

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Entwicklungsgenetik

Regulationsmechanismen für die adulte Neurogenese von Interneuronen des
olfaktorischen Bulbus

Sabine Herold

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender	Univ.-Prof. Dr. S. Scherer
Prüfer der Dissertation	1. Univ.-Prof. Dr. W. Wurst
	2. Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel

Die Dissertation wurde am 22.10.2009 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 05.02.2010 angenommen.

1 Einleitung	3
1.1 Neurale Stammzellen und die adulte Neurogenese	4
1.2 Die Regulation der adulten Neurogenese	7
1.3 Wnt-Signale	12
1.4 Der CREB-Signaltransduktionsweg	16
1.5 Ziele der Dissertation	19
2 Material und Methoden	20
2.1.1 Perfusion	20
2.1.2 Anfertigung von Gehirnschnitten	21
2.1.3 Immunhistochemie	22
2.1.4 Virusherstellung	25
2.1.5 Operationen	28
2.1.6 Zellkulturmethoden	30
2.1.7 Isolation von RNA aus Gewebe und Zellen	35
2.1.8 PCR und RT-PCR	35
2.1.9 Radioaktive <i>In Situ</i> Hybridisierungen (rISH)	36
2.1.10 Klonierung	43
2.1.11 Isolierung von Plasmid-DNA	43
2.1.12 Luciferasereporter-Experimente	44
2.1.13 Westernblots	46
2.1.14 Verwendete Plasmide	48
3 Ergebnisse	49
3.1 Bestimmung der Aktivität des Wnt/b-Catenin Signalweges in der SVZ-OB Neurogenese.	49
3.1.1 Nachweis von Wnt/b-Catenin Aktivierungen in den neurogenen Zonen des erwachsenen Mausgehirns	49
3.1.2 <i>In vitro</i> Generierung dopaminerger Neuronen durch Expression von Wnt1	51
3.1.3 <i>In vivo</i> Überexpression von Wnt1 (<i>gain-of-function</i>).	55
3.2 pCREB Signale in der SVZ, dem RMS und dem OB und Bedeutung dieser Signale für die adulte Neurogenese.	62
3.2.1 Der Verlauf der Phosphorylierung von CREB in der adulten Neurogenese des SVZ-OB-Systems.	62
3.2.2 Retrovirale Vektoren für <i>loss-</i> und <i>gain-of-function</i> Experimente <i>in vivo</i> .	64
3.2.3 Unterdrückung von pCREB-Signalen <i>in vivo</i> .	65

3.2.4	<i>Überstimulation des CREB-Signaltransduktionsweges im SVZ-OB-System</i>	80
3.3	Mögliche Interaktion von Signalwegen zur Generierung von dopaminergen Zellen	85
3.3.1	Interaktion von kanonischen Wnt-Signalen mit dem CREB-Signaltransduktionsweg	85
4	<i>Diskussion</i>	88
4.1	Kanonische Wnt-Signale in der SVZ, dem RMS und dem OB und die Bildung neuer Interneurone des OBs.	88
4.2	Bedeutung des CREB-Signaltransduktionsweges für die Neurogenese im SVZ-OB-System	93
4.3	Mögliche Interaktions-Signalwege zur Generierung von dopaminergen Neuronen	99
5	<i>Relevanz der durchgeführten Untersuchungen</i>	102
6	<i>Zusammenfassung</i>	104
7	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	106
8	<i>Literaturverzeichnis</i>	108
9	<i>Danksagung</i>	121
10	<i>Eidesstattliche Erklärung</i>	122

1 Einleitung

“Once the development was ended, the founts of growth and regeneration of the axons and dendrites dried up irrevocably. In the adult centers, the nerve paths are something fixed, ended, and immutable. Everything may die, nothing may be regenerated. It is for the science of the future to change, if possible, this harsh decree.”

(Ramon y Cajal, 1928)

Dieses von Ramon y Cajal 1928 formulierte Dogma, dass Gehirnzellen zwar im Laufe eines Lebens zerstört werden können, jedoch keine neuen Nervenzellen mehr gebildet werden, herrschte noch bis vor etwa vier Jahrzehnten vor. Aber dann gelang es Wissenschaftlern, neugebildete Zellen im Gehirn von Säugetieren nachzuweisen (Altman et al., 1965, Altman et al., 1967). Diese Ergebnisse wurden kontrovers diskutiert und erhielten zunächst wenig Beachtung. Zwischen 1992 und 1995 kamen erneut Ergebnisse im Hinblick auf das Vorhandensein sich teilender Stammzellen am lateralen Ventrikel und in der Subgranulären Zone des Hippokampus auf (zur Übersicht: Alvarez-Buylla und Lois, 1995). Mit Hilfe modernerer Methoden konnte bewiesen werden, dass Neurone auch noch im adulten Gehirn neu gebildet und diese Zellen in die vorhandenen neuronalen Netzwerke integriert werden können (Ma et al., 2009). Diese Erkenntnisse eröffneten das Forschungsgebiet der adulten Neurogenese. Im Allgemeinen beschreibt der Begriff „adulte Neurogenese“ die Generierung von Neuronen im ausgereiften Gehirn von Tieren unterschiedlicher Spezies. Die Funktion der adulten Neurogenese ist noch nicht vollständig geklärt. Allerdings belegen einige Ergebnisse, dass sie eine spezielle Form der neuronalen Plastizität darstellt (Jessberger et al., 2008, Garthe et al., 2009, zur Übersicht: Ortega-Perez et al., 2007; Magavi et al., 2005; Dupret et al., 2007). Sie scheint in engem Zusammenhang mit der hippokampalen Lernfähigkeit und dem Gedächtnis, sowie dem olfaktorischen Lernen und dem olfaktorischen Gedächtnis zu stehen (Kemperman et al., 1997; van Praag et al., 1999; Kempermann und Gage, 2002; Rochefort et al., 2002). Ebenfalls das Angstverhalten von Mäusen steht in Verbindung mit der Generierung neuer hippokampaler Neurone im erwachsenen

Gehirn (Bergami et al., 2009). Zusätzlich zu den Funktionen der adulten Neurogenese in der Erhaltung der neuronalen Plastizität besteht die Möglichkeit zur Regeneration von Gehirngewebe durch die Neubildung und synaptische Integration von funktionellen Nervenzellen im erwachsenen ZNS (Liu et al., 2009; Kaneko et al., 2009). In diesem Zusammenhang ist es von entscheidendem Interesse, dass auch beim Menschen die Neubildung von Neuronen nachgewiesen werden konnte (Eriksson et al., 1998; Curtis et al., 2005; Siebzehnrübel et al., 2008, zur Übersicht: Zhao et al., 2008 a).

1.1 Neurale Stammzellen und die adulte Neurogenese

Im adulten Gehirn von Säugetieren gibt es zwei Regionen in denen zeitlebens neue Nervenzellen gebildet werden. Diese neurogenen Nischen liegen in der Subgranulären Zone (SGZ) im *Gyrus dentatus* des Hippokampus (HC) und in der Subventrikulären Zone (SVZ) des lateralen Ventrikels (LV). In der SGZ werden Körnerzellen des *Gyrus dentatus* neu gebildet. In der SVZ entstehen neue Neurone des olfaktorischen Bulbus (OB) (zur Übersicht: Alvarez-Buylla und Garcia-Verdugo, 2002). Zelluläre Grundlage der adulten Neurogenese in beiden Regionen sind neurale Stammzellen. Diese Zellen zeichnen sich durch zwei besondere Eigenschaften aus: Sie besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und somit der Selbsterhaltung und sind in der Lage differenzierte Nachkommen zu bilden. Im Falle von neuralen Stammzellen des ZNS bedeutet dies, dass die Stammzellen alle drei neuronalen Zelltypen - Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten - bilden können. In Abbildung 1 ist die Differenzierung einer Stammzelle in ein Neuron dargestellt. Während der Differenzierung durchläuft die Zelle unterschiedliche Stadien und wird im Zuge ihrer Differenzierung zunächst zu einer sich schnell teilenden transient amplifizierenden Zellen, anschließend zu einem Neuroblasten, der sich schließlich in ein postmitotisches Neuron differenziert.

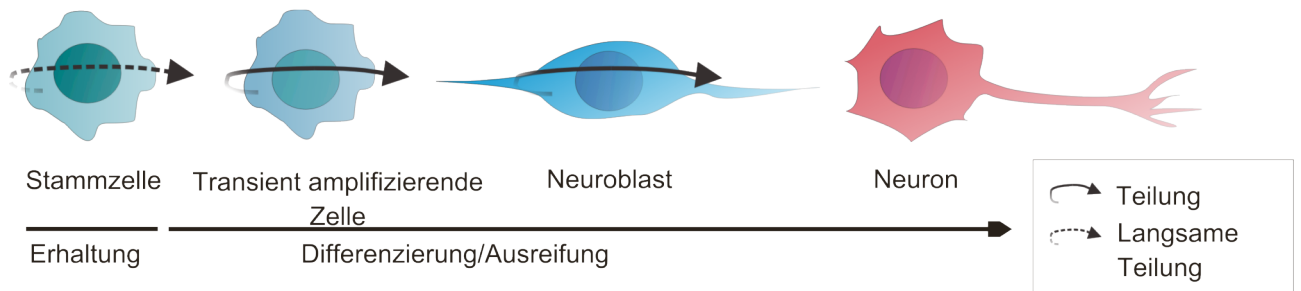


Abb.1: Differenzierung neuraler Stammzellen. Die Stammzelle zeichnet sich durch eine sehr langsame Teilungsrate aus. Im Zuge der Differenzierung wird sie zunächst zu einer transient amplifizierenden Vorläuferzelle, die sich durch eine rasche Proliferation auszeichnet. Die transient amplifizierende Zelle entwickelt sich weiter zur neuronalen Vorläuferzelle, dem Neuroblasten, der sich weiterhin im Zellzyklus befindet. Der Neuroblast differenziert sich schließlich in ein reifes postmitotisches Neuron.

Die Stammzellen in der Subventrikulären Zone des lateralen Ventrikels bleiben ein Leben lang erhalten (Ahlenius et al., 2009) und bilden täglich mehrere Tausend neuer Interneurone für den OB in der Maus (Lois und Alvarez-Buylla, 1994). Die Subventrikuläre Zone der adulten Maus wird von unterschiedlichen Zelltypen gebildet (Doetsch et al., 1997). Der Aufbau der SVZ ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

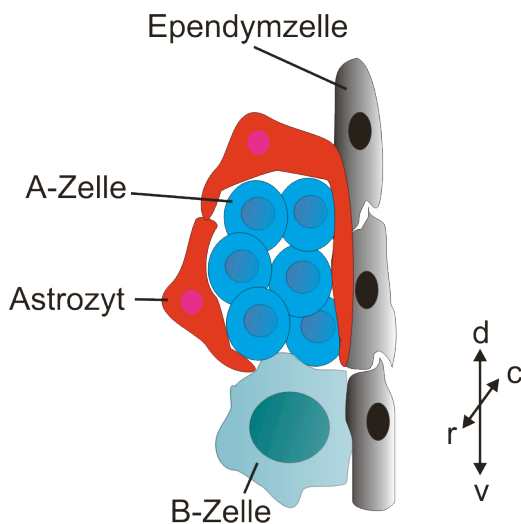


Abb. 2: Aufbau der SVZ im Coronalchnitt des Gehirns der erwachsenen Maus. Stammzellen (grün, Typ B Zelle) liegen an der lateralen Wand des lateralen Ventrikels und bilden zunächst transient amplifizierende Zellen (Typ C Zellen, in der Graphik nicht dargestellt) und später Neuroblasten (blau, Typ A Zellen). Die Neuroblasten werden von den Ependymzellen des Ventrikels (grau) durch Astrozyten (rot) abgegrenzt.

Stammzellen in der SVZ (Typ B-Zellen) sind Radialglia-ähnliche Zellen (Merkle et al., 2004). Diese bilden durch Zellteilung transient amplifizierende Zellen (Typ C-Zellen), welche ihrerseits neuronale Vorläuferzellen (Neuroblasten, Typ A-Zellen) bilden.

Neuronale Vorläuferzellen migrieren in einer Kette entlang des rostralen Migrationsstroms (RMS) in der Maus etwa vier bis fünf Millimeter weit zum OB (Lois et al., 1996). Während dieser Kettenmigration liegen die Vorläuferzellen (Type A) eng beieinander und werden von Astrozyten eingehüllt (Abb. 3 B). Im OB angekommen verlassen die Neuroblasten die Kette und wandern radial zu ihren finalen Positionen im OB (Abb.3 A). Der OB ist in einer geordneten Art und Weise aufgebaut (Abb. 3C). So liegen die Haarsinneszellen im olfaktorischen Epithel und senden ihre Axone in die erste Schaltregion des OBs, die Glomeruli (Glomerular-Schicht). Jede Haarzelle besitzt einen spezifischen Duftrezeptor, der von einem Glomerulus repräsentiert wird. Die Glomeruli sind umgeben von periglomerularen Interneuronen, welche zum überwiegenden Teil den Neurotransmitter Gamma-Amino-Buttersäure (GABA) verwenden (Lledo et al., 2005). Einige dieser periglomerularen Interneurone verwenden neben dem Neurotransmitter GABA Dopamin (DA) als Transmitter (Wachowiak et al., 2006). Die Information aus den Haarsinneszellen wird in den Glomeruli auf Mitral und Tufted Zellen übertragen, welche mit ihren Zellsomata in der Mitral / Tufted Zellschicht liegen. Beide Zelltypen sind Prinzipalneurone des OBs, welche untereinander durch Körnerzellen verschaltet sind, deren Zellsomata in der Körnerzellschicht liegen. Im Gehirn erwachsener Säugetiere werden sowohl Körnerzellen als auch periglomerulare Neurone neugebildet und in bestehende Netzwerke integriert (Carleton, 2003; Ninkovic et al., 2007).

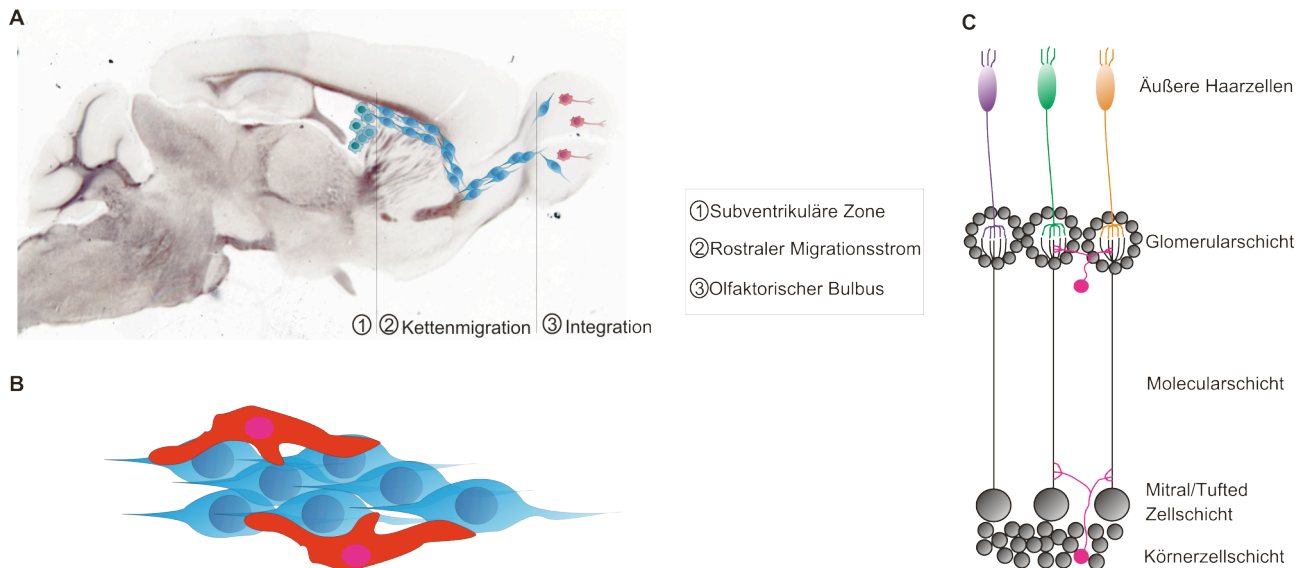


Abb.3: Neurogenese in SVZ-OB-System der Maus. **A** Sagittalschnitt durch das Gehirn einer adulten Maus. Die Stammzellen (grün) liegen in der SVZ des lateralen Ventrikels. Sie bilden Neuroblasten (blau) die entlang des RMS (Kettenmigration) zum OB migrieren, wo sie in das dort vorhandene neuronale Netzwerk integrieren. **B** Im RMS liegen die bipolaren Neuroblasten (blau) eng aneinander und werden durch Astrozyten (rot) eingehüllt. **C** Das neuronale Netzwerk des OBs wird von verschiedenen Zellschichten gebildet. Die äußeren Haarsinneszellen nehmen die Duftstoffe der Umgebung wahr und übermitteln die Information in die Glomeruli der Glomerulärschicht. Die Glomeruli sind die synaptischen Verbindungen zwischen den Haarsinneszellen und den Mitral- und Tuftedzellen. Die Glomeruli werden durch periglomeruläre Neurone begrenzt, die adult neugebildet werden können (pink). Die Mitral- / Tuftedzellen liegen mit ihren Zellsomata in der Mitral / Tufted Zellschicht Sie werden untereinander durch Körnerzellen, die mit ihren Somata in der Körnerzellschicht liegen vernetzt. Auch Körnerzellen werden im adulten Gehirn ständig neu gebildet (pink).

1.2 Die Regulation der adulten Neurogenese

Die adulte Neurogenese wird durch verschiedenste Umweltreize moduliert.

Umweltreize, wie eine angereicherte Umgebung (*enriched environment*,

Kempermann et al., 1997) oder das freiwillige Rennen in einem Laufrad können die

Neurogenese in der SGZ von Nagern positiv beeinflussen (van Praag et al., 1999,

Rhodes et al., 2003). Werden die Mäuse jedoch chronischem Stress ausgesetzt,

senkt dies die Rate der adulten Neurogenese im Hippokampus (Lee et al., 2006).

In der SVZ kann beispielsweise eine Anreicherung der Atemluft mit Duftstoffen (*odor enriched environment*) das Überleben der neugeborenen Neurone im OB positiv

beeinflussen (Rocheffort et al., 2002); eine Bulbektomie, also die Unterbrechung des

olfaktorischen *Inputs* aus der Umgebung, hingegen führt zur signifikant gesteigerten

Proliferation der Zellen in der SVZ (Carr et al., 1992). Leiden die Versuchstiere unter

Depressionen wirkt sich dies negativ auf die Neurogenese des Hippokampus und

des OBs aus (Vollmayer et al., 2007). Diese Umweltreize müssen in molekulare Signalkaskaden übersetzt werden, die die Rate der Neurogenese dann positiv oder negativ regulieren.

Eine präzise Regulation der Rate der Neurogenese ist von großer Bedeutung, da sichergestellt werden muss, dass eine adäquate Anzahl neuer Nervenzellen gebildet wird, welche für die Funktion des Hippokampus oder des olfaktorischen Systems notwendig ist. Dysregulationen haben Funktionsstörungen zur Folge, was beispielsweise auch bei Verhaltensuntersuchungen von Mausmutanten, in denen die adulte Neurogenese reduziert ist, nachgewiesen wurde (Kempermann und Gage, 2002). Zudem wird angenommen, dass beispielsweise eine unkontrollierte Proliferation von Stammzellen zur Bildung von Tumoren führen könnte (Jackson et al., 2006; Jackson et al., 2008). Die Proliferation der Stammzellen und der Neuroblasten, die Migration, die Integration in das neuronale Netzwerk und das Überleben der Zellen wird durch unterschiedliche Faktoren reguliert (zur Übersicht: Ming und Song, 2005). Die erste Phase in der adult Neurogenese, die reguliert werden muss, ist die relativ langsame Teilungsrate der Stammzellen. Es wird angenommen, dass Wachstumsfaktoren die Stammzellerhaltung bzw. die langsame Rate der Proliferation der Stammzellen im erwachsenen Gehirn kontrollieren. Beispielsweise wurde gezeigt, dass TGF (*transforming growth factor*)- β 1 die Proliferation der Stammzellen in der SGZ sowie in der SVZ beeinflusst. Wachs und Kollegen (2006) zeigten, dass durch Infusionen von TGF- β 1 die Teilungsrate der Stamm- und Vorläuferzellen im Hippokampus und in der SVZ reduziert wird. Gleichfalls wird den beiden Wachstumsfaktoren FGF (*fibrillary growth factor*) und EGF (*epithelial growth factor*) in der SVZ ein starker Einfluss auf die Proliferation der dort vorhandenen Neuroblasten zugesprochen, da *knockout* Mutanten für einen der beiden Wachstumsfaktoren eine signifikante Reduzierung der Neurogenese in der SVZ zeigen (Zheng et al., 2004). Durch Untersuchungen von Doetsch und Kollegen konnte gezeigt werden, dass transient amplifizierende Zellen *in vitro* durch die Zugabe von EGF Stammzellcharakter annehmen (Doetsch et al., 2002). Die Proliferation der Stammzellen in der SVZ wird zudem durch das Wirken des Morphogens *Sonic hedgehog* (Shh) kontrolliert. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Faktor die Selbsterneuerung der Stammzellen kontrolliert und zusammen mit EGF entscheidend für die Kontrolle der Proliferationsrate der SVZ-Stammzellen *in vivo* in der Maus ist (Palma et al., 2005). Auch Neurotransmitter können einen

Einfluss auf die Teilungsrate der Stammzellen haben. In der SVZ von frühen postnatalen Tieren wird die Teilungsrate der Stammzellen über den Neurotransmitter GABA moduliert. Durch die Bindung des Transmitters an den GABA_A-Rezeptor an der Stammzelle wird ein negatives *Feedback*-Signal ausgelöst, welches die Teilungsrate der Zellen limitiert (Liu et al., 2005).

Neben der Proliferation der Stammzellen muss auch die Schicksalsdeterminierung der Zellen reguliert werden. Sowohl Oligodendrozyten als auch Neurone werden aus den Stammzellen der SVZ gebildet (Menn et al., 2006). Die Entscheidung darüber welcher Zelltyp gebildet wird, wird über den Wachstumsfaktor PDGF (*Platelet-derived growth factor*) reguliert (Jackson et al., 2006). Untersuchungen von Jackson und Kollegen zeigten, dass eine Subpopulation der GFAP-positiven (*glial fibrillary acidic protein*) Stammzellen der SVZ den für den PDGF-Signaltransduktionsweg erforderlichen Rezeptor, PDGFR α , exprimieren. Durch die Inhibition des Rezeptors konnte die Oligodendrogenese unterdrückt werden. Die Überstimulation des Rezeptors durch die Infusion von PDGF führte alleine zur Inhibition der Neurogenese, steigerte jedoch die Proliferation der Stammzellen. Somit konnte gezeigt werden, dass diesem Faktor eine entscheidende Rolle in der Erhaltung des Gleichgewichtes zwischen der Neubildung von Oligodendrozyten und Neuronen und somit in der frühen Schicksalsdeterminierung der SVZ-Stammzellen zukommt.

