenden detaillierter dargestellt werden sollen.

1.2.1. SVZ-RMS-System

1.2.1.1. Subventrikuläre Zone (SVZ)

Die SVZ befindet sich im Bereich des Seitenventrikels und entspricht der aus der embryonalen Entwicklung persistierenden Keimzone des Vordergehirns. Anatomisch ist diese als die laterale Wand des lateralen Ventrikels definiert worden und setzt sich dabei aus ependymalen und subependymalen Zellen zusammen (Mitro und Palkovits 1981, Doetsch, Garcia-Verdugo et al. 1997, Alvarez-Buylla und Garcia-Verdugo 2002). Die SVZ erstreckt sich über die gesamte Länge des lateralen Ventrikels (Doetsch und Alvarez-Buylla 1996). Ein Teil der ansässigen Zellen befindet sich in kettenförmiger Migration und setzt sich nach rostral in den RMS fort. Bereits in der SVZ scheint eine molekulare und anatomische Heterogenität mit mosaikartigem Aufbau zu existieren. In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass aus verschiedenen anatomischen Ebenen der SVZ jeweils verschiedene Unterformen von Interneuronen des OBs entstehen; es wird diskutiert, ob anatomische Destination und Phänotyp

durch den anatomischen Ursprung vorgegeben sind (Merkle, Mirzadeh et al. 2007, Alvarez-Buylla, Kohwi et al. 2008).

Die zelluläre Zusammensetzung der subventrikulären Zone ist durch zahlreiche histologische und elektromikroskopische Studien detailliert beschrieben. Die erste elektronenmikroskopische Analyse erfolgte durch Doetsch und Kollegen (Doetsch, Garcia-Verdugo et al. 1997).

Die adulten neuronalen Stammzellen in der SVZ lassen sich nach Morphologie, histologischen Markern und Länge des Zellzyklus einteilen.

Die Stammzellen, von welchen die Entwicklung aller weiteren adulten neuronalen Vorläuferzellen ausgeht, sind die Typ-B-Zellen, welche den ruhenden neuronalen Stammzellen entsprechen. Aufgrund ihres Stammzellcharakters besitzen sie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Die Typ-B-Zellen sind langsam teilende Zellen mit astrozytären Eigenschaften, die während der embryonalen Entwicklung aus radialen Gliazellen hervorgingen. Die radialen Gliazellen fungierten während der Embryogenese als Vorläuferzellen der späteren adulten neuronalen Stammzellen sowie als Stützstruktur des RMS (Herrera, Garcia-Verdugo et al. 1999, Merkle, Tramontin et al. 2004, Malatesta und Gotz 2013). Elektronenmikroskopisch zeigen sich die für Astrozyten typischen langen Fortsätze, die in direktem Kontakt mit dem Ventrikel und somit dem Liquor stehen (Gage, Kempermann et al. 2008). Auch bei der immunhistologischen Charakterisierung zeigen sie astrozytäre Eigenschaften; die Typ-B-Zellen sind positiv für die Marker GFAP, Sox1, Mash1 und Nestin (Doetsch, Garcia-Verdugo et al. 1997). Die Typ-B-Zellen formen röhrenförmige Strukturen um die restlichen Zellen der SVZ und trennen diese vom umgebenden Gewebe. Morphologisch lassen sich zwei Untertypen unterscheiden: die Typ-B1-Zellen sind größer als die Typ-B2-Zellen; elektronenmikroskopisch lässt sich bei den Typ-B1-Zellen ein helleres Zytoplasma nachweisen. Sie sind in anatomisch unterschiedlichen Regionen lokalisiert: B1-Zellen trennen die wandernden Zellen von der ependymalen Wand; B2-Zellen bilden die Abgrenzung zum *Striatum*. Nach experimenteller Ablation der sich teilenden Zellen der SVZ zeigte sich, dass von den Typ-B-Zellen die Wiederbesiedelung der SVZ ausgeht (Doetsch, Garcia-Verdugo et al. 1997, Doetsch, Caille et al. 1999).

Aus den Typ-B-Zellen gehen die Typ-C-Zellen (schnell teilende neuronale Vorläuferzellen) hervor, welche die sich am schnellsten teilenden und morphologisch größten Zellen der SVZ darstellen. Diese sind bezüglich der immunhistologischen Marker für Vorläuferzellen lediglich für Nestin immunoreaktiv und treten in Clustern proliferierender Zellen im röhrenförmigen Netzwerk der Typ-B-Zellen auf (Doetsch et al. 1999).

Diese wiederum bilden Typ-A-Zellen, die den Neuroblasten entsprechen und zum olfaktorischen Bulbus wandern. Diese deutlich kleineren Zellen teilen sich während der Migration ebenfalls, jedoch deutlich langsamer als die Typ-C-Zellen der SVZ. Neuroblasten im Migrationsstrom sind immunoreaktiv für die Marker Nestin und die Migrationsmarker PSA-NCAM, Doublecortin und Tuj1 (Doetsch et al. 1999).

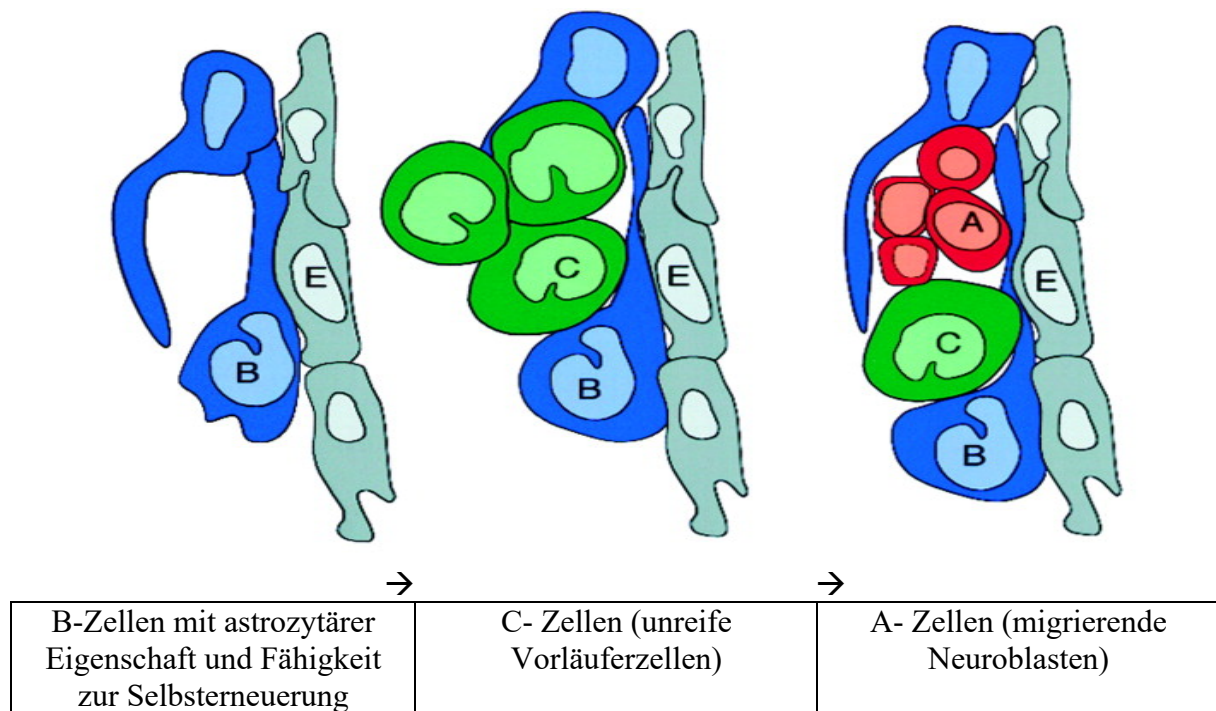


Abb.1: Schematische Darstellung der zellulären Zusammensetzung der SVZ. Aus den B-Zellen, die morphologisch Astrozyten ähneln, entstehen die Typ-C- und Typ-B-Zellen. Die Typ-C-Zellen sind in Clustern zwischen den Typ-B-Zellen angeordnet. Die Typ-A-Zellen wandern röhrenförmig angeordnet über den RMS in den OB. Die Typ-B-Zellen haben Stammzeleigenschaften und können sich selbst erneuern. Die Wand des Ventrikels wird durch Ependymzellen (E) ausgekleidet (modifiziert nach Garcia-Verdugo, Doetsch et al. 1998).

Ein weiterer Zelltyp der SVZ sind die Typ-E-Zellen (Ependymzellen), die die Wand des lateralen Ventrikels auskleiden und in direktem Kontakt mit dem Liquor stehen. Sie sind ebenfalls immunreaktiv für GFAP und wurden lange Zeit für Stammzellvorläuferzellen gehalten, da ihre Teilung sowie die Produktion von Zellen des OB *in vivo* nachgewiesen wurde (Chojnacki, Mak et al. 2009). Jedoch konnten *in vitro* keine Stammzeleigenschaften wie Selbsterneuerung und Multipotenz festgestellt werden (Palmer, Willhoite et al. 2000). Andere Studien konnten neuronale Stammzellmarker auf den Typ-E-Zellen identifizieren und stellten die Hypothese, dass es sich um eine noch langsamer als die Typ-B-Zellen teilende

Stammzellpopulation handeln könnte (Coskun, Wu et al. 2008). Eine besondere Rolle scheinen die ependymalen Zellen bei der Rekrutierung adulter neuronaler Stammzellen nach Verletzung zu spielen (Coskun, Wu et al. 2008, Carlen, Meletis et al. 2009).

Eine quantitative Analyse der Zelltypen der SVZ ergab eine Dominanz von Typ-A-Zellen als häufigsten Zelltyp; die Typ-B-Zellen bilden den zweithäufigsten Zelltyp. Die Typ-C-Zellen stellen lediglich circa 10% der Zellpopulation dar. Die Ratio entsprach 3:2:1 für A:B:C-Zellen (Doetsch, Garcia-Verdugo et al. 1997).

Zwischen den Zellen wird eine interne Rückkoppelung vermutet; so wird ein möglicher hemmender Einfluss der Typ-A-Zellen auf die Proliferation von Typ-B- und Typ-C-Zellen angenommen (Pignatelli und Belluzzi 2010).

1.2.1.2. Rostraler Migrationsstrom (RMS)

Der RMS ist ein Netzwerk aus Neuroblasten sowie Astrozyten und vaskulären Strukturen, die den neugeborenen Zellen den Weg zum OB leiten. Von der SVZ wandern die Neuroblasten durch sogenannte Kettenmigration mit einer Geschwindigkeit von circa 100 µm pro Stunde (Nakaguchi, Masuda et al. 2011) zum OB, im Gehirn der Maus einer Distanz von circa 5 mm entsprechend, wo sie circa zwei Wochen nach ihrer Entstehung zu Interneuronen differenzieren (Lois, Garcia-Verdugo et al. 1996, Peretto, Merighi et al. 1997). Kettenmigration bedeutet, dass die Neuroblasten bis zum Erreichen des OB in Ketten organisiert sind; die Migration orientiert sich an der vorhergehenden Zelle (Lois, Garcia-Verdugo et al. 1996). Die röhrenförmigen Zellstränge aus Neuroblasten werden durch astrozytäre Zellen flankiert (Gritti, Bonfanti et al. 2002).

Der Mechanismus, der die wandernden Zellen letztendlich zum adulten OB leitet, ist nicht vollständig geklärt. Es wird von einer sogenannten Kettenmigration ausgegangen (Zhao, Deng et al. 2008). Während der embryonalen Entwicklung hingegen orientiert sich die Migration an den radialen Gliazellen. Für die Kettenmigration ist das Adhäsionsprotein PSA-NCAM essentiell, welches auch zur histologischen Charakterisierung wandernder Neuroblasten benutzt wird (Tomasiewicz, Ono et al. 1993, Hu, Tomasiewicz et al. 1996). Da die migrierenden Zellen häufig in der Nähe von vaskulären Strukturen nachweisbar sind, wird eine Funktion der Blutgefäße als Leitstruktur der Migration diskutiert (Snapyan, Lemasson et al. 2009). Zudem scheinen die umgebenden, röhrenförmigen Astrozyten eine wichtige Leitstruktur für die Migration zu sein. Als wegweisende Signale werden auch weiter rostral sezernierte Chemokine diskutiert. Experimentell konnte jedoch gezeigt werden, dass auch nach

Ausschaltung des OBs eine Kettenmigration nach rostral stattfindet (Kirschenbaum, Doetsch et al. 1999). Zudem ist es interessant, dass nach chirurgischer Durchtrennung des RMS weiterhin eine Migration nach rostral stattfindet und die Zellen vor der Läsion akkumulieren (Alonso, Ortega-Perez et al. 2008).

Während ihrer Migration durch den RMS teilen sich die Neuroblasten weiterhin, sind jedoch nicht selbsterneuernd. Daher sind Neuroblasten nicht als neuronale Stammzellen, sondern als Vorläuferzellen definiert (Alvarez-Buylla und Lois 1995, Lim, Suarez-Farinas et al. 2006).

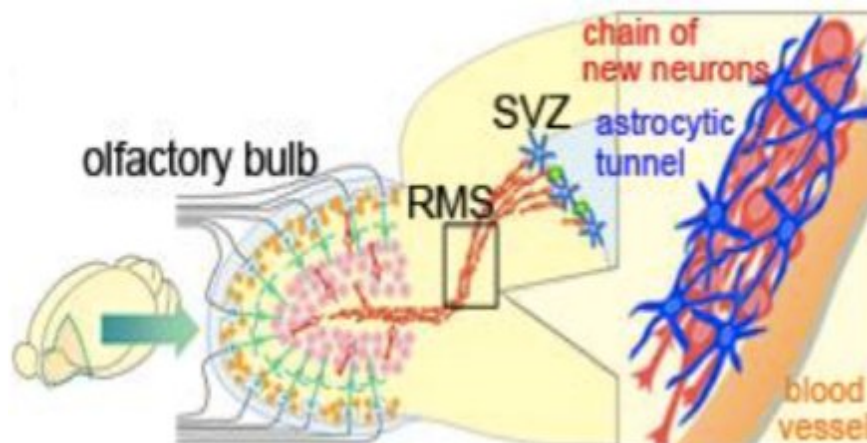


Abb. 2: Kettenmigration von Neuroblasten im RMS. Die Neuroblasten werden von Blutgefäßen und röhrenförmigangeordneten Astrozyten flankiert (olfactory bulb = OB, chain of new neurons = Ketten neuer Neuronen, blood vessel = Blutgefäß, astrocytic tunnel = astrozytärer Tunnel) (modifiziert nach Kaneko, Kako et al. 2011).

Bereits auf dem Weg von der SVZ zum OB sterben ungefähr 50% der neu entstandenen Zellen durch Apoptose (Alvarez-Buylla, Garcia-Verdugo et al. 2001, Ninkovic, Mori et al. 2007). Verschiedene Faktoren nehmen auf die Apoptoserate der neugeborenen Zellen Einfluss (Langenfurth, Gu et al. 2016). Beispielsweise scheint ein erhöhter olfaktorischer Input die Neurogenese zu stimulieren und die Überlebensrate unter den neugeborenen Zellen zu erhöhen (Gage, Coates et al. 1995).

In bestimmten Fällen kann es zu einer Abweichung der migrierenden Zellen von der anatomisch definierten Struktur des RMS kommen. So wurde beobachtet, dass bei Verletzung in anderen anatomischen Regionen, wie dem *Corpus callosum* oder dem *Striatum*, die neu geborenen Zellen zu diesen Strukturen wandern (Pignatelli und Belluzzi 2010).

Lange wurde der RMS lediglich als reine Transportstruktur neugeborener Zellen angesehen. In den letzten Jahren konnte jedoch in mehreren Arbeiten der Nachweis im RMS ansässiger adulter neuronaler Stammzellen erbracht werden (Gritti, Bonfanti et al. 2002, Merkle, Mirzadeh et al. 2007, Mendoza-Torreblanca, Martinez-Martinez et al. 2008). Beispielsweise konnten

Gritti *et al.* nach vorangegangener antimitotischer Behandlung Zellen aus dem Beginn des RMS isolieren und *in vitro* deren Stammzeleigenschaften nachweisen. Dabei bleibt das Zusammenspiel zwischen Neurogenese in der SVZ und im RMS unklar. In vorangegangenen Experimenten mit Unterbrechung der Migration von Neuroblasten aus der SVZ, sowie in retroviralen Untersuchungen des intakten RMS, konnte eine Produktion periglomerulärer Neuronen für den OB durch im RMS ansässige Vorläuferzellen nachgewiesen werden (Hack, Saghatelian et al. 2005).

Noch ungeklärt ist die Frage, ob die Neuroblasten des RMS bis zum Erreichen des OB eine homogene Population darstellen oder ob der endgültige Phänotyp bereits bei Entstehung der Zellen vorherbestimmt ist (Hack, Saghatelian et al. 2005).

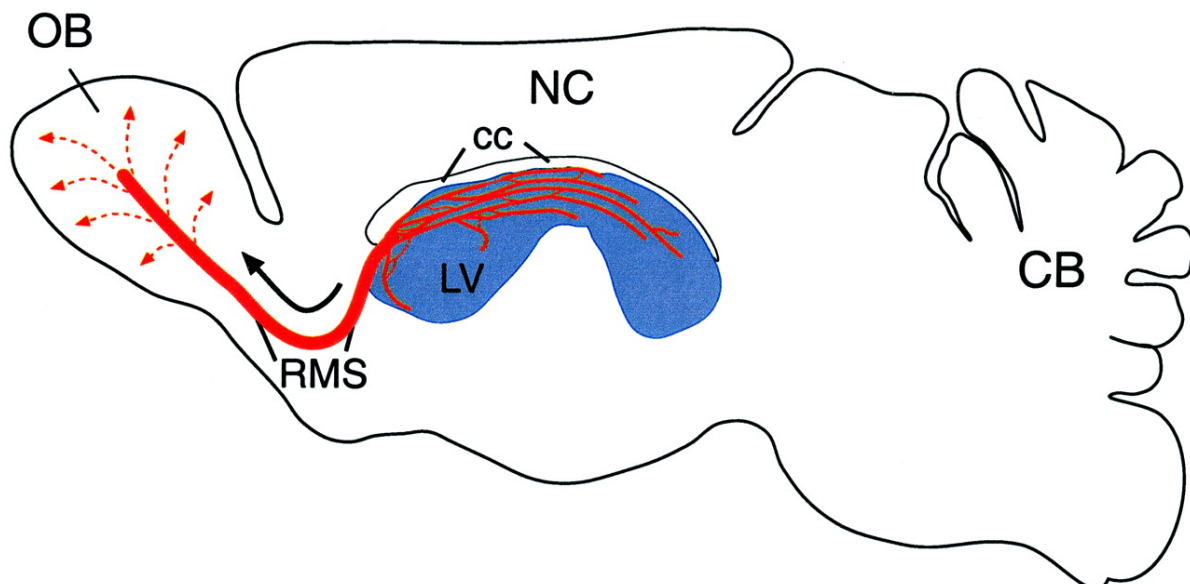


Abb.3: Schematische, sagittale Darstellung von SVZ, RMS und OB. Je nach Entwicklungsstadium und anatomischer Position exprimieren die Zellen im Verlauf spezifische Marker, wodurch sie durch histologische Färbungen näher einzuordnen sind. (LV= Lateraler Ventrikel, cc= Corpus Callosum, NC= Neocortex, CB = Cerebellum) (nach Petreanu und Alvarez-Buylla 2002).

1.2.1.3. Olfaktorischer Bulbus (OB)

Der OB ist für die primäre Verarbeitung von olfaktorischen Impulsen zuständig, was in einem Netzwerk von Mitralzellen und zum Großteil inhibitorischer Interneuronen erfolgt. Dabei werden durch adulte Neurogenese Interneuronen für die äußere periglomeruläre Schicht sowie die innere granuläre Schicht gebildet (Lledo, Merkle et al. 2008). Nach Ankunft der

neugeborenen Zellen über den RMS lösen sich circa 10% der ankommenden Zellen sich aus der Struktur der Kettenmigration und wandern tangential in die äußere periglomeruläre Schicht. Von diesen Zellen entwickeln sich circa 65-75% zu dopaminergen Zellen, die sich histologisch durch das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH) nachweisen lassen (Huisman, Uylings et al. 2004). Diese Zellen sowie auch die periglomerulären nicht-dopaminergen Zellen sind ebenfalls für Calretinin und Calbindin immunoreaktiv (Kosaka, Aika et al. 1995, Zhao, Hui et al. 2008). Die anderen 90% der Neuroblasten differenzieren sich zu GABA-ergen Zellen und verbleiben in der granulären Zone des OB (Alvarez-Buylla, Kohwi et al. 2008). Täglich werden dadurch ca. 10.000 bis 30.000 Zellen dem olfaktorischen Bulbus hinzugefügt, was circa einem Prozent der gesamten Zellzahl des OB entspricht (Kaplan, McNelly et al. 1985, Biebl, Cooper et al. 2000). Zur morphologischen Ausreifung und funktionellen Integration benötigen die granulären Zellen etwa zwei Wochen, die periglomerulären Zellen vier Wochen (Ryu, Hong et al. 2016). Bezüglich der Funktion der Neurogenese scheint die adulte Neurogenese wichtig, jedoch nicht unabdingbar, für die Fähigkeit des OB zur Unterscheidung verschiedener Gerüche zu sein (Gage, Coates et al. 1995). Dabei scheint insbesondere der hemmende Einfluss der neugeborenen GABA-ergen Interneurone eine wichtige Rolle zu spielen (Kosaka, Toida et al. 1998, Brill, Ninkovic et al. 2009).

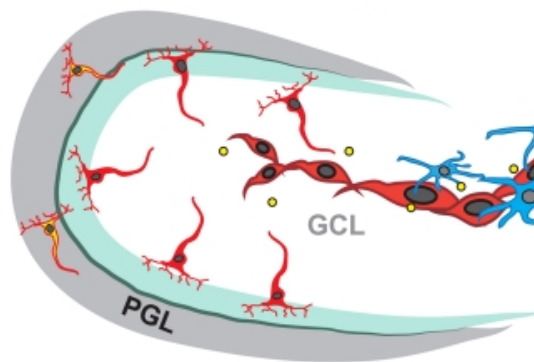


Abb.4: Schematische Darstellung des OB mit periglomerulärer Zone (periglomerular layer, PGL) und granulärer Zone (granular cell layer, GCL). Dargestellt sind ankommende neuronale Vorläuferzellen (rote Zellen) aus dem RMS, welche tangential in die entsprechende Schicht wandern. Bis zum Erreichen des olfaktorischen Bulbus ist der RMS von Astrozyten (blaue Zellen) umgeben (Wittko-Schneider, Schneider et al. 2013).

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass ähnlich zum RMS ein Großteil der im OB neu angekommenen Zellen nach kurzer Zeit - circa zwischen 15-45 Tagen nach Entstehung – durch Apoptose sterben. Die absolute Zellzahl des OB bleibt langfristig stabil (Petreanu und

Alvarez-Buylla 2002). Bezüglich der Relevanz der Neurogenese im OB wurde die Hypothese aufgestellt, dass die ankommenden Neurone bestimmte Reize oder Signale erhalten müssen, damit ein Überleben gewährleistet ist. Eine erhöhte olfaktorische Stimulation führte zu einer erhöhten Überlebensrate der neu gebildeten Neurone (Pignatelli und Belluzzi 2010).

In einzelnen Studien konnten aus dem OB wie auch aus dem RMS ansässige Zellen mit Stammzeleigenschaften isoliert werden. So konnten Liu *et al.* Nestin-positive Zellen aus dem OB im Nager und Menschen nachweisen, aus denen in Zellkultur Astrozyten, Neurone und Oligodendrozyten produziert werden konnten (Liu und Martin 2003).

1.2.2. Hippocampus

Die zweite nachgewiesene neurogene Nische des adulten Gehirns ist die SGZ des Hippocampus. Ein Unterschied zur SVZ besteht darin, dass die adulte Neurogenese im Hippocampus lokal in der SGZ stattfindet; eine Migration der neugeborenen Neuronen wie im RMS findet somit nicht statt. Die SGZ ist eine definierte Zellschicht im *Gyrus dentatus*, in der sich die Vorläuferzellen befinden (Gage, Coates et al. 1995). Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen (Ziv, Ron et al. 2006) konnte festgestellt werden, dass die Stammzellen in der SGZ wie in der SVZ ebenfalls Eigenschaften von Gliazellen aufweisen. Diese bilden Vorläuferzellen, die wiederum Neuroblasten bilden, die in die innere Granularzellschicht einwandern. Nach antimitotischer Behandlung mit Ara-C sind es auch im Hippocampus die Zellen mit astrozytären Eigenschaften, die als erstes neu entstehen und diesen erneut besiedeln (Ziv, Ron et al. 2006).

Als Funktion der hippocampalen Neurogenese werden ein Einfluss auf die kognitiven Funktionen, insbesondere die Gedächtnisbildung sowie die Anpassung erlernter Muster diskutiert (Parent, Yu et al. 1997).

Die adulte Neurogenese im Hippocampus ist geringer ausgeprägt als in der SVZ; so wird geschätzt, dass im Hippocampus des adulten Nagergehirns täglich ca. 9.000 Zellen gebildet werden (Cameron und McKay 2001).

1.3. Stammzelldefinition und Definition neurogener Nischen

Stammzellen werden grundsätzlich durch ihre Eigenschaften zur Selbsterneuerung, Proliferation und Pluri- bzw. Multipotenz definiert (Calza, Giardino et al. 1998, Sun, Halabisky et al. 2009, Zhang, Deguchi et al. 2010). Selbsterneuerung bedeutet, dass aus jeder einzelnen Stammzelle mehr als eine weitere Stammzelle entstehen kann. Dies kann im Rahmen einer symmetrischen oder asymmetrischen Teilung verlaufen. Bei der symmetrischen Teilung werden zwei identische Zellen, bei der asymmetrischen zwei verschiedenartige Zellen produziert. Von diesen Zellen muss erneut mindestens eine Zelle Stammzelleigenschaft aufweisen. Im Falle adulter neuraler Stammzellen findet eine asymmetrische Teilung statt, wobei die Typ-B-Zellen als Mutterzellen eine sich schnell teilende Typ-C-Zelle und eine weitere Typ-B-Zellen produzieren (Kempermann und Gage 2000).