Ist das Schicksal der Stammzellen in die neuronale Richtung determiniert, beginnt die Migration der Neuroblasten. Sie müssen die Distanz zwischen der SVZ und dem OB, welche in der adulten Maus vier bis fünf Millimeter beträgt, überwinden. Auch diese Phase während der Entwicklung neuer Neurone im erwachsenen Gehirn unterliegt Regulationsmechanismen. Bei der Migration der neuralen Vorläuferzellen entlang des RMS werden zwei Arten der Wanderung unterschieden: die tangentielle Migration, die von *caudal* nach *rostral* verläuft und eine enge Interaktion der Neuroblasten mit den sie einhüllenden Astrozyten erfordert; und die radiale Migration im OB, die unabhängig von den Astrozyten verläuft (Vergleiche hierzu Kapitel 1.1). Für die Wanderung der Zellen von *caudal* nach *rostral* entlang des RMS müssen migratorische Ketten gebildet werden. Die Bildung dieser Ketten aus Neuroblasten ist abhängig von PSA-NCAM (*polysialic-acid-neural cell adhesion molecule*), welches ein Oberflächenprotein ist und die Adhäsion benachbarter Neuroblasten gewährleistet. Wird die Expression des Proteins experimentell unterdrückt, kommt die gesamte Migration entlang des RMS zum Erliegen (Cremer et al., 1994; Ono et

al., 1994). Neben dem Oberflächenprotein PSA-NCAM in den Neuroblasten, regulieren auch die einhüllenden Gliazellen die Migration der Neuroblasten, d.h. die Migration der Neuroblasten wird ebenfalls über extrinsische Faktoren reguliert. Neuere Untersuchungen belegen, dass die einhüllenden Astrozyten den Neurotransmitter GABA freisetzen und somit die Migrationsgeschwindigkeit der Neuroblasten regulieren (Bolteus et al., 2005). Aber nicht nur die Astrozyten beeinflussen die Wanderung der neuronalen Vorläuferzellen. Beispielsweise gibt es Anhaltspunkte, dass die Richtung der Migration von *caudal* nach *rostral* über den Fluss der Cerebrospinalflüssigkeit vorgegeben sein könnte (Sawamoto et al., 2006). Welche Faktoren dabei entscheidend sind konnte jedoch noch nicht geklärt werden. Ein weiterer entscheidender Punkt in der adulten Neurogenese ist die Regulation des Überlebens der neugeborenen Zellen. Um zu gewährleisten, dass eine stabile und adäquate Anzahl neuer OB-Neurone zur Verfügung steht, müssen einige neugebildete Zellen eliminiert werden. Dies geschieht über den programmierten Zelltod und ist ebenfalls von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der geordneten Migration entlang des RMS (Kim et al., 2007). Die Zellen, welche überlebt haben, differenzieren in einen der Subtypen der OB-Interneurone. Beispielsweise werden zeitlebens neue dopaminerge periglomerulare Neurone gebildet. Es sind bereits einige Faktoren bekannt, die die Bildung neuer dopaminerger periglomerularer Interneurone begünstigen. Unter ihnen sind sowohl extrinsische als auch intrinsische Faktoren. Anhand von Transplantationsexperimenten konnten Suhonen und Kollegen (1996) belegen, dass Stammzellen, welche aus dem *Gyrus dentatus* von adulten Mäusen isoliert wurden, nach der Transplantation in das SVZ-OB-System in der Lage waren dopaminerge periglomerulare Neurone zu bilden. Dies deutet auf das Wirken extrinsischer Faktoren hin, da diese Zellen im *Gyrus Dentatus* keine dopaminergen Neurone generieren. Von besonderem Interesse ist es ebenfalls, dass gezeigt werden konnte, dass dopaminerge periglomerulare Neurone zum überwiegenden Teil ihren Ursprung nicht in der Stammzellnische der SVZ, sondern in einer weiteren zweiten Stammzellnische, welche im RMS liegt nehmen (Hack et al., 2005; Mendoza-Torreblanca et al., 2008). Es scheint demnach in diesem Gebiet Faktoren zu geben, welche das Schicksal der Zellen determinieren. Im Gegenzug gibt es jedoch auch Experimente, welche belegen, dass die Vorläuferzellen bereits in ihrer neurogenen Nische determiniert sind. Das heißt, dass aufgrund ihrer Position im SVZ-OB-

System vorbestimmt wird, welchen neuronalen Zelltyp sie bilden und dieses Schicksal auch durch ektopische Transplantationen der Zellen der Kultivierung der Zellen nicht verändert werden kann (Merkle et al., 2007). Dies spricht für das Vorhandensein von intrinsischen Faktoren, die das Schicksal der Zellen determinieren.

Ein entscheidender intrinsischer Faktor für die Neubildung von dopaminergen Neuronen des OBs ist Pax6 (*paired domain homeobox transcription factor 6*) (Hack et al., 2005; Kohwi et al., 2005), da durch eine virale Überexpression des Transkriptionsfaktors die dopaminerge Neurogenese im adulten Mausgehirn gesteigert werden kann. Zudem sind Tyrosinhydroxylase-immunopositive periglomeruläre Neurone immer positiv für den Transkriptionsfaktor Pax6. Dlx2, ebenfalls ein *homeodomain* Transkriptionsfaktor, hat einen vergleichbaren Effekt auf die dopaminerge Neurogenese im embryonalen Vorderhirn der Maus (Andrews et al., 2003) und deutet somit auf eine eventuelle Interaktion zwischen beiden Signalwegen hin, da Dlx2 ebenfalls von Vorläuferzellen im SVZ-OB-System exprimiert wird (Brill et al., 2008).

Der letzte Schritt der Neubildung von Neuronen im erwachsenen Gehirn ist die synaptische Integration in das bestehende neuronale Netzwerk. Die Regulation der Integration und somit auch des Überlebens der neugebildeten Neurone im OB wird in erster Linie von sensorischen Signalen über die Haarsinneszellen reguliert. Hier greift das Prinzip „*use them or loose them*“. Das heißt, dass neue Neurone, die nicht in das neuronale Netzwerk des OBs integriert werden, sterben (Corotto et al., 1994). Durch eine Anreicherung der Umgebung mit Geruchsstoffen (*odor enriched environment*) kann das Überleben der neugeborenen Zellen positiv beeinflusst werden (Rochefort et al., 2002), wobei das Überleben nur während einer kritischen Periode durch die Manipulation des sensorischen Inputs reguliert werden kann (Yamaguchi und Mori, 2005). Die Ergebnisse belegten, dass diese kritische Periode für das Überleben von Körnerzellen des OBs zwischen 14 bis 28 Tagen nach ihrem Entstehen liegt. Während dieser Zeit erhalten die Zellen bereits synaptische Eingänge von benachbarten Zellen (Petreaunu et al., 2002, Mouret et al., 2008). Alle diese Regulationsmechanismen müssen fehlerfrei zusammenarbeiten um neue funktionsfähige Neurone in einer angepassten Anzahl für den OB zu bilden.

1.3 Wnt-Signale

Wnt-Proteine (*wingless*) regulieren zahlreiche Prozesse während der Embryonalentwicklung von Säugetieren. Ebenso sind sie für die Homeostase verschiedener Gewebe im Erwachsenenalter von Säugetieren von entscheidender Wichtigkeit. Fehlfunktionen in der Wnt-Signaltransduktion stehen nicht selten in Zusammenhang mit der Bildung von Tumoren (zur Übersicht: Clevers, 2006). Es wurden bereits 19 humane Wnt-Proteine identifiziert (<http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>). Die Proteine werden sezerniert und vermitteln ihre Signale über *Frizzled*-Rezeptoren (Fz-Rezeptoren) auf benachbarte Zellen. Es wird davon ausgegangen, dass die Bindung von Wnt-Proteinen an den entsprechenden Rezeptor drei unterschiedliche Signalkaskaden auslösen kann: den kanonischen Wnt-Signalweg, den *planar-cell-polarity* Signalweg (PCP-Signalweg) und den Wnt / Ca^{2+} Signalweg. Da sich die vorliegende Arbeit fast ausschliesslich mit der Regulation der adulten Neurogenese durch den kanonischen Wnt-Signalweg beschäftigt, wird der Leser auf die Artikel von Kohn und Moon (2005) und Katho und Kollegen (2005) verwiesen. In diesen Übersichtsartikeln werden der PCP-Signalweg und der Calcium-abhängige Wnt -Signalweg ausführlich beschrieben.

Abbildung 4 stellt den kanonischen Wnt-Signalweg schematisch dar. Die Signalkaskade beginnt mit der Bindung des Wnt-Proteins an einen Fz-Rezeptor. Fz-Rezeptoren sind 7-transmembran Rezeptoren. Für die Bindung der Wnt-Proteine wird ein weiteres transmembran Molekül benötigt. Dieser Korezeptor ist der LRP 5/6-Rezeptor (*low-density lipoprotein receptor (LDLR)-related protein*) in Vertebraten (Tamai et al., 2000); In *Drosophila* ist dieser Rezeptor als *Arrow* bekannt (Wherli et al., 2000). Das Zielmolekül der kanonischen Wnt-Aktivierung ist β -Catenin. Dieses liegt ohne die Bindung von Wnt-Proteinen an den Rezeptorkomplex in einem Degradationskomplex vor. Dieser Komplex wird von den Serin / Threonin Kinasen CK1 (*C*asein *K*inase 1) und GSK3 α/β (*G*lycogen *S*ynthase *K*inase 3 α/β), und dem Tumor Suppressor Protein APC (*a*denomatous *p*olyposis *c*oli) gebildet. Der Komplex wird durch das Zellgerüstprotein Axin stabilisiert. CK1 und GSK3 α/β binden und phosphorylieren β -Catenin. Phosphoryliertes β -Catenin wird von β -TrCP (*β -transducing repeat-containing protein*) erkannt und dem Ubiquitin-Ligase-Komplex zugeführt, was zum Abbau von β -Catenin führt (Aberle et al., 1997; Feurer et al.,

2008). In Abwesenheit einer Wnt-Aktivierung sind die Bindestelle für β -Catenin an den beiden Transkriptionsfaktoren TCF (*T cell factor*) und LEF (*lymphoid enhancer factor*) durch das Korepressormolekül Groucho blockiert. TCF und LEF wirken dann zusammen mit Groucho als Repressorkomplex und unterbinden hierdurch die Transkription der Zielgene. Bindet ein Wnt-Protein an den entsprechenden Fz/LRP-Rezeptorkomplex (Abbildung 4 rechte Seite) wird das Adaptorprotein *Disheveled* (Dsh) phosphoryliert. In der Folge wird β -Catenin aus dem Degradationskomplex freigesetzt und akkumuliert in der Zelle. Dies geschieht dadurch, dass die Kinasen, in erster Linie GSK3 α/β , inhibiert werden und somit β -Catenin nicht mehr phosphoryliert wird. Nicht-phosphoryliertes β -Catenin ist stabil und kann sich im Zytoplasma der Zelle anreichern. β -Catenin wird in den Zellkern transportiert, wo es an den TCF / LEF-Komplex bindet (Behrens et al., 1996; Molenaar et al., 1996). Durch die Bindung von β -Catenin an TCF / LEF wird die Transkription von Zielgenen initiiert.

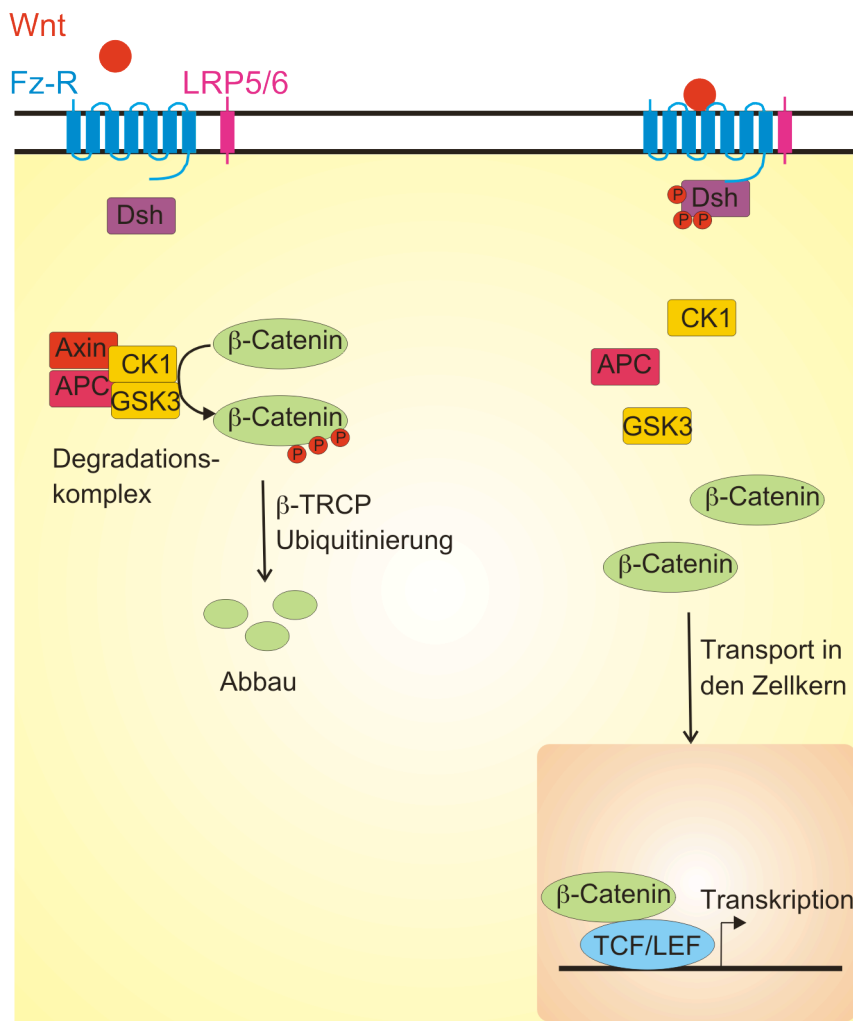


Abb. 4: Schematische Darstellung des kanonischen Wnt-Signalwegs. Ohne die Bindung von Wnt-Proteinen an den Fz / LRP5/6-Rezeptorkomplex (linke Bildhälfte) liegt β -Catenin in einem Degradationskomplex vor und wird durch die beiden Kinasen CK1 und GSK3 α/β phosphoryliert. In der phosphorylierten Form wird β -Catenin zunächst ubiquitiniert und dann abgebaut. Bindet ein Wnt-Protein an den Rezeptorkomplex (rechte Bildhälfte) wird *Disheveled* phosphoryliert und β -Catenin wird aus dem Degradationskomplex freigesetzt. Das nun nicht mehr phosphorylierte β -Catenin wird zum Zellkern transportiert, wo es an den Transkriptionsfaktor-Komplex aus TCF und LEF bindet und somit zur Transkription führt. Dsh = *Disheveled*, CK1 = *Casein Kinase 1*, GSK = *Glycogen Synthase Kinase*, β -TRCP = *β -transducing repeat-containing protein*, TCF = *transforming growth factor*, LEF = *lympoid growth factor*, APC = *adenomatous polyposis coli*

Aus der Embryonalentwicklung des Säugetiergehirns ist bekannt, dass Wnt-Proteine an der Regulation der Zellproliferation, der Differenzierung, der Polarität sowie der Migration und dem Zelltod beteiligt sind (Hirabayashi et al., 2004; Megason et al., 2002; Willert et al., 2003). Dass Wnt-Signale die Proliferation von Zellen auch noch in adulten Tieren beeinflussen, legen Forschungsergebnisse nahe, in denen β -Catenin-, APC- und Axin-Mutationen, die zur Stabilisierung von β -Catenin führen, in vielen unterschiedlichen Tumoren gefunden werden konnten (zur Übersicht: Giles et al., 2003). Mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen auf Gehirnschnitten von frühen

postnatalen Mäusen wurde die Expression mehrerer Wnt-Gene, sowie deren Fz-Rezeptoren in den neurogenen Zonen, nachgewiesen (Shimogori et al. 2004). Die Funktion dieser wichtigen Proteinklasse während der adulten Neurogenese ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch konnte bereits im *Gyrus dentatus* adulter Mäuse die Expression von Wnt3 nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde durch die experimentelle Inhibition kanonischer Wnt-Aktivität die Neurogenese in dieser Region reduziert, was darauf schließen lässt, dass die hippocampale Neurogenese durch Wnt3 reguliert wird (Lie et al. 2005). Aus der Embryonalentwicklung von Mäusen ist bekannt, dass Wnt/ β -Catenin Signale die Proliferation, die Differenzierung und die Migration der neugebildeten Neurone regulieren (Ille und Sommer, 2005). Unbekannt ist jedoch die Funktion von Wnt-Proteinen im SVZ-OB System. Shimogori und Kollegen (2004) konnten in ihren Experimenten in jungen postnatalen Tieren das Wnt1-mRNA nachweisen. Von Wnt1 ist aus der Embryonalentwicklung von Mäusen bekannt, dass es eine entscheidende Funktion in der Entwicklung von dopaminergen Mittelhirnneuronen ausübt, indem es ein komplexes genetisches Netzwerk reguliert (Prakash et al., 2006; Chi et al., 2003). Die Beobachtungen, dass Wnt1 im postnatalen SVZ-OB-System exprimiert wird, dass Wnt1 die Entwicklung dopaminergener Neurone in der Embryonalentwicklung reguliert, und dass in der adulten Neurogenese dopaminerge Neurone gebildet werden, legen die Hypothese nahe, dass Wnt1 bzw. kanonische Wnt-Signale die adulte Neurogenese im SVZ-OB-System regulieren und die Neubildung von dopaminergen periglomerularen Interneuronen des OBs im erwachsenen Gehirn von Mäusen steuern. Diese Hypothese wird in der vorliegenden Dissertation untersucht.

1.4 Der CREB-Signaltransduktionsweg

Wie in Kapitel 1.2 beschrieben, kann die adulte Neurogenese nicht nur durch das Wirken extrinsischer Faktoren beeinflusst werden, sondern ebenfalls über die Aktivität bestimmter intrinsischer Faktoren wie beispielsweise Transkriptionsfaktoren. Zudem wird die Neurogenese durch neuronale Netzwerkaktivität beeinflusst. Dies konnte beispielsweise an dem Einfluss den ein *enriched environment* bzw. ein *odor enrichment* auf die Neurogenese hat belegt werden (Vergleiche Kapitel 1.2; Kempermann et al. 1997; Rochefort et al., 2002). In diesem Zusammenhang sollte die Wirkung des Transkriptionsfaktors CREB (*cAMP response element binding protein*) auf verschiedene Entwicklungsstadien der neugeborenen Zellen im SVZ-OB-System untersucht werden.

CREB ist ein aktivitätsabhängiger Transkriptionsfaktor, der durch Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter (Lonze et al., 2002), Neurotrophine oder die Aktivierung von unterschiedlichen Ionenkanäle (zur Übersicht: Carlezon et al., 2005) phosphoryliert und somit in seine aktive Form überführt werden kann.

CREB wurde erstmals 1987 als ein Transkriptionsfaktor, der die Expression des Somatostatingens reguliert, beschrieben (Montminy et al., 1987). Seither wurden einige Zielgene wie *c-fos*, BDNF, Tyrosinhydroxylase (TH) und verschiedene Neuropeptide beschrieben (Carlezon et al., 2005). Funktionell und strukturell ist CREB eng verwandt mit CREM (*cAMP response element modulator*) und ATF 1 (*activating transcription factor 1*), und bildet mit ihnen eine Proteinfamilie.

Die Phosphorylierung von CREB kann über verschiedene Faktoren vermittelt werden. In Abbildung 6 sind einige der zellulären Mechanismen aufgezeigt, die zur Phosphorylierung von CREB an Ser133 führen. Unter anderem kann die Aktivierung des TrkB-Rezeptors durch Neurotrophine über die MAP-Kinase zur Phosphorylierung von CREB führen. Ebenso können die Glutamatrezeptor-Untereinheit GluR1 und der NMDA-Glutamatrezeptor (Dash et al., 1991), sowie der spannungabhängige Calciumkanal des L-Typs über die CaM-Kinasell (Sheng et al., 1991) die Phosphorylierung von CREB vermitteln.

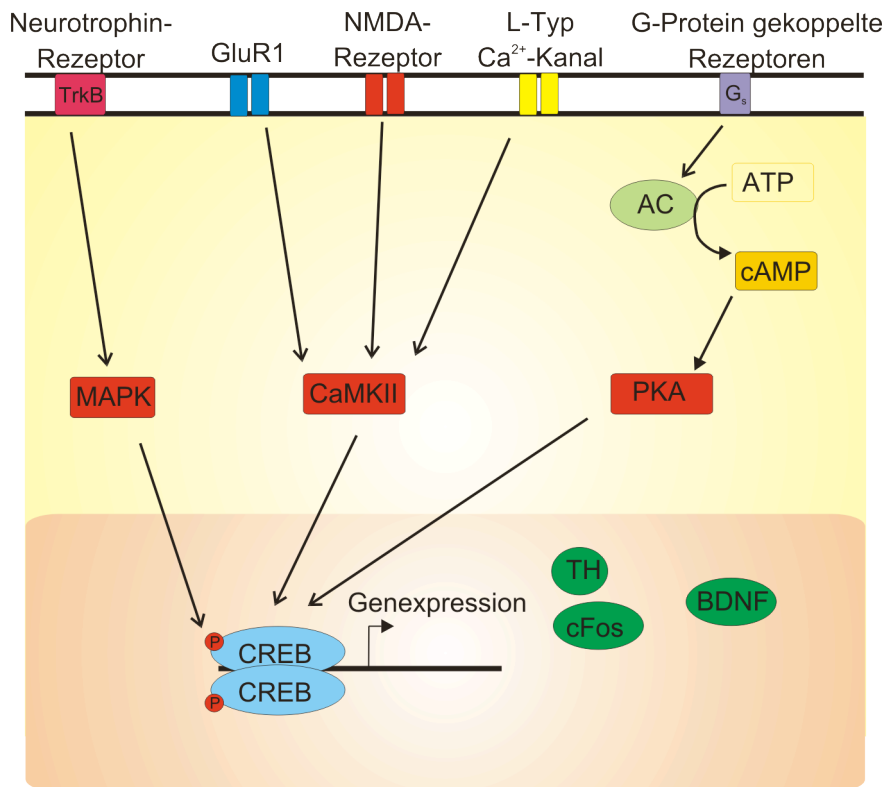


Abb. 5: Signalwege zur Regulation der CREB-vermittelten Transkription. Membranrezeptoren (TrkB, GluR1Rs, NMDA-Rezeptoren, L-Typ Ca²⁺-Kanäle und G-Protein gekoppelte Rezeptoren) werden über ihre entsprechenden Liganden aktiviert und setzen somit intrazelluläre Signalkaskaden in Gang, die zur Phosphorylierung von CREB und somit zur Expression von Zielgenen (beispielsweise TH, cFos, BDNF) führen. MAPK = MAP-Kinase, CaMKII = Cam-KinaseII, PKA = Proteinkinase A, AC = Adenylatcyclase, ATP = Adenosintriphosphat, cAMP = cyclic Adenosinmonophosphat.

Der am besten beschriebene Signalweg zur Phosphorylierung von CREB verläuft über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Die Bindung eines entsprechenden Transmitters an ein G_s-Protein-gekoppelten Rezeptor (zur Übersicht: Strader et al., 1994) führt zur Aktivierung der Adenylatcyclase (AC). Die AC überführt ATP (Adenosin Triphosphat) in cAMP (cyclic Adenosin monophosphate). cAMP aktiviert dann die cAMP-abhängige Proteinkinase des Typs A (PKA), welche ihrerseits CREB an Ser133 phosphorylieren kann und den Transkriptionsfaktor somit in seine aktive Form pCREB überführt (Gerhard Kraus, Biochemie der Regulation der Signaltransduktion, Wiley-VCH, 1997).

Für die CREB-vermittelte Transkription von Genen formen zwei CREB-Moleküle ein Dimer, welches an bestimmte DNA-Sequenzen, die sogenannten CRE-Bindestellen (cAMP response element) bindet. Aktivierung des CREB-Signaltransduktionsweges erfolgt über die Phosphorylierung von CREB an Ser133 (Mayr et al., 2001), was zu einer Rekrutierung von Koaktivatoren mit Histonacetylierungsaktivität wie CBP (CREB-binding protein) und p300 führt (Nordheim et al., 1994). Dieser

Transkriptionskomplex begünstigt Prozesse wie Histon-Acetylierungen, die zu einer Konformationsänderung des benachbarten Chromatins führen und die Bindung der RNA-Polymerase erlauben (Bannister et al., 2002). Abbildung 6 zeigt einen kurzen Überblick über die Ereignisse, die zur CREB-vermittelten Transkription führen.

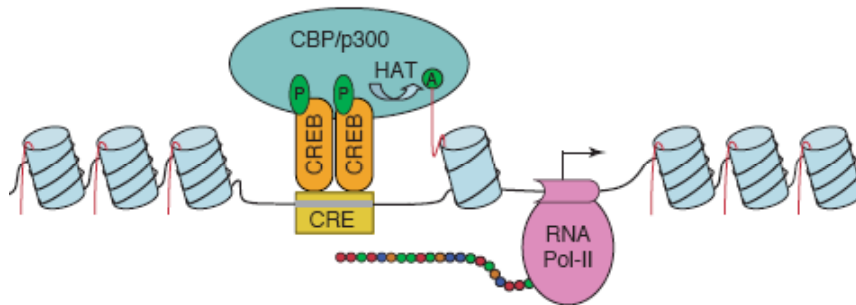


Abb. 6: Schematische Darstellung der Ereignisse, die zur CREB-vermittelten Transkription führen (aus Carlezon et al., 2005). Beide CREB-Moleküle sind an Ser133 phosphoryliert. Dies führt zur Bindung von CBP / p300 und zur Histon-Acetylierung durch die Histon-Acetyl-Transferase (HAT). Die Acetylierung des Chromatins führt zu einer Konformationsänderung, die die Bindung der RNA-Polymerase II (RNA Pol-II) begünstigt.

1.5 Ziele der Dissertation

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, molekulare Signalwege zu untersuchen, die die adulte Neurogenese im SVZ-OB-System regulieren. Dabei lag ein Schwerpunkt in der Charakterisierung von Signalwegen zur Schicksalsdeterminierung der neugeborenen Zellen. Die Schicksalsdeterminierung der Zellen wurde an Hand der Generierung neuer dopaminerg periglomerularer Interneurone untersucht. Hierbei wurde die Rolle von kanonischen Wnt-Signalen bei der Generierung dieses Zelltyps untersucht. Zur Untersuchung der Frage wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Modellsysteme verwendet. In beiden Systemen wurde ein kanonisches Wnt-Protein, Wnt1, überexprimiert und die Stammzellen und ihre Nachkommen auf ihren Phänotyp hin untersucht. Weiterhin sollte untersucht werden, ob der aktivitätsabhängige Transkriptionsfaktor CREB die Differenzierung neugebildeter Nervenzellen im SVZ-OB-System beeinflusst und ob er mit dem kanonischen Wnt-Signalweg interagiert. Aus diesem Grund wurde ebenfalls die Funktion dieses Transkriptionsfaktors während unterschiedlichen Entwicklungsstadien der neugeborenen Zellen untersucht. Die Fragen, welche in der vorliegenden Dissertation bearbeitet wurden, waren demnach:

Welche Funktion übt der Wnt/ β -Catenin Signalweg im Zusammenhang mit der dopaminergen Differenzierung im SVZ-OB-System aus?

Welche Phasen der adulten Neurogenese des SVZ-OB-Systems unterliegen der Kontrolle des Transkriptionsfaktors CREB?

Besteht die Möglichkeit, dass beide Signalwege *in vivo* miteinander interagieren?

2 Material und Methoden

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland) bezogen.

2.1.1 Perfusion

Alle Experimente, in denen Tiere verwendet wurden, sind nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt worden und wurden von der Regierung Oberbayerns genehmigt. Zur Herstellung von Gehirnschnitten aus der Maus für Immunfluoreszenz-Färbungen musste das Hirngewebe fixiert werden. Hierzu wurde eine 4%ige PFA-Lösung und eine 1xPBS-Lösung hergestellt und beide Lösungen auf einen pH-Wert von 7,4 mit HCl eingestellt. Die Tiere wurden mit CO₂ getötet und anschließend in einer Präparationswanne aufgespannt um den Brustkorb zu öffnen. Mit einer Kanüle wurde ein Zugang in den linken Ventrikel / Aorta gelegt. Der rechte Vorhof wurde ebenfalls eröffnet, um das Abfließen der Lösungen zu ermöglichen. Die Tiere wurden mit PBS mit einer Flussgeschwindigkeit von 10 ml / min für 10 min perfundiert. Im direkten Anschluss wurde das Gehirngewebe durch Perfusion mit 100 ml einer 4%igen eiskalten PFA-Lösung mit einer Flussgeschwindigkeit von 10 ml / min fixiert. Anschließend wurde das Gehirn aus dem Schädel präpariert, in 4% PFA über Nacht bei 4 °C nachfixiert und im Anschluss zur Dehydrierung für mindestens 24 Stunden in 30%iger Succroslösung in TBS bei 4 °C gelagert.

10 x PBS :

NaCl 2,25 M

KCl 20 mM

Na₂PO₄ 1 mM

KH₂PO₄ 20 mM

=> in 800 ml auflösen und den pH auf 7,4 einstellen mit HCl.

=> anschließend auf 1000 ml auffüllen

0,2 M PO₄-Puffer:

NaH ₂ PO ₄	500 mM
Na ₂ HPO ₄	1,5 M
Auffüllen auf 1 l	

4% Paraformaldehyd-Lösung(PFA):

Paraformaldehyd (PFA)	40 g
0,2 M PO ₄ -Puffer	500 ml
H ₂ O	500 ml
Lösung kurz auf 90 °C erwärmen und anschließend abkühlen. pH der eiskalten Lösung auf 7,4 mit HCl einstellen	

2.1.2 Anfertigung von Gehirnschnitten

Die Gehirne wurden der Sucrose-Lösung entnommen, mit Cryoblock (Polysciences, Inc., Warrington, USA) auf der Trägerplatte des Mikrotoms (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) fixiert und mit Hilfe von Trockeneis durchgefroren. Es wurden entweder Sagittalschnitte oder Coronalschnitte mit einer Schnittdicke von 40 µm angefertigt. Diese wurden in einer 96-*Multiwell* Zellkulturplatte (Falcon, Heidelberg, Deutschland) in Kryoprotect-Lösung gesammelt und bei -20 °C aufbewahrt.

Kryoprotect:

Glycerin (100%)	250 ml
Ethylen Glycol (100%)	250 ml
0,1 M PO ₄ -Puffer	500 ml

2.1.3 Immunhistochemie

Fluoreszenzfärbungen von Schnitten und Zellen

Die ausgewählten Gehirnschnitte bzw. Zellen wurden dreimal mit TBS gewaschen und anschließend mit TBS++ zwei Stunden blockiert. Die Inkubation der Gehirnschnitte mit der entsprechenden Antikörperlösung in TBS++ erfolgte über Nacht auf einem Schüttler bei 4 °C. Nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen wurden die Schnitte erneut dreimal mit TBS gewaschen und anschließend für 30 min in TBS++ blockiert. Die Inkubation mit den sekundären Antikörpern in TBS++ wurde bei 22 °C auf dem Schüttler für zwei Stunden durchgeführt. Zuletzt wurden die Schnitte erneut dreimal mit TBS gewaschen, wobei beim zweiten Waschgang der nukleäre Farbstoff Dapi (1:10000, Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) zugesetzt wurde. Anschließend wurden die Gehirnschnitte in 0,2 M PO₄-Puffer auf Superfrost®Plus Objektträger (Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen und mit Aqua/Poly Mount (Polysciences, Inc., Warrington, USA) und Deckgläsern der Firma Menzel Gläser (Braunschweig, Deutschland) versiegelt.

10 x TBS:

NaCl	1,4 M
KCl	30 mM
1 M TrisHCl pH 7,4 in H ₂ O	500 mM

=> Auffüllen auf 1000 ml und pH auf 7,5 einstellen
=> zur Herstellung der 1 X TBS-Lösung wurde die Stammlösung (10 x) jeweils frisch 1:10 mit H₂O verdünnt.

TBS++ für Gehirnschnitte:

Esel-Serum	3ml
10% TritonX-100	2,5 ml

Auffüllen auf 100 ml mit 1x TBS

TBS++ für Zellkultur:

Esel-Serum	1 ml
10% TritonX-100	1 ml
Auffüllen auf 100 ml mit TBS	

Table 1: Verwendete Antikörper für Immunfluoreszenz-Färbungen (IF):

Verwendete prim. Antikörper	Endkonzentration	Firma
Chicken-anti-GFP	1:500	<i>AVES Labs Inc.</i>
Rabbit-anti-RFP	1:250	<i>Chemicon</i>
Goat-anti-DCX	1:250	<i>Santa Cruz</i>
Guinea pig-anti-DCX	1:1000	<i>Chemicon</i>
rabbit-anti-AADC	1:1000	<i>Dako Cytomation</i>
Goat-anti- β -Galaktosidase	1:500	<i>Biogenesis England</i>
Rabbit-anti- β -Galaktosidase	1:1000	<i>Europa Bioproducts Ltd.</i>
Rabbit-anti-pCREB	1:200	<i>Santa Cruz</i>
Mouse-anti-pCREB	1:250	<i>Santa Cruz</i>
Rabbit-anti-TH	1:500	<i>Protos Biotech Corp.</i>
Mouse-anti-TH (monoclonal)	1:500	<i>Chemicon</i>
Mouse-anti-MAP2ab (monoclonal)	1:250	<i>Sigma</i>
Mouse-anti-NeuN (monoclonal)	1:50	<i>Hybridoma Bank</i>
Rabbit-anti-Pax6	1:1000	<i>Chemicon</i>

Alle verwendeten sekundären Antikörper stammen aus dem Esel und sind gegen die jeweilige Spezies des ersten Antikörpers gerichtet. Dabei wurden die Fluorophore Cy3, FITC und Cy5 (1:250, Jackson Laboratories) verwendet.

DAB-Färbungen

Für die DAB (3,3'-Diaminobenzidine)-Färbungen wurden die Gehirnschnitte dreimal in TBS gewaschen und anschließend für 30 min in 0,6% H₂O₂ in TBS inkubiert. Die weitere Behandlung der Schnitte bis zum sekundären Antikörper entspricht der unter dem Punkt „Immunfluoreszenzfärbungen“ beschriebenen Vorgehensweise. Nach Inkubation in einem mit Biotin gekoppelten sekundären Antikörper wurden die Schnitte erneut dreimal in TBS gewaschen und anschließend nach Herstellerangaben für eine Dauer von 1,5 Stunden in Vectastain ABC/Elite Standard Kit (Vector Laboratories, Burlingame, UK) inkubiert. Dieser enthält die Substrate Avidin und Streptavidin. Nach der Inkubation wurden die Schnitte in TBS gewaschen und für die DAB-Reaktion in 10 mg / ml DAB und 0,6% H₂O₂ in TBS inkubiert. Die Reaktion wurde durch Überführen der Schnitte in TBS bei Erreichen der gewünschten Intensität gestoppt.

Analyse der Immunfluoreszenzfärbungen

Alle gezeigten Aufnahmen wurden entweder mit einem konfokalen FluoView FV 300-Mikroskop (Olympus Mikroskopie, Hamburg, Deutschland) und der zugehörigen *Software* Fluoview aufgenommen und ausgewertet oder die Aufnahmen und Analysen wurden mit einem SP5 Mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) und der Software LASAF durchgeführt. Zur Kolo-kalisation verschiedener Fluoreszenzsignale wurden z-Stapel mit einem durchschnittlichen Abstand der Einzelbilder von 0,3-0,5 µm aufgenommen und in jeder optischen Ebene bestimmt, ob eine Doppelfärbung vorliegt.

Für die morphologischen Untersuchungen wurde das Programm ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) mit dem Plugin für Neuron J (<http://imagescience.bigr.nl/meijering/software/neuronj>), sowie dem Plugin für die Scholl-Analyse (<http://biology.ucsd.edu/labs/ghosh/software/index.html>) verwendet. Zur Bestimmung der Gesamtdendritenlänge und für die Scholl-Analyse wurden dreidimensionale Rekonstruktionen der Zellen angefertigt und ausgewertet. Die für diese Analysen herangezogenen Zellen stammten allesamt aus der äußeren Körnerzellschicht des OB und wurden alle mit einem 20-fach Objektiv (HCN-PLAPO-

20x, N.A.1,74, Öl) und einem zweifachen Zoom systemoptimiert am SP5-Mikroskop aufgenommen.

Analyse von DAB-Färbungen

Alle DAB-Färbungen wurden mit einem Axioplan-Mikroskop (Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Deutschland) und der Software StereoInvestigator (mbf Bioscience, Williston, USA) analysiert. Für alle analysierten Bereiche wurde die Anzahl der immunreaktiven Zellen bestimmt und auf das gemessene Volumen der analysierten Gehirnstruktur bezogen. Es wurden keine streng stereologischen Analysen durchgeführt, da viele Gehirnschnitte für andere Analysen verwendet wurden. Daher wird nicht die Verteilung der Zellen über die gesamte Struktur, sondern lediglich über einen Ausschnitt angegeben.

2.1.4 Virusherstellung

- Die retroviralen Vektoren CAG-GFP (Zhao et al.2006), CAG-RFP (Tashiro et al., 2006) und CAG-IRES-GFP (Jessberger et al., 2008) wurden bereits in den angegebenen Publikationen beschrieben. Für die *gain-* und *loss-of-function* Experimente wurde die cDNA für CREB-Y143F (Du et al., 2000) bzw. aCREB (Ahn et al., 1998) in den CAG-IRES-GFP Vektor kloniert. Die Funktionalität der Konstrukte wurde anschließend mittels eines Luciferasereporter-Experiments getestet.
- Der lentivirale Vektor CMV-GFP wurde bereits beschrieben (Consiglio et al., 2004). Für die *gain-of-function* Experimente wurde die GFP-Kassette gegen eine Wnt1-IRES-GFP-Expressionskassette ausgetauscht.

Virusproduktion

Retroviren

Zur Herstellung der Retroviren wurden Hek 293T Zellen mit dem jeweiligen viralen Vektor, sowie den Vektoren CMVgp (virale Polymerase) und VsVg (zur Generierung der erforderlichen Hüllproteine) mittels Lipofectamin 2000 Reagent (Invitrogen, California, USA) transient transfiziert. Danach wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das Transfektionsmedium wurde nach 12 Stunden gegen Hek 293T Zellen Wachstumsmedium ausgetauscht. Die Ernten der viralen Partikel erfolgte zwei und fünf Tage nach der Transfektion. Um die Konzentration des Virus zu erhöhen, wurde der Überstand der Zellen abgenommen und zunächst durch einen 0,45 µm Filter filtriert, anschließend in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt und die Viruspartikel bei 50 000g für 90 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit PBS gewaschen, wonach eine erneute Zentrifugation der Viruspartikel bei 50 000g für 1,5 h bei 4 °C folgte. Anschließend wurden die Viruspartikel in 10-30 µl TNE resuspendiert, aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

Transfektionsansatz für Hek 293T-Zellen zur Retrovirusproduktion:

(Ansatz für die Transfektion einer 10 cm Platte)

Lipofectamin 200 Reagent (Invitrogen)	60 µl
Opti-MEM Medium (Gibco)	3,0 ml
Virales Plasmid	9 µg
CMVgp	6 µg
pCMV-VsVg	3 µg

Wachstumsmedium für Hek293T-Zellen:

DMEM (Gibco)	500 ml
FBS (Gibco)	50 ml
Antibiotika/Antimykotika-Lösung (100X, Invitrogen)	2,5 ml

TNE:

Tris-HCl in H ₂ O (pH 7,8)	50 mM
NaCl	130 mM
EDTA	1 mM

Lentiviren

Das Protokoll für die Herstellung von Lentiviren entspricht grundsätzlich dem Protokoll zur Herstellung von Retroviren. Es wurden ebenfalls Hek 293T Zellen transient transfiziert. Lediglich die Zusammensetzung des Transfektionsansatzes war anders. Nach der Transfektion wurden die Zellen entsprechend dem Protokoll zur Herstellung von Retroviren behandelt und die Ernte der viralen Partikel entsprechend durchgeführt.

Transfektionsmedium für Hek 293T-Zellen zur Lentivirusproduktion:

(Ansatz für die Transfektion einer 10 cm Platte)

Lipofectamin 200 Reagent	50 µl
Opti-MEM Medium	2,0 ml
Viraler Vektor	7,5 µg
pMBL	5 µg
pCMV-VsVg	2,5 µg
pRSV.REV	1,9 µg

Titerbestimmung

Für die Bestimmung der Infektiosität des Virus wurden Hek 293-T-Zellen in einer 24 Wellplatte ausplattiert und bis zu einer Konfluenz von etwa 80% kultiviert. Der geerntete Virus wurde in einer Verdünnungsreihe von $2 \cdot 10^8$ bis $2 \cdot 10^5$ Viruspartikeln / ml zugegeben. Zwei Tage nach der viralen Infektion der Zellen wurden die infizierten Kolonien von drei Verdünnungen gezählt und der Mittelwert errechnet.

Anmerkung: Alle Klonierungen für die viralen Plasmide sowie die Herstellung der Viruspartikel wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Ravi Jagasia und Frau Katrin Wassmer durchgeführt.

2.1.5 Operationen

Zur stereotaktischen Injektion der Tiere wurde eine Stereotaxie Apparatur von Stoelting (Illinois, USA) mit einer dazugehörigen Injektionseinheit, dem Nanoliter 2000 mit einem Micro4 Controller der Firma WPI (World Precision Instruments, Berlin, Deutschland) verwendet. Zur Injektion wurden Glaskapillaren von WPI verwendet, welche mit einem *Puller* gezogen wurden. Des Weiteren kamen ein Feinbohrer (Dremel, Leinfelden-Echterdingen, Deutschland) mit einem Aufsatz mit einem Spitzendurchmesser von 2 mm, ein Makroskop (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) sowie die KL1500OLCD-Kaltlichtquelle (Olympus) zum Einsatz. Die Titer der Viren für eine Versuchsreihe wurden angeglichen durch

Verdünnung des Virus mit dem höheren Titer mit einer sterilen isotonischer NaCl-Lösung (Millipore, Schwalbach, Deutschland), damit sowohl die Kontrollgruppe als auch die genetisch veränderten Tiere eine vergleichbare Anzahl an transduzierten Zellen aufweist.

Alle Versuche wurden in Vollnarkose durchgeführt. Die Mäuse wurden mittels intraperitonealer Injektion eines Narkosegemisches aus Medetomin (0.5 mg / kg) Midazolam (5 mg / kg) und Fentanyl (0.05 mg / kg) narkotisiert. Die Augenhornhaut wurde durch Oclutet Fluid (wirksamer Bestandteil: 50 mg Polyvidon) vor dem Austrocknen geschützt. Die Operationen wurden unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Nach Eintritt der Vollnarkose wurden die Mäuse in die stereotaktische Apparatur eingespannt. Die Haut über dem Schädel wurde durch einen Schnitt geöffnet und der darunterliegende Schädelknochen mit Hilfe des Feinbohrers geöffnet. Eine mit viraler Suspension gefüllte Glaskapillare wurde in das Gehirn eingeführt und 1 μ l der Suspension langsam (150 nl / min) injiziert. Nach dem Entfernen der Kanüle wurde die Haut über dem Schädelknochen vernäht. Nach Beendigung der Operationen, die maximal eine Stunde pro Maus dauerten, wurde die Narkose durch Gabe von 2,5 mg / kg Atipamezol, 0,5 mg / kg Flumazenil und 1,2 mg / kg Naloxon antagonisiert. Innerhalb weniger Minuten waren die Mäuse wieder ganz wach und mobil.

Die zur Injektion in den rostralen Migrationsstroms verwendeten Koordinaten waren: mediolateral 0,8; rostralcaudal 3,2 und dorsoventral 1,9.

Anmerkung: Die genannten Operationen wurden unter der Betreuung von Herrn Dr. Ravi Jagasia durchgeführt.

2.1.6 Zellkulturmethoden

Beschichtung von Zellkulturplatten für neurale Stammzellen aus der Ratte (rNSZ)

Zellkulturplatten und Deckgläser wurden mit Poly-L-Ornithin (Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) und Laminin (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) beschichtet, um die Anheftung der Zellen zu gewährleisten. Poly-L-Ornithin wurde in einer Konzentration von 10 µg / ml in H₂O auf die Kulturmaterialien aufgebracht und anschließend 12 Stunden bei 22 °C in der Sterilbank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Poly-L-Ornithin-Lösung abgesaugt und die Platten zweimal mit sterilem H₂O gewaschen. Anschließend wurden die Platten mit einer Laminin-Lösung (5 mg/ml in PBS) erneut bei 22 °C für 12 Stunden inkubiert. Die Kulturschalen wurden bei -20 °C gelagert oder direkt verwendet.

Kultivierung von rNSZ

Die Wildtyp rNSZ wurden bereits früher beschrieben (Gage et al., 1995), und nach einem etwas abgewandelten Protokoll etabliert (Palmer et al., 1999). Es handelt sich um eine Zelllinie aus dem *Gyrus dentatus* der hippocampalen Formation von Fischer 344-Ratten im Alter von acht Wochen. Der *Gyrus dentatus* wurde aus 12 Tieren isoliert und gewogen. Die Gewebestücke wurden in 10 ml PPD-Lösung (neutrale Protease Dispase) / g Gewebe bei 37 °C für 30 min inkubiert, wobei die Gewebestücke während dieser Zeit alle 5 min resuspendiert wurden. Die Zellsuspension wurde mit dem gleichen Volumen an DMEM:F12 mit 1 mM Glutamin und 10% FBS (Gibco) versetzt und durch einen 70 µm Nylonfilter (Falcon) filtriert. Die Zellen wurden bei 1000 g für 3 min abzentrifugiert und das Zellpellet resuspendiert in DMEM:F12/Glutamin/FBS. Die Zellsuspension wurde mit dem gleichen Volumen Percoll (9 ml Percoll + 1 ml 10x PBS) vermischt und bei 20000g für 30 min bei 22 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen aus der Fraktion mit geringem Auftrieb (etwa 5 ml über den roten Blutkörperchen) gesammelt und mit PBS gewaschen und erneut bei 20000g für 5 min bei 22 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 1 ml DMEM:F12/Glutamin/FBS. resuspendiert. Die Zellanzahl wurde bestimmt und 5•10⁵ Zellen / 60 mm auf unbeschichteten Kulturschalen (Falcon) ausplattiert. Nach 15

Stunden Inkubation bei 37 °C wurde das Medium gegen Wachstumsmedium für rNSZ ausgetauscht. Nach der ersten Passage wurden die Zellen auf Poly-Ornithin / Laminin-beschichtete Kulturplatten übertragen. Die rNSZ-Wnt1 Zellen wurden generiert durch Transduktion der Wildtyp rNSZ mit dem pPIT-Wnt1-Vektor (Abb.7). Der hierfür verwendete Vektor besitzt eine Tetracyclin-Regulationseinheit (tet_{off}), d.h. so lange den Zellen im Medium Tetracyclin (Doxycyclin, DOX, 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$) zugesetzt wurde ist der Promotor inaktiv und die Zellen verhalten sich wie Wildtyp rNSZ; wird DOX entzogen beginnt die Transkription des Transgens (Gossen et al., 1992).

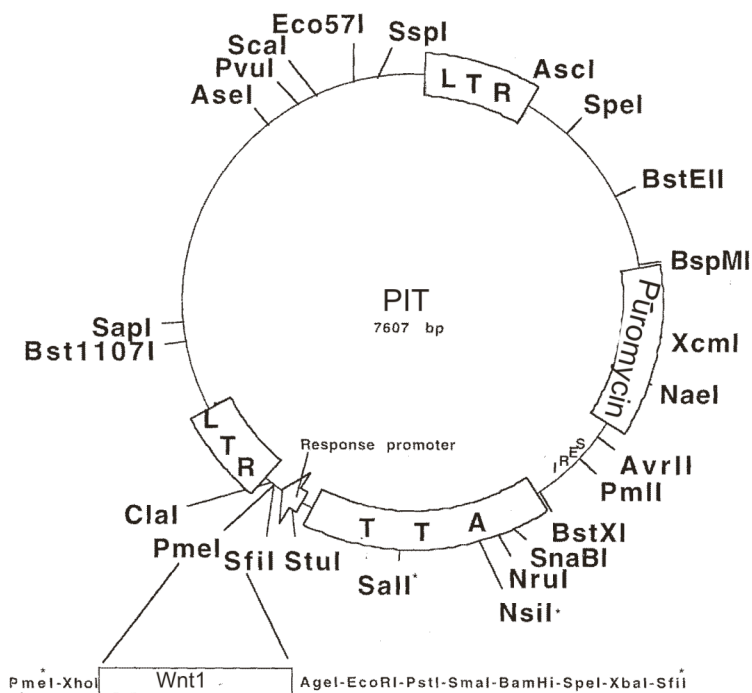


Abb. 7: Aufbau des pPIT-Wnt1-Plasmids, welches für die Herstellung der rNSZ-Wnt1 Zellen verwendet wurde.