Der Begriff Pluripotenz bedeutet, dass eine Stammzelle sich zu jeglichem Zelltyp der drei Keimblätter entwickeln kann, wohingegen sich multipotente Stammzellen zu mehr als einem Zelltyp einer bestimmten Zelllinie entwickeln können. Adulte neuronale Stammzellen entsprechen multipotenten Stammzellen, die sich zu Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen entwickeln können. Obwohl für aus der SVZ entnommene Vorläuferzellen *in vitro* eine Multipotenz nachgewiesen werden konnte, produzieren diese *in vivo* hauptsächlich neuronale Zellen (Kempermann und Gage 2000).

In diesem Zusammenhang ist es wichtig, den Begriff der neuronalen Stammzelle („*neural stem cell*“) von den neuronalen Vorläuferzellen („*neuronal progenitor cells*“) abzugrenzen. Neuronale Vorläuferzellen sind multipotente Zellen mit kurzen Zellzyklen, welche Nervenzellen hervorbringen können. Sie besitzen jedoch nicht mehr die Eigenschaft zur Selbsterneuerung und können somit nach Ablation einer Population diese nicht wiederherstellen. Häufig werden beide Zelltypen mit dem englischen Begriff „*progenitor cells*“ umschrieben (Palmer, Willhoite et al. 2000). Neuronale Stammzellen hingegen können sich zu Gliazellen und Nervenzellen entwickeln und können weitere Stammzellen bilden.

Bezüglich der adulten neuronalen Stammzellen wird inzwischen angenommen, dass die beschriebenen Typ-B-Zellen mit astrozytären Eigenschaften die neuronalen Stammzellen darstellen (Alvarez-Buylla und Lim 2004). Die Typ-C-Zellen hingegen entsprechen den oben beschriebenen neuronalen Vorläuferzellen (Doetsch, Garcia-Verdugo et al. 1997).

Der *in vitro* Nachweis der oben beschriebenen Stammzelleigenschaften adulter neuronaler Stammzellen gelang 1992 durch Kultur aus SVZ und RMS entnommener Zellen (Taupin und Gage 2002).

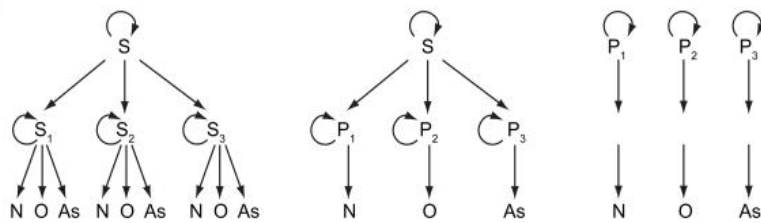


Abb.5: Schematische Darstellung der adulten neuronalen Stammzellen (S= Stammzelle, P= Vorläuferzellen (*progenitor cells*), N = Neuron, O = Oligodendrozyt, As = Astrozyt). Links wird die Fähigkeit der Stammzellen, sich selbst zu erneuern und die Multipotenz mit Fähigkeit zur Entwicklung zu Astrozyten, Neuronen und Oligodendrozyten dargestellt. In der Mitte und rechts sind die Vorläuferzellen dargestellt, die aus Stammzellen entstehen und sich dann entweder in Neuronen, Oligodendrozyten oder Astrozyten entwickeln können. Dabei sind diese bereits auf einen Subtyp festgelegt (Ming und Song 2011).

Die Neurogenese wird in den sogenannten *neurogenen Nischen* ermöglicht. Diese beherbergen die Stammzellen und liefern ihnen unter normalen Bedingungen essentielle Faktoren zur funktionellen Entwicklung (Ming und Song 2011). In dieser Umgebung scheinen einerseits bestimmte unterstützende Faktoren und Bedingungen vorzuherrschen und andererseits bestimmte restriktive Faktoren zu fehlen, was den Ablauf der Neurogenese ermöglicht. Als Nachweis der permissiven Eigenschaft dieser Zonen gilt, dass Vorläuferzellen, die in die jeweilige Region implantiert werden, sich ohne weiteres Hinzufügen von externen Faktoren zu Neuronen differenzieren (Kempermann 2006). Außerhalb dieser Nischen differenzieren sich diese transplantierten Vorläuferzellen lediglich zu Gliazellen oder werden durch Apoptose zerstört. Sporadisch auftretende Vorläuferzellen mit *in vitro* Stammzellpotential konnten aus diversen Gehirnregionen isoliert werden (Lledo, Alonso et al. 2006), diese erreichten *in vivo* außerhalb von SVZ und Hippocampus jedoch keine Stammzellaktivität. Dies zeigt, dass Neurogenese nur funktionieren kann, wenn sowohl eine permissive neurogene Nische als auch Stammzellen oder Vorläuferzellen vorhanden sind.

In einer Studie aus dem Jahr 1995 (Gage, Coates et al. 1995) wurden Vorläuferzellen aus der SGZ des Hippocampus in verschiedene anatomische Regionen außerhalb der SVZ transplantiert. Ein Teil der Zellen wurde in den RMS transplantiert und entwickelte sich zu funktionell integrierten olfaktorischen Interneuronen. In den restlichen untersuchten Gehirnregionen unterliefen die transplantierten Zellen Apoptose, wie in nachfolgenden Studien bestätigt werden konnte (Herrera, Garcia-Verdugo et al. 1999, Zhang, Zhang et al. 2003). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass neuronale Vorläuferzellen, die in die SGZ

oder SVZ transplantiert werden, sich hingegen zu reifen Neuronen entwickeln (Ming und Song 2011).

Entscheidende Bestandteile der neurogenen Nischen sind lokale Einflussfaktoren wie Astrozyten, endotheliale Zellen, Mikroglia und Neurotransmitter benachbarter Neuronen sowie diverse Faktoren, die über die Blut-Hirn-Schranke an die Stammzellen herangetragen werden (Kempermann 2006). Astrozyten werden somit nicht nur als eventuelle Vorläuferzellen der neugeborenen Neuronen angenommen; es wurde auch nachgewiesen, dass Faktoren, die von ihnen abgegeben werden, Teilung, Migration und Wanderung der neugeborenen Neuronen beeinflussen (Ming und Song 2011). Es wird angenommen, dass Mikroglia und Makrophagen besonders im verletzten oder entzündeten Gehirn einen fördernden Effekt auf die Neurogenese haben (Ziv, Ron et al. 2006).

Als weitere Erklärung, warum sich die Stammzellen nur in den genannten Regionen differenzieren können, wird die Expression inhibitorischer Faktoren außerhalb der neurogenen Nischen diskutiert, die die Stammzellen daran hindern, ihre Fähigkeit zur Stammzellproliferation auszuüben (Arias-Carrion, Freundlieb et al. 2007).

Unklar ist noch, inwieweit bestimmte Faktoren der neurogenen Nische einen Einfluss auf den späteren Zellphänotyp haben bzw. der Ursprung der Vorläuferzellen den späteren Zelltyp bestimmt.

1.4. Adulte Neurogenese beim Menschen

Bei vielen der hier beschriebenen Erkenntnisse handelt es sich um Ergebnisse aus Tiermodellen. Dadurch bleibt die Frage der Existenz ähnlicher anatomischer Strukturen im menschlichen Gehirn weitestgehend offen. Methodisch sind die Möglichkeiten zur Erforschung der Neurogenese beim Menschen eingeschränkt: zur Untersuchung der teilenden Zellen *in vivo* sind häufig Maßnahmen wie beispielsweise die Verabreichung radioaktiver Substanzen oder eines Chemotherapeutikums nötig. 1998 untersuchte Erikson die Neurogenese bei Patienten, denen aufgrund eines zerebralen Tumors ein Thymidinanalogon verabreicht wurde. Durch Nachweis proliferierender, neuronaler Zellen im Hippocampus konnte somit erstmalig der Nachweis adulter Neurogenese im menschlichen Gehirn erbracht werden (Eriksson, Perfilieva et al. 1998).

2001 gelang es Arsenijevic, multipotente Stammzellen aus dem frontalen Kortex aus Resektionsmaterial im Rahmen von Epilepsiechirurgie oder bei Resektionen nach Schädel-Hirn-Trauma zu isolieren und zu kultivieren (Arsenijevic, Villemure et al. 2001). Der Nachweis

adulter neuronaler Stammzellen im adulten humanen Gehirn wird mittlerweile als erwiesen angesehen. Die Existenz des RMS als Verbindung der SVZ zum OB im menschlichen Gehirn wird jedoch weiterhin kontrovers diskutiert (Sanai, Tramontin et al. 2004, Sierra, Encinas et al. 2011). Zwar wird anerkannt, dass im OB neue Zellen entstehen, jedoch bleibt unklar, ob diese lokal entstehen oder durch Migration durch den RMS eingewandert sind (Kam, Curtis et al. 2009). Eine Studie zeigte, dass im Kindesalter eine dem RMS ähnliche Struktur nachweisbar ist, die jedoch im Erwachsenenalter nicht mehr eindeutig festzustellen ist (Pignatelli und Belluzzi 2010). Eine ausführliche Studie hierzu wurde 2007 durch Curtis *et al.* durchgeführt. Die Studie benutzte humanes *post mortem* Gewebe und führte eine Reihe immunhistochemischer Färbungen mit PCNA als Proliferationsmarker durch, welche einen Migrationsstrom vom lateralen Ventrikel zum OB nachweisen konnten. Auch die Markerexpression stellte sich ähnlich zum Nagergehirn dar.

Zu berücksichtigen ist, dass im humanen Gehirn der OB einen lediglich sehr geringen Anteil der absoluten Gehirnmasse ausmacht, während bei der Ratte 2% des Gehirns auf den OB fallen, was eine mögliche Erklärung für die geringe Ausprägung des RMS im Menschen darstellen könnte (Pignatelli und Belluzzi 2010). Auch im humanen Gehirn scheint die adulte Neurogenese der SVZ reaktiv auf multiple Pathologien zu sein, während die SGZ im Hippocampus ab dem 20. Lebensjahr eine stabile, gering ausgeprägte Population zeigt (Kam, Curtis et al. 2009). Eine kürzlich veröffentlichte Studie sorgte für Aufsehen, da sie die hippocampale Neurogenese im adulten humanen Gehirn gänzlich in Frage stellte: in humanem *post-mortem*-Gewebe sowie in Primaten konnte eine starke Abnahme sich teilender Zellen im frühen Kindesalter nachgewiesen werden; bei über 18-Jährigen Probanden war keine Zellteilung im Hippocampus mehr nachvollziehbar (Sorrells, Paredes et al. 2018).

Im Großen und Ganzen bleibt trotz überzeugender Studien unklar, ob der RMS und somit eine SVZ, welche Zellen für den OB produziert, im humanen Gehirn in relevantem Ausmaß existiert. Eine neue potentielle Methode zur Erforschung humaner adulter Neurogenese *in vivo* ergibt sich durch kernspintomographische Studien, wobei von der Korrelation von Angiogenese und Neurogenese Gebrauch gemacht wird (Sierra, Encinas et al. 2011).

1.5. Idiopathisches Parkinsonsyndrom (IPS) und Stammzellen

1.5.1. Idiopathisches Parkinsonsyndrom

Das idiopathische Parkinsonsyndrom ist die nach der Alzheimer-Demenz am weitesten verbreitete neurodegenerative Erkrankung mit steigender Prävalenz (Marras, Beck et al. 2018).

Es handelt sich um eine klinische Diagnose, die durch die Kardinalsymptome Akinesie bzw. Bradykinesie, Rigor und Ruhetremor gekennzeichnet ist. Pathophysiologisch liegt der Erkrankung eine Degeneration der dopaminergen Neurone in der *Substantia nigra (pars compacta)* zugrunde, welche zu einer verminderten dopaminergen Innervation des *Striatums* führt. Durch die komplexen anatomischen Verschaltungen und Funktionen der Basalganglien führt dies zu oben genannten motorischen Symptomen (Dauer und Przedborski 2003, Beitz 2014). Darüber hinaus werden nicht-motorische Symptome beobachtet, zu welchen Depressionen, Angststörungen sowie ein Verlust des Geruchssinnes zählen. Die zugrundeliegende Pathologie der nicht-motorischen Symptome liegt größtenteils noch im Unklaren. Zeitlich treten diese Symptome zum Großteil vor den ersten motorischen Symptomen auf und sprechen nur mäßig auf die medikamentösen Therapien mit Dopamin an, was suggeriert, dass die beschriebenen Symptome durch eine Störung eines über die Basalganglien hinausgehenden Systems zustande kommen könnten (Hoglinger, Rizk et al. 2004).

Die Therapie der motorischen Symptome basiert hauptsächlich auf der Substitution des Neurotransmitters Dopamin, was einer effektiven symptomatischen, jedoch häufig nur temporär wirksamen Therapie entspricht, welche den Krankheitsprogress nicht aufhalten kann und häufig zu relevanten Nebenwirkungen führt. Bisher gibt es keine zugelassenen verlaufsmodifizierenden Therapieoptionen für das IPS. Die nicht-motorischen Symptome stellen eine schwierigere therapeutische Herausforderung dar und können trotz ausgeprägter Reduktion der Lebensqualität häufig nur unzureichend kontrolliert werden.

1.5.2. Adulte Neurogenese beim idiopathischen Parkinsonsyndrom

Eine Veränderung der adulten Stammzellproliferation wird als mögliche Ursache nicht-motorischer Symptome beim IPS diskutiert (Hoglinger, Rizk et al. 2004). Als pathologisches Korrelat wurde eine verringerte Proliferation neuronaler Vorläuferzellen in der SVZ in Betracht gezogen, welche aus einer verminderten dopaminergen Innervation der dort ansässigen Typ-C-Zellen resultiert (Hoglinger, Rizk et al. 2004). Eine verminderte Vorläuferproliferation in der SVZ konnte im Mausmodell sowie in *post mortem* Untersuchungen des Gehirngewebes an Morbus Parkinson erkrankter Personen nachgewiesen werden konnte (Hoglinger, Rizk et al. 2004). Interessanterweise konnten bei der Parkinsonerkrankung eine erhöhte Anzahl dopaminergere Interneurone im OB als mögliches Korrelat des frühen Verlusts des Geruchssinns nachgewiesen werden (Huisman, Uylings et al. 2004).

1.5.3. Ansätze zur Stammzelltherapie beim idiopathischen Parkinsonsyndrom

Aufgrund des Fehlens krankheitsmodifizierender Therapien für das IPS wird ein Ersatz der zugrunde gegangenen Zellen durch die Transplantation neuronaler Stammzellen kontrovers diskutiert.

Als Quelle der neuronalen Stammzellen kommen embryonale Stammzellen (ES), mesenchymale Stammzellen und induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) in Frage. Zudem können neuronale Stammzellen aus dem fetalen Gehirn und den Regionen adulter Neurogenese isoliert werden (Fu, Li et al. 2015). Mehrere Studien im Tiermodell konnten eine funktionelle Integration der transplantierten Zellen sowie eine kurzfristige Verbesserung der klinischen Symptome zeigen; in den meisten Fällen konnte jedoch kein Langzeitüberleben der Zellen erreicht werden (Ben-Hur, Idelson et al. 2004, Fu, Li et al. 2015). In einem Parkinsonmodell im Primaten konnten nach Transplantation von iPSCs eine Integration der Zellen in das neuronale Netzwerk sowie eine Symptomverbesserung beobachtet werden (Kikuchi, Morizane et al. 2017).

Aufgrund der Eigenschaft der Pluripotenz der ES, der Gefahr der Mittransplantation undifferenzierter Vorläuferzellen und der nötigen genetischen Programmierung der iPSCs besteht bei der Transplantation neuronaler Stammzellen ein erhöhtes Risiko zur Tumorbildung (Fu, Li et al. 2015). Zudem sind ethische Fragen bei der Entnahme von ES anzuführen (Kempermann 2006). Bezüglich der längerfristigen Auswirkungen bestehen zwei Bedenken. Zum einen war es in mehreren präklinischen und klinischen Studien zu durch die Transplantation ausgelöste Dyskinesien gekommen (Carlsson, Carta et al. 2009, Yasuhara, Kameda et al. 2017), zum anderen konnte ein Übergreifen der dem IPS zugrundeliegenden Pathologie der *Lewy-Bodies* auf die transplantierten Zellen gezeigt werden (Xiao, Ng et al. 2016).

Eine weitere Möglichkeit, von der adulten Neurogenese zu profitieren, ergibt sich durch die exogene Beeinflussung der endogenen adulten Neurogenese. Da wie oben beschrieben in bestimmten Fällen eine Migration von Neuroblasten aus der SVZ in eine Region neuronalen Schadens beobachtet wurde, wurde bereits in mehreren Studien versucht, dies experimentell zu nutzen (Kempermann 2006, Andres, Choi et al. 2011). Häufig jedoch starb ein Großteil der Zellen durch Apoptose, bevor sie sich in funktionell integrierte Neurone differenzieren konnten. Studien, welche im Tiermodell der Parkinsonerkrankung eine Migration und Differenzierung von Neuronen im Bereich des *Striatums* zeigen konnten, werden kontrovers diskutiert. Somit

gilt es, die Faktoren, die eine funktionelle Integration und ein Langzeitüberleben der neugeborenen Zellen außerhalb der bekannten neurogenen Nischen ermöglichen, zu identifizieren (Obernier, Tong et al. 2014).

2. Fragestellung dieser Arbeit

Die aktuelle Studie untersucht die Frage, ob der RMS lediglich einen Transportweg der Neuroblasten zwischen RMS und OB darstellt, oder ob dieser selbst adulte neuronale Stammzellen oder Vorläuferzellen beherbergt und somit als Region adulter Neurogenese dient. Wir untersuchten die Existenz, zytologische Identität und anatomische Lokalisation von neuronalen Stammzellen oder Vorläuferzellen im adulten RMS der Maus.

Zu diesem Zweck dezimierten wir die proliferierenden Zellen des RMS durch Infusion mit dem Zytostatikum Ara-C und untersuchten im Zeitverlauf nach der Beendigung der Infusion die Lokalisation der im RMS proliferierenden Zellen sowie deren Expression von charakteristischen Markern von Stammzellen oder Vorläuferzellen. Um zwischen lokal proliferierenden Zellen einerseits und einwandernden Zellen aus der SVZ andererseits unterscheiden zu können, implantierten wir in den rechten RMS eine physikalische Barriere, die die Immigration von Neuroblasten verhinderte. Der linke RMS blieb für immigrierende Neuroblasten passierbar.

Mit dieser experimentellen Anordnung erhofften wir eindeutig klären zu können, ob im RMS der adulten Maus eine Zellpopulation vorhanden ist, die, nach Entfernung der migrierenden Neuroblasten und nach Abbruch der Verbindung zur SVZ, in der Lage ist, den RMS erneut mit migrierenden Neuroblasten zu füllen.

3. Methoden

3.1. Überblick zur Methodik des Nachweises adulter neuronaler Stammzellen

Bei den immunhistochemischen Methoden, die zur Detektion und Charakterisierung von proliferierenden Vorläuferzellen *in vivo* angewandt werden, wird von verschiedenen Oberflächenmarkern der adulten neuronalen Vorläuferzellen Gebrauch gemacht. Um jedoch abschließend die oben genannten Stammzeleigenschaften nachzuweisen, ist es nötig, die jeweiligen Zellen zu isolieren und ihre *in vitro* Eigenschaften wie Selbsterneuerung und Multipotenz nachzuweisen (Taupin 2007).

Dabei sollen im Folgenden die etablierten und von uns verwendeten Stammzellmarker kurz vorgestellt werden.

3.1.1. Nachweis von proliferierenden Zellen

Um den Prozess der Neurogenese als Proliferation von Nervenzellen *in vivo* nachzuweisen und zu quantifizieren, stehen verschiedene Methoden zu Verfügung. Eine häufig angewandte Methode ist es, die Duplikation der DNA, die im Rahmen der Zellteilung durchgeführt wird, sichtbar zu machen. Hierfür wird ein Basenanalogen verabreicht, welches mit einem immunhistochemischen oder radioaktiven Marker verbunden ist. Dieses Basenanalogen wird während der Zellteilung anstatt der ursprünglichen Base eingebaut und durch den mit dem Basenanalogen verbundenen Marker anschließend sichtbar gemacht (Kempermann 2006). Bei der ursprünglichen Entdeckung der Neurogenese 1969 verwendete Altmann mit radioaktivem Tritium markiertes Thymidin. Anschließend wurden histologische Schnitte angefertigt, auf die eine Photoemulsion gegeben wurde. Radioaktiven markierten Zellen verfärbten sich schwarz. Diese Methode erlaubte jedoch nur eine unscharfe anatomische Zuordnung und grobe Quantifizierung, jedoch keine Korrelation mit weiteren, die Zellen identifizierenden Oberflächenmarker (Kempermann 2006).

Im Verlauf setzte sich vor allem die Methode der Markierung der proliferierenden Zellen durch Bromdesoxyuridin (BrdU) durch (Nowakowski, Lewin et al. 1989). Auch hier wird ein Basenanalogen, in diesem Fall 5-Bromuracil verbunden mit Desoxyribose, während der DNA-Synthese eingebaut. Der Nachweis erfolgt immunhistochemisch durch Detektion mit einem monoklonalen Antikörper, an welchen ein fluoreszenzmarkierter sekundärer Antikörper bindet. Neben der Möglichkeit der Ko-Färbung mit weiteren Oberflächenmarker bietet sich durch die Nutzung von BrdU der Vorteil, dass eine Art „Geburtsanalyse“ der neugeborenen Zellen durchgeführt werden kann. So wird BrdU in proliferierende Zellen eingebaut und von diesen an die jeweilige Tochterzelle weitergegeben, so dass die Entwicklung und Differenzierung der neugeborenen Zellen auch über längere Zeit nachverfolgt werden kann (Nowakowski, Lewin et al. 1989).

Bezüglich der nötigen Menge an BrdU muss zwischen neurotoxischer Wirkung und Markierung einer repräsentativen Anzahl proliferierender Zellen abgewogen werden. In einer ausführlichen Studie wurde eine ideale Dosis zwischen 100 mg/kg und 300 mg/kg beschrieben (Cameron und McKay 2001), bei welcher alle teilenden Zellen mit BrdU gesättigt seien bei gleichzeitig nur geringen Nebenwirkungen.

Alternativ zur beschriebenen Markierung mit BrdU gibt es verschiedene Zellzyklusproteine und Proliferationsmarker wie Ki67 und PCNA, die während der Zellteilung exprimiert werden und direkt immunhistologisch nachgewiesen werden können. PCNA ist ein Protein einer DNA-Polymerase-Untereinheit, welche zur DNA-Neusynthese, aber auch Reparatur nötig ist. Ki67 ist ein für DNA-Neusynthese spezifisches Protein und wird während der gesamten Zellteilungsphase exprimiert.

3.1.2. Nestin

Ein Marker, der auf allen Untertypen der Vorläuferzellen nachweisbar ist, ist das Intermediärfilament Nestin. Bereits während der pränatalen Entwicklung des Gehirns wird Nestin in Astrozyten und den radialen Gliazellen exprimiert. Am Ende der Entwicklungsperiode wird Nestin herunterreguliert und kann nur noch in den neurogenen Zonen der SVZ und des Hippocampus kontinuierlich nachgewiesen werden. Dabei ist Nestin ein zuverlässiger Stammzellmarker, der jedoch ebenfalls einige Limitation aufweist (Morshead, Reynolds et al. 1994, Taupin und Gage 2002). Seine Spezifität ist dadurch eingeschränkt, dass Nestin im Rahmen hypoxischer oder traumatischer Hirnschäden auch durch postmitotische Zellen erneut exprimiert werden kann (Lin, Matesic et al. 1995, Taupin und Gage 2002).

3.1.3. GFAP

GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) gilt als klassischer Marker für Gliazellen und gewann, nach der Entdeckung sich langsam teilender Stammzellen mit morphologisch, aber auch immunhistochemisch astrozytären Eigenschaften, an Bedeutung als Stammzellmarker (Doetsch, Caille et al. 1999). GFAP wird von den Typ-B-Zellen sowie von den Typ-E-Zellen der SVZ exprimiert. Es bestehen Gemeinsamkeiten mit dem Expressionsmuster des Stammzellmarker Sox2 (von Bohlen und Halbach 2011).

In Experimenten mit chemischer oder physikalischer Ablation der Vorläuferzellproliferation in der SVZ und im Hippocampus zeigt sich GFAP im Rahmen der Neubesiedelung der SVZ als erster erneut nachweisbarer Stammzellmarker (Doetsch, Garcia-Verdugo et al. 1999).

Da GFAP auch auf Gliazellen nachweisbar ist, ist seine Spezifität als Stammzellmarker begrenzt. Zusammen mit anderen Markern erlaubt er jedoch eine nähere Einordnung der Vorläuferzelle.

3.1.4. PSA-NCAM

Im Rahmen der adulten Neurogenese wird der Marker PSA-NCAM (*polysialylated-neural cell adhesion molecule*) von sich schnell teilenden, migrierenden Neuroblasten (Typ-A-Zellen) exprimiert. PSA-NCAM besitzt als Bindungsprotein eine wichtige Aufgabe bei der Migration der Neuroblasten. Nach Reifung der Neurone wird PSA-NCAM herunterreguliert. Die Expression von PSA-NCAM auf Migrationszellen erfolgt weitestgehend überlappend mit dem Migrationsmarker Doublecortin (Kempermann 2006).

PSA-NCAM ist als neurales Adhäsionsprotein relativ spezifisch für neuronale Zellen, jedoch konnte im Rahmen entzündlicher oder degenerativer Vorgänge auch eine Expression des Proteins *ex vivo* auf beteiligten Gliazellen nachgewiesen werden (Kempermann 2006). Kortikale Verletzungen führen zu einer Zunahme der Expression von PSA-NCAM in der SVZ (Szele und Chesselet 1996). Außerhalb der bekannten neurogenen Regionen konnte PSA-NCAM - beispielsweise im Hypothalamus - auch auf Gliazellen nachgewiesen werden (Kiss, Wang et al. 1993).