Alle rNSZ wurden auf Poly-L-Ornithin/Laminin-beschichteten Platten in Wachstumsmedium kultiviert. Die Zellen wurden alle vier Tage nach dem Erreichen einer Konfluenz von 80 - 90% passagiert. Alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Zum Passagieren wurden die Zellen mit 0,5% Trypsin/EDTA (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) von der Platte gelöst, bei 230 rpm für zwei Minuten abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und in der gewünschten Konzentration wieder auf eine Poly-Ornithin / Laminin-beschichtete 10 cm-Kulturplatte (BD Falcon, Heidelberg, Deutschland) ausplattiert. Für die Differenzierung wurden die Zellen von der Platte gelöst und anschließend die

Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Ausplattiert wurden für jeden Versuch $2,5 \cdot 10^4$ Zellen / cm^2 in Poly-Ornithin / Laminin-beschichtete 24-Well Zellkulturplatten (mit oder ohne Objektträger). Damit die Zellen differenzieren, wurde ihnen direkt beim Überführen in die 24-Wellplatte der Wachstumsfaktor FGF₂ entzogen. Die rNSZ-Wnt1 wurden ebenfalls ohne DOX für die Experimente ausplattiert, damit das Transgen exprimiert werden konnte. In einem primären Experiment wurden unterschiedliche Differenzierungszeiträume für die Zellen getestet (zwei - acht Tage). Nach vier Tagen war der höchste Anteil differenzierter MAP2AB-positiver Neurone auf den Zellkulturplatten zu detektieren. Nach sechs Tagen konnte dieser Wert nicht mehr weiter gesteigert werden und nach acht Tagen war bereits eine hohe Zelltod-Rate zu beobachten. Daher wurden alle Experimente mit einer Differenzierungsdauer von vier Tagen durchgeführt.

Wachstumsmedium rNSZ und rNSZ-Wnt1

DMEMF12:Glutamax (Gibco)	500 ml
Antibiotika/Antimykotika-Lösung (100X) (Invitrogen)	5 ml
N2-Supplement (Invitrogen)	5 ml
FGF ₂ (PeproTech EC Ltd, London, UK)	10 ng/ml
Doxyxyclin (DOX)	1 µg/ml

Differenzierungsmedium rNSZ und rNSZ-Wnt1:

DMEMF12:Glutamax (Gibco)	500 ml
Antibiotika/Antimykotika-Lösung (100X) (Invitrogen)	5 ml
N2-Supplement (Invitrogen)	5 ml

Isolation, Kultivierung und Infektion von Neurosphären

Isolation

Für die Isolation von Stammzellen aus der SVZ (Neurosphären) wurden Mäuse des Stammes C57Bl6 im Alter von acht Wochen verwendet. Die Tiere (drei - fünf Stück) wurden durch Genickbruch getötet, das Gehirn schnell entnommen und in eiskalter PBS-Lösung gelagert. Anschließend wurde die SVZ unter einem Mikroskop (Leica Microsystems, Mannheim, Deutschland) präpariert, in 5 ml Dissoziationsmedium überführt und für 15 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Gewebestücke vorsichtig mit einer Pipette zerkleinert und weitere 15 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Gewebesuspension wurde mit dem gleichen Volumen eiskalter Lösung 3 versetzt, durch einen 70 µm-Filter (Falcon) filtriert und die Lösung im Anschluß fünf Minuten bei 120g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml eiskalter Lösung 2 resuspendiert und die Zellen erneut zentrifugiert für 10 min bei 300g. Das Zellpellet wurde in 2 ml eiskalter Lösung 3 resuspendiert. Die Zellsuspension wurde vorsichtig in ein 15 ml - Reaktionsgefäß überführt (auf die Oberfläche der Lösung gegeben), das zuvor mit 12 ml eiskalter Lösung 3 gefüllt wurde, und die Zellen für 7 min bei 150g zentrifugiert. Abschließend wurde das Zellpellet im Neurosphären-Wachstumsmedium resuspendiert und die Zellen in Zellkulturflaschen (Falcon) in Neurosphären-Wachstumsmedium ausplattiert.

Lösung 1 (HBSS-Glucose)

HBSS (10 x, Life Tech)	50 ml
D-Glucose (300 mg/ml)	9,0 ml
Hepes (1 M)	7,5 ml
Auffüllen auf 500 ml mit H ₂ O	
pH 7,5 mit HCl einstellen.	

Lösung 2 (Succrose-HBSS)

HBSS (10x, Life Tech)	25 ml
Succrose	154 g
Auffüllen auf 500 ml mit H ₂ O	
pH 7,5 mit HCl einstellen.	

Lösung 3 (BSA-EBSS-Hepes)

BSA	20 g
Hepes (1 M)	10 ml
EBSS (1x, LifeTech)	
Auffüllen auf 500 ml mit H ₂ O	
pH 7,5 mit HCl einstellen.	

Dissoziationsmedium

Lösung 1	10 ml
Trypsin	13,3 g
Hyaluronidase	7,0 g

Wachstumsmedium Neurosphären

DMEMF12:Glutamax (Gibco)	500 ml
Hepes (1 M)	4 ml
B27-Supplement (Invitrogen)	5 ml
Antibiotika/Antimykotika-Lösung (100X)	5 ml
FGF ₂ (Roche)	10 ng/ml
EGF (Roche)	20 ng/ml

Kultivierung

Die Neurosphären erhielten alle zwei Tage frische Wachstumsfaktoren direkt ins Medium. Alle vier Tage wurde die Hälfte des Mediums gewechselt. Passagiert wurden die Neurosphärenkulturen alle sechs - acht Tage. Als Anhaltspunkt für den Zeitpunkt der Passage diente eine sich bildende sichtbare dunkle Kernregion, die darauf hindeutet, dass die Zelldichte sehr hoch ist. Für die Passage wurden die

Zellen in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden 15 - 20 min ruhen gelassen, damit sie auf den Boden des Gefäßes absinken. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, wobei 1 ml des Überstandes (= „konditioniertes“ Medium) aufbewahrt wurde. Das lose Zellpelett wurde mit PBS gewaschen. Nach erneutem Absinken der Zellen (ca. 15 – 20 min Wartezeit) wurde die PBS-Lösung abgesaugt und 1,5 ml 0,5 % Trypsin/EDTA zugegeben. Die Zellen wurden durch vorsichtiges Pipettieren vereinzelt. Die Wirkung des Trypsins wurde nach 1 min durch die Zugabe von 5 ml vorgewärmter Lösung 3 (stark serumhaltig) inaktiviert. Die Zellen wurden für 3 min bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 1 ml „konditioniertem“ Medium resuspendiert. Jeweils ein zehntel dieser Zellsuspension wurde auf Zellkulturplatten gleicher Größe ausplattiert.

2.1.7 Isolation von RNA aus Gewebe und Zellen

Der Hippokampus (HC), der olfaktorischer Bulbus (OB), die subventrikuläre Zone (SVZ) und der rostrale Migrationsstrom (RMS), sowie das komplette Gehirn von C57Bl6-Embryonen im Alter vom Embryonaltag 12,5 (E12,5) wurden unter einem Stereomikroskop (Leica) bei zweifacher Vergrößerung zügig und RNase-frei entnommen. Die Isolation der RNA erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

2.1.8 PCR und RT-PCR

Die RNA für die RT-PCR wurde wie unter Punkt 2.1.7 beschrieben isoliert und aufgereinigt. Zur Generierung der cDNA wurde das First-Strand Kit von Qiagen genutzt und den Angaben des Herstellers Folge geleistet. Die cDNA-Synthese wurde für alle untersuchten Gene mit OligodT-Primern durchgeführt. Die anschließende PCR zur Generierung doppelsträngiger DNA wurde mit den in Tabelle 2 angegebenen Primern und dem PCR-Kit von Invitrogen durchgeführt. Für alle PCR-Reaktionen wurden 40 Zyklen durchgeführt, wobei die *annealing Temperatur* (T_m) 58 °C betrug und die Extension bei 72 °C für 50 s erfolgte.

Tabelle 2: Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz	Position	T _m	Größe (bp)	GenebankID
Wnt1 vorwärts rückwärts	GTGCAAATGGCAATTCCGAAAC	597	58	620	NM-021279
	AGAAGTTGGGCGATTTCTCGAAG	1216	58		
Wnt3 vorwärts rückwärts	GATGGCTCCTCTCGGATACCTC	128	57	607	NM-009522
	CTTGAGGTGCATGTGACTGGC	734	57		
β-Actin vorwärts rückwärts	GTGGGGCGCCCCAGGCACCA	181	79	541	NM-007393
	CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC	721	63		

2.1.9 Radioaktive *In Situ* Hybridisierungen (rISH)

Anfertigung von Paraffinschnitten

Tiere des Stammes C57Bl6 wurden wie zuvor beschrieben, jedoch RNase-frei, perfundiert und nachbehandelt (s. Punkt „Perfusion“).

Tabelle 3: Vorbehandlung der Gehirne zur Anfertigung von Paraffinschnitten für die rISH.

Substanz	Temperatur (°C)	Inkubationszeit (min)
30% Ethanol	RT	90
50% Ethanol	RT	90
75% Ethanol	RT	90
85% Ethanol	RT	90
95% Ethanol	RT	90
100% Ethanol	RT	90
100% Ethanol	RT	90
RotiHistol	RT	60
RotiHistol	RT	60
50%RotiHistol/50%Paraffin	65	60
Paraffin	65	600
Einbetten in Paraffin bei 65 °C und auf RT abkühlen lassen.		

Im Anschluß wurden die eingebetteten Gehirne auf die Trägerplatte des Mikrotoms (Leica) aufgebracht und der Gewebekblock bei 4 - 8 °C ca. 60 min ausgehärtet. Das Gewebe wurde in 8 µm dicke Scheiben geschnitten, die in ein Wasserbad (Leica) gegeben wurden. Im Wasser wurden die Schnitte auf Superfrost®Plus Objektträger (Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen und zum Trocknen auf eine auf 37 °C vorgewärmte Heizplatte gelegt.

Linearisierung der Plasmide und radioaktive Markierung der RNA-Sonden

Die Plasmide wurden mittels Restriktionsverdau linearisiert. Abbildung 8 zeigt die Plasmidkarte des zur Untersuchung der TH-RNA auf Gehirnschnitten verwendete Plasmid. Das Plasmid für die Wnt5-ISH wurde von Dr. A.McMahon (Cambridge, Massachusetts, USA) bereitgestellt. In der unten angegebenen Plasmidkarte ist die TH-DNA durch die Wnt5-DNA ersetzt (GenebankID der verwendeten Wnt5 cDNA: NM_009524, wobei die Länge der verwendeten cDNA etwa 400 bp betrug, für TH: NM_009377, Länge der verwendeten cDNA 766 bp). Die Herstellung der Antisense-Transkripte, welche für die ISH verwendet wurden, erfolgt in beiden Fällen mit der SP6-Polymerase (Invitrogen).

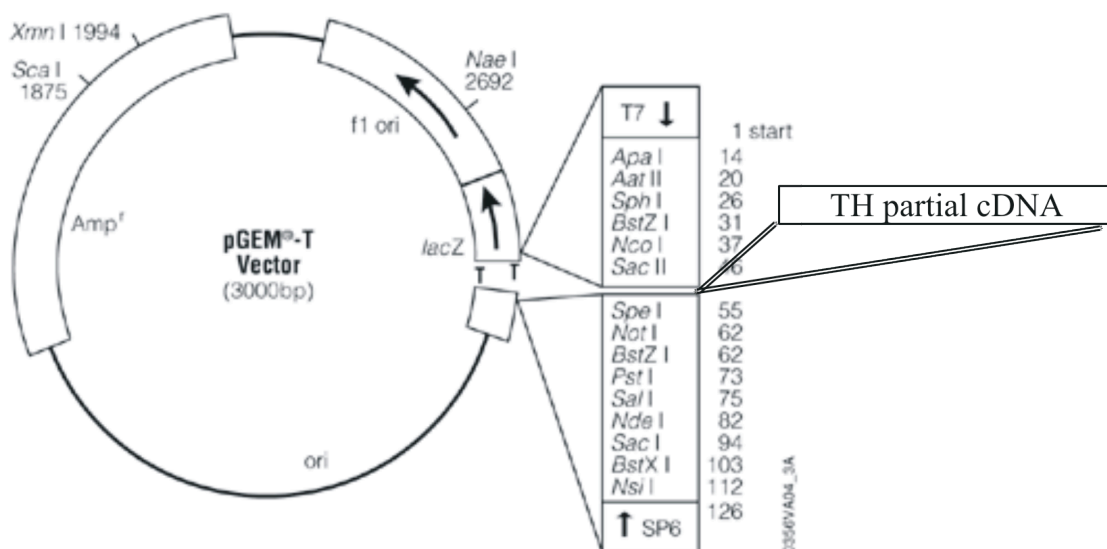


Abb. 8: Plasmidkarte für die Generierung von RNA-Sonden für den Nachweis der TH-RNA . Das Wnt5-Plasmid ist analog aufgebaut. Für die Herstellung der Atisense-Transkripte wurde die SP6-Polymerase verwendet.

Die Aufreinigung der linearisierten DNA erfolgte mit dem Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-up system und dem im Kit angegebenen Protokoll. Die radioaktiven RNA-Sonden wurden durch *in vitro* Transkription hergestellt.

Ansatz zur Herstellung radioaktiver RNA-Sonden

linearisierte Plasmid-DNA	x μ l (1,5 μ g)
10x Transcriptionspuffer (Invitrogen)	3 μ l
NTP-Mix (rATP/rCTP/rGTP 10 mM jedes) (Invitrogen)	3 μ l
0,5 M DTT (Sigma-Aldrich)	1 μ l
RNAse Inhibitor (Promega) (40 u / μ l)	1 μ l
³⁵ S-thio-rUTP (Amersham) (12,5 mCi / mM)	3 μ l
SP6 RNA-Polymerase (Invitrogen) (20 u / μ l)	1 μ l
auffüllen auf 30 μ l mit H ₂ O-DEPC	

Die Sonden wurden bei 37 °C für 3 Stunden inkubiert, wobei nach einer Stunde zusätzlich 0,5 μ l RNA-Polymerase (Invitrogen) zu dem Ansatz zugegeben wurde.

Um die Matrizen-DNA zu zerstören erfolgte eine 15 minütige Inkubation mit RNAse-freier DNase (Roche Molecular Diagnostics) bei 37 °C.

Anschließend wurden die Sonden mit dem RNeasy Minikit nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll aufgereinigt und die Effektivität der radioaktiven Markierung anhand der Anzahl der Zerfälle pro Minute mit einem Szintillationszähler bestimmt. Pro Objektträger wurden für die rISH Sonden mit einer Aktivität von $7 \cdot 10^6$ Zerfällen pro Sekunde (counts per minute = cpM) eingesetzt. Die Sonden wurden bis zu fünf Tagen bei -20 °C gelagert.

Vorbehandlung der Paraffinschnitte

Vor der Hybridisierung mussten die Paraffinschnitte zunächst entwacht und entwässert werden.

Tabelle 4: Vorbehandlung der Paraffinschnitte für die rISH

Substanz	Zeit
Rotihistol	2x 5 min
100 % Ethanol	2x 5 min
70% Ethanol	5 min
DEPC-Wasser	3 min
1x PBS	3 min
4% PFA	20 min (auf Eis)
1x PBS	2x 5 min
20 µg/ml ProteinaseK in Proteinase K Puffer	7 min
1x PBS	5 min
4% PFA	20 min (auf Eis)
1x PBS	5 min
TEA mit 600 µl acetic anhydrid	10 min
2x SSC	5 min
60% Ethanol	1 min
70% Ethanol	1 min
95% Ethanol	1 min
100% Ethanol	1 min
Trocknen lassen	

Hybridisierung

Die Schnitte wurden zunächst in einer Hybridisierungs-Kammer im Ofen in Hybridisierungspuffer (90 µl pro Objektträger) ohne Sonde bei ca. 57 °C für 60 min prähybridisiert (die Hybridisierungstemperatur entspricht einer Temperatur, die 25 °C

unter der Schmelztemperatur der Sonde liegt). Zur Hybridisierung wurden die Sonden in einer Aktivität von 70 000 cpM / μ l in Hybridisierungspuffer angesetzt. Davon wurden 100 μ l auf jeden Objektträger gegeben. Die Objektträger wurden in der Hybridisierungskammer über Nacht bei der Hybridisierungstemperatur inkubiert.

Nachbehandlung der Schnitte

Die Objektträger wurden erneut einer Reihe von Waschungen unterzogen und über eine Alkoholreihe entwässert.

Tabelle 5: Nachbehandlung der Paraffinschnitte.

Lösung	Zeit
4x SSC	4x 5 min
NTE mit 20 μ g/ml RNaseA	20 min, 37 °C
2x SSC mit 1 mM DTT	2x 5 min
1x SSC mit 1 mM DTT	10 min
0,5x SSC mit 1 mM DTT	10 min
0,1x SSC mit 1 mM DTT	2x 30 min, 64 °C
0,1x SSC	2x 10 min
30% Ethanol	1 min
50% Ethanol	1 min
70% Ethanol	1 min
95% Ethanol	1 min
100% Ethanol	2x 1 min
An der Luft trocknen lassen.	

Autoradiographie und Entwicklung der Objektträger

Nach der Hybridisierung und dem Trocknen der Gehirnschnitte wurde zunächst ein Röntgenfilm (BioMax MR, Kodak) aufgelegt und für 3 Tage exponiert. Der Film wurde anschließend entwickelt, um erste Hinweise darauf zu erhalten, ob die rISH

erfolgreich war. Weiterhin kann anhand der Intensität des Signals die Dauer der nachfolgenden Autoradiographie abgeschätzt werden.

Die Objektträger wurden für vier Sekunden in Fotoemulsion-Lösung (KODAK NTB2, KODAK) getaucht und anschließend im Dunkeln über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag wurden die getrockneten Objektträger in einer schwarzen, lichtdichten Objektträgerbox gegeben und die Schnitte bis zu sechs Wochen, je nach Intensität der Sonde auf dem Röntgenfilm, bei 4 - 8 °C inkubiert.

Gegenfärbung mit Kresylviolett

Diese wurde nach der Entwicklung der Schnitte durchgeführt. Sie dient zur allgemeinen Sichtbarmachung der Zellkerne in dem Schnittpräparat.

Tabelle 6: Gegenfärbung mit Kresylviolett

Lösung	Inkubationszeit
Kresylviolett-Färbelösung	15 min
H ₂ O	2 min
70% Ethanol	2 min
70% Ethanol	2 min
96% Ethanol mit 1 ml Essigsäure	30 sec
96% Ethanol	2 min
96% Ethanol	2 min
100% Ethanol	2 min
100% Ethanol	2 min
RotiHistol	5 min
RotiHistol	5 min

Anschließend wurden die Objektträger mit dem RotiHisto-Kit (Promega) eingedeckelt.

Hybridisierungsmix für radioaktive In Situ Hybridisierungen (rISH):

Formamid	50%
Tris-HCl pH 8,0	20 mM
NaCl	300 mM
EDTA pH 8,0	5 mM
Dextran Sulphat	10%
Ficoll 400	0,02%
PVP40	0,02%
BSA	0,02%
tRNA (Roche)	0,5 mg/ml
Carrier DNA (Lachssperma)	0,2 mg/ml
DTT	200 mM

Aliquotieren und bei -80 °C lagern.

Alle für die ISH verwendeten Lösungen wurden RNasefrei in DEPC-Wasser angesetzt.

20x SSC:

NaCl	3 M
Na ₃ -Citrat•H ₂ O	88,2 g

In 800 ml H₂O lösen und pH auf 7,4 mit HCl einstellen.
Volumen auffüllen auf 1l.
1 ml DEPC zugeben und 2x autoklavieren.

Lösung für die Hybridisierungskammer:

Formamide	250 ml
20 x SSC	50 ml
H ₂ O	200 ml

Kresylviolett-Färbelösung:

Kresylviolett	2,5 g
Na-Actetat	0,102 g
Essigsäure	1,55 ml
Mit H ₂ O auf 500 ml auffüllen, pH auf 3,5 mit acetic acid einstellen.	

2.1.10 Klonierung

Um die Plasmide an den erforderlichen Schnittstellen für die Klonierungen zu verdauen wurden Puffer und Enzyme von NEB verwendet. Die für die Ligation verwendeten Bakterien waren chemisch kompetent. Die viralen Plasmide wurden entsprechend den Angaben unter Punkt 2.1.4 kloniert und anschließend einem Test auf Funktionalität unterzogen.

2.1.11 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurde das „Miniprep Kit“ von Invitrogen und das „Pure Yield™ Plasmid Midiprep System“ von Promega gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

2.1.12 Luciferasereporter-Experimente

In Hek293T Zellen

Transfektion

Die Zellen wurden von der 10 cm Kulturplatte trypsiniert, abzentrifugiert (0,3 rcf für 3 min) und in 1 ml Medium resuspendiert. Anschließend wurden 15000 Zellen/ cm² in einer 24-Well Zellkulturplatte ausplattiert. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80% transfiziert.

Transfektionsansatz:

Firefly-Luciferase (EVX4, TOPFlash oder FOPFlash)	4 µg
Renilla-Luciferase (hEF-Renilla)	0,2 µg
Zu testendes Konstrukt	5,8 µg

Der Ansatz wurde mit H₂O auf 1095 µl aufgefüllt.

Dann wurden 155 µl einer 2 M CaCl₂-Lösung und 2x HBS zugeben.

Anschließend wurde je 15 µl des Ansatzes pro Well auf die ausplattierten Zellen getropft.

2x HBS:

NaCl	8,0 g
KCl	0,37 g
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	0,133 g
Glucose	1,0 g
HEPES	5,0 g

Auf 500 ml mit H₂O auffüllen, pH 7,05 einstellen mit HCl, steril filtrieren.

Messung der Luciferase-Aktivität

Zwei Tage nach der Transfektion wurde die Reporteraktivität ermittelt. Experimenten, in denen Forskolin (FSK, 5 μ M) verwendet wurde, wurde dieses 12 - 24 Stunden vor Messung der Aktivität den Zellen zugegeben.

Die Zellen wurden mit „Passiv Lysis Puffer“ (Promega) lysiert und in die Messplatte des Luminometers (Centro LB 960 von Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad, Deutschland) überführt. Zur Ermittlung der Aktivität wurde das „Luciferase Kit“ von Promega mit den beiden Lösungen „Luciferase assay buffer“ und „Stop and Glow“ (Promega) verwendet. Die Aktivität wurde mit dem Programm Mikro Win 2000 ermittelt.

In rNSZ

Elektroporation

Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben passagiert und in 1 ml Medium resuspendiert. Je $2 \cdot 10^6$ Zellen wurden pro Elektroporation in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 1560 rpm für 2 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 100 μ l „rat Nucleofector Lösung“ (amaxxaTM) resuspendiert und zum jeweiligen Elektroporationsansatz gegeben.

Elektroporationsansatz

Zu testendes Konstrukt	1,5 μ g
Firefly-Luciferase (TOPFlash oder FOPFlash)	3,0 μ g
Renilla-Luciferase (hEF-Renilla)	0,1 μ g

Die Zellen wurden mit der DNA vermengt und gemäß den Angaben des Herstellers elektroporiert (amaxxaTM). Anschließend wurden die Zellen auf eine 24 Well Zellkulturplatte ausplattiert und die Luciferase-Aktivität wie oben beschrieben zwei Tage später ermittelt.

2.1.13 Westernblots

Proteinisolierung

Die Zellen wurden in RIPA-Puffer homogenisiert und für 15 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet einer 10 cm Zellkulturschale in 10 ml RIPA-Puffer resuspendiert. Die Proteinkonzentration der Proben wurde mittels BCA-Test bestimmt (BCA-Test Kit von NEB).

Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden die Proben mit Lämmli-Puffer versetzt, bei 95 °C denaturiert und anschließend auf Eis gelagert. Verwendet wurden „NuPAGE®Novex Bis-Tris Gele“ (10%) von Invitrogen und „NuPAGE®MES“ Laufpuffer. In jede Tasche wurden 25 µl Probe aufgetragen. Das Gel lief bei 200 V etwa eine Stunde.