3.1.5. Pax6

Pax6 (*paired type homebox 6*) ist ein Transkriptionsfaktor, der in der embryonalen Entwicklung in Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert wird und eine entscheidende Rolle für die neuronale Entwicklung und Differenzierung bestimmter Hirnregionen spielt (Osumi, Shinohara et al. 2008). Im adulten Gehirn kann der Transkriptionsfaktor in deutlich weniger Zellpopulationen nachgewiesen werden; so konnte eine Persistenz von Pax6 lediglich in den periglomerulären, dopaminergen Zellen des OB sowie in einer Untergruppe der neuronalen Vorläuferzellen im SVZ-RMS-System nachgewiesen werden (Hack, Saghatelian et al. 2005). Im Hippocampus wird Pax6 ebenfalls von für Nestin und GFAP positiven Vorläuferzellen exprimiert. Zudem exprimiert ein Großteil der Typ-C-Zellen in der SVZ Pax6 (Kohwi et al. 2005). Bei Untersuchung des RMS konnte Kohwi *et al.* eine kontinuierliche Abnahme der Pax6-Expression während der Migration zum OB feststellen. Eine *in vitro* Untersuchung aus RMS und SVZ entnommenen Vorläuferzellen ergab eine unterschiedliche Pax6-Expression der ansonsten immunhistochemisch und morphologisch sehr ähnlichen Zellen. Pax6 spielt eine wichtige Rolle für das Überleben dopaminergischer Zellen: Nach experimenteller Ausschaltung der Pax6-Expression konnte ein ausgeprägter Rückgang der dopaminergen Zellen in der periglomerulären Zone des OB beobachtet werden (Brill, Snayyan et al. 2008, Ninkovic, Pinto

et al. 2010). In transgenen Mäusen mit einer Punktmutation im Pax6-Gen konnte eine deutliche Reduktion der dopaminergen Neurogenese im OB festgestellt werden (Dellovade, Pfaff et al. 1998).

3.1.6. Überblick über die immunhistologischen Stammzellmarker

	PSA-NCAM	NeuN	GFAP	Pax6	Tyrosin-Hydroxylase	Nestin
Typ-A-Zellen	+			+		+
Typ-B-Zellen			+			+
Typ-C-Zellen				+		+
Granuläre Zellen OB		+				
Periglomeruläre Zellen OB		+		+	+	
Typ-E-Zellen			+			+

Tab. 1: Überblick über die histologischen Stammzellmarker. Die verschiedenen Untertypen der Stammzellen exprimieren unterschiedliche Marker und sind somit immunhistochemisch voneinander abgrenzbar (nach Doetsch, Garcia-Verdugo et al. 1997, Kempermann and Gage 1999, Lledo, Alonso et al. 2006, von Bohlen Und Halbach 2007, Zhao, Deng et al. 2008).

3.2. Verwendete Geräte und Materialien

Material/Gerät	Hersteller
Deckgläser 24x40 mm, 24x50 mm, 24x60 mm	Gerhard Menzel GmbH – Braunschweig, Deutschland
Einmalhandschuhe, NOBAGLOVE®-Nitril weiß,	NOBA Verbandmittel Danz GmbH & Co. KG – Wetter, Deutschland
Einmal-Skalpelle	B. Braun Melsungen AG – Melsungen, Deutschland
Mikrotomklingen Breitband-Einwegklingen, Typ 818	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH – Wetzlar, Deutschland

Nahtmaterial Prolene, Ethicon	Johnson & Johnson Medical GmbH – Norderstedt, Germany
Minipumpen Alzet, Brain Infusion Kit 3 (1-3 mm), Flussrate 0,5 µl/h	Durect Corporation, Alzet Osmotic Pumps – Cupertino, California, USA
Cryotube CryoPure 1,8 ml	Sarstedt AG & Co. – Nümbrecht, Deutschland
Objektträger, 25x75x1 mm	Gerhard Menzel GmbH – Braunschweig, Deutschland
Pipetten, 10-100 µl/ 100-1000 µl/ 1000 µl	Eppendorf AG – Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf AG – Hamburg, Deutschland
Overhead-Folie aus Polyester (Stärke 0,11 mm), Herstellung der physikalischen Barriere	Avery Zweckform GmbH – Oberlaindern, Deutschland
Phosphatzement Pulver und Flüssigkeit	Heraeus Kulzer GmbH – Hanau, Deutschland
Terralin-Liquid (Desinfektionsmittel)	Schülke & Mayr – Norderstedt, Deutschland
Trockeneis	Apotheke DZNE München, Deutschland
Kaltlichtlampe Flexilux 300 longlife	Schölly Fiberoptic GmbH – Denzlingen, Deutschland
Koordinatenmesser	Stoelting Co. – Wood Dale, Illinois, USA
Schüttelwasserbad 1083	Gesellschaft für Labortechnik mbH – Burgwedel, Deutschland
Trepanationsbohrer	Proxxon Werkzeug GmbH – Niersbach, Deutschland
Präparierbesteck	Carl Roth GmbH & Co. KG – Karlsruhe, Deutschland
Präzisionswaage 440-47N, Wägebereich maximal 2000 g	Ohaus – Greifensee, Schweiz
Elektronische Präzisionswaage 770-13, Wägebereich 600 ct	Ohaus – Greifensee, Schweiz
Stereo Investigator® - System	MBF Bioscience – Williston, Vermont, USA
Stereotaxierahmen	Stoelting Co. – Wood Dale, Illinois USA
Mikrotom Cryostat Leica CM3050 S	Leica Biosystems Nussloch GmbH – Nussloch, Deutschland

Konfokalmikroskop TCS SP5	Leica Biosystems Nussloch GmbH – Nussloch, Deutschland
Schwenkschüttler	neoLab – Heidelberg, Deutschland
Routine-Stereomikroskop M80 mit Kamera IC80 HD	Leica Biosystems Nussloch GmbH – Nussloch, Deutschland

3.3. Chemikalien, Puffer und Lösungen

Substanz	Hersteller
DABCO Mounting Medium anti-fade	Sigma-Aldrich - St. Louis, Missouri, USA
0,9% NaCl-Lösung (steril)	Applichem - Maryland Heights, MO, USA
Vectashield Antifade Mounting Medium	Vectorlabs - Burlingame, CA, USA
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth – Karlsruhe, Deutschland
5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU)	Sigma-Aldrich - St. Louis, Missouri, USA
Ara-C 10% (Cytosine β -D-arabinofuranoside hydrochloride)	Sigma-Aldrich - St. Louis, Missouri, USA
Normal Goat Serum (NGS) 2,5%	Vectorlabs - Burlingame, CA, USA
VECTASTAIN® ABC-Staining Kit	Vectorlabs, Burlingame, CA, USA
Natriumphosphat (monobasisch)	Sigma-Aldrich - St. Louis, Missouri, USA
Methanol 99,5%	Sigma-Aldrich - St. Louis, Missouri, USA
HCl rauchend 37%, ROTIPURAN®	Carl Roth – Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, jeweils 70%, 80%, 90%	Thermo Fisher Scientific - Waltham, Massachusetts, USA
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) – Reagens	Sigma-Aldrich - St. Louis, Missouri, USA
Borsäure	Carl Roth – Karlsruhe, Deutschland
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich - St. Louis, Missouri, USA
Einbettmedium für Gefrierschnitte (Tissue freezing medium)	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH – Wetzlar, Deutschland
Glycerin	Sigma-Aldrich - St. Louis, Missouri, USA

Triton™ X-100	Sigma-Aldrich - St. Louis, Missouri, USA
Gelatine	Sigma-Aldrich - St. Louis, Missouri, USA
Zitronensäure	Thermo Fisher Scientific -Waltham, Massachusetts, USA
Paraformaldehyd-Pulver	Sigma-Aldrich - St. Louis, Missouri, USA
Bovine serume albumine (BSA)	Sigma-Aldrich - St. Louis, Missouri, USA

Lösungen	Herstellung
0,1 M Phosphat-Puffer-Lösung (PBS-Gebrauchslösung, pH 7,4)	ad 10 l: 10 l dest H ₂ O 230 g Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 52,44 g NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O
Boratpuffer (pH 8,5)	Für 450 ml Borsäure 3,09 g 450 ml H ₂ Odest. ad 450 ml pH 8,5 mit 5N NaOH einstellen
DAB – Färbelösung	ad 20 ml Tris 20 ml DAB 10 mg H ₂ O ₂ 2 µl
DAB – Konzentrat	100 mg DAB 10 ml H ₂ O dest. 10 ml 0,2 M PB
Citratpuffer (pH 5,8)	ad 1l 1,92g Zitronensäure pH 5,8 mit 1 M HCl einstellen 0,5 ml Tween 20 dazugeben
Blockierlösung 0,3% (V/V) -Triton-X mit PBS und NGS	100 ml PBS 3 ml Triton X-100 50 ml NGS ad 1000 ml H ₂ O dest.

Peroxidasenblockadelösung	ad 1 l 200 ml Methanol 30 ml H ₂ O ₂ Mit 0,1M PB zu einem Liter auffüllen
Antifreeze- Gefrierschutzlösung	5,18 g Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 1,57 g NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O 400 ml H ₂ O dest. 300 ml Ethylenglycol 300 ml Glyzerin
Gelatine-Lösung	13 g Gelatine 0,18 g Chromkaliumsulfat 300 ml H ₂ O dest.
8% (m/V) -PFA-Lösung	20 g PFA 241,6 ml H ₂ O dest. 1 Tropfen 30% NaOH

3.4. Versuchstiere

Bei den verwendeten Versuchstieren handelte es sich um Mäuse vom Wildtyp C57BL/6 (Charles River, Sulzfeld), welche zum Zeitpunkt des Experiments zwischen 8 und 10 Wochen alt waren. Dabei handelte es sich um adulte, männliche Mäuse, deren Körpergewicht zwischen 20-25 g betrug. Der Tierstamm ist ein häufig in der Erforschung zerebraler Prozesse verwendeter, validierter Stamm. Während und bis zur experimentellen Phase wurden die Mäuse in Macrolon-Käfigen (Firma Ehret GmbH, Emmendingen, Germany) unter kontrolliert pathogenfreien Bedingungen mit freiem Zugang zu Futter und Wasser und bei gesetzlich vorgeschriebener Temperatur und Luftfeuchtigkeit gehalten. Der Hell-/Dunkel-Zyklus in den Tierställen war auf 12/12 Stunden eingestellt (Hellphase 7-19 Uhr, Dunkelphase 19-7 Uhr). Die Tiere wurden täglich auf Auffälligkeiten untersucht. Der olfaktorische Input oder die Aktivität wurde nicht überwacht; generell herrschten jedoch für alle Versuchstiere identische Bedingungen.

Alle Versuche waren durch das Regierungspräsidium Gießen genehmigt worden (Ordnungsnummer V54–19c20-15(1) MR20/15Nr.41/2009).

3.5. Versuchsaufbau und zeitlicher Ablauf

3.5.1. Implantation der physikalischen Barriere

Die Unterbrechung des RMS mittels physikalischer Barriere (PB) wurde entsprechend dem Protokoll von Mendoza und Kollegen (Mendoza-Torreblanca, Martinez-Martinez et al. 2008), 7 Tage vor Beginn Ara-C-Infusion durchgeführt. Die PB wurde selbstständig aus einer Overhead-Folie aus Polyester hergestellt und mit einem Cutter ein Stück mit folgenden Maßen ausgeschnitten: die Länge betrug 3,5 mm, die Breite 2,0 mm und die Dicke 0,11 mm.

Die Versuchstiere wurden für den Eingriff durch intraperitoneale Injektion von Ketamin (80 mg/kg KG) und Xylazin (2%, 4 mg/kg KG) verdünnt in NaCl (0,9%) in Vollnarkose versetzt. Für den Eingriff wurden die Mäuse nach ausreichender Narkotisierung, welche durch Setzen eines Schmerzreizes geprüft wurde, in einem stereotaktischen Rahmen fixiert. Es wurde eine rechtsseitige Kraniotomie mit Eröffnung der Schädelkalotte durch Trepanation durchgeführt. Hierfür wurde im Bereich des Schädels das Fell entfernt; durch Desinfektion und Säuberung mit einem Tupfer wurden aseptische Bedingungen geschaffen. Im Bereich der Mittellinie wurde dann ein sagittaler Hautschnitt durchgeführt. Die Schädelkalotte wurde anschließend mit einem Feinbohrer eröffnet. Anschließend wurde die Dura mater unter Erhaltung der Gefäßversorgung vorsichtig eröffnet. Die Position der PB wurde relativ zum Bregma unter Verwendung des Mausatlas von Paxinos und Franklin (Paxinos und Franklin 2001) ermittelt. Die Implantation erfolgte an folgenden Koordinaten:

- die Barriere befindet sich +1,75 mm anterior des Bregmas
- in der rechten Hemisphäre betragen die Koordination ausgehend vom Bregma 0 bis +2,0 mm (Breite der PB, von median nach lateral)
- die horizontalen Maße betragen von dorsal nach ventral 3,5 mm (Länge der PB).

Um sicherzugehen, dass eine vollständige Unterbrechung des RMS erreicht wird, wurde die Barriere senkrecht bis zum knöchernen Boden des Schädels heruntergedrückt. Oberhalb der Barriere sollte das Gehirngewebe wieder verschlossen sein. Anschließend erfolgte eine erneute Desinfektion. Nach Abschluss des Eingriffs nach circa 30 Minuten wurden die Mäuse zurück in ihre Käfige gebracht und mit Wärmelampen behandelt.

Wie in späteren histologischen Schnitten bestätigt werden konnte, wurde so eine vollständige Unterbrechung des Migrationsstroms gewährleistet.

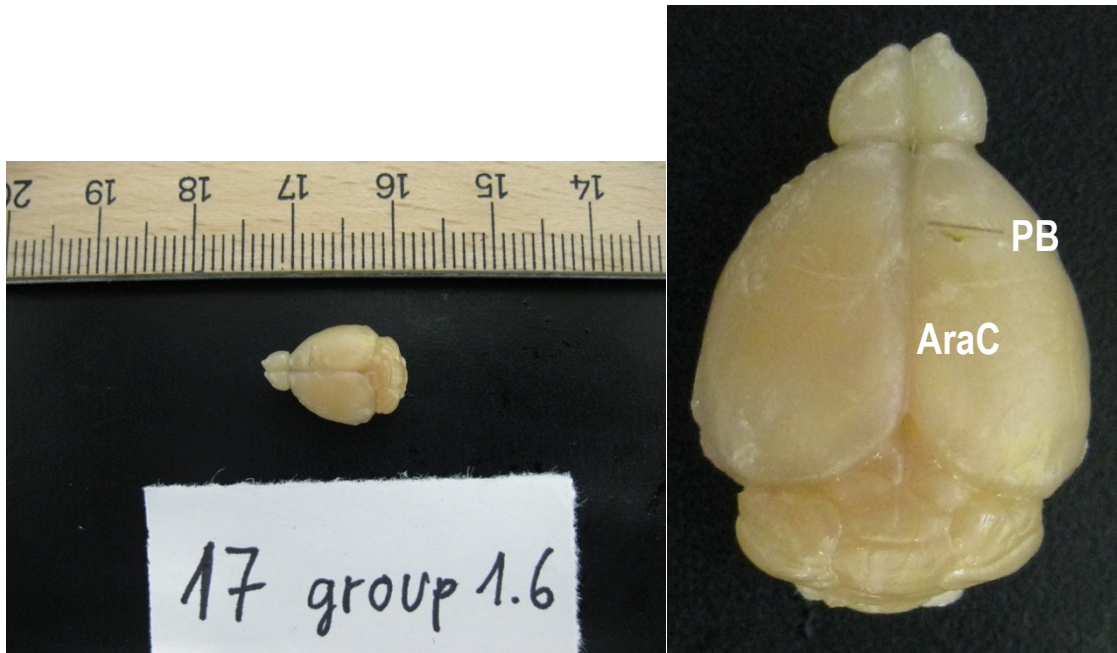
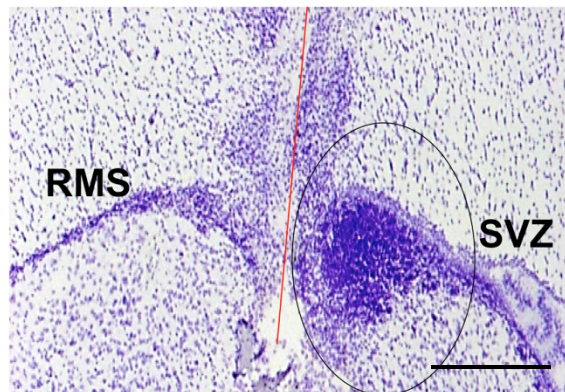
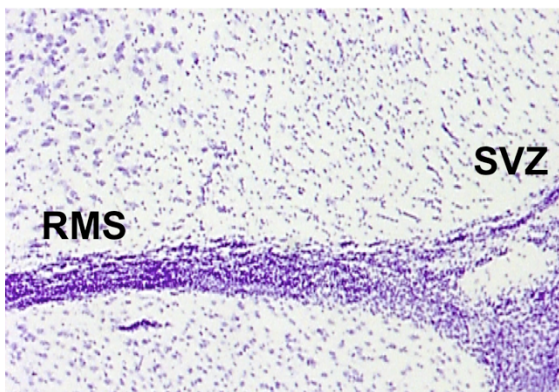
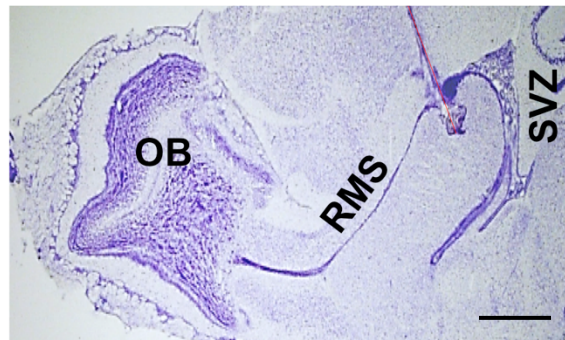
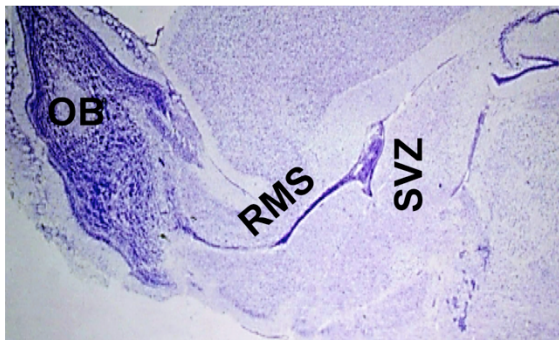


Abb. 6: Präpariertes Mäusegehirn mit Veranschaulichung der Größenverhältnisse, der Schnittsetzung zur Implantation der PB sowie der Position der Ara-C-Pumpe.



Kontrolle

Experimentelle Gruppe mit PB

Abb.7: Sagittale Schnitte durch SVZ und RMS in der Kontrollgruppe und in der experimentellen Gruppe nach Implantation der PB im Rattengehirn (Nissl Färbung). Es zeigen sich die Position der PB sowie eine effiziente Unterbrechung des RMS mit Akkumulation der Zellen vor der Barriere und Verdickung der SVZ. Die PB entspricht dem roten Balken (Maßstabeinheit 2,2 mm oben, unten 100 µm, PB = physikalische Barriere, SVZ = subventrikuläre Zone, RMS = rostraler Migrationsstrom, OB = olfaktorischer Bulbus, histologische Schnitte zur Verfügung gestellt durch Oscar Arias-Carrion).

3.5.2. Implantation der osmotischen Pumpe und Ara-C-Behandlung

Nach Implantation der physikalischen Barriere wurden 7 Tage abgewartet, um mögliche inflammatorische oder traumatische Effekte des Eingriffs abklingen zu lassen, bis weitere experimentelle Eingriffe durchgeführt wurden. Das Ziel des folgenden Eingriffs war es, die profilierenden Zellen aus der SVZ und dem RMS temporär zu entfernen. Hierfür implantierten wir eine Minipumpe auf der Schädeloberfläche, durch welche die Infusion des Chemotherapeutikums Ara-C (Cytarabin, 1-β-D-Arabinofuranosylcytosine) erfolgte. Für Ara-C wurde in verschiedenen früheren Experimenten (Doetsch, Garcia-Verdugo et al. 1999) gezeigt, dass es die Proliferation von Vorläuferzellen stark reduziert. In der verwendeten Dosis konnten keine neurotoxischen Effekte nachgewiesen werden. Bei der Pumpe handelte es sich um eine osmotisch arbeitende Pumpe (Alzet, Palo Alto, CA, Model 1700D), welche vor dem Eingriff mit Ara-C (2%, Sigma, gelöst in 0,9%-iger NaCl Lösung) befüllt wurde. Für die Intervention wurden die Versuchstiere erneut mit oben genannten Anästhetika in Narkose versetzt und im Stereotaxie-Rahmen fixiert. Als Zugang wurde die Wunde des vorhergehenden Eingriffs genutzt. Als Referenz wurde erneut das Bregma lokalisiert; die Kanüle der Pumpe wurde 1,1 mm rostral davon implantiert. Dafür wurde die knöcherne Schädeldecke nach Entfernung des Periosts getrocknet und aufgeraut, mit einem Trepanationsbohrer ein Loch in die Schädeldecke gebohrt und die Kanüle in diesem mit Dentalzement befestigt. Die Kanüle endete 1,0 mm unterhalb der Dura im Subarachnoidalraum. Es wurde darauf geachtet, keine kortikalen Verletzungen durch den Eingriff zu produzieren. Die an die Kanüle angeschlossene Minipumpe wurde nach Härtung des Zements in einer Hauttasche nach stumpfer Präparation des bestehenden Zugangs im spinalen Bereich implantiert.

Über die einliegende Kanüle erfolgte die kontinuierliche intrathekale Infusion von Ara-C mit einer Flussrate von 5µl pro Stunde über 7 Tage.

Ara-C wirkt antimetabolisch, indem es in die DNA-Synthese bei Zellteilung eingreift. Dabei wird es zu seiner aktiven Form phosphoryliert und in der S-Phase des Zellzyklus in die DNA

als Cytosinanalogen eingebaut, was zum Kettenabbruch durch Störung der weiteren DNA-Synthese und –Reparatur führt (Gage, Björklund et al. 2012). Ara-C wirkt dadurch hauptsächlich auf die sich in der S-Phase des Zellzyklus befindlichen Zellen. Da schnell teilende Zellen aufgrund der hohen Zellteilungsrate diese Phase häufiger durchlaufen, werden insbesondere diese Zellen eliminiert. Das bedeutet für das SVZ-RMS-System, dass es vor allem zu einer Ablation der schnell teilenden Typ-C- und Typ-A-Zellen kommt, während die Typ-B-Zellen zu einem geringeren Anteil eliminiert werden (Ghanbari, Esmailpour et al. 2015).

Mit der Ara-C-Infusion wurde 7 Tage nach Implantation der Barriere begonnen. Das Ende der kontinuierlichen Ara-C-Infusion wurde als Tag 0 der Weiterbeobachtung definiert.

3.5.3. Verabreichung von BrdU

Für die weiteren experimentellen Eingriffe wurden die Versuchstiere in verschiedene Gruppen eingeteilt, die jeweils nach einem bestimmten Schema BrdU (5-Bromo-2'-desoxyuridin) erhielten. BrdU kann anschließend im histologischen Schnitt durch einen fluoreszenzmarkierten Antikörper nachgewiesen werden, womit sich teilende Zellen sichtbar gemacht werden können und eine Rückdatierung der Zellteilung erfolgen kann.

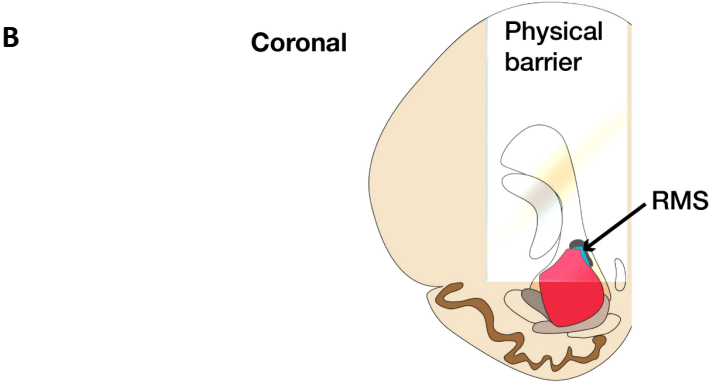
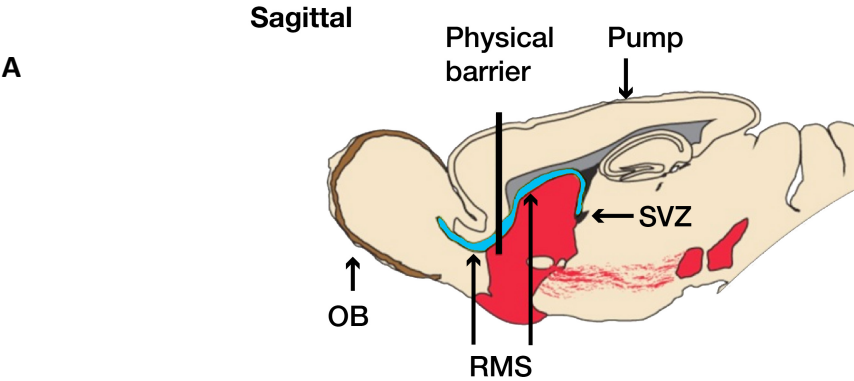
BrdU gelöst in isotonischer Kochsalzlösung (c= 10 mg/ml) wurde mittels intraperitonealer Injektion in einer Dosis von 100 mg/kg verabreicht

Die Versuchstiere wurden in zwei Gruppen zur Kurzzeit- und Langzeitbeobachtung eingeteilt.

Die Kurzzeitgruppe wurde in 3 Untergruppen mit jeweils 4 Versuchstieren aufgeteilt. Die 3 Untergruppen erhielten einmalig BrdU jeweils zu verschiedenen Zeitpunkten nach Ara-C-Infusion (entspricht Tag 0) und wurden 2 Stunden nach Verabreichung von BrdU getötet. Die erste Gruppe erhielt BrdU direkt an Tag 0, die zweite Gruppe an Tag 2 und die dritte Gruppe an Tag 14. Somit erfolgte eine Markierung der proliferierenden Zellen jeweils an verschiedenen Zeitpunkten nach Ara-C-Infusion. Die Kontrolltiere der Kurzzeitgruppe erhielt BrdU 14 Tage nach Ara-C-Infusion und wurde ebenfalls 2 Stunden danach geopfert.