Westernblot

Die Proteine wurden in einer Blot-Kammer (NuPAGE®) von dem Gel auf eine Membran (BioTrace™PVDF) übertragen. Verwendet wurde hierzu der „10x NuPAGE®Transferpuffer“. Die Membran (BioTrace™PVDF) und das Whatman-Papier (Whatman) wurden auf die jeweilige Größe des Gels zugeschnitten und die Whatmanpapiere sowie die Blotting-Papiere in Transferpuffer getränkt. Die Membran wurde für 1 min mit 100% Methanol benetzt und anschließend in Transferpuffer aufbewahrt. Der Aufbau in der Blotkammer war folgendermaßen (von der Kathode zur Anode): 2 Blotting-Papiere, Whatmanpapier, Gel, PVDF Membran, Whatmanpapier, Blotting-Papiere. Der Transfer der Proteine dauerte bei 30 V ca. eine Stunde.

Immundetektion

Die PVDF Membran wurde der Blotkammer entnommen und anschließend in einer kleinen Kammer auf dem Schüttler bei Raumtemperatur für eine Stunde mit Blockierungspuffer blockiert. Die Antikörperlösungen wurden ebenfalls in Blockierungspuffer angesetzt und im Anschluß für 1 Stunde bei 22 °C auf die Membran gegeben. Anschließend wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit den sekundären Antikörpern, an die die HRPO (*horse reddish peroxidase*) gekoppelt ist, erfolgte für eine Stunde auf dem Schüttler bei 22 °C. Danach wurde die Membran erneut dreimal mit TBS-T gewaschen und anschließend zur Detektion vorbereitet.

Das „ECL™ Substrat“ (Amersham) wurde gemäß der Anleitung verdünnt und auf die Membran getropft. Nach 1 min Inkubationszeit wurde die Membran in eine Filmkassette gelegt. Ein Hyperfilm ECL (Amersham) wurde auf die Membran aufgelegt und nach unterschiedlichen Expositionszeiten in der Entwicklermaschine entwickelt.

10x TBS-T

Tris-HCl (pH 7,5)	200 mM
NaCl (5M)	1,5 M
Tween20	0,5%

Blockierungs-Puffer für Westernblot

4% Magermilchpulver in 1xTBS-T

RIPA-Buffer

Tris-HCl (1 m, pH7,5)	50 mM
NaCl (5 M)	150 mM
TritonX-100 (10%)	1 %
Na-Deoxycholat (5%)	0,5%
SDS (10%)	0,1%
Protease Inhibitor Tablette (Sigma)	1 Tablette
Auffüllen auf 50 ml, aliquotieren und bei -20 °C lagern.	

Lämmli-Puffer (5x)

Tris-HCl pH 6,8	313 mM
Glycerol	50%
SDS	10%
Bromphenolblau	0,05%
β-Mercaptoethanol	25%

2.1.14 Verwendete Plasmide

Tabelle 6: verwendete Plasmide

Plasmid	Referenz
pEVX4-Luciferase	(Li et al., 2008)
pTOPFlash-Luciferase	(Moon et al., 2004)
pFOPFlash	(Moon et al., 2004)
phEF-Renilla	(Nakashima et al., 2005)
pCMVgp	(van Praag et al., 2002)
pPMSG	(Biffi et al., 2005)
pRSV.REV	(Li et al., 2008)
pCMV-VsVg	(Zhao et al., 2006)
pCAG-GFP	(Zhao et al., 2006)
pCAG-RFP	(Tashiro et al., 2006)
pCAG-IRES-GFP	(Jessberger et al., 2008)
pCAG-ACREB-IRES-GFP	(Ahn et al., 1998)
pCAG-CREBY134F-IRES-GFP	(Du et al., 2000)
pCMV-GFP	(Consiglio et al., 2004)
pCMV-Wnt1-IRES-GFP	(Consiglio et al., 2004)
pPIT-Wnt1	Plasmidkarte in Abb. 7 angegeben
pBS-Wnt5a	Plasmidkarte vergleiche Abb. 8
pBS-TH	Plasmidkarte in Abb. 8 angegeben

3 Ergebnisse

3.1 Bestimmung der Aktivität des Wnt/ β -Catenin Signalweges in der SVZ-OB Neurogenese.

Periglomeruläre dopaminerge Neurone des olfaktorischen Bulbus werden im Gehirn von adulten Mäusen kontinuierlich gebildet (Hack et al., 2003; Saino-Saito, 2003). Extrinsische Signale, welche die Generierung von dopaminergen periglomerulären Interneurone steuern, sind noch weitgehend unbekannt. Die Differenzierung von Stammzellen in dopaminerge Neurone ist am besten für die embryonale Entwicklung des Mittelhirns untersucht. Es ist bekannt, dass ein entscheidender Faktor für die Generierung neuer dopaminergener Neurone in dieser Region Wnt1 ist (Prakash et al., 2007; zur Übersicht: Arenas, 2005). Da weiterhin bekannt ist, dass Wnt-Proteine auch im postnatalen Gehirn exprimiert werden (Shimogori et al., 2004), stellt sich die Frage ob Wnt-Proteine auch in den neurogenen Zonen des erwachsenen Mausgehirns vorkommen und welche Rolle sie bei der Neurogenese dopaminerg periglomerularer Interneurone des OBs in der adulten Maus spielen.

3.1.1 Nachweis von Wnt/ β -Catenin Aktivierungen in den neurogenen Zonen des erwachsenen Mausgehirns

Wnt-Signale spielen während der Entwicklung des Zentralnervensystems eine entscheidende Rolle. Ob kanonische Wnt-Aktivierungen auch in Bereichen des adulten Mausgehirns, in denen zeitlebens neue Neurone gebildet werden, stattfindet sollte anhand von Immunfärbungen in der BATgal-Reportermaus (Maretto et al., 2003) untersucht werden. Die BATgal-Maus ist eine transgene Reportermaus, in der die Expression des Reportergens β -Galaktosidase von multimerisierten TCF/LEF Bindungsstellen kontrolliert wird (Abb. 9 A). Somit exprimieren Zellen, in denen der Wnt/ β -Catenin Signalweg aktiv ist, β -Galaktosidase. Die β -Galaktosidase kann mit Hilfe einer Immunfärbung gegen das Enzym bzw. einer lacZ-Färbung sichtbar gemacht werden (Abb. 9 B, im Folgenden „Reporter-positiv“ bezeichnet). Abbildung 9 B zeigt Immunfärbungen für β -Galaktosidase. Es ist zu erkennen, dass Zellen im RMS, im OB und im *Gyrus Dentatus* Reporter-positiv sind. Dies bestärkt die Hypothese, dass kanonische Wnt-Signalwegaktivität an der Neurogenese im adulten

Mausgehirn beteiligt sein könnten. Es ist bekannt, dass Wnt3 die Neurogenese im adulten Hippokampus und Wnt1 die dopaminerge Neurogenese während der Embryonalentwicklung reguliert. Um zu untersuchen, ob diese kanonischen Wnt-Proteine in den adulten neurogenen Nischen exprimiert werden, wurde eine RT-PCR durchgeführt (Abb. 9 C). Hierzu wurden Gewebestücke aus den unterschiedlichen neurogenen Regionen des adulten Mausgehirns entnommen und eine RT-PCR für Wnt1 und Wnt3 durchgeführt. Es zeigte sich, dass Wnt1 in allen untersuchten neurogenen Bereichen des Vorderhirns (SVZ, RMS, OB, HC) exprimiert wird. Wnt3 konnte im OB und im HC nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Shimogori et al. (2003), die in jungen postnatalen (p20) Mäusen Wnt1-RNA in der SVZ und im RMS mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen (ISH) nachwiesen. Wnt3-Protein konnte bereits durch Lie und Kollegen (2005) im *Gyrus Dentatus* der adulten Maus nachgewiesen werden und die Rolle des Proteins für die Neurogenese *per se* in dieser Region gezeigt werden. Mit Hilfe der durchgeführten RT-PCR (Abb. 9 C) lässt sich zeigen, dass Wnt1-mRNA im gesamten SVZ-OB-System exprimiert wird. Es besteht daher die Möglichkeit, dass die Generierung von dopaminergen Neuronen im adulten Gehirn, wie auch in der Embryonalentwicklung, von Wnt1 abhängig sein könnte. Um diese Hypothese genauer zu untersuchen war es von besonderem Interesse zu charakterisieren welche Zellen in den entsprechenden Hirnregionen Reporter-positiv sind. Hierzu wurde eine Immunfluoreszenzfärbung für das Neuroblasten-Markerprotein *Doublecortin* (DCX) zusammen mit β -Galaktosidase durchgeführt (Abb. 9 D). Es zeigte sich, dass lediglich eine Subpopulation der Reporter-positiven Zellen im RMS und im OB gleichzeitige Expression mit dem DCX zeigt (Abb. 9 D). Ebenfalls werden lediglich aus einer Subpopulation der Zellen des RMS neue dopaminerge periglomerulare Neurone gebildet. Der Anteil an dopaminergen Vorläuferzellen an der Gesamtpopulation von Vorläuferzellen macht in etwa 5% aus (Winner et al., 2002). Da es sich bei den Reporter-positiven Zellen ebenfalls um eine Subpopulation der DCX-positiven Zellen handelt, könnte dies bedeuten, dass es sich bei diesen Zellen eben um die dopaminergen Vorläuferzellen handelt.

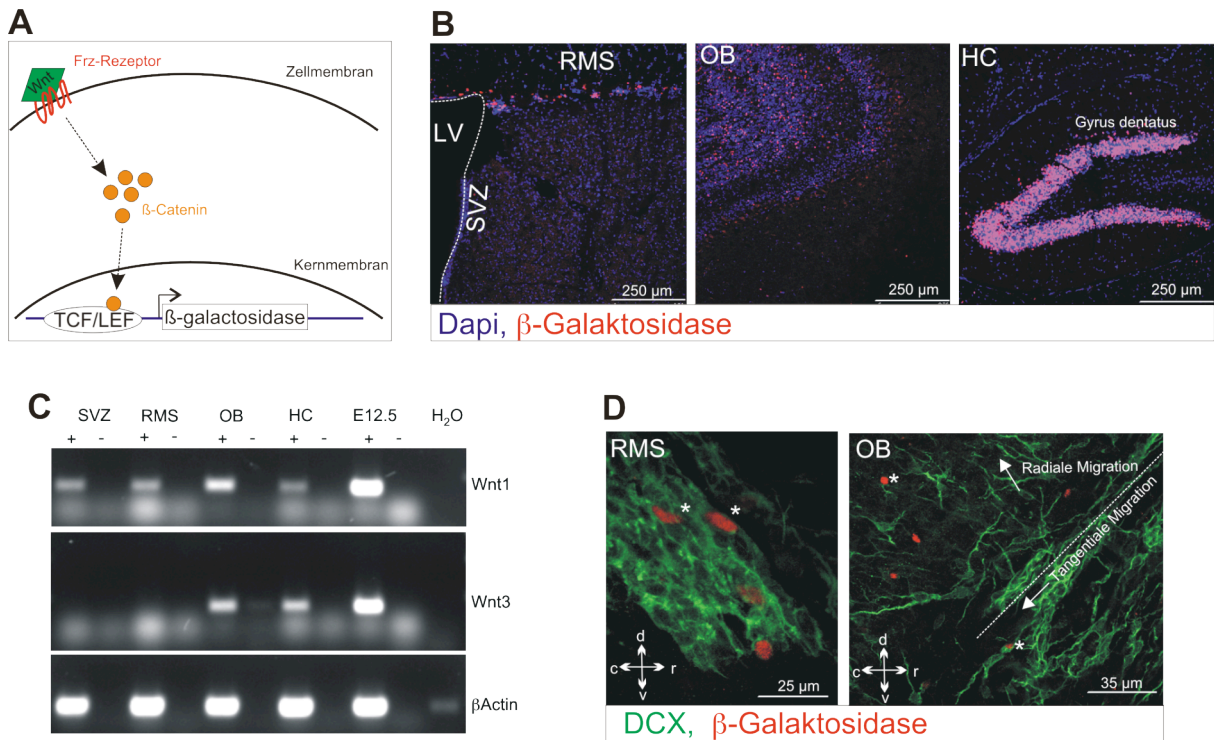


Abb. 9: Nachweis von kanonischer Wnt-Signalwegaktivität in den neurogenen Zonen des adulten Mausgehirns. **A** Schematische Darstellung der Funktionsweise der BATgal-Reportermaus. Wnt-Proteine binden an Frz-Rezeptoren und lösen eine intrazelluläre Signalkaskade aus. Im Falle der BATgal-Reportermaus steht an deren Ende die Expression des Reportergens β -Galaktosidase. **B** Anhand von Immunfärbungen gegen β -Galaktosidase lassen sich durch kanonische Wnt-Signale aktivierte Zellen in den neurogenen Regionen des adulten Mausgehirns erkennen. Verwendete Antikörper goat-anti- β -Galaktosidase (1:250), **C** RT-PCR aus Gewebe der SVZ, des RMS, des OB und des HC. E12.5-Embryo = Positivkontrolle, H₂O = Negativkontrolle, β -Actin = RT-PCR-Kontrolle (+ = mit reverser Transkriptase, - = ohne reverse Transkriptase, 40 Zyklen). **D** Durch Immunfärbung für β -Galaktosidase und DCX zeigt sich, dass Subpopulationen der DCX-positiven Zellen mit dem Reporter gen im RMS und im OB kolokalisieren (*). Verwendete Antikörper rabbit-anti- β -Galaktosidase (1:1000), goat-anti-DCX (1:250).

3.1.2 In vitro Generierung dopaminerger Neuronen durch Expression von Wnt1

Anhand der vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der kanonische Wnt-Signalweg im Gehirn der adulten Maus aktiv sind. Es konnte belegt werden, dass Wnt1-RNA in den entsprechenden Bereichen des Vorderhirns, in denen zeitlebens neue dopaminerge Neurone gebildet werden, exprimiert ist. In den folgenden Untersuchungen sollte die Frage geklärt werden, ob Wnt1 das Potenzial besitzt, die dopaminerge Neurogenese zu induzieren. Hierfür wurden Stammzellen aus dem *Gyrus dentatus* von adulten Ratten isoliert und kultiviert. Es wurden Rattenzellen verwendet, da diese in Kultur besser überleben als Mauszellen und

leichter zu differenzieren sind. Ein Teil dieser Stammzellen wurde genetisch so manipuliert, dass sie die Fähigkeit besitzen Wnt1-Protein zu produzieren. Mit Hilfe dieser genetischen Manipulation sollte die Frage geklärt werden, ob das Aktivieren der Stammzellen in Kultur mit Wnt1 ausreichend ist, um neue dopaminerge Neurone zu generieren. Die Expression des Wnt1-Proteins verlief hierbei unter der Kontrolle eines *tet_{off}-Systems*, d.h. die Expression konnte durch den Entzug des Antibiotikums Tetracyclin (Doxycyclin, DOX) aktiviert werden. So lange die Zellen DOX in ihrem Zellkulturmedium haben, verhalten sie sich wie Wildtyp rNSZs (rNSZ, neurale Stammzellen aus der Ratte). Die Differenzierung der rNSZ sowie der Wnt1-exprimierenden (Wnt1-rNSZ) erfolgte durch den vier-tägigen Entzug des Wachstumsfaktors FGF₂. Im Falle der Wnt1-rNSZ wurde ebenfalls für diese Zeit DOX entzogen (Abb. 10 A). Nach der Differenzierung wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und anschließend einer Immunfärbung unterzogen. Abbildung 10 B zeigt repräsentative Immunfärbungen für das Neuronenmarkerprotein MAP2ab sowie das Enzym Tyrosinhydraxylase (TH) *in vitro*. Durch die Expression von Wnt1 in hippokampalen Stammzellen der Ratte (rNSZ) konnten 6,25 +/- 0,34% TH-positive Zellen, welche auch positiv für MAP2ab waren, generiert werden. MAP2ab ist ein neuronales Markerprotein während TH, das limitierende Enzym der Dopaminsynthese ist. Daher weisen diese Befunde darauf hin, dass durch die Überexpression von Wnt1 vermehrt dopaminerge Neurone gebildet werden. Ohne Expression von Wnt1 konnten in der Stammzellkultur mittels Immunfärbung keine TH-positiven Neurone nachgewiesen werden (Abb. 10 C).

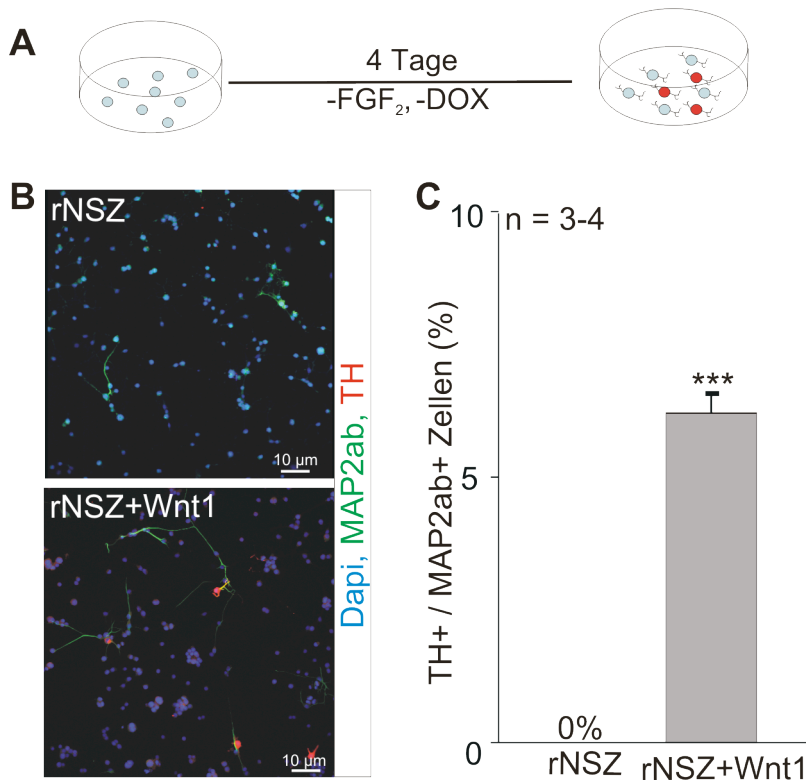


Abb. 10: Expression von Wnt1 in rNSZ führt zur Generierung von TH-positiven Neuronen. **A** Differenzierungsprotokoll für rNSZ und Wnt1-rNSZ (rote Zellen = dopaminerge Neurone). Durch den Entzug des Wachstumsfaktors FGF2 differenzieren die Zellen zu Mapsab-positiven Neuronen. Im Falle der Wnt1-rNSZ wurde für die gleiche Zeit zusätzlich DOX entzogen um die Expression von Wnt1 zu starten. **B** Immunfärbung. Representative Aufnahme von differenzierten rNSZ in Kultur nach 4 Tagen mit und ohne Expression von Wnt1. Verwendete Antikörper mouse-anti-MAP2ab (1:250), rabbit-anti-TH (1:500), Dapi (1:10000) **C** Statistische Analyse der Anzahl an TH-positiven / MAP2ab-positiven Neuronen. Signifikanz $p < 0,005$ (***).

Neben dem Enzym TH spielt auch die aromatische Aminosäure-Decarboxylase (AADC) eine entscheidende Rolle in der Dopaminsynthese, indem sie L-DOPA zu Dopamin überführt (Abb. 11 B). Um zu belegen, dass die in Abbildung 10 gezeigten TH-positiven Neuronen auch weitere Enzyme für die Dopaminsynthese exprimieren, wurde ein Westernblot für TH und AADC durchgeführt. Die Wnt1-rNSZ wurden wie zuvor beschrieben differenziert, wobei den Zellen für die letzten beiden Tage der Differenzierung FSK zugesetzt wurde, um die Anzahl der generierten dopaminergen Neuronen zu steigern (Abb. 11 A). [Die Zugabe von Forskolin (FSK, 5 μ M), einem Stimulator der Adenylatzyklase, erfolgte, da in anderen Versuchen die Generierung von TH-positiven Zellen durch Forskolin gesteigert werden konnte (siehe auch Abb. 29).] Nach der Differenzierung wurden die Zellen für den Westernblot geerntet. TH und AADC Proteine konnten nach der Differenzierung nachgewiesen werden (Abb. 11 C). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die TH / MAP2ab-positiven Zellen

in der Lage sind, den Neurotransmitter Dopamin zu synthetisieren, und dass es sich bei den TH / MAP2ab-positiven Zellen um dopaminerge Neurone handeln könnte.

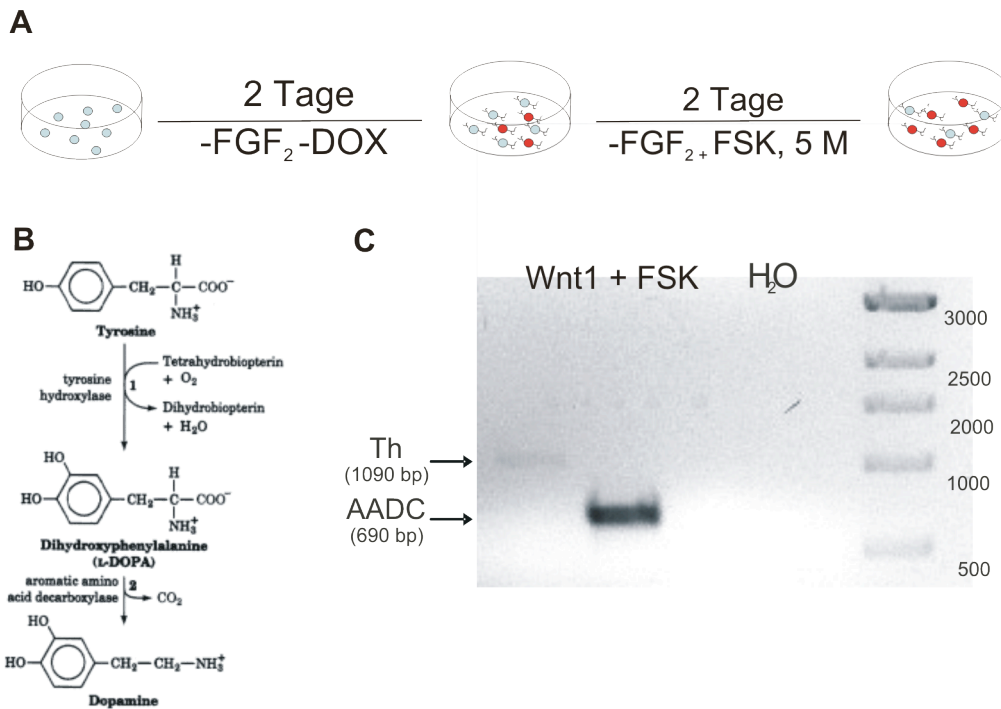


Abb. 11: Westernblot für Schlüsselenzyme der Dopaminsynthese. **A** Differenzierungsprotokoll zur Generierung von dopaminergen Neuronen. **B** Syntheseweg für Dopamin. **C** Nach 4-tägiger Differenzierung der Wnt1-rNSZ ist sowohl das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH) als auch die aromatische Aminosäuren-Decarboxylase (AADC) nachzuweisen. Verwendete Antikörper rabbit-anti-TH (1:1000), rabbit-anti-AADC (1:1000)

Erwähnenswert ist, dass Stammzellen aus dem adulten Hippokampus durch Wnt1 zur Bildung TH-positiver Neurone angeregt wurden. Die Tatsache, dass hippokampale Stammzellen *in vivo* keine TH-exprimierenden Nervenzellen bilden, dies aber nach Stimulation mit Wnt1 tun, unterstützt die Schlussfolgerung, dass die alleinige Expression von Wnt1 in Kultur ausreichend ist, die dopaminerge Schicksalsbestimmung adulter neuraler Stammzellen zu stimulieren.

3.1.3 *In vivo* Überexpression von Wnt1 (*gain-of-function*).