In der Langzeitgruppe verabreichten wir BrdU direkt anschließend an die Ara-C-Infusion täglich über einen Zeitraum von insgesamt 6 Tagen (Tag 0 bis Tag 6). Um die Migration und Differenzierung der während des Infusionszeitraum geborenen Zellen nachverfolgen zu

können, wurden die Tiere in 2 Gruppen geteilt (jeweils n=4), die jeweils 55 und 105 Tage nach Ara-C-Infusion und Verabreichung von BrdU geopfert wurden. Die Auswertung der Langzeitgruppe wird in der Dissertation von Frau Corinna Steiner (Universität Marburg) behandelt.



C

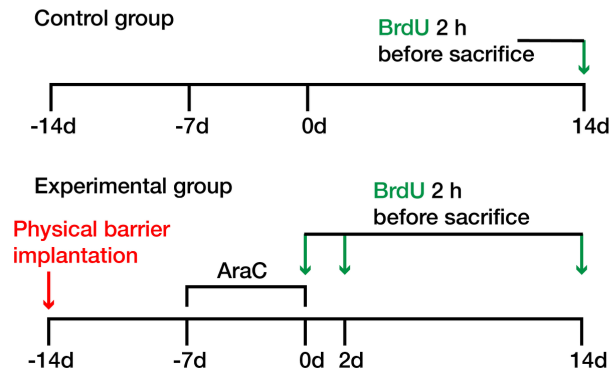


Abb.8: Experimenteller Aufbau und Administrationsprotokoll von BrdU und Ara-C. (A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus im Sagittalschnitt. Unterbrechung der Migration der Neuroblasten zum OB im RMS circa 1,75 mm rostral des Bregmas; Implantation der Ara-C-Infusionspumpe circa 1,1 mm rostral des Bregmas. (B) Koronare Ansicht mit schematischer Darstellung der Unterbrechung des RMS durch die PB. (C) Administrationsprotokoll mit Beginn der Ara-C-Infusion 7 Tage nach Implantation der PB. Die Kurzzeitgruppe wurde in drei Untergruppen unterteilt, welche BrdU jeweils an Tag 0, 2 und 14 nach Beendigung der Ara-C-Infusion erhielten und 2 Stunden später getötet wurden. Die Kontrollgruppe wurde nur mit Ara-C-Infusion behandelt und 14 Tage nach Beendigung dieser nach einmaliger BrdU-Gabe geopfert (physical barrier implantation = Zeitpunkt der Implantation der PB, Control = Kontrolle, d = day, 2h before sacrifice = 2 Stunden vor Tötung).

3.5.4. Perfusion, Gewebeaufbereitung und Herstellung von Gewebsschnitten

Die Versuchstiere wurden zu verschiedenen Zeitpunkten des Experiments getötet. Das Gehirn wurde entnommen und für die histologische Untersuchung aufbereitet.

Die Tötung der Tiere erfolgte durch intraperitoneale Injektion von Pentobarbital-Natrium in einer Dosis von 600 mg/kg. Anschließend wurden die Versuchstiere an allen vier Extremitäten mit der ventralen Seite nach oben auf einem Untergrund fixiert und Abdomen und Thorax chirurgisch eröffnet. Daraufhin erfolgte die intrakardiale Perfusion. Gleichzeitig wurde der rechte Vorhof eröffnet, um den Abfluss des venösen Blutes gewährleisten zu können. Zunächst wurde zur Waschung der Gefäße eine gekühlte 0,9%ige Kochsalzlösung perfundiert; anschließend erfolgte zur späteren Fixierung die Perfusion von ebenfalls gekühltem 4%-igem Paraformaldehyd (PFA) in 0,1 M Phosphatpuffer (PB chem.). Bei ausreichender Spülung sind in der anschließenden histologischen Färbung keine Erythrozyten mehr nachweisbar (Gage, Kipke et al. 2012). Die Perfusion wurde über 20 min mit einer Perfusionspumpe und einer Flussrate von 10 ml/min durchgeführt.

Anschließend wurde nach Abtrennung des Kopfes vom Körper das Cerebrum vorsichtig mit einer Schere aus dem Kranium entfernt. Nach einem sagittalen Schnitt durch Haut und Knochen wurde der Schädel eröffnet und unter Anhebung der sagittalen Schuppe die Öffnung durch eine Pinzette erweitert. Nach Eröffnung wurde das Gehirn mittels eines Spatels vom Foramen magnum entfernt und vorsichtig entnommen. Anschließend wurde das Gehirn unmittelbar auf eine eisgekühlte, mit nassem Filterpapier bedeckte Metallplatte gegeben. Es erfolgte eine erneute Fixierung in 4%igem PFA für circa 24 h. Darauffolgend wurden die Gehirne für 72 h in 30%iger Saccharose-Lösung aufbewahrt. Für die anschließende Aufbewahrung wurden die Gehirne für 60 s in Isopentan bei - 30 °C schockgefroren und anschließend in Gefrierschutzlösung mit 30%iger Saccharose-Lösung und 0,1 M Phosphatpuffer bei – 20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Für die Anfertigung der histologischen Schnitte wurden aus den Gehirnschnitten anschließend mit Hilfe eines Gefriermikrotoms bei -20 °C Schnitte von 30 µm Dicke hergestellt. Dabei wurden unter Verwendung des anatomischen Atlas von Paxinos und Franklin (Paxinos und Franklin 2001) zum Mausgehirn die anatomischen Regionen Hippocampus, *Striatum* und rechter und linker olfaktorischer Bulbus unterschieden und getrennt in verschiedenen Kryoröhrchen in Anti-Freeze-Lösung gesammelt. Das Striatum als Region von SVZ und RMS wurde nach rostral als die Region, ab welcher sich der Bulbus nicht mehr abtrennen ließ, definiert. Nach ventral erfolgte der Abschluss bei Erreichen des *Cerebellums*.

Gesammelt wurden die Schnitte frei flottierend in den Kryoröhrchen in 10er-Serien, sodass ein Sammelgefäß jeweils jeden 10. Schnitt enthielt; zwischen zwei aufeinanderfolgenden Schnitten bestanden somit bei ein Schichtdickenunterschied von 300µm Abstand.

3.6. Immunhistochemische Färbungen

Zur Detektion und Charakterisierung proliferierender Zellen führten wir mehrfache immunhistochemische Färbungen durch.

3.6.1. Verwendete Antikörper

3.6.1.1. Primäre Antikörper

Antigen	Eigen-schaften	Ver-dünnung	Hersteller	Produkt-Nummer	Marker für
GFAP	Wirt: Hase	1:200	Thermo Fisher Scientific - Waltham, Massachusetts, USA	18-0063	Neuronale Stammzellen, Gliazellen

NeuN	Wirt: Maus	1:1000	Merck-Millipore – Darmstadt, Deutschland	MAB377B	Neuronen
BrdU	Wirt: Ratte	1:500	AbD Serotec – Kidlington, GB	OBT003	Teilende Zellen
Nestin	Ziel: Rat, Wirt: Maus	1:300	Becton-Dickinson Biosciences – Franklin Lakes, New Jersey, USA	556309	Neuronale Stammzellen
PSA-NCAM	Wirt: Maus IgM, monoklonal	1:500	Merck-Millipore – Darmstadt, Deutschland	MAB5324	Neuroblasten
Tyrosin-Hydroxylase (TH)	Wirt: Hase	1:1000	Merck-Millipore – Darmstadt, Deutschland	AB5324	Dopaminerge Zellen
Pax6 (paired box 6)	Wirt: Hase	1:200	Abcam – Cambridge, GB	Ab5790	Neuronale Stammzellen

3.6.1.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper mit Konjugat	Verdünnung	Hersteller	Produktnummer
Biotin-SP (long spacer) AffiniPure IgG (H+L) Ziel: Anti-Ratte Wirt: Esel	1:500	Jackson Immunologicals - West Grove, PA, USA	712-065-153
Cy TM 3-AffiniPure F(ab') ₂ FragmentIgG (H+L) Ziel: Maus Wirt: Ziege	1:500	Jackson Immunologicals	115-166-003
Cy TM 3 AffiniPure IgG (H+L) Ziel: Hase Wirt: Ziege	1:500	Jackson Immunologicals	111-165-003
Alexa Fluor 488 IgG (H+L) Ziel: Ratte Wirt: Ziege	1:1000	Thermo Fisher Scientific - Waltham, Massachusetts, USA	A11006

IgM (μ -Ketten spezifisch) –Biotin-conjugated Ziel: Maus Wirt: Ziege	1:500	Sigma-Aldrich - St. Louis, Missouri, USA	B 9265
Cy TM 5 Streptavidin-conjugated (Reaktion mit Biotin)	1:500	ThermoScientific	SA1011
Cy TM 5 AffiniPure IgG (H+L) Ziel: Hase Wirt: Ziege	1:500	Jackson Immunologicals	111-175-144

3.6.2. APC-Methode und DAB-Färbung

3.6.2.1. Allgemeines Prinzip

Für die reine Quantifizierung bestimmter Zellen verwendeten wir die DAB (3,3'-Diaminobenzidin) - Methode. Dies ist eine gebräuchliche Methode zur *in situ* Darstellung von Antigenen und bietet gegenüber Immunfluoreszenzfärbungen den Vorteil, dass durch Reduktion unspezifischer Färbungen die Zellen einfacher zu quantifizieren sind, auch unter einfacher Lichtmikroskopie. Mehrfachfärbungen zur genaueren Identifikation des Zelltyps sind jedoch nicht möglich. Wir verwendeten diese Methode zur Quantifizierung von BrdU-positiven Zellen in der SVZ und im RMS. Somit erhielten wir Auskunft über die Proliferation in bestimmten anatomischen Regionen, ohne jedoch den Phänotyp näher zu bestimmen.

Für die Methode erfolgt zunächst die Blockierung unspezifischer endogener Peroxidasen; anschließend wurden die histologischen Schnitte mit einem primären Antikörper gegen das gesuchte Antigen inkubiert. Die Detektion erfolgt indirekt, das heißt der gebundene primäre Antikörper wird mit einem Biotin-gebundenen sekundären Antikörper gekoppelt, der nach Zugabe der Glykoproteine Avidin oder Streptavidin einen Komplex mit Biotin bildet und somit letztendlich zu einer Verstärkung der Färbung führt. Katalysiert wird diese Reaktion durch Methylperoxidase, was zu einer Braunfärbung des DAB führt. Für die Färbungen verwendeten wir frei im Medium schwimmende Gewebeschnitte.

3.6.2.2 Protokoll der DAB-Färbung mit BrdU

Zeitverlauf und Färbung	Arbeitsschritt	Antikörper und Verdünnung
Jeweils 10 min	5x Waschen in 0,1 M PB	

5 min	Blockade endogener Peroxidasen in 0,1 M PB mit 20% Methanol und 3% H ₂ O ₂	
Jeweils 10 min	5x Waschen in 0,1 M PB	
15 min	Inkubation in 0,1 M PB + 0,3%- Triton-X für 15 min	
1 h	Inkubation 0,1 M PB + 2,5%-igem NGS	
Jeweils 10 min	5x Waschen in 0,1 M PB	
<u>BrdU</u>		
24 h	Inkubation Primärantikörper Anti-BrdU in 0,1M PB und 5%-igem NGS	1:500, Wirt: Ratte
Jeweils 10 min	5x Waschen in 0,1 M PB	
2-3 h	Inkubation Sekundärantikörper Anti Ratte Biotin-konjugiert	1:500
Jeweils 10 min	5x Waschen in 0,1M PB	
1 h	Inkubation mit Avidin und Biotin (ABC-Kit, Vectastain)	1:200
Unter optischer Beurteilung der Färbungsintensität, ca. 1-2 min	Inkubation in 50%-iger DAB-Lösung in filtriertem H ₂ O und 0,003% H ₂ O ₂ (unter Abzug)	
	Aufziehen auf gelatinierte Objektträger in einem Wasserbad mit 0,9%iger NaCl	
Jeweils 10 min	Dehydration durch Inkubation in aufsteigender Alkoholreihe (Ethanol 70%, 80%, 90%, 100%)	
Jeweils 15 min	Zweimalige Inkubation in Xylen	
	Zugabe Vectastain Mounting Medium, Bedeckung mit Deckglas	

3.6.3. Immunfluoreszenzfärbung

3.6.3.1. Allgemeines Prinzip

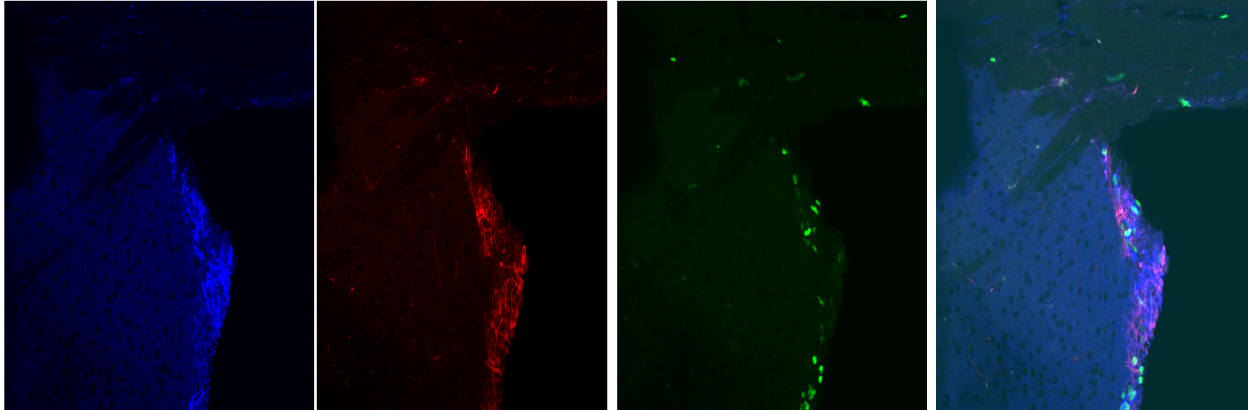


Abb.9: Immunfluoreszenzfärbung der SVZ im koronaren Schnitt. Von links nach rechts sind zunächst die Einzelfärbungen mit PSA-NCAM (blau), Nestin (rot) und BrdU (grün) dargestellt; die letzte Abbildung zeigt die Dreifachfärbung mit den drei Markern.

Für die Bestimmung von Ko-Expression und Phänotyp-Differenzierung der Zellen spielt die Technik der Immunfluoreszenzfärbung eine große Rolle. Hier können verschiedene Antigene durch Antikörper nachgewiesen werden. Die Antikörper werden in einer bestimmten Spezies als Wirt hergestellt und anschließend mit sekundären Antikörpern gegen diesen nachgewiesen. Die sekundären Antikörper sind mit Fluoreszenzfarbstoffen verschiedener Wellenlänge markiert und können so durch Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden.

Die Färbungen wurden erneut auf frei im Medium schwimmenden Schnitten durchgeführt. Zur Darstellung der Ko-expression von bestimmten Markern wurden sequenzielle Mehrfachfärbungen durchgeführt. Zur Blockade unspezifischer Färbungen wurden die Schnitte zunächst in Triton-X und Ziegen Serum (normal goat serum (NGS)) inkubiert. Besondere Maßnahmen sind vor den Färbungen für BrdU nötig. Damit die DNA für die Bindung des Antikörpers zugänglich ist, muss diese zunächst durch Hitze und einen sauren pH-Wert denaturiert werden. Dafür wurden die Schnitte für 30 min in 2 M Salzsäure bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine erneute Neutralisation des pH-Wertes durch Inkubation in Boratpuffer. Dies erfolgt vor der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch oben genannte Methoden, da dieser Prozess zur Freisetzung unspezifischer Antigene führen kann. Alle Färbungen erfolgten bei 4 °C, um unspezifische Bindungen zu reduzieren

3.6.3.2 Protokolle der durchgeführten Fluoreszenzfärbungen

Sequenzielle Dreifachfärbung BrdU – Nestin – PSA-NCAM

Zeitverlauf und Färbung	Arbeitsschritt	Antikörper und Verdünnung
Jeweils 10 min	5x Waschen in 0,1 M PB	
15 min	Blockieren mit 0,3%-Triton-X in 0,1 M PB und 5%-igem NGS	
Jeweils 10 min	5x Waschen in 0,1 M PB	
<u>Tag 1: Nestin</u>		
24 Sh bei 4 °C	Inkubation mit Primärantikörper anti-Nestin in 0,1 M PB und 5%-igem NGS	1:300, Wirt: Maus
Jeweils 10 min	5x Waschen in 0,1 M PB	
2-3 h	Inkubation mit Sekundärantikörper Cy ³ -konjugiert anti-Maus-IgG	1:500
<u>Tag 2: PSA-NCAM</u>		
24 h bei 4 °C	Inkubation mit Primärantikörper IgM anti-PSA-NCAM in 0,1 M PB und 5%-iger NGS	1:500, Wirt: Maus
Jeweils 10 min	5x Waschen in 0,1 M PB	
Jeweils 1-2 h	Inkubation mit Sekundärantikörper Biotin-konjugiert anti-Maus IgM Inkubation mit Streptavidin Cy ⁵ -konjugiert	1:300, 1:500
<u>Tag 3: BrdU</u>		
1 h Jeweils 2x 5 min	Denaturierung der DNS mittels Inkubation in Salzsäure HCl (2 N) in einem 37 °C warmen Wasserbad (frei flottierende Schnitte in abgeschlossenen Gefäßen), anschließend Blockieren in 0,1 M Boratpuffer	

Jeweils 10 min	Zwischen jedem Schritt jeweils 5x Waschen in 0,1 M PB	
24 h bei 4 °C	Inkubation des Primärantikörpers anti-BrdU 1 in 0,1 M PB und 5%-iger NGS	1:500, Wirt: Ratte
Jeweils 10 min	5x Waschen in 0,1 M PB	
2-3 h	Inkubation des Sekundärantikörpers Alexa Fluor 488-konjugiert anti-Ratte IgG	1:1000
Jeweils 10 min	5x Waschen in 0,1 M PB	
	Aufziehen auf Objektträger in 0,9%-NaCl Zugabe von Vectastain Mounting Medium und Bedeckung mit Deckglas	

Sequenzielle Dreifachfärbung BrdU – GFAP – Nestin

Zeitverlauf und Färbung	Arbeitsschritt	Antikörper und Verdünnung
Jeweils 10 min	5x Waschen in 0,1 M PB	
15 min	Blockieren mit 0,3%-Triton-X in 0,1 M PB und 5%-igem NGS	
Jeweils 10 min	5x Waschen in 0,1 M PB	
<u>Tag 1: BrdU</u>		
1 h	Denaturierung der DNS mittels Inkubation in Salzsäure HCl (2 N) in einem 37°C warmen Wasserbad (frei flottierende Schnitte in abgeschlossenen Gefäßen)	
Jeweils 2x 5 min	anschließend Blockieren in 0,1 M Boratpuffer,	
Jeweils 10 min	zwischen jedem Schritt jeweils 5x Waschen in 0,1 M PB	
24 h bei 4 °C	Inkubation des Primärantikörpers anti-BrdU in 0,1 M PB und 5%-iger NGS	1:500, Wirt: Ratte

Jeweils 10 min	5x Waschen in 0,1 M PB	
2-3 h	Inkubation des Sekundärantikörpers Alexa Fluor 488-konjugiert anti-Ratte IgG	1:1000
Jeweils 10 min	5x Waschen in 0,1 M PB	
<u>Tag 2: GFAP</u>		
24 h bei 4 °C	Inkubation des Primärantikörpers Hase anti-GFAP in 0,1 M PB und 5%-igem NGS	1:200, Wirt: Hase
2-3 h	Inkubation des Sekundärantikörpers Cy ⁵ -konjugiert anti-Hase-IgG	1:500
<u>Tag 3: Nestin</u>		
24 h	Inkubation des Primärantikörpers Maus anti-Ratte Nestin in 0,1M PB und 5%-igem NGS	1:300, Wirt:Ratte
2-3 h	Inkubation des Sekundärantikörpers anti-Maus IgG Cy ³ -konjugiert	1:500
	Aufziehen auf Objektträger in 0,9%-NaCl Zugabe von VectaStain Mounting Medium und Bedeckung mit Deckgläschen	

Sequenzielle Dreifachfärbung BrdU – Nestin – Pax6

Zeitverlauf und Färbung	Arbeitsschritt	Antikörper und Verdünnung
Jeweils 10 min	5x Waschen in 0,1M PB	
15 min	Blockieren mit 0,3%-Triton-X in 0,1 M PB und 5%-igem NGS	
Jeweils 10 min	5x Waschen in 0,1 M PB	
<u>Tag 1: BrdU</u>		
1 h	Denaturierung der DNS mittels Inkubation in Salzsäure HCl (2 N) in einem 37°C warmen Wasserbad (frei flottierende	

Jeweils 2x 5 min Jeweils 10 min	Schnitte in abgeschlossenen Gefäßen), anschließend Blockieren in 0,1 M Boratpuffer, zwischen jedem Schritt jeweils 5x Waschen in 0,1 M PB	
24 h bei 4 °C	Inkubation des Primärantikörpers anti-BrdU in 0,1 M PB und 5%-igem NGS	1:500, Wirt: Ratte
Jeweils 10 min	5x Waschen in 0,1 M PB	
2-3 h	Inkubation des Sekundärantikörpers Alexa Fluor 488-konjugiert anti-Ratte IgG	1:1000
Jeweils 10 min	5x Waschen in 0,1 M PB	
<u>Tag 2: GFAP</u>		
24 h bei 4 °C	Inkubation des Primärantikörpers Hase anti-GFAP in 0,1 M PB und 5%-igem NGS	1:200, Wirt: Hase
2-3 h	Inkubation des Sekundärantikörpers Cy ⁵ -konjugiert anti-Hase-IgG	1:500
<u>Tag 3: Pax6</u>		
1 h	Blockierung und Permeabilisierung mit 0,3%-Triton-X in 0,1 M PB und 5%-igem NGS	
48 h bei 4 °C	Inkubation des Primärantikörpers Pax6 in 0,1 M PB sowie 5%-igem NGS und BSA	1:500, Wirt: Hase
1 h	Blockierung und Permeabilisierung mit 0,3%-Triton-X und 5%-igem NGS	Aufziehen auf Objektträger
Jeweils 10 min	5x Waschen in 0,1 M PB	
2-3 h	Inkubation des Sekundärantikörpers IgG Cy ³ -konjugiert anti-Hase	1: 500
Jeweils 10 min	5x Waschen in 0,1 M PB	
	Aufziehen auf Objektträger in 0,9%-NaCl, Zugabe von Vectastain Mounting Medium und Bedeckung mit Deckglas	

3.7. Auswertung

3.7.1 Konfokalmikroskopie

Die Auswertung der fluoreszenzgefärbten Schnitte erfolgte durch die Methode der Konfokalmikroskopie. Die Konfokalmikroskopie unterscheidet sich von der Lichtmikroskopie dadurch, dass nur Licht aus einer Ebene und einem definierten Punkt aufgenommen wird. Somit ergeben sich weniger Interferenzen mit Ebenen außerhalb des Fokus (Paddock 2000). Die Auflösung ist höher als in der konventionellen Lichtmikroskopie.

Das Konfokalmikroskop ist prinzipiell wie ein Lichtmikroskop aufgebaut, jedoch mit einem Laser ausgestattet, der als Lichtquelle eingesetzt wird. Der ausgesandte Laserstrahl wird zunächst auf einen dichroitischen Spiegel geleitet. Dadurch wird der Strahl auf das Objekt fokussiert, welches punktförmig „abgescannt“ wird (Kempermann 2006). Dabei entsteht zu keinem Zeitpunkt ein komplettes Bild. Anschließend wird das Licht durch eine Pinhole-Blende geleitet, die Wellenlänge des Fluoreszenzlichtes über einen Emissionsfilter selektiert und an den *Photomultiplier* weitergegeben, der das Licht detektiert und digitalisiert. Die einzelnen Punkte werden zu einem Bild zusammengesetzt. Durch schrittweises computergesteuertes Verschieben bzw. Abtasten der Fokusebene in der vertikalen Ebene kann eine *z-Serie* erstellt werden, welche einer zusammengesetzten Aufnahme aus der Tiefenebene entspricht. Dies ist die Voraussetzung für die dreidimensionale Ansicht, welche durch die Gerätesoftware im Anschluss erzeugt werden kann (Kempermann 2006, Hanrahan, Harris et al. 2011). Die dreidimensionale Ansicht erlaubt sichere Aussagen über die Kollokalisierung mehrerer immunhistochemischer Marker in einer Zelle.

Das von uns verwendete Mikroskop war das Confocal Leica TCS SP5 II Mikroskop.

3.7.2. Stereologie

Zur Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte die verblindete Zählung der markierten Zellen in definierten anatomischen Regionen (RMS, SVZ). Hierbei soll durch die zweidimensionale Auszählung eines histologischen Schnittes die Zellzahl des dreidimensionalen anatomischen Abschnittes abgeschätzt werden (Kempermann 2006). In unseren Auswertungen benutzten wir die Optical Fractionator Methode des StereoInvestigator Programms (Golub, Brewer et al. 2015)

Die Methode des *Optical Fractionator* setzt sich aus dem Prinzip des *optical dissector* und des *fractionator* zusammen (Zimmermann 2013). Der *optical dissector* unterteilt die

auszählenden Regionen (ROI = region of interest) durch ein Gitternetz in mehrere kubische Abschnitte, dessen mikroskopisch sichtbare Oberfläche als Zählrahmen (*counting frame*) dient. Zwei der vier Grenzen sind grün markiert; daran angrenzende Zellen werden mitgezählt, wohingegen die Zellen, die an eine rote Linie angrenzen, vernachlässigt werden, was eine zweifache Zählung verhindert. In der vertikalen Ebene dürfen nur Zellen erfasst werden, die scharf dargestellt werden können. In unserer Studie verwendeten wir die Maße 100µm x100µm für den Zählrahmen. Die vertikalen Dimensionen (*optical dissector height*) entsprachen in unserem Fall der Schnittdicke von 30µm. Die Zellzählung erfolgte unter dem Auflichtmikroskop in einer mikroskopischen Vergrößerung von 40x. Danach berechnet die Software aus den eingegebenen Daten und den gezählten Objekten die absolute geschätzte Zahl der Zellen in der ROI (Golub, Brewer et al. 2015).

Die anatomischen Koordinaten für unsere Auszählung ermittelten wir mit Hilfe des anatomischen Mausatlas (Paxinos und Franklin 2001)

Für die SVZ zählten wir hierfür die Zellen an der lateralen Wand des Seitenventrikels in den Schnitten mit den Koordinaten +0,002 bis +0,0845 mm relativ zum Bregma aus. Für die Gegend rostral der Barriere (1,75 mm relativ zum Bregma) im RMS legten wir die Koordinaten +1,85 mm bis +2,045 mm relativ zum Bregma fest. Die Zählung erfolgte verblindet, ohne vorab die Identität des Versuchstiers zu kennen. Das verwendete Lichtmikroskop war das Nikon Microphot-FX; die verwendete Software die StereoInvestigator Software Version 8 (MicroBrightField, Magdeburg, Germany).

3.8. Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen wurden mit der Software Prism 7.03 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Die Mittelwerte der Gruppen wurden in einem zweifachen ANOVA mit Fisher's LSD *post hoc* Test gegenübergestellt. Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwert mit Standardabweichung. Ein P-Wert von < 0,05 wurde als signifikant angesehen. Die Anzahl der Sternchen (*) über den Graphen zeigen die verschiedenen Signifikanzlevel (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

4. Ergebnisse

4.1. Reduktion der proliferierenden Zellen in der SVZ durch Ara-C-Administration

Um die Auswirkungen der anti-mitotischen Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Ara-C auf die SVZ zu untersuchen, führten wir immunzytochemische Färbungen der SVZ von BrdU an Tag 0, 2 und 14 nach Ara-C-Gabe durch und quantifizierten die positiven Zellen mit der oben beschriebenen stereologischen Technik. Als Kontrollgruppe zur Messung der regulären Proliferation der in der SVZ ansässigen Vorläuferzellen dienten Mäuse, deren RMS nicht durch eine physikalische Barriere unterbrochen wurde und die kein Ara-C erhielten.

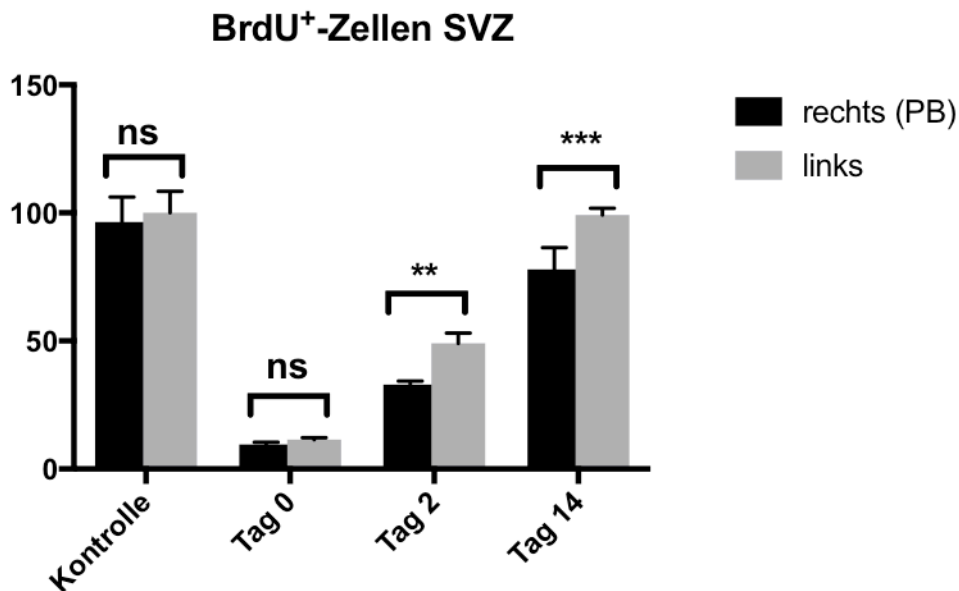


Abb.10: Quantifizierung der BrdU⁺-Zellen in der SVZ. Die Zellzahl der linken SVZ wurde als Referenzwert mit 100% gleichgesetzt. Zwischen rechts und links besteht in der Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied. An Tag 0 waren auf beiden Seiten wenige verbliebene BrdU⁺-Zellen nachweisbar, die Zellzahl nimmt im Verlauf zu. Die linke Seite der SVZ entspricht an Tag 14 der Kontrollgruppe; es ist ein signifikanter Unterschied zwischen rechter und linker Seite nachweisbar.

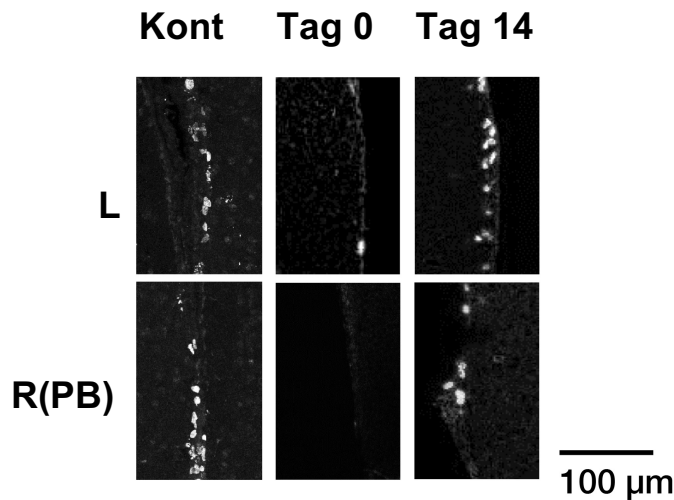


Abb.11: Koronarschnitte durch die SVZ mit BrdU⁺-Zellen der Kontrolle, an Tag 0 und 14 nach Ara-C-Infusion. Dargestellt ist eine nahezu vollständige Ablation proliferierender Zellen an Tag 0 mit erneuter deutlicher Zunahme bis Tag 14. An Tag 14 ist ein leichter Seitenunterschied zuungunsten rechts sichtbar, die Gesamtzahl der Zellen erreicht nahezu die Zellzahl der Kontrolle (Maßstabeinheit 100 µm, L=links, R(PB) = rechts (physikalische Barriere), Kont=Kontrolle).

Da die Mäuse zwar alle zum gleichen Zeitpunkt Ara-C erhalten haben, aber alle unmittelbar vor ihrer Tötung BrdU, spiegeln diese Zahlen die Proliferation der Zellen in der SVZ zu verschiedenen Zeitpunkten nach Ara-C-Behandlung wieder. So lassen sich der Zeitverlauf der Wiederbesiedelung und das Ausmaß der Proliferation nachvollziehen (Abb. 11 und 12).

Die linke SVZ der Kontrollgruppe wurde als Referenzwert mit 100% (absolute Zellzahl 6200 \pm 303, n=3) festgelegt. Zur rechten SVZ der Kontrollgruppe ergab sich mit 96,6% \pm 5,6% kein signifikanter Unterschied (5982 \pm 347, n=3).

Direkt nach der anti-mitotischen Behandlung zeigen sich auf beiden Seiten wenige verbleibende Zellen. Dabei sind auf der rechten Seite 9,5% \pm 0,5% Zellen der Kontrollgruppe nachweisbar (592 \pm 29 Zellen, n=4), auf der linken Seite 11,4% \pm 0,4% (MW 710 \pm 24 Zellen). Hier zeigt sich kein Unterschied zwischen beiden Gruppen. An Tag 2 nach Ara-C-Gabe zeigte sich bereits ein signifikanter Unterschied (p-Wert = 0,0012) zwischen linker und rechter SVZ: rechts liegen 32,9% \pm 0,7% (2038 \pm 45,07 Zellen, n=4) vor; auf der linken Seite finden sich 49,0% \pm 2,0% (MW 3041 \pm 124,22 Zellen, n=4).

An Tag 14 zeigt sich für die linke SVZ der experimentellen Gruppe kein Unterschied zur Kontrollgruppe mehr (p-Wert = 0,0937); die Zellzahl beträgt 99,1% \pm 1,3% der Kontrollgruppe (6147 \pm 82 Zellen, n=4). Es besteht ein signifikanter Unterschied zur rechten

Seite (p-Wert < 0,0001), auf der die Zellzahl lediglich 77,9% +/- 1,3% (MW 4829 +/- 263 Zellen, n=4) beträgt. Somit ist eine Wiederbesiedelung nach Ablation der schnellteilenden Zellen sichtbar, die jedoch auf der rechten Seite langsamer verläuft.

Weiterhin färbten wir die Region der SVZ dreifach für BrdU, Nestin und PSA-NCAM und werteten dies mikroskopisch aus.

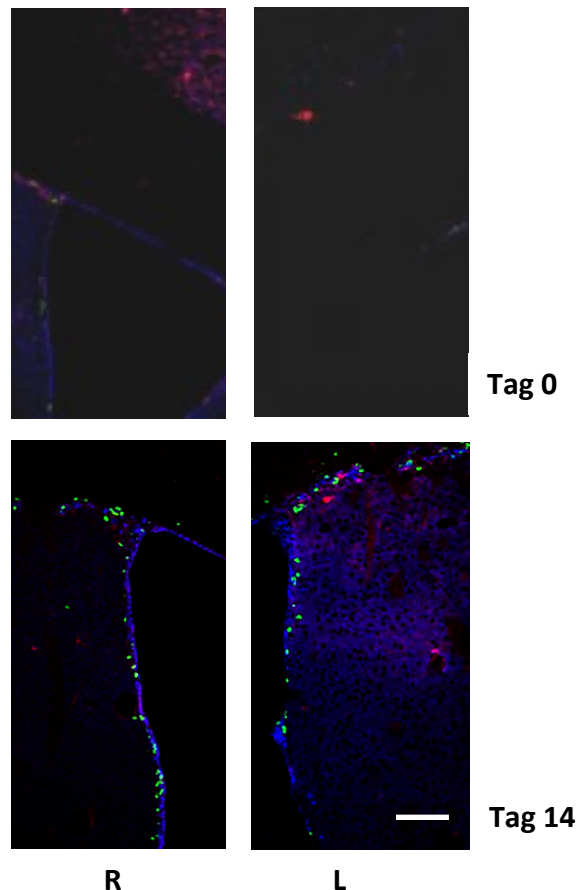


Abb. 13: Dreifachfärbung von Koronarschnitten durch die linke und rechte SVZ mit BrdU, Nestin und PSA-NCAM an Tag 0 und Tag 14. Man beachte die Doppelfärbung für BrdU und Nestin der Zellen im Bereich der SVZ sowie einzelne PSA-NCAM⁺ /BrdU⁺- Zellen im Bereich des Beginns des RMS (Maßstabeinheit =0,01mm, BrdU grün, Nestin rot, PSA-NCAM blau, R = rechts, L = links).

Dabei zeigte sich nach Ara-C- Behandlung ein deutlicher Rückgang des Markers PSA-NCAM und wie auch in der DAB-Färbung eine starke Reduktion der BrdU⁺-Zellen (Abb. 13). Es ist zu beobachten, dass einzelne Nestin⁺-Zellen wie auch einige wenige BrdU⁺- Zellen trotz der antimitotischen Behandlung weiterhin nachweisbar sind.

4.2. Erhöhte Anzahl proliferierender Zellen im RMS auf Seite der physikalischen Barriere

Weiterhin betrachteten wir die Proliferation nach Ara-C-Infusion und Implantation der PB weiter rostral der SVZ im RMS. Hierfür verwendeten wir wieder die Kurzzeitgruppe und fertigten für BrdU⁺ gefärbte Gehirnschnitte von Tag 0, 2 und 14 nach Ara-C-Infusion an und zählten die Region +1,85 mm bis +2,045 mm relativ zum Bregma stereologisch aus. Als Kontrollgruppe zur Feststellung der normalen Proliferationsrate der Vorläufer im RMS dienten Mäuse ohne Implantation einer physikalischen Barriere und ohne Durchführung einer anti-mitotischen Behandlung.

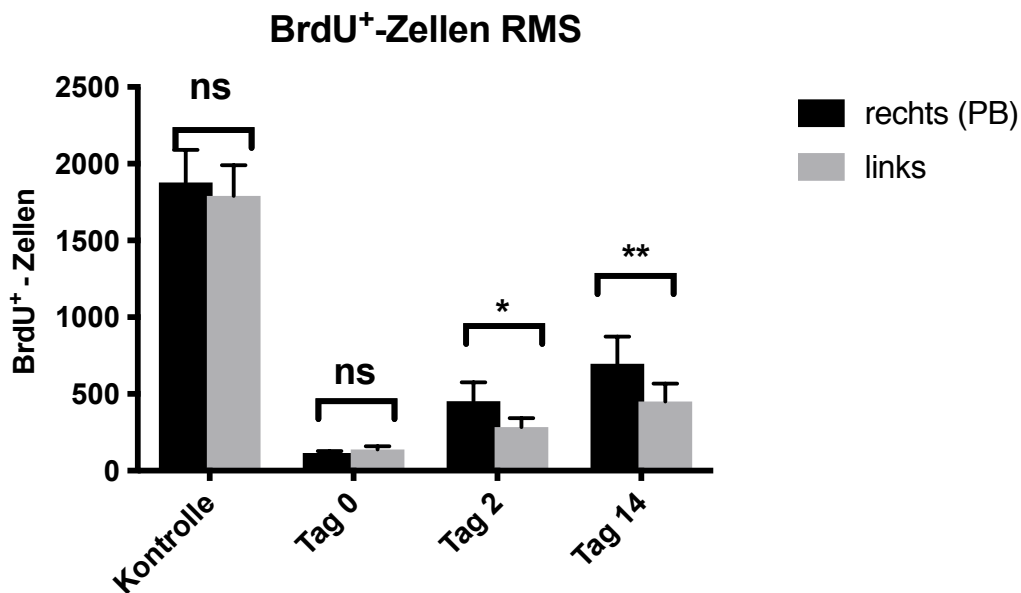


Abb. 13: Zeitlicher Verlauf der Zellproliferation nach Ara-C-Infusion. Gezeigt wird die absolute Anzahl gezählter BrdU⁺-Zellen im RMS. Ein langsames Ansteigen der BrdU⁺-Zellen auf beiden Seiten war zu beobachten; erstaunlicherweise zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl von BrdU⁺-Zellen auf der rechten Seite. In der Kontrollgruppe und an Tag 0 ist kein Seitenunterschied nachweisbar (ns= nicht signifikant).

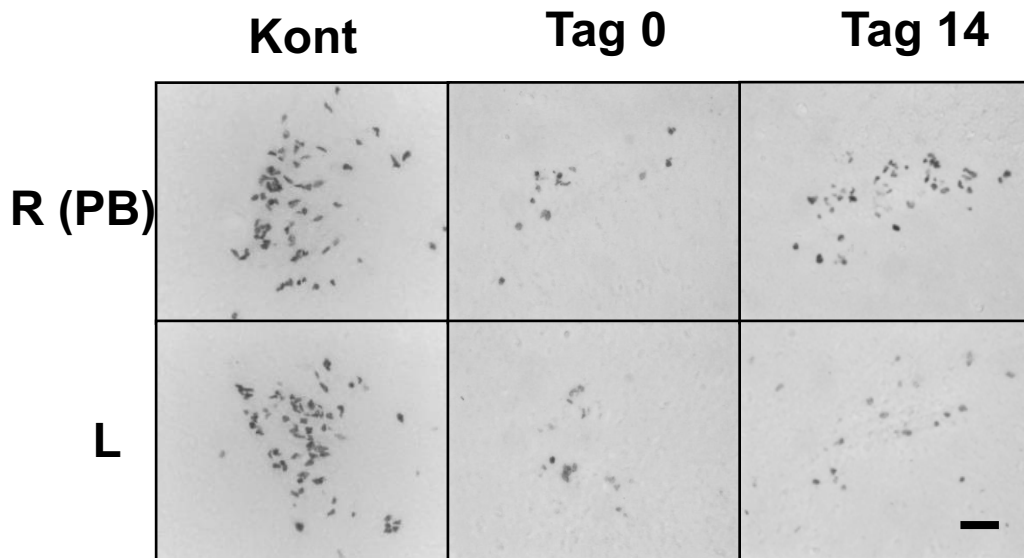


Abb. 14: DAB-Färbung auf BrdU von koronaren Schnitten im Bereich des RMS unmittelbar rostral der PB. Dabei zeigt sich in der Kontrollgruppe der RMS mit seitengleich proliferierenden Zellen. An Tag 0 ist die anti-mitotische Wirkung von Ara-C sichtbar; hier zeigt sich seitengleich eine deutliche Reduktion der Zellzahl. An Tag 14 zeigt sich eine Wiederaufnahme der Proliferation mit vermehrt nachweisbaren BrdU⁺-Zellen auf der rechten Seite, welche dem RMS rostral der PB entspricht. (Maßstabeinheit = 0,05mm, R= rechts, entspricht der Seite der PB, L = links, Kont= Kontrolle).

Die Zellzahl des linken RMS der Kontrollgruppe diente als 100% Referenzwert (1790 +/- 115 Zellen, n=3). Zur Zellzahl des rechten RMS fand sich kein signifikanter Unterschied; hier lagen 106,0% +/- 6,8 % Zellen im Vergleich zur Gegenseite vor (1879 +/- 122 Zellen, n=3).

Direkt nach Ara-C-Behandlung fanden wir eine deutliche Reduktion der BrdU⁺-Zellen mit im rechten RMS 7,6% +/- 0,4% der BrdU⁺-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (115 +/- 7 Zellen, n=4); im linken RMS fanden sich 6,9% +/- 0,2% (MW 139 +/- 10 Zellen, n=4). Zwischen den beiden Gruppen fand sich zu diesem Zeitpunkt kein signifikanter Unterschied.

An Tag 2 nach Ara-C-Gabe ist bereits ein signifikanter Unterschied (p-Wert = 0,036) zwischen den Gruppen feststellbar; die Zellzahl steigt wie bereits in der SVZ beobachtet langsam an. Auf der rechten Seite finden sich an Tag 2 25,3% +/- 3,4% BrdU⁺-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (426 +/- 62 Zellen, n=4); auf der linken Seite zählten wir 14,8% +/- 1,2% BrdU⁺- Zellen (284 +/- 29 Zellen, n=4).

An Tag 14 nach Ara-C-Gabe stellten wir einen noch deutlicheren Unterschied zwischen den beiden Seiten bezogen auf die Zunahme der Zellzahl fest. Auf der rechten Seite fanden wir nun 37,8 % +/- 5, 8% BrdU⁺-Zellen (679 +/- 89 Zellen, n=4); auf der linken Seite 25,3% +/- 1,1% BrdU⁺-Zellen (451 +/- 56 Zellen, n=4). Somit fand sich zu diesem Zeitpunkt ebenfalls eine signifikante Seitendifferenz (p-Wert = 0,0002).

Man beachte hier, dass die Proliferation im RMS an Tag 14 maximal 37,8% der Kontrollgruppe erreicht, wohingegen in der SVZ an Tag 14 99,1% BrdU⁺-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisbar sind. Auch unterscheiden sich die absoluten Zellzahlen deutlich.

4.3. Proliferierenden Zellen auf Seite der physikalischen Barriere

4.3.1. Erhöhte Nestin-Expression auf Seite der physikalischen Barriere

Um die proliferierenden Zellen auf der Seite mit der Barriere näher zu charakterisieren, führten wir eine Immunfluoreszenz-Dreifachfärbung für BrdU und die Marker neuronaler Stammzellen- und Vorläuferzellen Nestin und PSA-NCAM für die Tage 0, 2 und 14 nach Ara-C-Infusion durch.

Die Bilder werteten wir mikroskopisch aus und achteten dabei auf die Ko-Expression der Stammzellmarker mit der Kernfärbung durch BrdU. Außerdem schlossen wir durch Darstellung der Zellen in 63x-Vergrößerung aus, dass die höhere Nestin-Expression durch die Ausbildung einer Glianarbe oder durch reaktive Gliose bedingt ist.

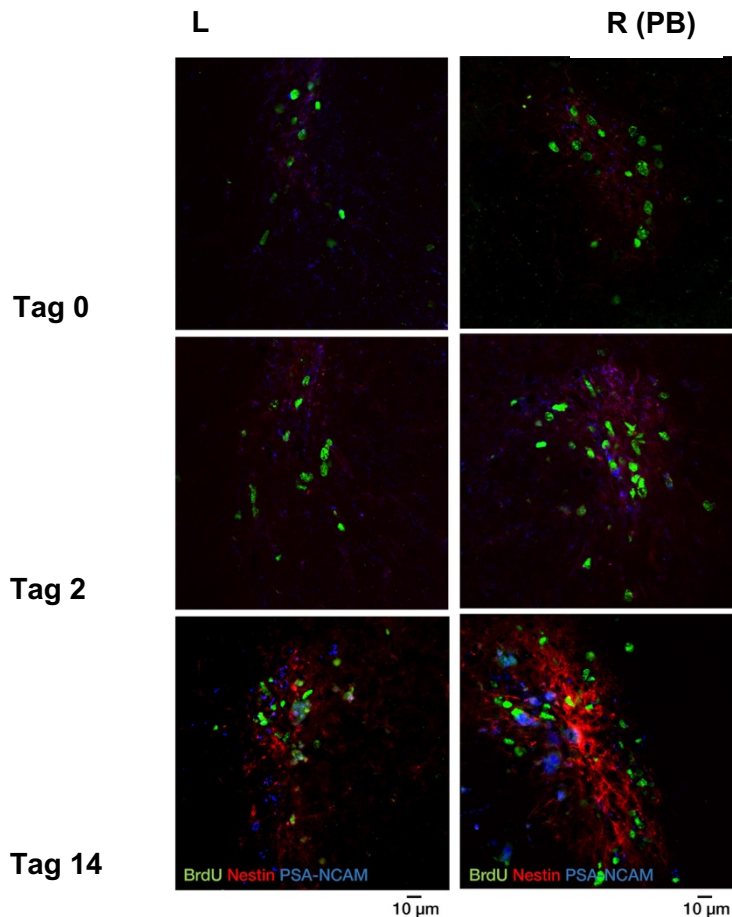


Abb. 15: Darstellung der Markerexpression von Nestin, BrdU und PSA-NCAM im RMS an Tag 0, 2 und 14 in der Immunfluoreszenz-Färbung koronarer Schnitt durch den RMS (ca. 2,05 mm rostral des Bregmas).

Es zeigt sich auch hier in der Fluoreszenzfärbung erneut eine Zunahme der BrdU⁺ Zellen im RMS, bei dem analog zur DAB-Färbung auch in der Immunfluoreszenzmikroskopie ein Seitenunterschied sichtbar ist. Eine vollständige Ablation der proliferierenden Zellen gelang nicht. PSA-NCAM, welches bereits initial beidseits nachweisbar ist, nimmt im Verlauf auf beiden Seiten zu. Die Nestin-Expression nimmt ebenfalls zu, wobei sich hier ein deutlicher Seitenunterschied auf der rechten Seite zeigt (R=rechts, entspricht der Seite der PB, L= links).

Besonders stark war die Zunahme der Nestin-Expression beim Vergleich von Tag 0 zu Tag 14. Auch hier zeigt sich eine Seitenunterschied: auf der Seite mit Barriere zeigt sich eine stärkere Zunahme der Färbung für Nestin als auf der ohne, auf der zwar auch eine Zunahme der Expression stattfindet, diese weniger stark ausgeprägt ist (Abb. 15).

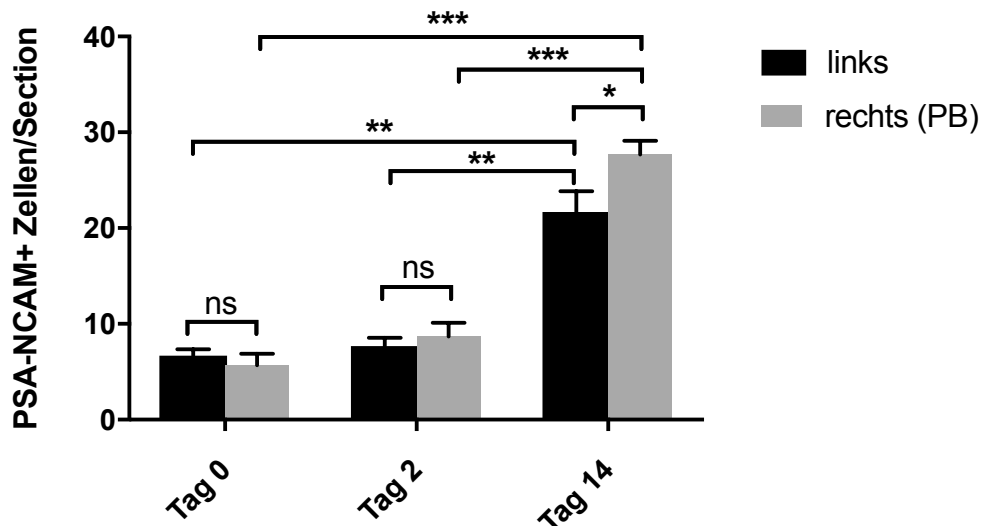


Abb. 16: Quantifizierung der PSA-NCAM⁺-Zellen im RMS rostral der PB an verschiedenen Zeitpunkten nach Ara-C-Gabe. An Tag 14 besteht ein signifikanter Seitenunterschied mit erhöhter Anzahl PSA-NCAM⁺-Zellen hinter der PB, zudem besteht ein signifikanter Unterschied in der Zellzahl zwischen Tag 0 und 14 und 2 und 14. Ein signifikanter Seitenunterschied besteht an Tag 0 und 2 nicht. (ns= nicht signifikant).

Auch die Anzahl der PSA-NCAM⁺-Zellen stieg von Tag 0 bis 14 allmählich an, dem Verlauf der Zunahme der BrdU⁺- und Nestin⁺- Vorläuferzellen entsprechend (Abb. 16). Auch hier fiel ein Seitenunterschied mit erhöhter Anzahl PSA-NCAM⁺-Zellen an Tag 14 rostral der PB auf (p-Wert = 0,0304), während an Tag 0 und 2 kein signifikanter Seitenunterschied festzustellen war. Zwischen Tag 0 und Tag 14 sowie zwischen Tag 2 und Tag 14 bestand ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der PSA-NCAM⁺-Zellen der einzelnen Seiten, während zwischen Tag 0 und 2 kein signifikanter Unterschied in der Zellzahl bestand.