Um die *in vitro* erzielten Ergebnisse auch *in vivo* zu validieren, wurden unterschiedliche Viren für *gain-of-function*- Experimente generiert. Für die Überexpressionsexperimente mit Wnt1 wurden Lentiviren benutzt. Lentiviren haben den Vorteil, dass sie im Gegensatz zu Retroviren, deren Erbgut nur in teilende Zellen eingebaut werden kann (Ramezani et al., 2002), auch postmitotische Zellen transduzieren (Mochizuki et al., 1998; Ramezani et al., 2002). Es wurden Lentiviren zur Expression von Wnt1 im RMS benutzt, da Wnt1 ein Protein ist, welches sezerniert wird und durch Bindung an die entsprechenden Rezeptoren auf Nachbarzellen wirkt. Es wurden die Lentiviren CMV-GFP (GFP-Virus, *green fluorescent protein*) und CMV-Wnt1-IRES-GFP (Wnt1-Virus) zur Überexpression von Wnt1 *in vivo* und *in vitro* generiert. Zudem wurde ein retroviraler Vektor CAG-RFP (RFP-Virus, *red fluorescent protein*) generiert (Abb. 12 A). Die Funktionalität des CMV-Wnt1-IRES-GFP Konstrukts wurde mit Hilfe eines Luciferasereporter-Tests ermittelt. Für den Luciferasetest wurden die lentiviralen Plasmide zusammen mit einem Reporterkonstrukt für kanonische Wnt-Aktivität, TOPFlash, in rNSZ elektroporiert. Der TOPFlash-Luciferasereporter enthält mehrere Bindestellen für TCF und LEF, die die Transkription des Luciferasereportergens kontrollieren. Eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalweges in den elektroporierten Zellen führt somit zur Induktion der Luciferase-Aktivität. Die Luciferase-Aktivität in den mit Wnt1 elektroporierten Zellen war etwa 11-fach im Vergleich zur GFP-Kontrolle induziert (Abb. 12 B). Das bedeutet dass die Expression von Wnt1 durch den CMV-Wnt1-IRES-GFP Vektor den kanonischen Wnt-Signalweg stimuliert.

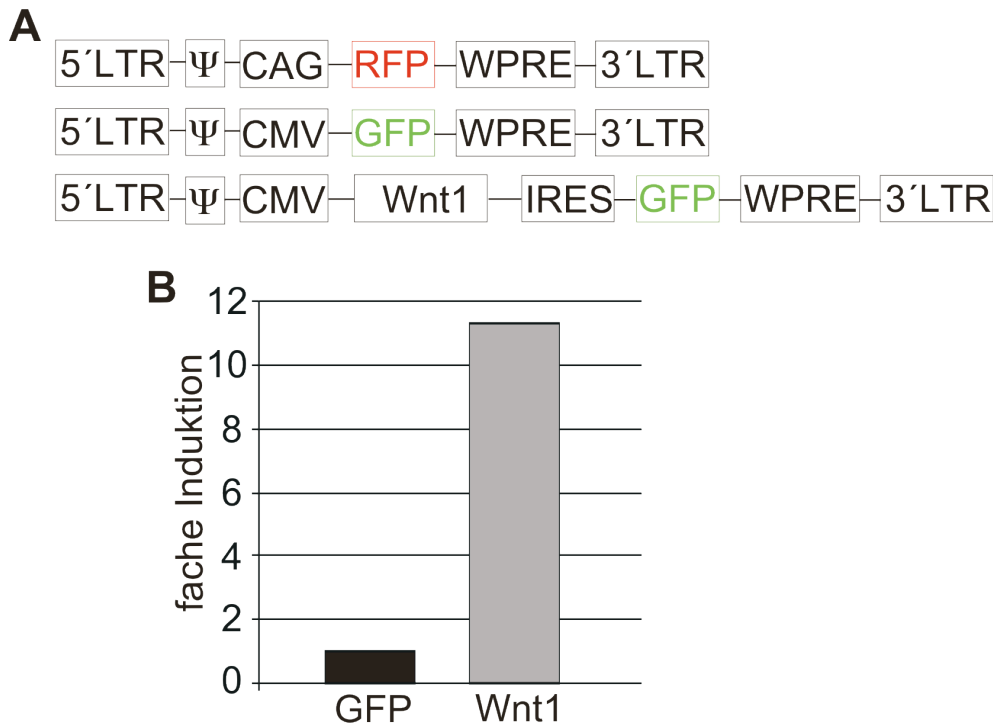


Abb. 12: Funktionstest der viralen Vektoren mittels Luciferase-assays. **A** Aufbau der Lentiviralen Vektoren und des retroviralen (RFP) Kontrollvirus. CMV = early promotor des Cytomegalovirus, WPRE = Woodchuk Hepatitisvirus posttranscriptional regulatory element, LTR = long terminal repeat, CAG = CMV/chicken β -actin promotor, GFP = green fluorescent protein, RFP = red fluorescent protein, IRES = internal ribosomal entry side. **B** Luciferasereporter-Test der viralen Konstrukte. Die Luciferase-Aktivität wird durch die Expression von Wnt1 in rNSZ im Vergleich mit der GFP-Kontrolle ungefähr 11-fach induziert. Der retrovirale RFP-Virus diente als Kontrollvirus in sich anschließenden Untersuchungen *in vivo*.

Als primäres Experiment für die Überexpression *in vivo* wurde Wnt1 in Zellkultur überexpremiert. Für diese Experimente wurden frisch aus der SVZ isolierte Neurosphären verwendet. Neurosphären sind Zellkonglomerate, die auf die Teilung einer einzelnen Stamm- bzw. Vorläuferzelle zurückgehen. Die Zellen für die Neurosphären wurden aus fünf acht Wochen alten Tieren des Stammes C57Bl6 isoliert und bis zur Passagenummer drei kultiviert. Nach der dritten Passage wurde eine Hälfte der Zellen mit dem CMV-GFP Kontrollvirus und die andere Hälfte mit dem CMV-Wnt1-IRES-GFP Virus transduziert. Zu allen untersuchten Zeitpunkten (3 dpi, 7 dpi, 9 dpi, 19 dpi) konnte belegt werden, dass die mit Wnt1-infizierten Neurosphären sich in ihrer Größe von den Kontrollneurosphären unterschieden (Abb. 13). Versuche wurden zweimal wiederholt und in allen drei Experimenten zeigten sich vergleichbare Unterschiede in der Größe der untersuchten Neurosphären.

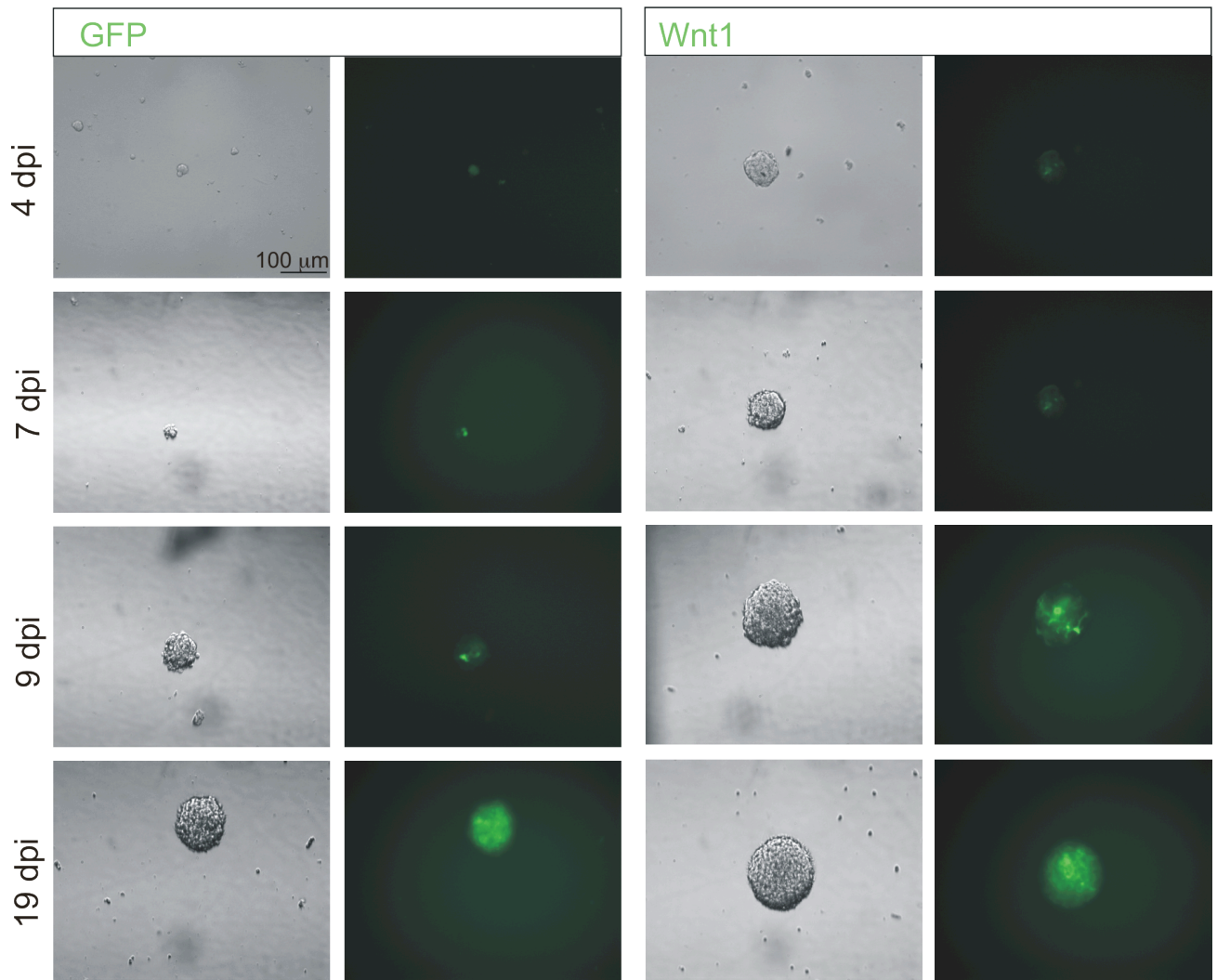


Abb. 13: Überexpression von Wnt1 in Neurosphären der SVZ. Die Zellen für die Neurosphären wurden frisch aus der SVZ isoliert und bis Passagenummer drei genetisch nicht verändert. Anschließend wurden die Zellen entweder mit dem CMV-GFP Virus (GFP, linke Bildhälfte) oder mit dem CMV-Wnt1-IRES-GFP Virus (Wnt1, rechte Bildhälfte) infiziert. Zu allen untersuchten Zeitpunkten übersteigt die Größe der mit dem Wnt1-Virus infizierten Neurosphären die der Kontrollneurosphären (GFP).

Dieses primäre Experiment *in vitro* deutet darauf hin, dass Wnt1 die Proliferation von Zellen aus der SVZ steigern kann. Eine alternative Erklärung für den Unterschied in der Größe der Neurosphären ist, dass die Überexpression von Wnt1 *in vitro* nicht zur Steigerung der Proliferation führt, sondern das Überleben der Zellen begünstigt. Das Überleben der Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit nicht systematisch getestet. Es erscheint aber unwahrscheinlich, dass Wnt1 das Überleben von Zellen fördert, da es keinen augenscheinlichen Unterschied in der Anzahl an einzelnen freischwimmenden Zellen in den Kulturen gab, welche ein Hinweis auf Zelltod sind.

Im Anschluß an diese primären Experimente wurden die Lentiviren (GFP bzw. Wnt1) zusammen mit einem retroviralen RFP-Virus stereotaktisch in den RMS von Mäusen im Alter von acht Wochen des Stammes C57Bl6 injiziert (Abb. 14). Es wurden die Kombinationen der genannten Viren injiziert, um eine möglichst hohe Anzahl sich teilender Zellen zu infizieren und den Effekt des Wnt1-Proteins auf die Proliferation der Neuroblasten ermitteln zu können. Alle Tiere für diese Versuchsreihe wurden am gleichen Tag injiziert. Die Tiere hatten anschließend eine Überlebenszeit von 28 Tagen (28 dpi, Abb. 14).

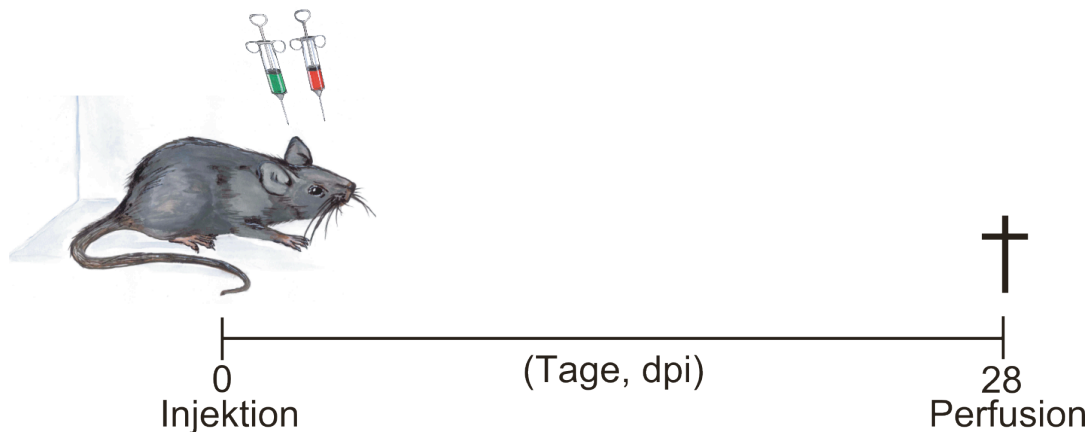


Abb. 14: Injektionsschema für die nachfolgenden Überexpression von Wnt1 *in vivo*. Es wurden entweder CMV-GFP + CAG-RFP oder CMV-Wnt1-IRES-GFP + CAG-RFP zusammen injiziert und die Tiere nach 28 Tagen getötet und analysiert (28 dpi, days post injection).

Anhand der Überexpression von Wnt1 *in vivo* sollte die Frage geklärt werden welchen Einfluss das Protein auf die Neurogenese des SVZ-OB-Systems nimmt. Um den Effekt, den die Überexpression auf die Neurosphären ausübt *in vivo* zu überprüfen, wurde die Gesamtzahl der RFP-positiven Zellen über einen Bereich von 240 – 480 μm in der Körnerzellschicht und in der periglomerularen Schicht anhand einer DAB-Färbung für RFP ermittelt. Es zeigt sich, dass die lentivirale Expression von Wnt1 möglicherweise die Dichte der RFP-positiven Zellen in der Körnerzellschicht steigert (GFP: 1416 \pm 576,55 Zellen / mm^3 , Wnt1: 2405,4 \pm 480,95 Zellen/ mm^3 $p = 0,22$). In der periglomerularen Schicht ist die Anzahl der RFP-positiven Zellen während der Überexpression von Wnt1 ebenfalls tendentiell gesteigert im Vergleich mit der GFP-Kontrolle (GFP: 186,81 \pm 71,47 Zellen/ mm^3 , Wnt1: 320,32 \pm 60,60 Zellen/ mm^3 , $p = 0,22$) (Abb. 15 B). Jedoch kann dies lediglich als Trend betrachtet werden, da die Anzahl der Zellen in der Statistik keine signifikanten Unterschied ergaben. Vergleicht man den prozentualen Anteil der

neugebildeten periglomerularen Zellen an der Gesamtheit der neugebildeten Zellen der GFP-Injektion mit der Wnt1-Injektion so ergibt sich, dass sich dieses Verhältnis kaum verschiebt (GFP: 17,7 +/- 7,10%; Wnt1: 14,7 +/- 3,3%, $p = 73$) (Abb. 15 C). Dies deutet darauf hin, dass Wnt1 einen proliferativen Effekt auf die Neuroblasten im SVZ-OB-System ausüben könnte, der jedoch nicht zu Gunsten eines bestimmten Zelltyps im OB verläuft, sondern vielmehr die gesamte Neubildung von Neuronen steigert.

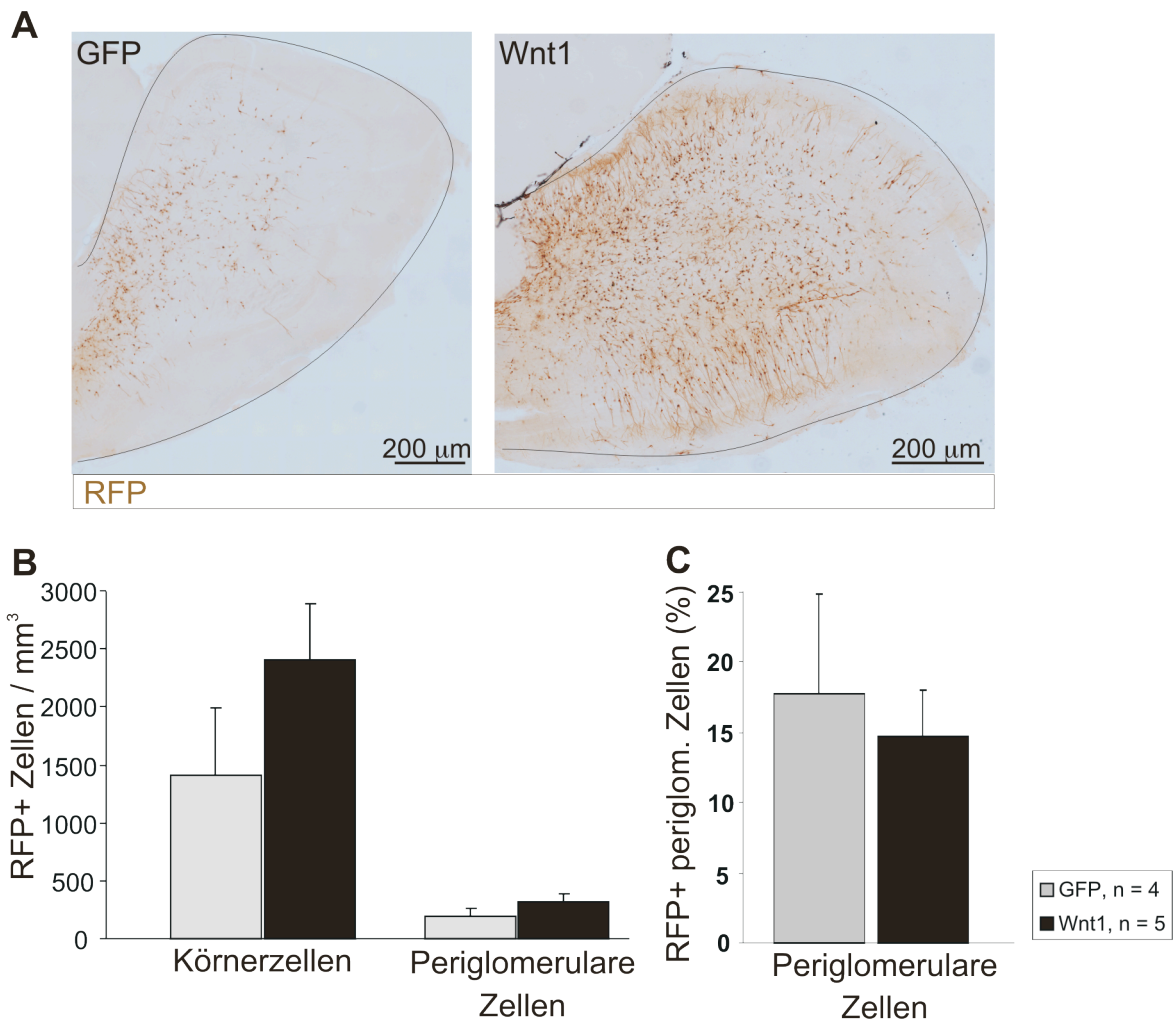


Abb. 15: *In vivo* Überexpression von *Wnt1*. **A** Representative Aufnahme von neugeborenen RFP-positiven Zellen in einer DAB-Färbung 28 Tage nach der Injektion (28 dpi) von CMV-GFP + CAG-RFP (links) oder Wnt1-IRES-GFP + CAG-RFP (rechts). Die Anzahl der neugebildeten RFP-positiven Zellen ist stark gesteigert durch die Überexpression von Wnt1 *in vivo*. Verwendeter Antikörper rabbit-anti-RFP (1:250) **B** Dichte der neugeborenen RFP-positiven Zellen im Olfaktorischen Bulbus 28 dpi. **C** Prozentualer Anteil der periglomerularen Neuronen an der Gesamtheit der neugebildeten Zellen des olfaktorischen Bulbus.

Durch weitere Immunfärbungen der Gehirnschnitte der injizierten Tiere sollte untersucht werden, ob Wnt1 die dopaminerge Neurogenese im SVZ-OB-System begünstigen kann.

Durch die Expression von Wnt1 im RMS konnte die Bildung von neuen dopaminergen, periglomerularen Interneuronen tendentiell gesteigert werden.

Abbildung 16 A und B zeigen representative Aufnahmen von Immunfluoreszenzfärbungen für TH und RFP. Durch die Überexpression von Wnt1 wurden tendentiell vermehrt RFP-positive / TH-positive Neurone gebildet. Die Statistik in Abbildung 16 C zeigt, dass sich die Prozentzahl der neugebildeten dopaminergen Interneurone in Wnt1 injizierten Tieren tendentiell erhöht ist (8,97 +/- 4,98% in der Kontrolle, 16,28 +/- 2,95% durch die Überexpression von Wnt1, n = 4, p = 0,076, Abb. 16 C). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Expression von Wnt1 im RMS die Bildung von neuen dopaminergen, periglomerularen Interneuronen induzieren könnte.

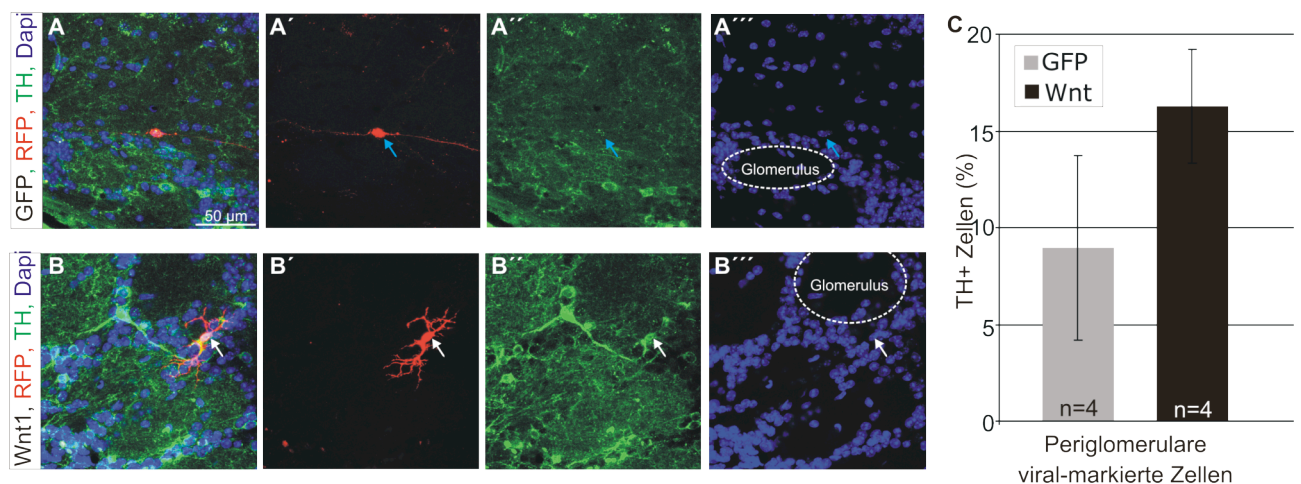


Abb. 16: *In vivo* Überexpression von Wnt1 und die Generierung von TH-positiven Zellen in der Glomerularschicht des OB. **A** Repräsentative Aufnahme von neugeborenen Zellen 28 dpi des Kontrollvirus GFP. Der blaue Pfeil markiert eine RFP-positive / TH-negative periglomeruläre Zelle. **B** Representative Aufnahme transduzierter Zellen 28 Tage nach der Injektion des Wnt1-Virus. Der weiße Pfeil markiert eine RFP-Positive / TH-positive periglomeruläre Zelle. Verwendete Antikörper mouse-anti-TH (1:500), rabbit-ant-RFP (1:500) **C** Statistische Analyse der Anzahl an TH-positiven Zellen in der Glomerularschicht 28 Tage nach der Injektion.