4.3.2. Expression von Nestin, GFAP und Pax6

Um die Zellproliferation hinter der PB weiter zu einzuordnen, führten wir weitere immunhistologische Färbungen der Region rostral der PB im RMS durch. Wir verwendeten dazu die Stammzellmarker GFAP und Pax6 und fertigten jeweils eine Dreifachfärbung zusammen mit Nestin und BrdU an. Die Hirnschnitte werteten wir mit Konfokalmikroskopie aus.

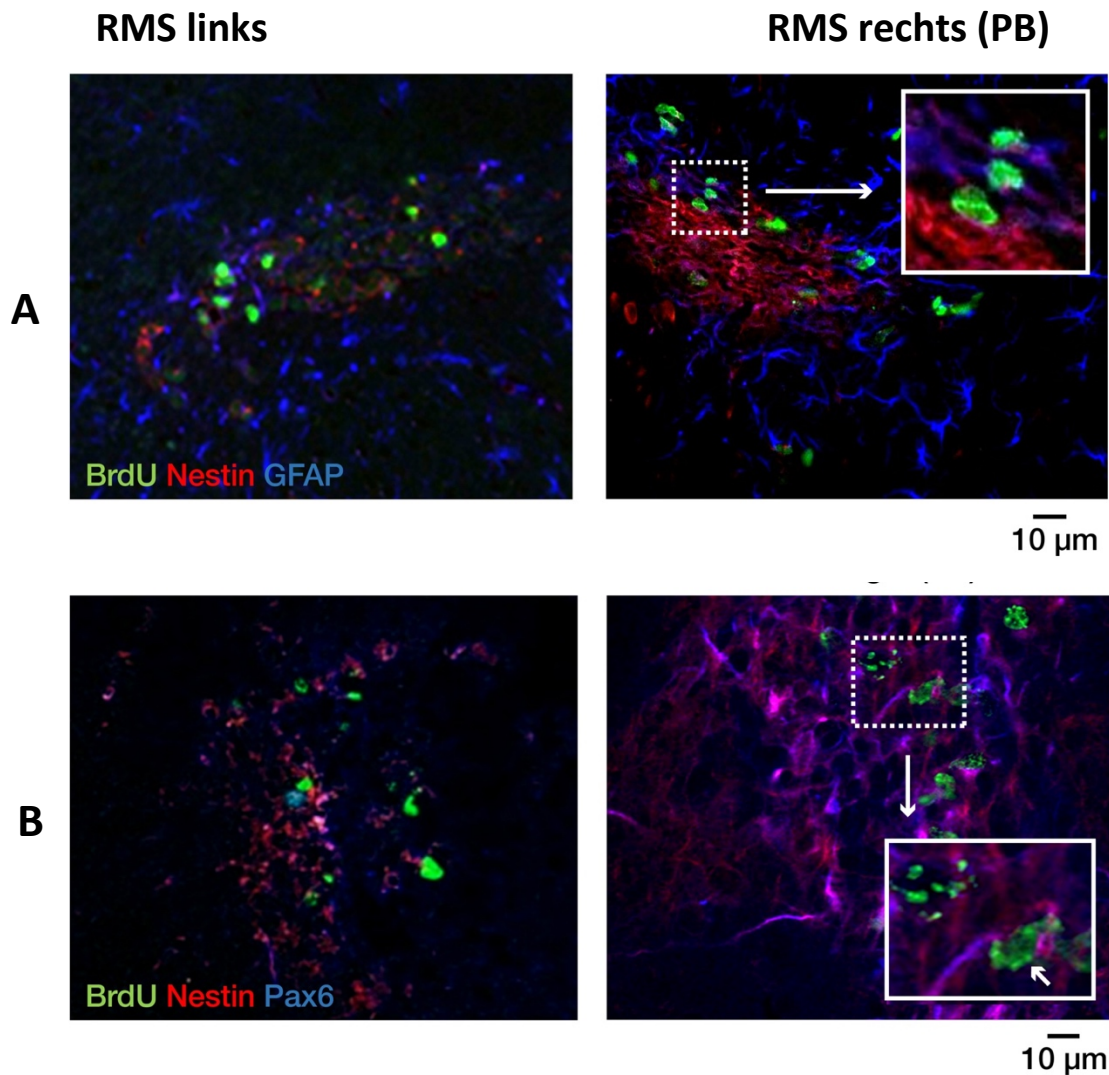


Abb. 17: Immunfluoreszenzfärbung mit BrdU, Nestin, GFAP und Pax6 des rechten RMS an Tag 14 nach Ara-C-Behandlung auf Seite der PB. Links jeweils Darstellung der Kontrolle, rechts des RMS rostral der PB. A: Dreifachfärbung BrdU-Nestin-GFAP, in der Vergrößerung ist eine BrdU⁺/Nestin⁺/GFAP⁺-Zelle durch eine Pfeilspitze markiert. B: Dreifachfärbung BrdU-Nestin-Pax6, in der Vergrößerung ist eine BrdU⁺/Nestin⁺/Pax6⁺-Zelle markiert (Maßstabeinheit= 0,1 mm, PB = physikalische Barriere).

Bei Auszählung der Pax6⁺-Zellen (Abb. 17, B) fanden wir in der auf der rechten Seite in der Kontrollgruppe einen Mittelwert von 1 +/- 0,82 Zellen (n=4) und auf der linken Seite einen Mittelwert von 0,5 Zellen +/- 0,5773 (n=4). In der experimentellen Gruppe zeigten sich auf der rechten Seite, der Seite der Barriere entsprechend, 1,75 +/- 0,9574 Zellen (n=4) und auf der linken Seite 0,25 +/- 0,5 Zellen (n=4). Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Seite der Barriere und der unbehandelten Seite (p-Wert = 0,0274).

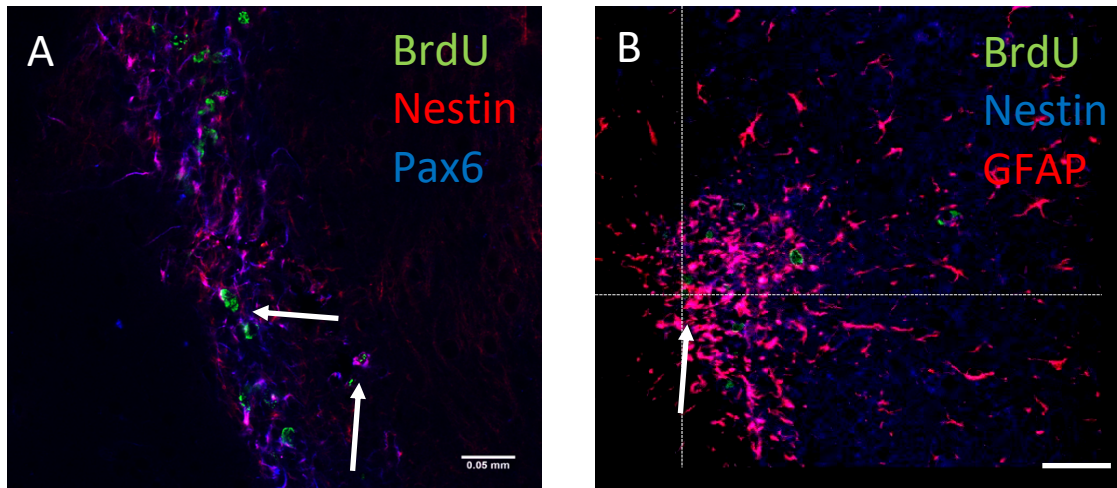


Abb. 18: Expression von Pax6 und GFAP im RMS rostral der PB. (A) Immunfluoreszenzfärbung eines koronaren Schnittes durch den rechten RMS auf BrdU, Nestin und Pax6 an Tag 14 nach Ara-C-Gabe. Es zeigen sich zwei Pax6⁺/Nestin⁺- Zellen (siehe Pfeilspitzen). (B) Immunfluoreszenzfärbung eines koronaren Schnittes durch den rechten RMS auf BrdU, Nestin und GFAP an Tag 14 nach Ara-C-Gabe. Zur exakten Ko-Lokalisation der Marker führten wir unter dem Konfokalmikroskop eine Z-Projektion für die einzelnen Zellen durch, was uns eine dreidimensionale Darstellung der Zelle und somit eine zweifelsfreie Aussage über die zeitgleiche Markerexpression in einer Zelle erlaubt. Die dreidimensionale Darstellung lässt sich am Bildrand in der Z-Projektion nachvollziehen (Maßstabeinheit= 0,01 mm).

Die Konfokalmikroskopie mit durchgeführten *z-Scans* und orthogonalen Projektionen zeigte eine eindeutige Ko-Lokalisation von BrdU, Nestin und GFAP in den bereits untersuchten Zellen rostral der physikalischen Barriere, aber auch einzelne für Nestin positive, aber für GFAP negative Zellen, so dass auch Typ-C-Zellen im RMS rostral der PB nachgewiesen werden konnten (Abb. 18).

5. Diskussion

Durch experimentelle Unterbrechung der Einwanderung neuronaler Vorläuferzellen aus der SVZ konnten wir den Nachweis einer neurogenen Nische im RMS erbringen.

5.1. Deutliche Reduktion der Proliferation in der SVZ durch Ara-C und erneute Zunahme der Proliferation in Abhängigkeit von der Zeit

Zunächst konnten wir zeigen, dass die Behandlung mit dem Zytostatikum Ara-C eine gute Methode darstellt, um die Stammzellproliferation und die Proliferation der Neuroblasten signifikant zu reduzieren. In früheren Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass es durch Infusion von Ara-C in den lateralen Ventrikel zu einer Reduktion der Neuroblasten von bis zu 75% kommt (Breton-Provencher, Lemasson et al. 2009). Die Neurogenese im anatomisch weiter entfernten *Hippocampus* hingegen wurde durch die Behandlung deutlich weniger reduziert. Eine weitere Methode, um die Neurogenese zu beeinflussen, ist die physikalische Behandlung der sich teilenden Zellen in der SVZ durch radioaktive Strahlung. Bei Bestrahlung mit 15 Gray kann eine selektive Entfernung von circa 85% in der SVZ ansässigen neuronalen Vorläuferzellen erreicht werden (McGinn et al. 2008).

In einer anderen Studie wurde die Verabreichung von Ara-C erfolgreich genutzt, um die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen im RMS nachzuweisen (Gritti, Bonfanti et al. 2002). Die antimitotische Behandlung bietet hier die Möglichkeit, eine lokal stattfindende *de-novo*-Proliferation in RMS und SVZ nachzuweisen. Damit kann geschlussfolgert werden, dass die Zellen vor Ort entstanden sind.

In unserem Experiment war nach Gabe von Ara-C eine deutliche Reduktion der Zellproliferation in der SVZ nachweisbar. Nach 14 Tagen hatte sich diese jedoch nahezu vollständig regeneriert, so dass die Proliferation auf der linken Seite keinen Unterschied zur Proliferation der Kontrollgruppe aufwies. Durch radioaktive Bestrahlung der SVZ konnte hingegen eine langfristige Reduktion der Zellzahl bis zu 3 Monaten nachgewiesen werden (Tada, Yang et al. 1999, Panagiotakos, Alshamy et al. 2007). Als mögliche Erklärung für den Unterschied in der Dauer der Wirksamkeit zur Ara-C-Behandlung wird diskutiert, dass Ara-C die sich langsam teilenden Typ-B-Zellen, aus denen der erneute Aufbau der SVZ hervorgeht, schlechter erfasst als die physikalische Bestrahlung.

Weitere Studien untersuchten die Wirksamkeit verschiedener Dosierungen von Ara-C zur Erforschung der Stammzellproliferation. Durch chemische Behandlung auch in höheren Dosen

konnte keine komplette Ablation der ruhenden Stammzellen erreicht werden. In allen Fällen ging von diesen eine mit Verzögerung einsetzende Proliferation aus (Ghanbari, Esmaeilpour et al. 2015). Dadurch eignet sich die Behandlung mit Ara-C als eine der besten Methoden für Ablation der Stammzellproliferation in der SVZ sowie für Beobachtung deren Neubesiedelung. Als Dosis verabreichten wir Ara-C (2%, 5µl/Stunde über 7 Tage), wobei dies eine der höchsten bisher verwendeten Dosen ohne toxischer Nebenwirkungen darstellt (Yau, Lau et al. 2011, Sun, Daniels et al. 2015), bei der davon ausgegangen werden kann, dass in diesem Zeitraum proliferierende Zelltypen zuverlässig eliminiert werden (Ghanbari, Esmaeilpour et al. 2015). Zu beachten ist, dass in Studien mit geringeren Ara-C-Dosen, diese intraventrikulär und nicht durch eine Kanüle auf die Gehirnoberfläche verabreicht wurden.

Im Verlauf beobachteten wir einen signifikanten Seitenunterschied der proliferierenden Zellen in der SVZ: auf der rechten Seite, auf welcher die Implantation der PB, aber auch die Anbringung der Kanüle der Ara-C-Infusion erfolgte, zeigte sich eine niedrigere Zellzahl. Wie oben beschrieben, scheint Ara-C lokal eine stärkere Wirkung zu haben und weniger stark auf anatomisch entfernte Gebiete Einfluss zu nehmen. In Anbetracht der Tatsache, dass die Kanüle, über welche Ara-C verabreicht wurde, rechtsseitig implantiert wurde, stellt dies eine mögliche Erklärung dar. Einen weiteren Einflussfaktor auf die veränderte Zellzahl könnte die weiter rostral befindliche Barriere darstellen: so ist es möglich, dass über bestimmte Faktoren aus dem RMS oder des OB Informationen über die Unterbrechung der Migration an die Vorläuferzellen in der SVZ weitergegeben werden. Eine Möglichkeit scheint, in Anbetracht der Architektur der SVZ, eine rückkoppelnde Kommunikation und Weitergabe der Information über die verbleibenden Neuroblasten in Kettenmigration, was bereits in vorangegangenen Studien postuliert wurde (Alvarez-Buylla und Lim 2004). Zudem konnte in einer vorangegangenen Studie eine verminderte Proliferation in der SVZ bei verminderter olfaktorischer Stimulation gezeigt werden (Corotto, Henegar et al. 1994), was nach der Verletzung und Durchtrennung des RMS ebenfalls einen möglichen Mechanismus darstellen kann. Unsere Ergebnisse entsprechen hier einer weiteren Studie, die nach Durchtrennung des RMS eine verminderte Proliferation in der ipsilateralen SVZ beobachten konnte (Jankovski, Garcia et al. 1998).

Durch kortikale Verletzung bzw. Manipulation konnte zudem eine erhöhte Proliferation in der ipsilateral zur Verletzung befindlichen SVZ gezeigt werden (Gage, Kempermann et al. 2008, Kernie und Parent 2010). Dies ließ sich in unserem Experiment nicht nachvollziehen, da sich auf der Seite der Manipulation sogar eine geringere Anzahl proliferierender Zellen zeigte. Jedoch ist aufgrund der Vielzahl der dies beschreibenden Arbeiten von einem Einfluss des

experimentellen Aufbaus auf die Proliferation auszugehen. So könnte die rasche Wiederbesiedelung der SVZ ein Zeichen für eine erhöhte Proliferationsrate sein.

Im RMS weiter rostral konnten wir auf der rechten Seite hingegen eine signifikant erhöhte Proliferation im Vergleich zur Gegenseite finden. In Anbetracht unserer Ergebnisse gehen wir davon aus, dass durch die Erhöhung der Proliferation der Vorläuferzellen im RMS der fehlende Zustrom von Neuroblasten aus der SVZ kompensiert wird. Eine weitere Erklärung stellt dar, dass es unter Annahme einer sich ergänzenden Stammzellproduktionen im RMS und SVZ durch die Reduktion der Proliferation in der SVZ zu einer erhöhten Aktivität der neurogenen Nische im RMS kommt. In vorangegangenen Studien wurde jedoch ein geringes Anpassungsvermögen der SVZ beschrieben. Beispielsweise kam es bei einem verminderten Bedarf an Interneuronen im OB zu keiner Änderung der Proliferation in der SVZ, jedoch im RMS (Langenfurth, Gu et al. 2016).

Durch Doetsch *et al.* konnte gezeigt werden, dass nach chemischer Ablation der SVZ eine Wiederbesiedelung der SVZ von Typ-B-Zellen ausgeht, was sich auch in unserem Modell nachvollziehen lässt.

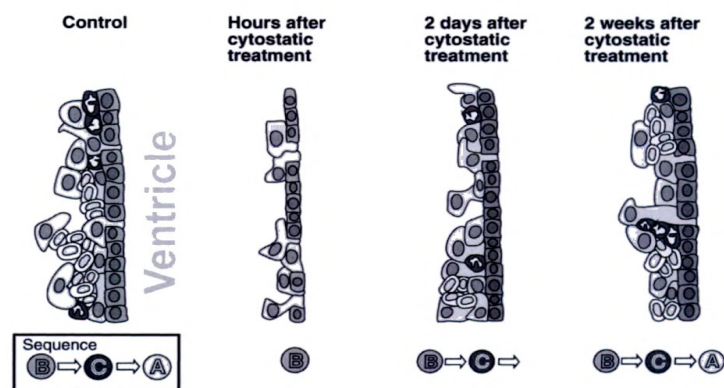


Abb. 19: Schematische Darstellung der Wiederbesiedelung der SVZ nach Ara-C-Ablation wenige Stunden, 2 Tage und 2 Wochen nach der Behandlung. Demnach führt Ara-C zu einer vollständigen Ablation der Typ-C- und Typ-A-Zellen, wohingegen wenige Typ-B-Zellen erhalten bleiben. Diese bilden an Tag 2 zunächst Typ-C-Zellen, welche im Verlauf Typ-A-Zellen ausbilden (nach Doetsch, Garcia-Verdugo et al. 1999, Kempermann 2006).

In der Immunfluoreszenzfärbung zeigten sich in unserem Modell nach Behandlung mit Ara-C ein Verschwinden des Markers für Neuroblasten PSA-NCAM sowie eine starke, jedoch nicht komplette Reduktion von Nestin. Es ist somit anzunehmen, dass es sich bei den wenigen

verbleibenden Zellen um die ausschließlich für Nestin, aber nicht PSA-NCAM immunreaktiven Typ-B-Zellen handelt, da diese eine geringere Teilungsrate aufweisen und so durch die antimitotische Wirkung von Ara-C weniger beeinträchtigt sind. Die am stärksten von der Ara-C-Behandlung beeinträchtigten Zellen sind – wie in vorangegangenen Studien gezeigt - die Typ-C-Zellen, die die höchste Teilungsrate aufweisen (Gritti, Bonfanti et al. 2002). Der weitere Verlauf der Markerexpression ist vereinbar mit den bisherigen Daten zum Aufbau und der Zelltypzusammensetzung der SVZ (Doetsch, Garcia-Verdugo et al. 1999) und auch mit weiteren Studien zur Wiederbesiedelung nach Ara-C-Behandlung (Maslov, Barone et al. 2004). Zusammengefasst ist die SVZ demnach aufgrund der Existenz der langsam proliferierenden Typ-B Zellen in der Lage, sich nach anti-mitotischer Behandlung erneut zu besiedeln. Die Typ-B-Zellen dienen somit als die eigentlichen Stammzellen der SVZ. Die Proliferationsrate ist so ausgeprägt, dass die SVZ in unseren Untersuchungen nach Ablation innerhalb von 14 Tagen nahezu die Proliferationsrate der Kontrollgruppe erreichen konnte. Ein Einfluss des invasiven Versuchsaufbaus auf die rasche Zunahme Proliferationsrate der Vorläuferzellen ist aufgrund der pro-stimulatorischen Wirkung auch hier in Betracht zu ziehen.

5.2. BrdU als Marker für die Proliferation der neuronalen Vorläuferzellen

Weiterhin ist zu diskutieren, ob BrdU geeignet ist, um die Proliferation der neuronalen Vorläuferzellen zu visualisieren und zu quantifizieren.

Es ist zu beachten, dass BrdU nur in jene Zellen eingebaut wird, die sich zum Zeitpunkt der Verabreichung in der Synthese-Phase (S-Phase) des Zellzyklus befinden, welche in etwa einem Drittel der Zellzyklusdauer entspricht (Welsch 2014). Da BrdU in der Kurzzeitgruppe nur punktuell und nicht über einen längeren Zeitraum verabreicht wurde, wird nur ein Bruchteil der vorhandenen, sich teilenden Zellen markiert. So ergeben vergleichende Färbungen mit dem Marker Ki67, eines während der gesamten Zellteilung exprimierten Protein, eine um 50% höhere Anzahl markierter Vorläuferzellen (Kee, Sivalingam et al. 2002). Aus diesem Grund sind die Zahlen verschiedener Gruppen zwar untereinander vergleichbar, nicht jedoch als absolute Zahlen proliferierender Zellen zu werten (Winner, Cooper-Kuhn et al. 2002).

Darüber hinaus gibt es weitere Aspekte, die bei der Auswertung von Studien, bei welchen BrdU verwendet wurde, beachtet werden müssen. Zum einen besteht eine wechselnde zerebrale Verfügbarkeit des Markers. BrdU kann die Blut-Hirn-Schranke nicht frei passieren, sondern benötigt dafür unter physiologischen Bedingungen einen Transporter. Dieser Transporter kann im Rahmen entzündlicher oder hypoxischer Vorgänge gestört sein, was zu einer fehlenden

Vergleichbarkeit des quantitativen BrdU-Nachweises in verschiedenen Versuchstieren führen kann (von Bohlen Und Halbach 2007).

Eine weitere Möglichkeit zur Fehlinterpretation ergibt sich aus der Tatsache, dass nicht nur während der Zellteilung, sondern auch während der Zellreparatur DNA-Synthese stattfindet. Somit kann auch bei zellulären Reparaturvorgängen BrdU eingebaut werden. Mehrere Autoren diskutieren jedoch, dass die Anzahl dieser markierten Zellen vernachlässigbar sei. Dies wurde durch mehrere Experimente, in denen eine Verdopplung der BrdU-positiven Zellen entsprechend des realen Zellzyklus nachgewiesen werden konnte (Kempermann 2006), unterstützt. Andere Publikationen widerlegten gänzlich, dass BrdU bei DNA-Reparatur eingebaut wird (Biebl, Cooper et al. 2000, Taupin 2007).

Zudem wird diskutiert, dass BrdU im Rahmen der Apoptose durch einen erneuten, nicht zielführenden Versuch der DNA-Synthese im Sinne eines „*abortive cell cycle try*“ in apoptotische Zellen eingebaut wird (Kempermann 2006).

Darüber hinaus wird BrdU ein mutagenes und toxisches Potential zugeschrieben (Bannigan und Langman 1979, Brito, Filipe et al. 1992), wobei die Toxizität durch die Verwendung kleinerer Dosen (circa 50 mg/kg) verringert werden kann.

Als weitere Fehlerquelle kommt der Aufbereitungsprozess der histologischen Schnitte vor Verwendung von BrdU in Frage. Hierfür ist eine Vorbehandlung mit Salzsäure und Hitze zur Denaturierung der DNA nötig. Dies kann im weiteren Verlauf durch Denaturierung der Zelloberflächenproteine anschließende immunhistochemische Färbungen beeinflussen und zu einer Reduktion der Spezifität führen, weswegen BrdU in Reihenfärbungen als letzter Antikörper in Folge verwendet werden sollte.

Bei der Analyse ist weiterhin zu beachten, dass die verschiedenen Zelltypen der SVZ verschiedene Zellzykluslängen haben. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich eine schnell teilende Typ-C-Zelle in der S-Phase befindet und somit BrdU eingebaut wird, ist höher. Dadurch wird in unterschiedliche Zelltypen zu verschiedenen Anteilen BrdU eingebaut (Kee, Sivalingam et al. 2002). Sich langsam teilende Zellen können sich somit der Markierung entziehen oder in der Auswertung unterrepräsentiert sein. So konnte gezeigt werden, dass nach einmaliger Injektion von [³H]-Thymidin, 52% der markierten Zellen die sich am schnellsten teilenden Typ-C-Zellen waren. 15% der markierten Zellen waren Typ-A-Zellen und 12% waren Typ-B-Zellen (Doetsch, Garcia-Verdugo et al. 1997). Dies entspricht nicht dem oben beschriebenen elektronenmikroskopisch charakterisierten Aufbau der SVZ, bei dem lediglich 10% Typ-C-Zellen zu finden sind. Dies spricht dafür, dass Typ-C-Zellen überproportional ihres

tatsächlichen Vorliegens markiert werden, wie in weiteren Studien bestätigt werden konnte (Kohwi, Osumi et al. 2005).

Trotz beschriebener Aspekte, die bei der Interpretation der Daten in Betracht gezogen werden müssen, stellt die Verabreichung von BrdU eine spezifische Methode dar, um Zellen, die zu einem bestimmten Zeitpunkt proliferieren, darzustellen. Aufgrund des Einbaus in die DNA der Zelle wird BrdU an jede Tochterzelle weitergegeben, was eine Nachverfolgung der proliferierenden Zellen erlaubt und somit einen Vorteil gegenüber den oben beschriebenen Methoden darstellt (Wojtowicz und Kee 2006).

5.3. Veränderung der Zellproliferation und Markerexpression im unterbrochenen RMS

5.3.1. Beurteilung der erhöhten Proliferation auf Seite der physikalischen Barriere

Bei der Untersuchung der proliferierenden Zellen im RMS fanden wir auf Seiten der PB trotz dem verminderten Zufluss von Neuroblasten aus der SVZ nicht nur eine persistierende Proliferation im RMS, sondern auch eine erhöhte Anzahl proliferierender Zellen im Vergleich zur lediglich mit Ara-C behandelten Gegenseite ohne PB.

Durch Ara-C konnten nicht nur die Vorläuferzellproliferation der proliferierenden Zellen in der SVZ reduziert werden, sondern es wurden auch die sich schnell teilenden Vorläuferzellen im RMS eliminiert. Da wir gleichzeitig die Migration der Vorläuferzellen aus der SVZ in den OB bzw. den rostralen Abschnitt des RMS durch die Implantation der PB blockierten, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den proliferierenden Zellen um Tochterzellen lokal ansässiger neuronaler Stammzellen handelt. Analog zur Re-Population der SVZ ist es wahrscheinlich, dass die unabhängige Proliferation im RMS von den sich langsam teilenden Typ-B-Zellen mit Stammzeleigenschaft ausgeht.

Dabei ist vor allem der Unterschied in der Zellproliferation zwischen der unbehandelten und der Seite mit der implantierten PB interessant. Hier stehen unsere Resultate im Gegensatz zu den Ergebnissen vorangegangener Arbeiten (Mendoza-Torreblanca, Martinez-Martinez et al. 2008; Alonso, Prieto et al. 1999), die nach experimenteller Unterbrechung des RMS zwar eine Wiederaufnahme der Proliferation unabhängig von der SVZ beobachteten, aber keinen signifikanten Unterschied zwischen der Anzahl proliferierender Zellen auf der behandelten und unbehandelten Seite des RMS feststellen konnten.

Für die erhöhte Zahl von BrdU-positiven Zellen im experimentell unterbrochenen RMS gibt es mehrere mögliche Erklärungen.

Bei alleiniger Analyse der BrdU-positiven Zellen ohne nähere Charakterisierung besteht die Möglichkeit, dass es sich bei den proliferierenden Zellen um Gliazellen handelt, die als reaktive Gliose eine Glianarbe um die Implantationsstelle der Barriere gebildet haben. Dies scheint jedoch aufgrund des vorliegenden zeitlichen Verlaufs mit Zunahme der Proliferation im Verlauf unwahrscheinlich. Zudem besteht an Tag 0 nach Ara-C-Infusion, der dem Tag 13 nach Implantation der PB entspricht, noch kein Seitenunterschied. Im Falle einer reaktiven Gliose würden sich die Gliazellen anfangs stark vermehren und dann, nach Konsolidierung der Verletzung, die Proliferation wieder abnehmen (Lie, Dziewczapolski et al. 2002).

Wie in der Einleitung ausgeführt, wurden in der Vergangenheit mehrere Studien durchgeführt, die die Präsenz von adulten neuronalen Stammzellen im RMS beschreiben (Gritti, Bonfanti et al. 2002, Merkle, Mirzadeh et al. 2007, Panagiotakos, Alshamy et al. 2007, Mendoza-Torreblanca, Martinez-Martinez et al. 2008). Hierbei konnte eine kontinuierliche Proliferation der Stammzellen im RMS mit Produktion von periglomerulären Interneuronen für den OB gezeigt werden (Alonso, Ortega-Perez et al. 2008). Unser Experiment zeigte dementsprechend eine kontinuierliche Proliferation im RMS auf beiden Seiten mit Wiederaufnahme der Proliferation nach anti-mitotischer Behandlung, was eine von der SVZ unabhängige Stammzellaktivität im RMS unterstützt (Gritti, Bonfanti et al. 2002). Zusätzlich zu den bereits bekannten Ergebnissen konnte in unserer Studie ein Unterschied in der Proliferation zwischen dem unterbrochenen RMS und dem durchgehenden RMS festgestellt werden. Dies könnte als Resultat einer verminderten Einwanderung von Neuroblasten aus der SVZ hindeuten: die potentielle *neurogene Nische* im RMS wird durch Ausschaltung der SVZ aktiviert und übernimmt die Aufgabe dieser. Dies ist insbesondere dadurch plausibel, dass der Seitenunterschied mit einer gewissen zeitlichen Latenz an Tag 14 deutlicher sichtbar wird; zu einem Zeitpunkt, zu welchem bei ununterbrochenen RMS die Einwanderung von Neuroblasten aus der SVZ zu erwarten wäre.

Eine Anpassung der Proliferation der neuronalen Vorläuferzellen im RMS an Veränderungen der äußeren Umstände wurde bereits in einer anderen Studie festgestellt: Langenfurth *et al.* konnten bei verringertem Bedarf an periglomerulären Interneuronen im OB eine Reduktion der Proliferation im RMS ansässiger Zellen durch eine erhöhte Apoptoserate nachweisen, die unabhängig von der Proliferation in der SVZ war (Langenfurth, Gu et al. 2016). Dies würde bedeuten, dass die *neurogene Nische* im RMS im Gegensatz zur SVZ ihre Aktivität an den aktuellen Bedarf anpassen kann.

Eine Stimulation der Stammzellaktivität aufgrund der der Implantation der PB ist nicht gänzlich auszuschließen (Kernie und Parent 2010); es wäre jedoch auch hier eine unterschiedliche zeitliche Dynamik zu erwarten gewesen.

5.3.2. Expression von Stammzellmarkern im unterbrochenen RMS

Zur näheren Einordnung der proliferierenden Zellen betrachteten wir die Expression von ausgewählten Stammzellmarkern im Bereich der *neurogenen Nische* im RMS.

Wir fanden eine Zunahme von Nestin im Zeitverlauf mit erhöhter Anzahl Nestin-positiver Zellen im RMS rostral der PB im Vergleich zur Gegenseite.

Nestin ist ein Stammzellmarker, der auf allen Untertypen der adulten neuronalen Stammzellen exprimiert wird (von Bohlen und Halbach 2011). Jedoch kann Nestin auch von reaktiven Gliazellen exprimiert werden (Lin, Matesic et al. 1995, Taupin and Gage 2002), so dass ein Zusammenhang der erhöhten Nestinexpression mit einer erhöhten post-interventioneller Gliazellproliferation folglich nicht auszuschließen ist. Durch Untersuchungen histologischer Schnitte in anatomischer Nachbarschaft zur physikalischen Barriere fanden wir Färbungsmuster, die deutlich eine Glianarbe zeigten, die sich stark positiv für Nestin färbte. Die Struktur zeigt sich deutlich als Narbengewebe im Bereich des Kortex und nicht als Ansammlung einzelner für Nestin immunoreaktiven Zellen im Bereich des RMS. Zudem lässt der zeitliche Verlauf der Zunahme der lässt nicht auf eine reaktive Gliose schließen. Interessant ist hierbei die in manchen Färbungen nachweisbare röhrenförmige Anordnung der Nestin-positiven Zellen, die an die röhrenförmig angeordneten Nestin-positiven Typ-B-Zellen der SVZ erinnert (Doetsch, Garcia-Verdugo et al. 1997). Da diese Zellen jedoch auf nur wenigen Schnitten zu sehen waren, ließen sich diese Beobachtungen nicht genauer einordnen.

Wir beobachteten zudem eine Ko-Lokalisation von Nestin und dem Marker von Neuroblasten PSA-NCAM. Zwar gilt PSA-NCAM als relativ neuronenspezifisch (Tomasiewicz, Ono et al. 1993), jedoch wurde in einzelnen Arbeiten eine Re-Expression von PSA-NCAM auf reaktiven Gliazellen beschrieben (Barral-Moran, Calaora et al. 2003). Eine Expression von PSA-NCAM auf Gliazellen ist daher nicht auszuschließen (Kempermann 2006). Die Ko-Expression von Nestin und PSA-NCAM macht es jedoch unwahrscheinlich, dass dies auf eine reaktive Gliose zurückzuführen ist und erhöht die Spezifität für die einzelnen Marker (von Bohlen und Halbach 2011).

Auch für die Expression von PSA-NCAM als Marker für in Migration befindliche Neuroblasten zeigte sich eine Zunahme im Zeitverlauf. An Tag 14 war ein signifikanter Seitenunterschied

mit einer erhöhten Anzahl PSA-NCAM-positiver Zellen rostral der PB sichtbar. Durch den verzögerten Auftritt des Seitenunterschiedes ist davon auszugehen, dass die höhere Anzahl BrdU- und PSA-NCAM-positiver Zellen auf Seite der PB nicht das Resultat einer höheren Anzahl aus der SVZ eingewanderter Neuroblasten ist, wie es von Alonso *et al.* nach chirurgischer Läsion des RMS ohne Durchführung einer Ara-C-Infusion festgestellt wurde (Alonso, Prieto *et al.* 1999). Direkt nach der Behandlung mit Ara-C fanden wir eine zwar gering ausgeprägte, aber persistierende, seitengleiche PSA-NCAM-Expression im RMS auf beiden Seiten. Hierbei ist es möglich, dass es sich um Neuroblasten handelt, welche nicht durch Ara-C eliminiert wurden.

Zudem kann auch der chirurgische Eingriff zu einer Veränderung der Markerexpression führen. In vorangegangenen Studien konnte ebenfalls eine Zunahme der Expression im Rahmen exogener Manipulation gezeigt werden (Szele und Chesselet 1996, Kempermann 2006).

Zusammengefasst zeigten die immunhistochemischen Untersuchungen eine Zunahme der für den Marker Nestin-positiven sowie in geringerem Ausmaß PSA-NCAM-positiver Zellen auf Seite der PB und unterstützen damit die These, dass es sich bei der Proliferation hinter der PB im RMS um die Proliferation im RMS ansässiger neuronaler Vorläuferzellen handelt. Der Unterschied zur Gegenseite auch in der Markerexpression deutet darauf hin, dass die Proliferation der Vorläuferzellen im RMS durch die mechanische Unterbrechung aktiviert wurde. Nach Ablation sich schnell teilender Zellen muss diese zunächst von den Typ-B-Zellen mit Stammzeleigenschaften ausgehen. Das Expressionsprofil lässt zudem eine Proliferation vor allem von Typ-C- und Typ-B-Zellen vermuten.

Eine nähere Untersuchung auf den Marker GFAP, der bei gleichzeitiger Expression von Nestin als Marker für Typ-B-Zellen gilt, ergab die Detektion mehrfacher für Nestin- und GFAP-positiven Zellen rostral der PB. Somit ergab sich Hinweis für das Vorliegen von Typ-B-Zellen im RMS (Doetsch, Caille *et al.* 1999, Gritti, Bonfanti *et al.* 2002). Zusätzlich fanden wir wenige Zellen, die weder für GFAP noch für PSA-NCAM, sondern ausschließlich für Nestin positiv waren und somit am ehesten Typ-C-Zellen entsprechen. Es ist daher von einem Vorhandensein aller drei Untertypen der Vorläuferzellen in der *neurogenen Nische* hinter der PB auszugehen. Ähnliche Ergebnisse konnten bereits in einer vorhergehenden Studie nach anti-mitotischer Behandlung gezeigt werden (Gritti, Bonfanti *et al.* 2002). Hier wurden wenige Tage nach Ara-C-Gabe im RMS Typ-C-Zellen nachgewiesen, welche in der unbehandelten Kontrollgruppe mit erhaltenem Einstrom von Neuroblasten aus der SVZ, nicht nachweisbar waren. Zudem konnten Typ-B-Zellen mit Stammzeleigenschaften und Typ-A-Zellen isoliert werden. Mendoza *et al.* konnten nach Unterbrechung des RMS mittels PB eine Expression von Sox2,

eines weiteren Markers für Typ-B-Zellen, hinter der Barriere sowie auf der Kontrollseite festgestellt werden (Mendoza-Torreblanca, Martinez-Martinez et al. 2008). Eine nur einseitige Veränderung der Expression konnte nicht gezeigt werden. Auch Doetsch *et al.* konnten in der rostralen Ausdehnung der SVZ Typ-B-Zellen nachweisen, jedoch konnten sie im unbehandelten RMS keine Typ-C-Zellen nachweisen (Doetsch, Garcia-Verdugo et al. 1997). Eine Änderung der Zellzusammensetzung im RMS, hervorgerufen durch die experimentelle Unterbrechung des RMS, ist somit als möglich anzusehen.

Zusammengefasst ist insbesondere aufgrund starker Anhaltspunkte, die für im RMS ansässige Typ-B-Zellen sprechen, eine von der SVZ unabhängige Proliferation wahrscheinlich. Durch unseren Versuchsaufbau konnten wir nachweisen, dass es sich bei der Proliferation im RMS um eine von der SVZ unabhängige Stammzellproliferation handelt, welche sich an die geänderten Bedingungen anpassen kann. Auch die Wiederbesiedelung des RMS nach Ablation der Proliferation der Vorläuferzellen scheint von ruhenden Typ-B-Zellen auszugehen. Der immunhistochemischen Markerexpression entsprechend scheint die Wiederbesiedelung des RMS analog zur SVZ zu verlaufen. Zu diskutieren bleibt jedoch, ob es sich bei SVZ und RMS um zwei unterschiedliche *neurogene Nischen* handelt, oder ob die Vorläuferproliferation im RMS eine rostrale Ausdehnung der SVZ darstellt. Hierbei sind auch der sehr ähnliche anatomische Aufbau der SVZ und des RMS mit röhrenförmiger Anordnung der Astrozyten wie in der Einleitung beschrieben zu beachten. Durch den Vergleich mit der Gegenseite lässt sich nachvollziehen, dass die ruhenden Stammzellen auch im intakten RMS proliferieren, jedoch mit einer geringeren Proliferationsrate. Somit liefert unsere Studie eine weitere Bestätigung, dass der RMS auch unter physiologischen Bedingungen neuronale Vorläuferzellen beinhaltet. Weiterhin interessant wäre eine Färbung für den Marker Mcm2, der mit Nestin eine hohe Sensitivität für ruhende Stammzellen aufweist (Palmer, Willhoite et al. 2000), sowie eine Färbung auf Neuronen-spezifische Migrationsmarker wie beta-III Tubulin (TuJ-1) sowie die Abgrenzung neuronaler Vorläuferzellen von glialen Vorläuferzellen durch die Färbung mit NG2 (*Nerve/glial antigen 2*), welcher auf diesen exprimiert wird (Kempermann 2006).

5.3.3. Pax6-Expression auf der Seite der physikalischen Barriere

In einer weiteren zu diesem Versuchsaufbau durchgeführten Arbeit (Corinna Steiner, Universität Marburg) konnte im OB rostral der PB eine erhöhte Anzahl dopaminergener Neurone unter den neugeborenen Neuronen festgestellt werden. Somit lässt sich schlussfolgern, dass die

oben beschriebene Aktivierung der *neurogenen Nische* im RMS zu einer Veränderung des finalen Phänotyps der neugeborenen Zellen führen kann.

Aus diesem Grund untersuchten wir im RMS die Expression des Transkriptionsfaktors Pax6, der die Ausbildung eines dopaminergen Phänotyps im Rahmen der embryonalen und adulten Neurogenese fördert (Dellovade, Pfaff et al. 1998, Hack, Saghatelyan et al. 2005). Hierbei stellten wir eine erhöhte Pax6-Expression im RMS auf der Seite der PB im Gegensatz zur lediglich mit Ara-C behandelten Gegenseite fest. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits in vorangegangenen Studien beobachtet. In einem toxininduzierten Tiermodell zum Morbus Parkinson (6-OHDA-Modell) konnte eine Reduktion der Vorläuferzellproliferation in der SVZ nachgewiesen werden, was in der entsprechenden Studie interessanterweise zu einem erhöhten Anteil an Pax6-positiven Zellen im SVZ-RMS-System mit einer erhöhter dopaminergen Neurogenese im OB führte (Winner, Geyer et al. 2006). Eine Beeinträchtigung durch die chirurgische Implantation der PB kann jedoch auch hier nicht ausgeschlossen werden. So konnte gezeigt werden, dass es durch kortikale und striatale Verletzungen zu einer vermehrten Expression von Pax6 kommt, was die Ausbildung eines neuronalen Phänotyps fördert (Szele und Chesselet 1996, Jones und Connor 2011).

Der Transkriptionsfaktor Pax6 ist im SVZ-RMS-System in Typ-A- und Typ-C-Zellen sowie in den periglomerulären Zellen des OB nachweisbar (Stoykova und Gruss 1994, Hack, Sugimori et al. 2004, Hack, Saghatelyan et al. 2005). Dabei ist Pax6 auf nahezu allen schnellteilenden Vorläuferzellen der SVZ nachweisbar, jedoch von nur ca. 32% der Neuroblasten im RMS, wobei der Anteil nach rostral hin abnimmt (Kohwi, Osumi et al. 2005). Aufgrund vorangegangener Ergebnisse zur essentiellen Rolle von Pax6 bei der Ausbildung eines dopaminergen Phänotyps wurde vermutet, dass es sich hier um eine Untergruppe der Neuroblasten handelt, die sich im Verlauf zu dopaminergen Neuronen differenzieren (Kohwi, Osumi et al. 2005). Dies stützt die Hypothese der Heterogenität der Neuroblasten bereits in ihrer Entstehungsphase (Hack, Saghatelyan et al. 2005).

Eine erhöhte Pax6-Expression auf der Seite der PB kann somit mehrere Gründe haben. Zum einen kann es sich bei den von uns beobachteten Zellen um einen erhöhten Anteil Pax6-positiver Zellen unter den in Migration befindlichen Neuroblasten (Typ-A-Zellen) handeln. Es konnte gezeigt werden, dass diese Pax6-positiven Neuroblasten sich im OB mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit zu dopaminergen Zellen differenzieren (Hack, Saghatelyan et al. 2005). Zum anderen kann es sich um Pax6-positive Typ-C-Zellen handeln, die -wie oben beschrieben- ohne experimentelle Unterbrechung im RMS nicht nachweisbar sind (Gritti, Bonfanti et al. 2002).

Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass es durch die Behandlung mit Ara-C und die Implantation der PB eine Veränderung der Aktivität der *neurogenen Nische* hervorrufen wird, wobei die aktivierten Zellen einen dopaminergen Phänotyp zu favorisieren scheinen. Nach Nachweis einer erhöhten Pax6-Expression im unterbrochenen RMS ist es möglich, dass Pax6 eine Schlüsselrolle für die Veränderung der dopaminergen Neurogenese im OB rostral der PB spielt.

6. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit entwickelten wir ein Tiermodell zur Untersuchung der adulten Neurogenese in der SVZ und im RMS, mit dem wir in der Lage waren, durch antimitotische Behandlung und Implantation einer PB, die Proliferation in beiden Bereichen unabhängig voneinander zu betrachten. Durch den gewählten Versuchsaufbau konnte eine Einwanderung neuronaler Vorläuferzellen aus der SVZ sowie die Teilung weiterer vorhandener Vorläuferzellen im RMS unterbunden werden, was uns ermöglichte, eine *neurogene Nische* mit Vorläuferproliferation im RMS nachzuweisen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Proliferation der Vorläuferzellen im RMS ihre Aktivität und Zellzusammensetzung den veränderten Bedingungen anpassen kann. Neben vermehrter Proliferation und erhöhtem Nachweis von etablierten Stammzellmarkern im RMS hinter der PB, konnte eine erhöhte Anzahl Pax6-positiver Zellen festgestellt werden, was eventuell die Ursache für die Veränderung der dopaminergen Neurogenese im OB darstellt.

Erkenntnisse über die adulte neuronale Neurogenese, insbesondere von fördernden Einflüssen auf die Ausbildung eines dopaminergen Phänotyps, sind von Bedeutung für die Entwicklung stammzellbasierter Therapien im Bereich neurodegenerativer Erkrankungen, wie beispielsweise der Parkinsonkrankheit. Aufgrund der niedrigen Überlebensraten transplanteder Zellen, die in vorangegangenen Studien gefunden wurden (Obernier, Tong et al. 2014) ist es besonders wichtig, die bekannten *neurogenen Nischen* adulter neuronaler Stammzellen näher zu charakterisieren, um zu verstehen, welche Faktoren eine Proliferation sowie ein längerfristiges Überleben der neugeborenen Zellen mit funktioneller Integration erlauben. Hierfür scheint die *neurogene Nische* im RMS aufgrund ihrer Plastizität und der Ausbildung von Zellen mit dopaminergem Phänotyp besonders geeignet zu sein.

In den letzten Jahren erhielt die Erforschung der stammzellbasierten Therapie für die Parkinsonkrankheit unterstützt durch die Erforschung der iPSC und die Verleihung des Nobelpreises 2012 für ebendiese einen starken Auftrieb. Während einzelne Fallstudien Erfolge

in der Behandlung des IPS berichten konnten (Freed, Greene et al. 2001, Kefalopoulou, Politis et al. 2014, Li, Englund et al. 2016), bleibt der therapeutische Nutzen insbesondere in Anbetracht der Sicherheitsbedenken jedoch weiterhin umstritten (Barker, Parmar et al. 2016). Zudem bleibt unklar, welches Gewebe die beste Quelle für die Gewinnung der Stammzellen darstellt. Aktuell wird, nach überzeugenden präklinischen Resultaten, die weltweit erste klinische Studie mit transplantierten iPSC zur Behandlung der Parkinsonkrankheit an der Universität Melbourne durchgeführt (NCT02452723). Eine chinesische Arbeitsgruppe plant parallel dazu eine klinische Studie mit Transplantation embryonaler Stammzellen, die jedoch aufgrund einer möglichen Tumorbildung auf sicherheitsrelevante- sowie auf ethische Bedenken stößt (Barker, Parmar et al. 2016, Cyranoski 2017). Zudem wurde 2013 die europaweite klinische Studie TRANSNEURO gestartet, im Rahmen welcher Parkinsonpatienten im Frühstadium eine Transplantation von Stammzellen aus dem fetalen Mesenzephalon erhalten. Die Ergebnisse sind noch ausstehend (NCT01898390).

Zusammengefasst ist die Stammzellforschung ein dynamisches Feld, in dem es besonders aufgrund der bekannten Risiken der Transplantation ein grundlegendes Verständnis der Regulationsmechanismen der Neurogenese bedarf. Darüber hinaus sind alternative Quellen neuronaler Stammzellen zu identifizieren, nicht zuletzt wegen ethischer Bedenken der Isolation von Zellen aus embryonalem und fetalem Gewebe. Vor diesem Hintergrund leistet diese Arbeit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der intrinsischen Regulation der adulten Neurogenese.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANOVA	Analysis of variance
Ara-C	Arabinosylcytosin
BrdU	Bromodesoxyuridin, 5-Bromo-2'-desoxyuridin
BSA	bovine serume albumin (Rinderserumalbumin)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCX	Doublecortin
ES	embryonale Stammzellen
et al.	et alii
GABA	γ -Aminobuttersäure
GFAP	glial fibrillary acidic protein (saures Gliafaserprotein)
HCl	Salzsäure
IPS	idiopathisches Parkinsonsyndrom
iPSC	induced pluripotent stem cells (induzierte pluripotente Stammzellen)
KG	Körpergewicht
Ki67	Kiel-67
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NGS	normal goat serum (Ziegenserum)
NG2	neuron-glia antigen 2 (neurales Gliaantigen 2)
NSC	neural stem cells (neuronale Stammzellen)
OB	olfaktorischer Bulbus
Pax6	paired box protein 6
PB	physikalische Barriere
PB chem.	phosphate buffer
PCNA	proliferating cell nuclear antigen (sogenanntes Ringklemmenprotein)
PFA	Paraformaldehyd

PGL	perigolmerular layer (periglomeruläre Schicht)
PSA-NCAM	polysialic acid - neural cell adhesion molecule (neurales Zelladhäsionsprotein)
RMS	rostral migratory stream (rostraler Migrationsstrom)
ROI	Region of interest (Bereich von Interesse)
S-Phase	Synthese-Phase
SGZ	subgranular zone (subgranuläre Zone)
Sox2	SRY (sex determining region Y)-box 2
SVZ	subventricular zone (subventrikuläre Zone)
ZNS	zentrales Nervensystem

8. Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Günter Höglinger für die Überlassung des Themas sowie die ständige Unterstützung. Vielen Dank für die Förderung während der Promotion sowie auch anschließend. Herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Thomas Rösler für die Korrektur sowie die große Hilfsbereitschaft bedanken. Bei Herrn Dr. Oscar Arias-Carrion bedanke ich mich für die Einführung in die Thematik sowie für die praktische Anleitung im Labor. In diesem Zusammenhang gilt mein Dank auch Herrn Robin Konhäuser und Herrn Dr. Hong Xu für die praktische und geduldige Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten.

Darüber hinaus gebührt ein großer Dank meinen Eltern und meiner Schwester, die mich immer mit dem größten Einsatz sowie mit Herzlichkeit und Menschlichkeit unterstützt haben.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Marco Lo Bue, der durch seine Geduld und seinen unerschütterlichen Optimismus jederzeit eine große Unterstützung ist.

Veröffentlichung

Diese Arbeit ist Teil der folgenden Veröffentlichung::

Schweyer K, Rüschhoff-Steiner C, Arias-Carrión O, Oertel WH, Rösler TW, Höglinger GU. Neuronal precursor cells with dopaminergic commitment in the rostral migratory stream of the mouse. **Sci Rep.** 2019;9(1):13359.

9. Literaturverzeichnis

- Alonso, M., I. Ortega-Perez, M. S. Grubb, J. P. Bourgeois, P. Charneau and P. M. Lledo (2008). "Turning astrocytes from the rostral migratory stream into neurons: a role for the olfactory sensory organ." *J Neurosci* **28**(43): 11089-11102.
- Altman, J. (1962). "Are new neurons formed in the brains of adult mammals?" *Science* **135**(3509): 1127-1128.
- Altman, J. (1969). "Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb." *J Comp Neurol* **137**(4): 433-457.
- Altman, J. and G. D. Das (1965). "Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats." *J Comp Neurol* **124**(3): 319-335.
- Alvarez-Buylla, A. and J. M. Garcia-Verdugo (2002). "Neurogenesis in adult subventricular zone." *J Neurosci* **22**(3): 629-634.
- Alvarez-Buylla, A., J. M. Garcia-Verdugo and A. D. Tramontin (2001). "A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells." *Nat Rev Neurosci* **2**(4): 287-293.
- Alvarez-Buylla, A., M. Kohwi, T. M. Nguyen and F. T. Merkle (2008). "The heterogeneity of adult neural stem cells and the emerging complexity of their niche." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **73**: 357-365.
- Alvarez-Buylla, A. and D. A. Lim (2004). "For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain." *Neuron* **41**(5): 683-686.
- Alvarez-Buylla, A. and C. Lois (1995). "Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates." *Stem Cells* **13**(3): 263-272.
- Andres, R. H., R. Choi, A. V. Pendharkar, X. Gaeta, N. Wang, J. K. Nathan, J. Y. Chua, S. W. Lee, T. D. Palmer, G. K. Steinberg and R. Guzman (2011). "The CCR2/CCL2 interaction mediates the transendothelial recruitment of intravascularly delivered neural stem cells to the ischemic brain." *Stroke* **42**(10): 2923-2931.
- Arias-Carrion, O., N. Freundlieb, W. H. Oertel and G. U. Hoglinger (2007). "Adult neurogenesis and Parkinson's disease." *CNS Neurol Disord Drug Targets* **6**(5): 326-335.
- Arsenijevic, Y., J. G. Villemure, J. F. Brunet, J. J. Bloch, N. Deglon, C. Kostic, A. Zurn and P. Aebischer (2001). "Isolation of multipotent neural precursors residing in the cortex of the adult human brain." *Exp Neurol* **170**(1): 48-62.
- Bannigan, J. and J. Langman (1979). "The cellular effect of 5-bromodeoxyuridine on the mammalian embryo." *J Embryol Exp Morphol* **50**: 123-135.
- Barker, R. A., M. Parmar, A. Kirkeby, A. Bjorklund, L. Thompson and P. Brundin (2016). "Are Stem Cell-Based Therapies for Parkinson's Disease Ready for the Clinic in 2016?" *J Parkinsons Dis* **6**(1): 57-63.
- Barral-Moran, M. J., V. Calaora, L. Vutskits, C. Wang, H. Zhang, P. Durbec, G. Rougon and J. Z. Kiss (2003). "Oligodendrocyte progenitor migration in response to injury of glial monolayers requires the polysialic neural cell-adhesion molecule." *J Neurosci Res* **72**(6): 679-690.
- Beitz, J. M. (2014). "Parkinson's disease: a review." *Front Biosci (Schol Ed)* **6**: 65-74.
- Ben-Hur, T., M. Idelson, H. Khaner, M. Pera, E. Reinhartz, A. Itzik and B. E. Reubinoff (2004). "Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors improves behavioral deficit in Parkinsonian rats." *Stem Cells* **22**(7): 1246-1255.
- Biebl, M., C. M. Cooper, J. Winkler and H. G. Kuhn (2000). "Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain." *Neurosci Lett* **291**(1): 17-20.
- Breton-Provencher, V., M. Lemasson, M. R. Peralta, 3rd and A. Saghatelian (2009).