Zusammenfassend lässt sich zu den Überexpressions-Experimenten sagen, dass Wnt1 einen proliferationsteigernden Effekt auf die Neuroblasten im SVZ-OB-System zu haben scheint und dass Wnt1 die Bildung neuer dopaminergener Neurone durch Überexpression begünstigen könnte. Die Tatsache, dass die Auswirkung der Wnt1-Stimulation auf die Generierung neuer dopaminergener Neurone *in vivo* im Vergleich zu den *in vitro* Beobachteten Effekte sehr gering sind, deutet darauf hin, dass eventuell weitere Signalkaskaden in die Schicksalsdeterminierung *in vivo* involviert sind.

3.2 pCREB Signale in der SVZ, dem RMS und dem OB und Bedeutung dieser Signale für die adulte Neurogenese.

3.2.1 Der Verlauf der Phosphorylierung von CREB in der adulten Neurogenese des SVZ-OB-Systems.

*c*AMP *r*esponse *e*lement *b*inding *p*rotein-(CREB)-Signale spielen eine entscheidende Rolle während der Entwicklung des Zentralnervensystems (Dworkin et al., 2009). CREB ist ein aktivitätsabhängiger Transkriptionsfaktor, der auf verschiedene Weise, beispielsweise durch das Wirken bestimmter Wachstumsfaktoren oder Neurotransmitter, an Ser133 phosphoryliert werden kann und hierdurch in die aktive Form pCREB überführt wird (Vergleiche hierzu Kapitel 1.4). Anhand von Immunfluoreszenzfärbungen sollte die Frage geklärt werden, ob die aktive Form des Transkriptionsfaktors während der Neurogenese im SVZ-OB-System vorliegt. Weitere Experimente sollten die Bedeutung dieses Signalwegs für die dort stattfindende Neurogenese untersuchen. Gehirnschnitte von Wildtyp-Tieren des Stammes C57Bl6 im Alter von acht Wochen wurden einer Immunfärbung unterzogen. Es konnte gezeigt werden, dass pCREB-Signale in Zellen des SVZ-OB-Systems nachweisbar sind (Abb. 17 A und B). Abbildung 17 A und B zeigen, dass pCREB nicht in DCX-positiven Zellen der SVZ aktiv ist (Abb. 17 A, A', E), eine zunehmende Anzahl an Zellen jedoch im Verlauf der tangentialen Migration entlang des RMS positiv für pCREB werden (Abb. 17 B und E) bis schließlich die Mehrzahl der DCX-positiven Zellen während der radialen Migration zu ihren finalen Positionen im OB positiv ist für die aktive Form des Transkriptionsfaktors CREB ist (Abb. 17 C, E). Dies zeigt, dass der CREB-Signaltransduktionsweg im SVZ-OB-System aktiv ist und dass diese Aktivität abhängig vom Entwicklungsstand der Neuroblasten zu sein scheint. Um die Frage zu klären ob auch reife Neurone im OB immunopositiv für pCREB sind, wurde eine stereotaktische Injektion des GFP-Retrovirus in den RMS durchgeführt und die injizierten Mäuse zwei Monate nach der Injektion analysiert. In Abbildung 17 D ist zu sehen, dass diese nunmehr ausgereiften Zellen zwei Monate nach der Injektion weder positiv für DCX noch für pCREB sind (Abb. 17 D, E). Dies deutet darauf hin, dass Neuroblasten zur Ausreifung und Migration pCREB-

Signale benötigen könnten; sobald die neugebildeten Zellen jedoch in das Netzwerk des OBs integriert sind, scheint die Aktivität des pCREB-Signalweges nicht mehr oder nur noch sporadisch benötigt zu werden. Diese Resultate decken sich mit denen von Giacchino et al. (2003), die ein ähnliches Aktivitätsmuster für pCREB im SVZ-OB-System beschrieben haben.

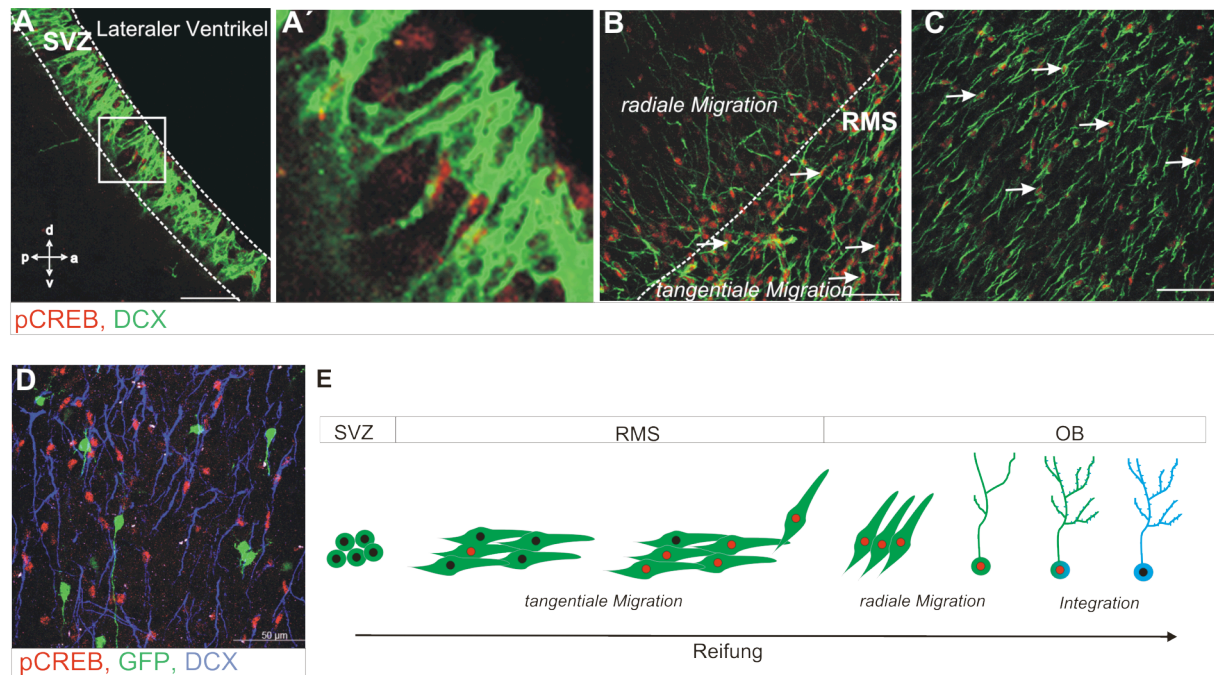


Abb. 17: Immunfärbung für pCREB im SVZ-OB-System der adulten Maus. **A** DCX-positive Zellen in der SVZ sind nicht positiv für pCREB. **A'** Vergrößerung der Box in A. Die pCREB-positive Zellen liegen zwischen den DCX-positiven Zellen. **B** Annähernd alle DCX-positive Zellen während der tangentiellen Migration im RMS sind positiv für pCREB, ebenso wie die Mehrzahl der radial migrierenden DCX-positiven Zellen im OB (weiße Pfeile, **C**). **D** Aufnahme von GFP+ Zellen 2 Monate nach der Injektion mit dem Kontrollvirus CAG-GFP. Die Zellen sind komplett ausdifferenziert und pCREB-negativ. **E** Schematische Darstellung der pCREB-Aktivität in der SVZ, dem RMS und dem OB. Grüne Zellen kennzeichnen dabei Neuroblasten, blaue ausgereifte Neurone. Rote Zellkerne zeigen pCREB-Aktivität. Verwendete Antikörper goat-anti-DCX (1:250), rabbit-anti-pCREB (1:250), chicken-anti-GFP (1:500).

3.2.2 Retrovirale Vektoren für *loss-* und *gain-of-function* Experimente *in vivo*.

Um zu untersuchen, welche Rolle pCREB-Signale während der Neurogenese im SVZ-OB-System spielen, wurden retrovirale Vektoren zur Inhibition (*loss-of-function*) bzw. zur Überexpression (*gain-of-function*) des Signalweges *in vivo* generiert. aCREB ist eine dominant negative CREB-Mutante, welche die Bindung von Wildtyp-CREB an die DNA aufgrund einer amphipathischen Erweiterung am N-Terminus unterbindet und somit die pCREB-vermittelte Transkription verhindert (Ahn et al., 1998). CREBYF ist eine Mutante von CREB, welche konstitutiv aktiv ist aufgrund eines Austausches von Tyrosin (Y) gegen Phenylalanin (F) an Position 134 (Du et al., 2000). Dieser Aminosäureaustausch führt dazu, dass diese CREB-Mutante eine höhere Affinität zu der PKA aufweist als die Wildtyp-Form, was zu einer konstitutiven Phosphorylierung von CREBYF führt. Die viralen Konstrukte (Abb. 18 A) wurden vor der Injektion auf Funktionalität mit Hilfe eines Luciferasereporter-Systems getestet. Als Reporterkonstrukt wurde eine EVX-Luciferase verwendet, welche multiple Bindestellen für pCREB aufweist und somit durch die Bindung des Transkriptionsfaktors aktiviert werden kann (Li et al., 2008). Forskolin (FSK, 5 μ M) stimuliert die Adenylatzyklase und führt über die Aktivierung der Proteinkinase A zur Phosphorylierung von CREB. Unter Kontrollbedingungen ergab sich durch die Stimulation der Zellen mit FSK eine 24,5-fache Induktion der Luciferase. Durch die Transfektion der Zellen mit aCREB blieb die durch FSK-vermittelte Induktion der Luciferase aus (2,46 fache Induktion; Abb. 18 C), was darauf schließen lässt, dass das Konstrukt funktionell ist. Die Transfektion mit CREBYF führte zu einer 13,37-fachen Induktion der Luciferase (Abb. 18 B). Dies zeigt, dass das retrovirale CREBYF Konstrukt funktionell ist, da dieser Vektor ähnlich wie FSK die EVX4-Luciferaseaktivität induziert.

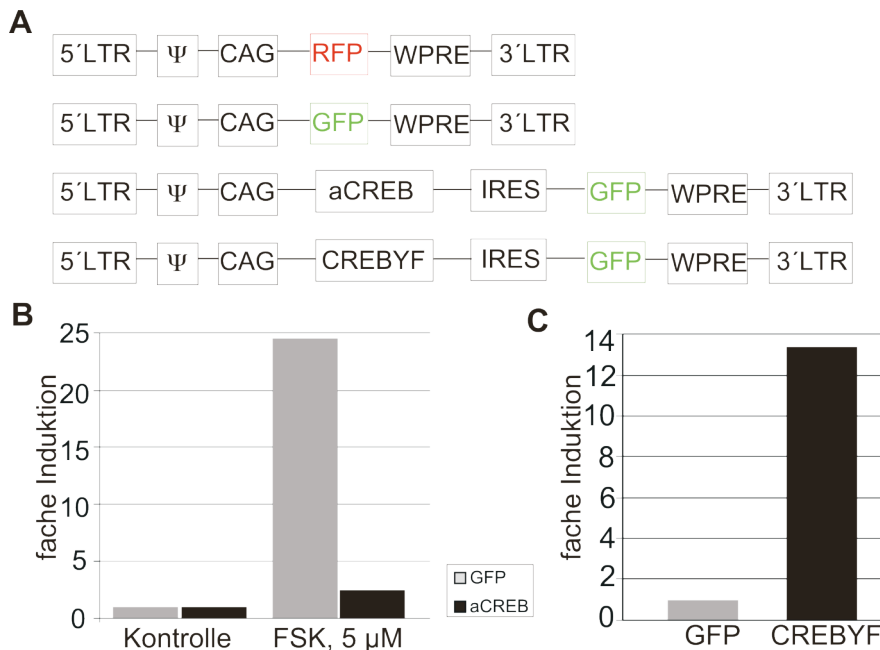


Abb. 18: Aufbau und Funktionstest der viralen Konstrukte zur Unterdrückung und Überstimulation des CREB-Signalweges *in vivo*. **A** Aufbau der retroviralen Vektoren. **B** Test auf Funktionalität des dominant negativen Konstrukts mit Hilfe eines Luciferasereporter-Systems in HEK 293T-Zellen und der EVX-Luciferase. Durch Stimulation des CREB-Signalweges mit Forskolin (FSK, 5 μM) konnte die Luciferase-Aktivität induziert werden (GFP). Bei der Transfektion der Zelle mit aCREB blieb diese Induktion aus, was darauf schließen lässt, dass es sich um eine funktionelle dominant negative Mutante von CREB handelt. **C** Luciferasereporter-Test zur Bestimmung der Funktionalität des konstitutiv aktiven Konstrukt CREBYF. Nach der Transfektion der Zellen mit CREBYF ließ sich die Luciferase-Aktivität erheblich steigern in Bezug auf die GFP-Kontrolle. Auch hier wurde die Funktionalität des Konstruktes bestätigt. WPRE = Woodchuk Hepatitisvirus posttranscriptional regulatory element, LTR = long terminal repeat, CAG = CMV/chicken β-actin promotor, GFP = green fluorescent protein, RFP = red fluorescent protein, IRES = internal ribosomal entry side.

3.2.3 Unterdrückung von pCREB-Signalen *in vivo*.

Der Virus zur Unterdrückung des CREB-Signalweges (aCREB) wurde zusammen mit einem RFP-Kontrollvirus streotaktisch in den RMS von acht Wochen alten Mäusen injiziert. Abbildung 19 sind die unterschiedlichen Überlebenszeiten zu entnehmen, zu denen unterschiedliche Stadien der Ausreifung und Differenzierung der neugeborenen Zellen des SVZ-OB-Systems untersucht wurden. Die Transduktion der Zellen kann hierbei als Geburtsmarkierung verwendet werden. Als Analysezeitpunkte wurden 3 dpi, 7 dpi, 14 dpi, 21 dpi und 28 dpi gewählt und jeweils fünf Tiere für die GFP und fünf Tiere für die aCREB Injiziert.

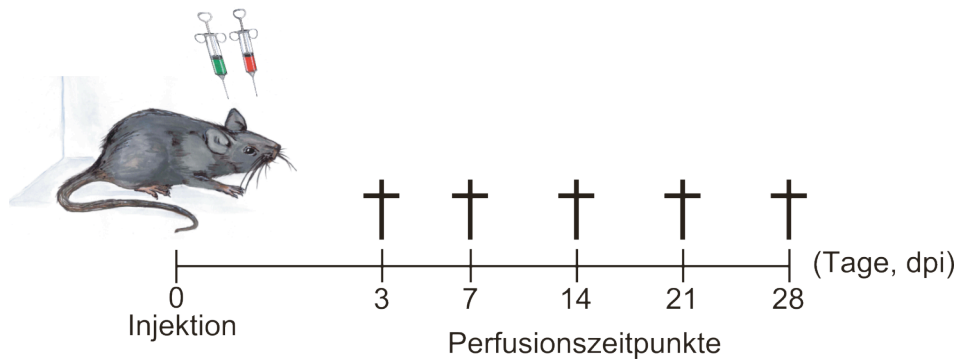


Abb. 19: Injektionschema für *gain*- und *loss-of-function* Experimente. Das Virusgemisch wurde injiziert und die Tiere nach unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Injektion (*days post injection*, dpi) perfundiert.

3.2.3.1 Die Dichte der aCREB-transduzierten Zellen ist im Vergleich mit der Dichte der GFP-transduzierten Zellen signifikant reduziert

Aufgrund der Vermutung, dass die Blockierung von pCREB-Signalen sich auf das Überleben der Zellen auswirken könnte, wurde in einer ersten Analyse *der loss-of-function* Experimente die Dichte der infizierten Zellen bestimmt. Um zu gewährleisten, dass in beiden Injektionen die gleiche Anzahl an Zellen mit dem jeweiligen Virus infiziert wird, müssen die Titer beider Viren, also die Anzahl an infektiöser Partikel pro Milliliter, vor den Experimenten angeglichen werden. Zu allen untersuchten Zeitpunkten erschien die Anzahl der aCREB-infizierten Zellen im Vergleich zu der Anzahl der GFP-Kontrollzellen reduziert (Abb.20). Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 für den RMS und in Tabelle 8 für den OB aufgelistet.

Tabelle 7: Dichte der GFP-infizierten und der aCREB-infizierten Zellen im RMS der injizierten Tiere..

	GFP	aCREB	
<i>Days post injection (dpi)</i>	Anzahl infizierter Zellen / mm ³	Anzahl infizierter Zellen / mm ³	p-Wert
3	64138,7 +/- 10274,8	43222,2 +/- 18410,5	0,6618
7	54176,3 GFP- +/- 29204,2	20060,6 +/- 3890,5	0,1953
14	43707,2 +/- 11837,1	7424,9 +/- 2508,8	0,02962

Tabelle 8: Dichte der GFP-infizierten und der aCREB-infizierten Zellen im OB der injizierten Tiere.

	GFP	aCREB	
<i>Days post injection (dpi)</i>	Anzahl infizierter Zellen / mm ³	Anzahl infizierter Zellen / mm ³	p-Wert
14	12136,5 +/- 1256,1	1345,7 +/- 621,2	0,00871
21	3732,1 +/- 1375,2	924,9 +/- 651,4	0,1659
28	13508,0 +/- 5549,4	1445,3 +/- 493,4	0,007327

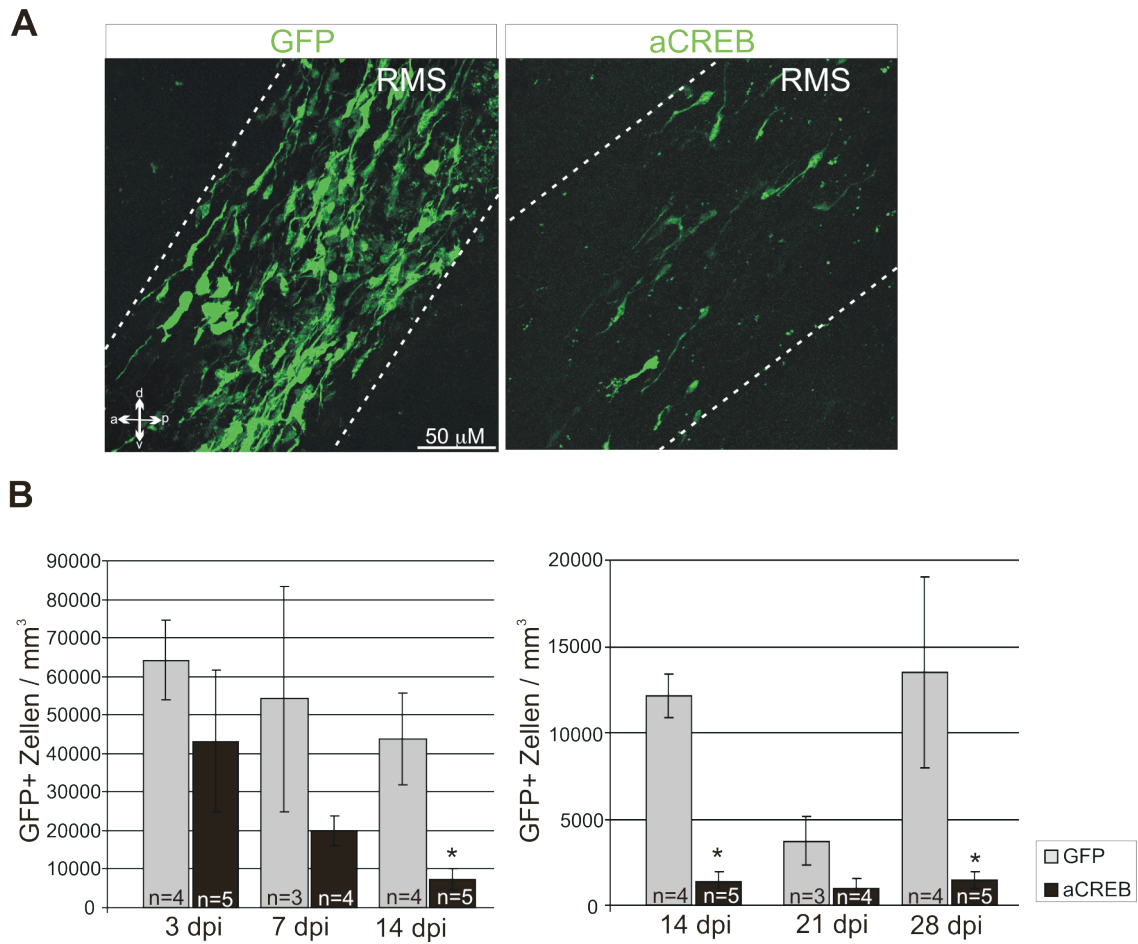


Abb. 20: Unterdrückung des CREB-Signalweges *in vivo*. **A** Representative Aufnahme einer Immunfärbung der infizierten Zellen im RMS 14 Tage nach der Injektion des GFP-Virus oder des aCREB-Virus. Die linke Aufnahme zeigt ein Beispiel von einer Injektion mit GFP, die rechte Aufnahme stammt von einer Injektion mit aCREB. Mit gestrichelten Linien ist jeweils der Verlauf des RMS angedeutet. Verwendete Antikörper: chicken-anti-GFP (1:500) **B** Die Dichte der aCREB-positiven Zellen ist zu allen Zeitpunkten geringer als die Dichte der GFP-positiven Zellen. Die linke untere Bildhälfte zeigt die Statistik über die Dichte der infizierten Zellen im RMS, die rechte untere Bildhälfte die Dichte der infizierten Zellen im OB.

Da die verwendeten Viren (aCREB und GFP) den gleichen Titer besaßen, ließe sich die Reduktion der Zellzahl durch die Blockierung der pCREB-Signale zum Einen durch eine verminderte Proliferation der infizierten Zellen oder zum Anderen durch einen vermehrten Zelltod der aCREB-infizierten Zellpopulation erklären.

3.2.3.2 Viele der CREB-Signaldefizienten Zellen (aCREB) sterben im Verlauf der adulten Neurogenese

Die zuvor erzielten Ergebnisse zur Veränderung der Dichte der infizierten Zellen durch die Inhibition der pCREB-Signale sollten näher untersucht werden. Um einen eventuellen Zelltod sichtbar zu machen, wurde die Strategie einer Doppelinjektion (ein Gemisch aus GFP / RFP oder ACREB-IRES-GFP / RFP, vergleiche Abb. 19) gewählt. Die grundlegende Methode des Experiments besteht darin, dass der GFP-Virus und der aCREB-Virus gleiche Titer haben und zusammen mit einem RFP Virus (der ebenfalls für beide Gruppen die gleiche Anzahl infektiöser Partikel pro Milliliter aufweisen muss) injiziert werden. Es wird davon ausgegangen, dass weder die GFP- noch RFP-Expression eine Auswirkung auf das Überleben der Zellen haben. Aus diesen Doppelinjektionen ergibt sich dann ein gewisser Prozentsatz an doppelt-transduzierten (roten und grünen = gelben) Zellen. Dieser Prozentsatz sollte für die Injektion von GFP / RFP zu allen Zeitpunkten konstant sein, da davon auszugehen ist, dass dieselbe Anzahl an roten (RFP) wie auch an grünen (GFP) Zellen über die Zeit stirbt. Ändert sich nun der Prozentzahl doppelt-transduzierter Zellen zu der internen Kontrolle RFP durch die Unterdrückung von CREB-Signalen durch aCREB, so lässt dies auf Veränderungen im Zelltod oder in der Proliferation schließen. In Tabelle 9 und 10 sind die prozentualen Anteile der doppelttransduzierten Zellen der einzelnen Untersuchungszeitpunkte für den RMS sowie für den OB aufgelistet. In Abbildung 21 A sind infizierte Zellen im RMS zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Injektion (dpi) exemplarisch abgebildet. Im Falle von aCREB verringert sich die Anzahl von gelben Zellen über die Zeit verglichen mit der Kontrollgruppe (Abb. 21. C). Im OB (Abb. 21 B, C) sinkt der prozentuale Anteil an gelben Zellen im Laufe der Zeit in aCREB transduzierten Tieren.

Tabelle 9: Prozentualer Anteil doppelt-transduzierter (gelber) Zellen an der Gesamtanzahl an roten (RFP + doppelttransuzierten) Zellen im RMS.