- "Interneurons produced in adulthood are required for the normal functioning of the olfactory bulb network and for the execution of selected olfactory behaviors." *J Neurosci* **29**(48): 15245-15257.
- Brill, M. S., J. Ninkovic, E. Winpenny, R. D. Hodge, I. Ozen, R. Yang, A. Lepier, S. Gascon, F. Erdelyi, G. Szabo, C. Parras, F. Guillemot, M. Frotscher, B. Berninger, R. F. Hevner, O. Raineteau and M. Gotz (2009). "Adult generation of glutamatergic olfactory bulb interneurons." *Nat Neurosci* **12**(12): 1524-1533.
- Brill, M. S., M. Snappyan, H. Wohlfrom, J. Ninkovic, M. Jawerka, G. S. Mastick, R. Ashery-Padan, A. Saghatelian, B. Berninger and M. Gotz (2008). "A *dlx2*- and *pax6*-dependent transcriptional code for periglomerular neuron specification in the adult olfactory bulb." *J Neurosci* **28**(25): 6439-6452.
- Brito, M. J., M. I. Filipe and R. W. Morris (1992). "Cell proliferation study on gastric carcinoma and non-involved gastric mucosa using a bromodeoxyuridine (BrdU) labelling technique." *Eur J Cancer Prev* **1**(6): 429-435.
- Calza, L., L. Giardino, M. Pozza, C. Bettelli, A. Micera and L. Aloe (1998). "Proliferation and phenotype regulation in the subventricular zone during experimental allergic encephalomyelitis: in vivo evidence of a role for nerve growth factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(6): 3209-3214.
- Cameron, H. A. and R. D. McKay (2001). "Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus." *J Comp Neurol* **435**(4): 406-417.
- Carlen, M., K. Meletis, C. Goritz, V. Darsalia, E. Evergren, K. Tanigaki, M. Amendola, F. Barnabe-Heider, M. S. Yeung, L. Naldini, T. Honjo, Z. Kokaia, O. Shupliakov, R. M. Cassidy, O. Lindvall and J. Frisen (2009). "Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke." *Nat Neurosci* **12**(3): 259-267.
- Carlsson, T., M. Carta, A. Munoz, B. Mattsson, C. Winkler, D. Kirik and A. Bjorklund (2009). "Impact of grafted serotonin and dopamine neurons on development of L-DOPA-induced dyskinesias in parkinsonian rats is determined by the extent of dopamine neuron degeneration." *Brain* **132**(Pt 2): 319-335.
- Chojnacki, A. K., G. K. Mak and S. Weiss (2009). "Identity crisis for adult periventricular neural stem cells: subventricular zone astrocytes, ependymal cells or both?" *Nat Rev Neurosci* **10**(2): 153-163.
- Corotto, F. S., J. A. Henegar and J. A. Maruniak (1993). "Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain." *Neurosci Lett* **149**(2): 111-114.
- Corotto, F. S., J. R. Henegar and J. A. Maruniak (1994). "Odor deprivation leads to reduced neurogenesis and reduced neuronal survival in the olfactory bulb of the adult mouse." *Neuroscience* **61**(4): 739-744.
- Coskun, V., H. Wu, B. Bianchi, S. Tsao, K. Kim, J. Zhao, J. C. Biancotti, L. Hutnick, R. C. Krueger, Jr., G. Fan, J. de Vellis and Y. E. Sun (2008). "CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(3): 1026-1031.
- Cyranoski, D. (2017). "Trials of embryonic stem cells to launch in China." *Nature* **546**(7656): 15-16.
- Dauer, W. and S. Przedborski (2003). "Parkinson's disease: mechanisms and models." *Neuron* **39**(6): 889-909.
- Dellovade, T. L., D. W. Pfaff and M. Schwanzel-Fukuda (1998). "Olfactory bulb development is altered in small-eye (*Sey*) mice." *J Comp Neurol* **402**(3): 402-418.
- Doetsch, F. and A. Alvarez-Buylla (1996). "Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(25): 14895-14900.
- Doetsch, F., I. Caille, D. A. Lim, J. M. Garcia-Verdugo and A. Alvarez-Buylla (1999). "Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain." *Cell* **97**(6): 703-716.

- Doetsch, F., J. M. Garcia-Verdugo and A. Alvarez-Buylla (1997). "Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain." *J Neurosci* **17**(13): 5046-5061.
- Doetsch, F., J. M. Garcia-Verdugo and A. Alvarez-Buylla (1999). "Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(20): 11619-11624.
- Eriksson, P. S., E. Perfilieva, T. Bjork-Eriksson, A. M. Alborn, C. Nordborg, D. A. Peterson and F. H. Gage (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." *Nat Med* **4**(11): 1313-1317.
- Freed, C. R., P. E. Greene, R. E. Breeze, W. Y. Tsai, W. DuMouchel, R. Kao, S. Dillon, H. Winfield, S. Culver, J. Q. Trojanowski, D. Eidelberg and S. Fahn (2001). "Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease." *N Engl J Med* **344**(10): 710-719.
- Fu, M. H., C. L. Li, H. L. Lin, P. C. Chen, M. J. Calkins, Y. F. Chang, P. H. Cheng and S. H. Yang (2015). "Stem cell transplantation therapy in Parkinson's disease." *Springerplus* **4**: 597.
- Gage, F. H., A. Björklund, A. Prochiantz and Y. Christen (2012). *Stem Cells in the Nervous System: Functional and Clinical Implications*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Gage, F. H., P. W. Coates, T. D. Palmer, H. G. Kuhn, L. J. Fisher, J. O. Suhonen, D. A. Peterson, S. T. Suhr and J. Ray (1995). "Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(25): 11879-11883.
- Gage, F. H., G. Kempermann and H. Song (2008). *Adult Neurogenesis*, Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Gage, G. J., D. R. Kipke and W. Shain (2012). "Whole animal perfusion fixation for rodents." *J Vis Exp*(65).
- Garcia-Verdugo, J. M., F. Doetsch, H. Wichterle, D. A. Lim and A. Alvarez-Buylla (1998). "Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells." *J Neurobiol* **36**(2): 234-248.
- Ghanbari, A., T. Esmailpour, S. Bahmanpour, M. G. Golmohammadi, S. Sharififar and H. Azari (2015). "Depletion of neural stem cells from the subventricular zone of adult mouse brain using cytosine b-Arabinofuranoside." *Brain Behav* **5**(11): e00404.
- Golub, V. M., J. Brewer, X. Wu, R. Kuruba, J. Short, M. Manchi, M. Swonke, I. Younus and D. S. Reddy (2015). "Neurostereology protocol for unbiased quantification of neuronal injury and neurodegeneration." *Front Aging Neurosci* **7**: 196.
- Gritti, A., L. Bonfanti, F. Doetsch, I. Caille, A. Alvarez-Buylla, D. A. Lim, R. Galli, J. M. Verdugo, D. G. Herrera and A. L. Vescovi (2002). "Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents." *J Neurosci* **22**(2): 437-445.
- Hack, M. A., A. Saghatelian, A. de Chevigny, A. Pfeifer, R. Ashery-Padan, P. M. Lledo and M. Gotz (2005). "Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis." *Nat Neurosci* **8**(7): 865-872.
- Hack, M. A., M. Sugimori, C. Lundberg, M. Nakafuku and M. Gotz (2004). "Regionalization and fate specification in neurospheres: the role of Olig2 and Pax6." *Mol Cell Neurosci* **25**(4): 664-678.
- Hanrahan, O., J. Harris and C. Egan (2011). "Advanced microscopy: laser scanning confocal microscopy." *Methods Mol Biol* **784**: 169-180.
- Herrera, D. G., J. M. Garcia-Verdugo and A. Alvarez-Buylla (1999). "Adult-derived neural precursors transplanted into multiple regions in the adult brain." *Ann Neurol* **46**(6): 867-877.
- Hoglinger, G. U., P. Rizk, M. P. Muriel, C. Duyckaerts, W. H. Oertel, I. Caille and E. C. Hirsch (2004). "Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease." *Nat Neurosci* **7**(7): 726-735.
- Hu, H., H. Tomasiewicz, T. Magnuson and U. Rutishauser (1996). "The role of polysialic acid

- in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone." Neuron **16**(4): 735-743.
- Huisman, E., H. B. Uylings and P. V. Hoogland (2004). "A 100% increase of dopaminergic cells in the olfactory bulb may explain hyposmia in Parkinson's disease." Mov Disord **19**(6): 687-692.
- Jankovski, A., C. Garcia, E. Soriano and C. Sotelo (1998). "Proliferation, migration and differentiation of neuronal progenitor cells in the adult mouse subventricular zone surgically separated from its olfactory bulb." Eur J Neurosci **10**(12): 3853-3868.
- Jones, K. S. and B. Connor (2011). "Proneural transcription factors *Dlx2* and *Pax6* are altered in adult SVZ neural precursor cells following striatal cell loss." Mol Cell Neurosci **47**(1): 53-60.
- Kam, M., M. A. Curtis, S. R. McGlashan, B. Connor, U. Nannmark and R. L. Faull (2009). "The cellular composition and morphological organization of the rostral migratory stream in the adult human brain." J Chem Neuroanat **37**(3): 196-205.
- Kaneko, N., E. Kako and K. Sawamoto (2011). "Prospects and Limitations of Using Endogenous Neural Stem Cells for Brain Regeneration." Genes (Basel) **2** (1).
- Kaplan, M. S. and D. H. Bell (1984). "Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus." J Neurosci **4**(6): 1429-1441.
- Kaplan, M. S., N. A. McNelly and J. W. Hinds (1985). "Population dynamics of adult-formed granule neurons of the rat olfactory bulb." J Comp Neurol **239**(1): 117-125.
- Kee, N., S. Sivalingam, R. Boonstra and J. M. Wojtowicz (2002). "The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis." J Neurosci Methods **115**(1): 97-105.
- Kefalopoulou, Z., M. Politis, P. Piccini, N. Mencacci, K. Bhatia, M. Jahanshahi, H. Widner, S. Rehnrota, P. Brundin, A. Bjorklund, O. Lindvall, P. Limousin, N. Quinn and T. Foltyniec (2014). "Long-term clinical outcome of fetal cell transplantation for Parkinson disease: two case reports." JAMA Neurol **71**(1): 83-87.
- Kempermann, G. (2006). "Adult neurogenesis : stem cells and neuronal development in the adult brain." Oxford, Oxford Univ. Press, 2006.
- Kempermann, G. (2011). Adult Neurogenesis 2: Stem Cells and Neuronal Development in the Adult Brain, Oxford Univ Pr.
- Kempermann, G. and F. H. Gage (2000). "Neurogenesis in the adult hippocampus." Novartis Found Symp **231**: 220-235; discussion 235-241, 302-226.
- Kernie, S. G. and J. M. Parent (2010). "Forebrain neurogenesis after focal Ischemic and traumatic brain injury." Neurobiol Dis **37**(2): 267-274.
- Kikuchi, T., A. Morizane, D. Doi, H. Magotani, H. Onoe, T. Hayashi, H. Mizuma, S. Takara, R. Takahashi, H. Inoue, S. Morita, M. Yamamoto, K. Okita, M. Nakagawa, M. Parmar and J. Takahashi (2017). "Human iPS cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model." Nature **548**(7669): 592-596.
- Kirschenbaum, B., F. Doetsch, C. Lois and A. Alvarez-Buylla (1999). "Adult subventricular zone neuronal precursors continue to proliferate and migrate in the absence of the olfactory bulb." J Neurosci **19**(6): 2171-2180.
- Kiss, J. Z., C. Wang and G. Rougon (1993). "Nerve-dependent expression of high polysialic acid neural cell adhesion molecule in neurohypophysial astrocytes of adult rats." Neuroscience **53**(1): 213-221.
- Kohwi, M., N. Osumi, J. L. Rubenstein and A. Alvarez-Buylla (2005). "Pax6 is required for making specific subpopulations of granule and periglomerular neurons in the olfactory bulb." J Neurosci **25**(30): 6997-7003.
- Kosaka, K., Y. Aika, K. Toida, C. W. Heizmann, W. Hunziker, D. M. Jacobowitz, I. Nagatsu, P. Streit, T. J. Visser and T. Kosaka (1995). "Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb." Neurosci Res **23**(1): 73-88.

- Kosaka, K., K. Toida, Y. Aika and T. Kosaka (1998). "How simple is the organization of the olfactory glomerulus?: the heterogeneity of so-called periglomerular cells." Neurosci Res **30**(2): 101-110.
- Kuhn, H. G., H. Dickinson-Anson and F. H. Gage (1996). "Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation." J Neurosci **16**(6): 2027-2033.
- Langenfurth, A., S. Gu, V. Bautze, C. Zhang, J. E. Neumann, U. Schuller, K. Stock, S. A. Wolf, A. M. Maier, G. Mastrella, A. Pak, H. Cheng, R. E. Kalin, K. Holmbeck, J. Strotmann, H. Kettenmann and R. Glass (2016). "Decreased demand for olfactory periglomerular cells impacts on neural precursor cell viability in the rostral migratory stream." Sci Rep **6**: 32203.
- Li, W., E. Englund, H. Widner, B. Mattsson, D. van Westen, J. Latt, S. Rehncrona, P. Brundin, A. Bjorklund, O. Lindvall and J. Y. Li (2016). "Extensive graft-derived dopaminergic innervation is maintained 24 years after transplantation in the degenerating parkinsonian brain." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(23): 6544-6549.
- Lie, D. C., G. Dziewczapolski, A. R. Willhoite, B. K. Kaspar, C. W. Shults and F. H. Gage (2002). "The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential." J Neurosci **22**(15): 6639-6649.
- Lim, D. A., M. Suarez-Farinas, F. Naef, C. R. Hacker, B. Menn, H. Takebayashi, M. Magnasco, N. Patil and A. Alvarez-Buylla (2006). "In vivo transcriptional profile analysis reveals RNA splicing and chromatin remodeling as prominent processes for adult neurogenesis." Mol Cell Neurosci **31**(1): 131-148.
- Liu, Z. and L. J. Martin (2003). "Olfactory bulb core is a rich source of neural progenitor and stem cells in adult rodent and human." J Comp Neurol **459**(4): 368-391.
- Lledo, P. M., M. Alonso and M. S. Grubb (2006). "Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits." Nat Rev Neurosci **7**(3): 179-193.
- Lledo, P. M., F. T. Merkle and A. Alvarez-Buylla (2008). "Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity." Trends Neurosci **31**(8): 392-400.
- Lois, C., J. M. Garcia-Verdugo and A. Alvarez-Buylla (1996). "Chain migration of neuronal precursors." Science **271**(5251): 978-981.
- Luskin, M. B., J. G. Parnavelas and J. A. Barfield (1993). "Neurons, astrocytes, and oligodendrocytes of the rat cerebral cortex originate from separate progenitor cells: an ultrastructural analysis of clonally related cells." J Neurosci **13**(4): 1730-1750.
- Malatesta, P. and M. Gotz (2013). "Radial glia - from boring cables to stem cell stars." Development **140**(3): 483-486.
- Marras, C., J. C. Beck, J. H. Bower, E. Roberts, B. Ritz, G. W. Ross, R. D. Abbott, R. Savica, S. K. Van Den Eeden, A. W. Willis, C. M. Tanner and P. G. Parkinson's Foundation (2018). "Prevalence of Parkinson's disease across North America." NPJ Parkinsons Dis **4**: 21.
- Mendoza-Torreblanca, J. G., E. Martinez-Martinez, M. Tapia-Rodriguez, R. Ramirez-Hernandez and G. Gutierrez-Ospina (2008). "The rostral migratory stream is a neurogenic niche that predominantly engenders periglomerular cells: in vivo evidence in the adult rat brain." Neurosci Res **60**(3): 289-299.
- Merkle, F. T., Z. Mirzadeh and A. Alvarez-Buylla (2007). "Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain." Science **317**(5836): 381-384.
- Merkle, F. T., A. D. Tramontin, J. M. Garcia-Verdugo and A. Alvarez-Buylla (2004). "Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(50): 17528-17532.
- Ming, G. L. and H. Song (2011). "Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions." Neuron **70**(4): 687-702.
- Mitro, A. and M. Palkovits (1981). "Morphology of the rat brain ventricles, ependyma, and periventricular structures." Bibl Anat(21): 1-110.
- Nakaguchi, K., H. Masuda, N. Kaneko and K. Sawamoto (2011). "Strategies for Regenerating

- Striatal Neurons in the Adult Brain by Using Endogenous Neural Stem Cells." Neurol Res Int. **4**.
- Ninkovic, J., T. Mori and M. Gotz (2007). "Distinct modes of neuron addition in adult mouse neurogenesis." J Neurosci **27**(40): 10906-10911.
- Ninkovic, J., L. Pinto, S. Petricca, A. Lepier, J. Sun, M. A. Rieger, T. Schroeder, A. Cvekl, J. Favor and M. Gotz (2010). "The transcription factor Pax6 regulates survival of dopaminergic olfactory bulb neurons via crystallin alphaA." Neuron **68**(4): 682-694.
- Nowakowski, R. S., S. B. Lewin and M. W. Miller (1989). "Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population." J Neurocytol **18**(3): 311-318.
- Obernier, K., C. K. Tong and A. Alvarez-Buylla (2014). "Restricted nature of adult neural stem cells: re-evaluation of their potential for brain repair." Front Neurosci **8**: 162.
- Osumi, N., H. Shinohara, K. Numayama-Tsuruta and M. Maekawa (2008). "Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator." Stem Cells **26**(7): 1663-1672.
- Paddock, S. W. (2000). "Principles and practices of laser scanning confocal microscopy." Mol Biotechnol **16**(2): 127-149.
- Palmer, T. D., A. R. Willhoite and F. H. Gage (2000). "Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis." J Comp Neurol **425**(4): 479-494.
- Panagiotakos, G., G. Alshamy, B. Chan, R. Abrams, E. Greenberg, A. Saxena, M. Bradbury, M. Edgar, P. Gutin and V. Tabar (2007). "Long-term impact of radiation on the stem cell and oligodendrocyte precursors in the brain." PLoS One **2**(7): e588.
- Parent, J. M., T. W. Yu, R. T. Leibowitz, D. H. Geschwind, R. S. Sloviter and D. H. Lowenstein (1997). "Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus." J Neurosci **17**(10): 3727-3738.
- Paton, J. A. and F. N. Nottebohm (1984). "Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits." Science **225**(4666): 1046-1048.
- Paxinos, G. and K. B. J. Franklin (2001). Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Academic Press.
- Peretto, P., A. Merighi, A. Fasolo and L. Bonfanti (1997). "Glial tubes in the rostral migratory stream of the adult rat." Brain Res Bull **42**(1): 9-21.
- Pignatelli, A. and O. Belluzzi (2010). Neurogenesis in the Adult olfactory Bulb, Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis.
- Ramon y Cajal, S. (1928). "Degeneration and Regeneration of the Nervous System." New York: Hafner.
- Reynolds, B. A., W. Tetzlaff and S. Weiss (1992). "A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes." J Neurosci **12**(11): 4565-4574.
- Ryu, J. R., C. J. Hong, J. Y. Kim, E. K. Kim, W. Sun and S. W. Yu (2016). "Control of adult neurogenesis by programmed cell death in the mammalian brain." Mol Brain **9**: 43.
- Sanai, N., A. D. Tramontin, A. Quinones-Hinojosa, N. M. Barbaro, N. Gupta, S. Kunwar, M. T. Lawton, M. W. McDermott, A. T. Parsa, J. Manuel-Garcia Verdugo, M. S. Berger and A. Alvarez-Buylla (2004). "Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration." Nature **427**(6976): 740-744.
- Sierra, A., J. M. Encinas and M. Maletic-Savatic (2011). "Adult human neurogenesis: from microscopy to magnetic resonance imaging." Front Neurosci **5**: 47.
- Snappyan, M., M. Lemasson, M. S. Brill, M. Blais, M. Massouh, J. Ninkovic, C. Gravel, F. Berthod, M. Gotz, P. A. Barker, A. Parent and A. Saghatelian (2009). "Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling." J Neurosci **29**(13): 4172-4188.
- Sorrells, S. F., M. F. Paredes, A. Cebrian-Silla, K. Sandoval, D. Qi, K. W. Kelley, D. James, S.

- Mayer, J. Chang, K. I. Auguste, E. F. Chang, A. J. Gutierrez, A. R. Kriegstein, G. W. Mathern, M. C. Oldham, E. J. Huang, J. M. Garcia-Verdugo, Z. Yang and A. Alvarez-Buylla (2018). "Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults." Nature.
- Stoykova, A. and P. Gruss (1994). "Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns." J Neurosci **14**(3 Pt 2): 1395-1412.
- Sun, B., B. Halabisky, Y. Zhou, J. J. Palop, G. Yu, L. Mucke and L. Gan (2009). "Imbalance between GABAergic and Glutamatergic Transmission Impairs Adult Neurogenesis in an Animal Model of Alzheimer's Disease." Cell Stem Cell **5**(6): 624-633.
- Sun, D., T. E. Daniels, A. Rolfe, M. Waters and R. Hamm (2015). "Inhibition of injury-induced cell proliferation in the dentate gyrus of the hippocampus impairs spontaneous cognitive recovery after traumatic brain injury." J Neurotrauma **32**(7): 495-505.
- Szele, F. G. and M. F. Chesselet (1996). "Cortical lesions induce an increase in cell number and PSA-NCAM expression in the subventricular zone of adult rats." J Comp Neurol **368**(3): 439-454.
- Tada, E., C. Yang, G. T. Gobbel, K. R. Lamborn and J. R. Fike (1999). "Long-term impairment of subependymal repopulation following damage by ionizing irradiation." Exp Neurol **160**(1): 66-77.
- Taupin, P. (2007). "Adult neural stem cells: The promise of the future." Neuropsychiatr Dis Treat **3**(6): 753-760.
- Taupin, P. (2007). "BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation." Brain Res Rev **53**(1): 198-214.
- Taupin, P. and F. H. Gage (2002). "Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals." J Neurosci Res **69**(6): 745-749.
- Tomasiewicz, H., K. Ono, D. Yee, C. Thompson, C. Goriadis, U. Rutishauser and T. Magnuson (1993). "Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system." Neuron **11**(6): 1163-1174.
- von Bohlen Und Halbach, O. (2007). "Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus." Cell Tissue Res **329**(3): 409-420.
- von Bohlen und Halbach, O. (2011). "Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus." Cell Tissue Res **345**(1): 1-19.
- Welsch, U. D., Thomas (2014). Lehrbuch Histologie, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
- Wittko-Schneider, I. M., F. T. Schneider and K. H. Plate (2013). "Brain homeostasis: VEGF receptor 1 and 2-two unequal brothers in mind." Cell Mol Life Sci **70**(10): 1705-1725.
- Wojtowicz, J. M. and N. Kee (2006). "BrdU assay for neurogenesis in rodents." Nat Protoc **1**(3): 1399-1405.
- Xiao, B., H. H. Ng, R. Takahashi and E. K. Tan (2016). "Induced pluripotent stem cells in Parkinson's disease: scientific and clinical challenges." J Neurol Neurosurg Psychiatry **87**(7): 697-702.
- Yasuhara, T., M. Kameda, T. Sasaki, N. Tajiri and I. Date (2017). "Cell Therapy for Parkinson's Disease." Cell Transplant **26**(9): 1551-1559.
- Yau, S. Y., B. W. Lau, J. B. Tong, R. Wong, Y. P. Ching, G. Qiu, S. W. Tang, T. M. Lee and K. F. So (2011). "Hippocampal neurogenesis and dendritic plasticity support running-improved spatial learning and depression-like behaviour in stressed rats." PLoS One **6**(9): e24263.
- Zhang, R. L., L. Zhang, Z. G. Zhang, D. Morris, Q. Jiang, L. Wang, L. J. Zhang and M. Chopp (2003). "Migration and differentiation of adult rat subventricular zone progenitor cells transplanted into the adult rat striatum." Neuroscience **116**(2): 373-382.
- Zhang, X., K. Deguchi, T. Yamashita, Y. Ohta, J. Shang, F. Tian, N. Liu, V. L. Panin, Y. Ikeda, T. Matsuura and K. Abe (2010). "Temporal and spatial differences of multiple protein

- expression in the ischemic penumbra after transient MCAO in rats." Brain Res **1343**: 143-152.
- Zhao, C., W. Deng and F. H. Gage (2008). "Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis." Cell **132**(4): 645-660.
- Zhao, X. G., E. S. Hui, K. C. Chan, K. X. Cai, H. Guo, P. T. Lai and E. X. Wu (2008). "Identifying rodent olfactory bulb structures with micro-DTI." Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc **2008**: 2028-2031.
- Zimmermann, A. (2013). Etablierung eines verbesserten chronisch- neurotoxikologischen Parkinson-Mausmodells, Dr. med vet, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Ziv, Y., N. Ron, O. Butovsky, G. Landa, E. Sudai, N. Greenberg, H. Cohen, J. Kipnis and M. Schwartz (2006). "Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood." Nat Neurosci **9**(2): 268-275.