	GFP	aCREB	
<i>Days post injection (dpi)</i>	Gelbe Zellen / (rote + gelbe) Zellen (%)	Gelbe Zellen / (rote + gelbe) Zellen (%)	p-Wert
3	34,12 +/- 2,12	25,43 +/- 6,96	0,2340
7	24,42 +/- 8,95	11,0 +/- 8,6	0,2692
14	30,65 +/- 5,55	6,0 +/- 2,4	0,01415

Tabelle 10: Prozentualer Anteil doppelttransduzierter (gelber) Zellen an der Gesamtanzahl an roten (RFP + doppelt-transuzierten) Zellen im OB.

	GFP	aCREB	
<i>Days post injection (dpi)</i>	Gelbe Zellen / (rote + gelbe) Zellen (%)	Gelbe Zellen / (rote + gelbe) Zellen (%)	p-Wert
14	35,53 +/- 3,75	5,90 +/- 1,53	0,0005813
21	30,12 +/- 6,59	6,0 +/- 2,4	0,04901
28	32,29 +/- 4,30	4,39 +/- 1,307	0,002711

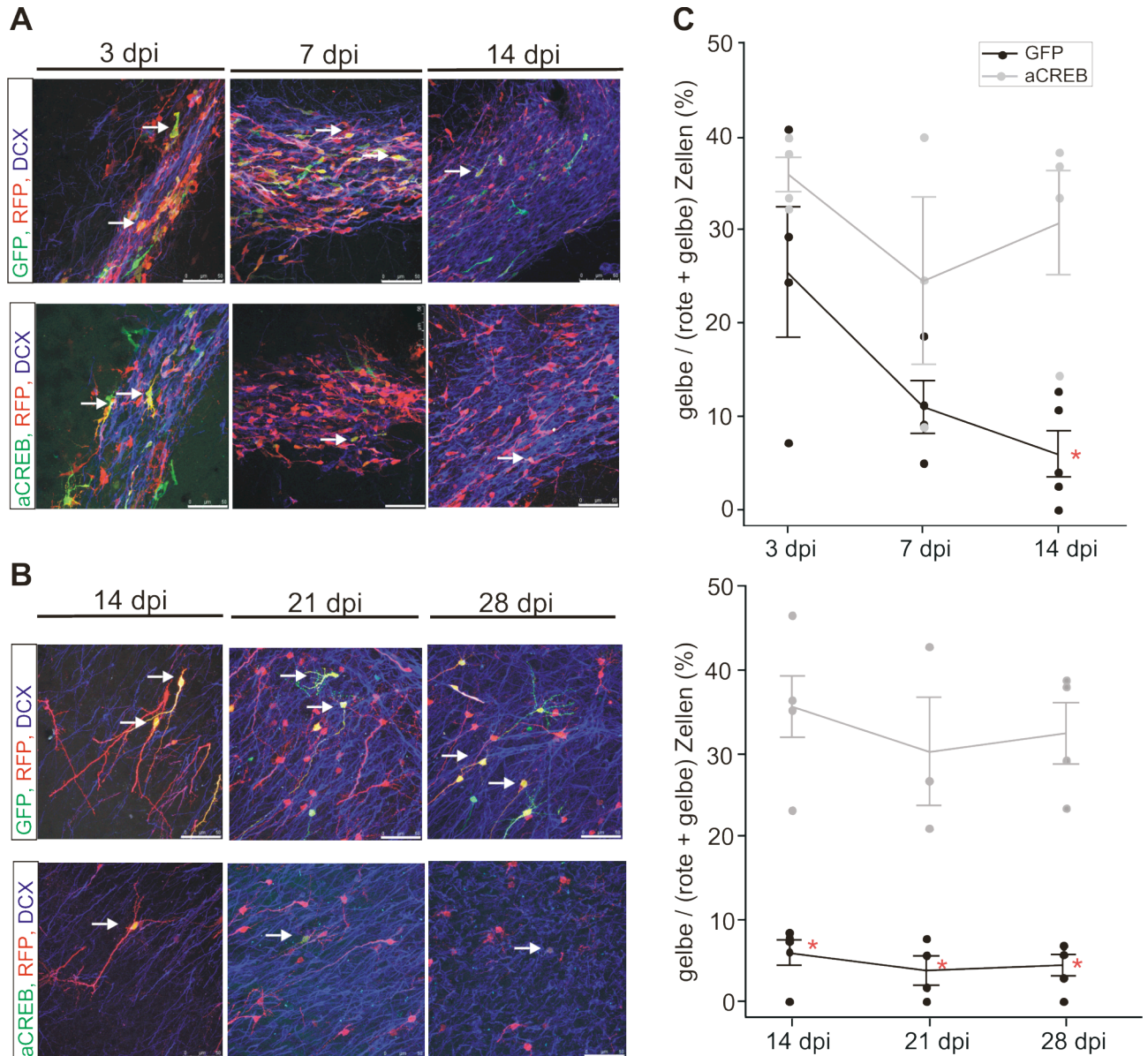


Abb. 21: Doppel-Injektionen zur Quantifizierung eines möglichen Zellsterbens nach der Unterdrückung von pCREB. **A** Immunfluoreszenzfärbung. Representative Aufnahmen von transduzierten Zellen des RMS. Weiße Pfeile zeigen doppelt-transduzierte (gelbe Zellen) **B** Aufnahmen von transduzierten Zellen des OBs. Weiße Pfeile zeigen doppelt-transduzierte (gelbe) Zellen im OB. Verwendete Antikörper: chicken-anti-GFP (1:500), rabbit-anti-RFP (1:250), goat-anti-DCX (1:250) **C** statistische Analyse der Daten. Sowohl im RMS (oberes Diagramm) wie auch im OB (unten) verringert sich der prozentuale Anteil an gelben Zellen über das untersuchte Zeitfenster. Einheitsmaßbalken = 50 μ m.

Die Untersuchungen zeigen deutlich, dass die Zellen in denen die pCREB-Aktivität unterbunden ist, zum Zelltod neigen. Nachdem die Hälfte der infizierten Zellen den OB erreicht hat (14 dpi) ist die Anzahl der gelben Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert. Diese Reduktion der gelben Zellen durch die Unterdrückung des CREB-Signalweges bleibt auch im weiteren zeitlichen Verlauf erhalten. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass Neuroblasten im SVZ-OB-System zu einer definierten Zeit während ihrer Entwicklung auf Aktivität des Signalweges angewiesen sind.

3.2.3.3 Die Unterdrückung von CREB-Signalen im RMS/OB beeinflusst die DCX-Expression der Vorläuferzellen.

Um die Ursache des erhöhten Zelltods der aCREB-transduzierten Zellen zu klären, wurde untersucht, ob eventuell Fehler in der neuronalen Entwicklung durch die Unterdrückung des CREB-Signaltransduktionsweges auftreten, welche zum Zelltod führen könnten. Hierzu wurde untersucht, ob die aCREB-transduzierten Zellen die Expression des Neuroblasten Markerproteins *Doublecortin* (DCX) während den entsprechenden Entwicklungszeitpunkten zeigen. Die verschiedenen Analysezeitpunkte (3 dpi, 7 dpi, 14 dpi, 21 dpi und 28 dpi) repräsentieren hierbei die zeitliche Entwicklung der neugeborenen Zellen. In der SVZ neugeborene Zellen migrieren entlang des RMS und erreichen den OB etwa nach sieben Tagen. Sie treten dann in die radiale Migration über. Zu dieser Zeit sollte die Zellen das Markerprotein DCX exprimieren. Neun Tage nach ihrer Generierung in der SVZ befinden sie sich in der adulten Maus bereits in der Körnerzellschicht und erhalten GABAerge synaptische Signale. Die Entwicklung des Dendritenbaums der Neurone setzt zu dieser Zeit ein, jedoch exprimieren sie immer noch DCX. Nach 11 Tagen erhalten die neugeborenen Neurone neben GABAergen Signalen zusätzlich glutamaterge Eingänge und ihr Dendritenbaum bildet sich weiter aus. Die Zellen exprimieren weiterhin DCX. Zwischen 14 bis 28 Tagen ist die Zeit für die Ausbildung dendritischer *Spines*. Zudem ist diese Zeit die kritische Periode, während welcher die Entscheidung über Leben und Tod der jungen Neurone getroffen wird. Die Zellen verlieren die Expression von DCX allmählich und exprimieren in Folge NeuN (zur Übersicht: Zhao et al., 2008b). Mit Hilfe der durchgeführten Experimente sollte untersucht werden, ob dieser stereotypische Ablauf dieses Differenzierungsprogramms durch die Unterdrückung des CREB-Signaltransduktionsweges beeinflusst wird. In dem Zeitintervall zwischen drei bis 14 Tage nach der Injektion befinden sich die transduzierten Zellen im RMS und somit in der tangentialen Migration von *caudal* nach *rostral*. Während dieser Zeit sollten die Zellen unter Standardbedingungen DCX exprimieren. Durch die Unterdrückung des CREB-Signaltransduktionsweges exprimieren die transduzierten Zellen sieben Tage nach der Injektion zu einem signifikant geringeren Anteil DCX im Vergleich mit den Kontrollzellen. Drei und 14 Tage nach der Injektion ist die Expression von DCX zwar durch die Unterdrückung des CREB-Signaltransduktionsweges im Vergleich zur Kontrolle reduziert, es liegen jedoch keine signifikanten Unterschiede vor.

Viele der transduzierten Zellen, in denen der CREB-Signaltransduktionsweg inhibiert ist, sind bereits sieben Tage nach der Injektion gestorben, allerdings erreichen einige Zellen trotz der Inhibition des Signalweges den OB. Aus diesem Grund wurden zusätzlich die Zellen 14 bis 28 Tage nach der Injektion im OB analysiert, um eventuelle Abweichungen im stereotypischen Differenzierungsprogramm zu bestimmen. Während dieses Zeitintervalls sollte unter Standardbedingungen die DCX-Expression allmählich abnehmen. 14 und 21 Tage nach der Injektion treten keine signifikanten Unterschiede in der Expression zwischen den aCREB-transduzierten und den GFP-transduzierten Zellen auf. Allerdings ist die Expression von DCX 28 Tage nach der Injektion in den aCREB-transduzierten Zellen signifikant gesteigert im Vergleich zur GFP-Kontrolle (Abb.22). Alle ermittelten Werte sind in Tabelle 10 (RMS) und Tabelle 11 (OB) aufgelistet.

Tabelle 10: DCX-Expression der transduzierten Zellen im RMS.

	GFP	aCREB	
Days post injection (dpi)	GFP+ / DCX+ (%)	aCREB+ / DCX+ (%)	p-Wert
3	75,4 +/- 11,5	38,7 +/- 5,3	0,094
7	65,2 +/- 9,14	31,6 +/- 5,3	0,044
14	58,5 +/- 14,2	51,5 +/- 15,5	0,75

Tabelle 11: DCX-Expression der transduzierten Zellen im OB.

	GFP	aCREB	
Days post injection (dpi)	GFP+ / DCX+ (%)	aCREB+ / DCX+ (%)	p-Wert
14	83,6 +/- 5,86	63,6 +/- 16,9	0,67
21	31,1 +/- 17,35	21,42 +/- 21,42	0,94
28	7,45 +/- 2,87	46,4 +/- 16,75	0,045

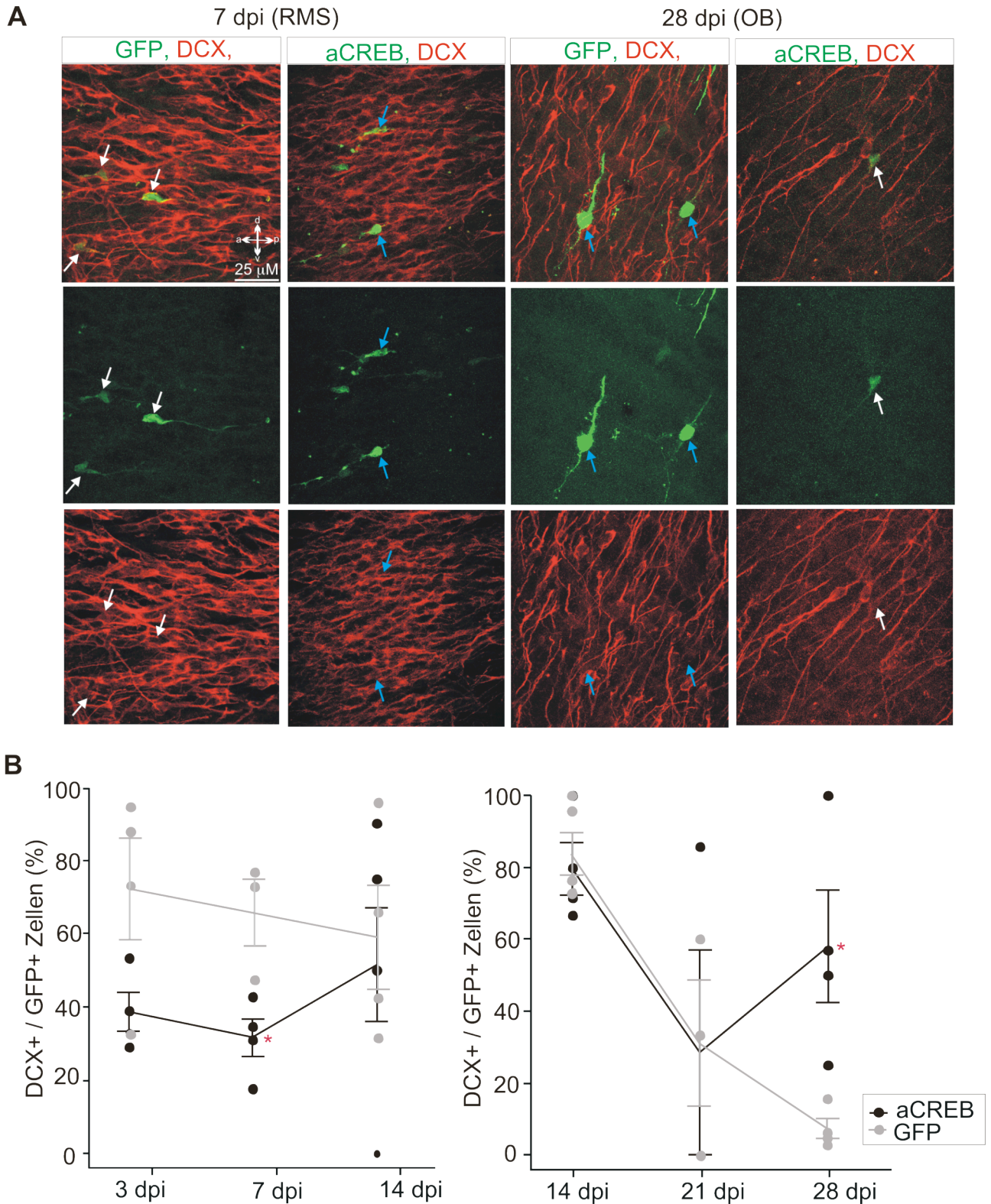


Abb. 22: Immunhistochemie zur Analyse der *Doublecortin*expression nach Unterdrückung des CREB-Signaltransduktionsweges in adulten neuronalen Vorläuferzellen im SVZ-OB-System. **A** Representative Beispiele für die DCX-Expression transduzierter Zellen 7 dpi und 28 dpi. Weiße Pfeile markieren DCX-positive Zellen, blaue Pfeile DCX-negative. Verwendete Antikörper: chicken-anti-GFP (1:500), goat-anti-DCX (1:250) **B** Verlauf der DCX-Expression in GFP-transduzierten und aCREB-transduzierten Zellen im RMS (links) und im OB (rechts). Die Unterdrückung des CREB-Signaltransduktionsweges führt zur Reduzierung der DCX-Expression im Vergleich zur Kontrolle. Lediglich 28 dpi ist die DCX-Expression der aCREB-transduzierten Zellen signifikant gesteigert im Vergleich zur GFP-Kontrolle

Sieben Tage nach der Injektion (7dpi) der Viren ist durch die Unterdrückung des CREB-Signaltransduktionsweges ein signifikant geringerer Anteil an Zellen positiv für DCX im Vergleich zur GFP-Kontrolle. 28 Tage nach der stereotaktischen Injektion (28 dpi) ist ein signifikant höherer prozentualer Anteil der aCREB-transduzierten Zellen positiv für DCX als der der GFP-transduzierten Zellen. Beide Veränderungen im Differenzierungsprogramm der Zellen könnten die Folge einer Ausreifungsverzögerung der aCREB-transduzierten Zellen sein.

3.2.3.4 Die Inhibition von CREB-Signaltransduktionsweges führt zur Reduktion der Pax6-Expression

In den folgenden Experimenten stand weiterhin die Frage im Vordergrund, ob das stereotypische Programm zur Bildung neuer OB-Neurone durch die Inhibition des CREB-Signaltransduktionsweges gestört ist. DCX ist wahrscheinlich kein direktes Zielgen von pCREB, da der DCX-Promoter keine CREB-Bindestellen aufweist (<http://natural.salk.edu/CREB/>). Es ist bereits bekannt, dass dem Transkriptionsfaktor Pax6 ebenfalls eine tragende Rolle in der adulten Neurogenese der SVZ-OB-Systems zukommt und die retrovirale Unterdrückung des Transkriptionsfaktors zu einer Verringerung der DCX-Expression führt (Hack et al., 2003). Außerdem ist Pax6 ein direktes Zielgen von pCREB (<http://natural.salk.edu/CREB/>). In der Folge wurde daher untersucht, ob die Inhibition des CREB-Signaltransduktionsweges die Expression von Pax6 in den transduzierten Zellen verändert. Ein signifikanter Effekt auf die Pax6-Expression war sieben Tage nach der Injektion (7 dpi) zu ermitteln (Abb. 23). Zu diesem Zeitpunkt waren 46,68 +/- 8,47% der Kontroll-GFP Zellen und 20,62 +/- 5,73% der aCREB-transduzierten Zellen positiv für Pax6 ($p = 0,028$). Drei Tage nach der Injektion gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen der aCREB-transduzierten Zellen und der GFP-transduzierten Zellen (34,722 +/- 10,63% der aCREB+ Zellen, und 50,87 +/- 14,88% der GFP-Kontrollzellen sind Pax6+, $p = 0,492$, Abb. 23).

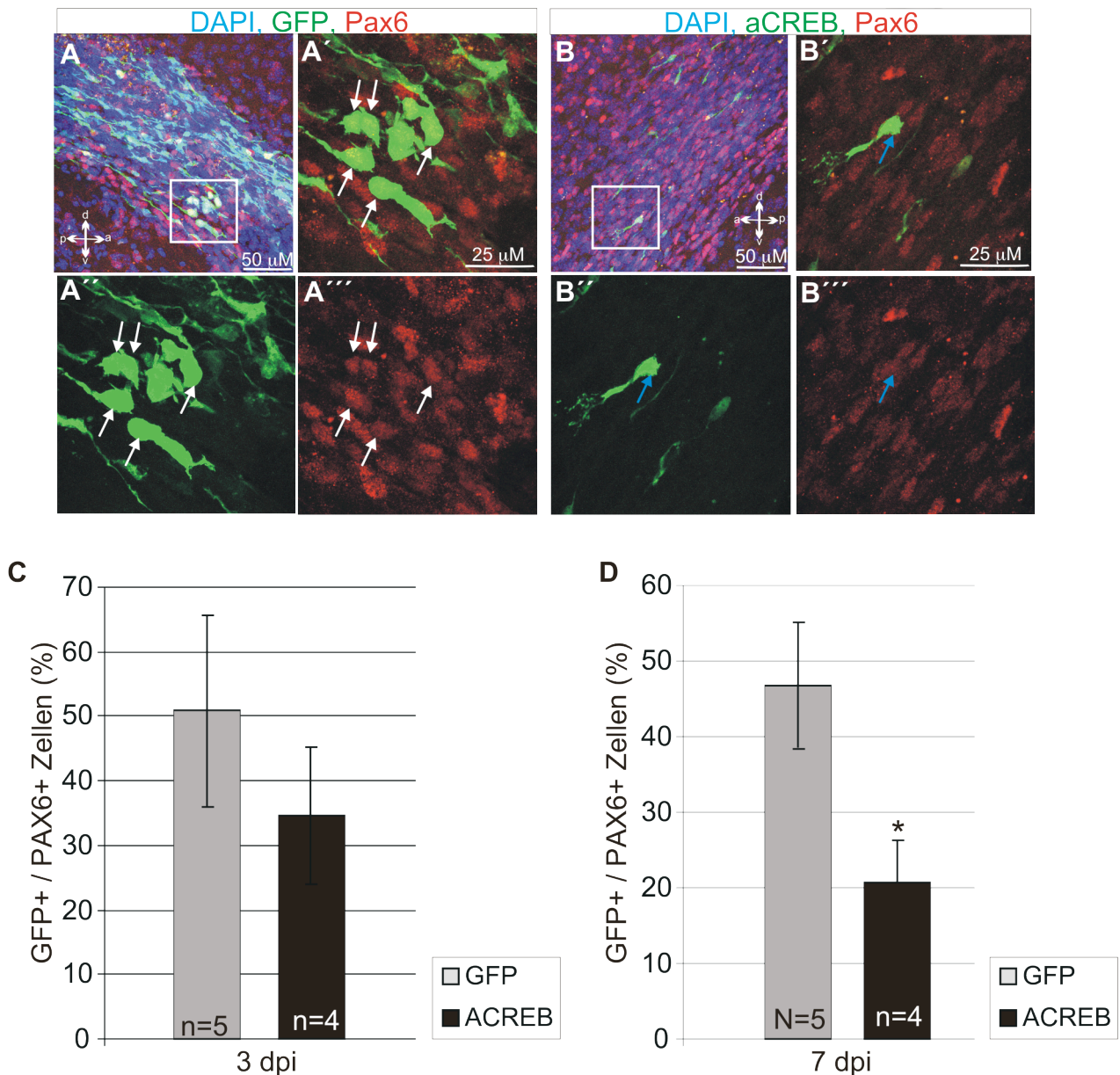


Abb. 23: Immunfluoreszenzfärbung für die Analyse der Pax6-Expression der transduzierten Zellen im RMS nach Blockierung von CREB-Signalen. **A-A'''** Representative Beispiele für die Pax6-Expression im RMS 7 Tage nach der Injektion des Kontrollvirus GFP. **B-B'''** Representative Aufnahmen für die Pax6-Expression im RMS 7 Tage nach der Injektion von aCREB. Verwendete Antikörper chicken-anti-GFP (1:500), rabbit-anti-Pax6 (1:1000), Dapi (1:10000) **C** Statistische Analyse der Pax6-Expression in Zellen des RMS 3 dpi und 7 dpi (**D**). Ein signifikanter Unterschied in der Pax6-Expression zeigt sich 7 Tage nach der Blockierung von CREB-Signalen im RMS ($p < 0,05$, *).

3.2.3.5 Reifung von GFP- und aCREB-positiven Zellen zu Neuronen.

Nach den vorangegangenen Untersuchungen stellte sich nun die Frage, ob weitere Faktoren des Neurogeneseprogramms der neugeborenen OB-Interneurone durch die Unterdrückung des CREB-Signaltransduktionsweges beeinflusst werden. Diejenigen Zellen, welche den OB erreicht hatten, sollten zwischen 14 bis 28 Tagen nach der Injektion die Expression des neuronalen Markerproteins NeuN zeigen (Zhao et al.,

2008; Batista-Brito et al., 2008). Die Expression überschneidet sich zwar zeitlich mit der Expression von DCX, NeuN bleibt allerdings auch in reifen Neuronen der Körnerzellschicht erhalten und sollte daher 28 Tage nach der Injektion nachweisbar sein, wohingegen die Expression von DCX erloschen sein sollte. In den folgenden Experimenten wurde daher die NeuN-Expression in GFP-transduzierten bzw. aCREB-transduzierten Zellen des OB 28 Tage nach der Injektion (28 dpi) der Viren analysiert (Abb. 24). Es zeigt sich, dass zu diesem Zeitpunkt keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen vorliegen. 71,89 +/- 16,25% der GFP-transduzierten Zellen exprimieren NeuN und ebenfalls 70,83 +/- 10,49% der aCREB-transduzierten Zellen sind positiv für NeuN ($p = 0,94$).

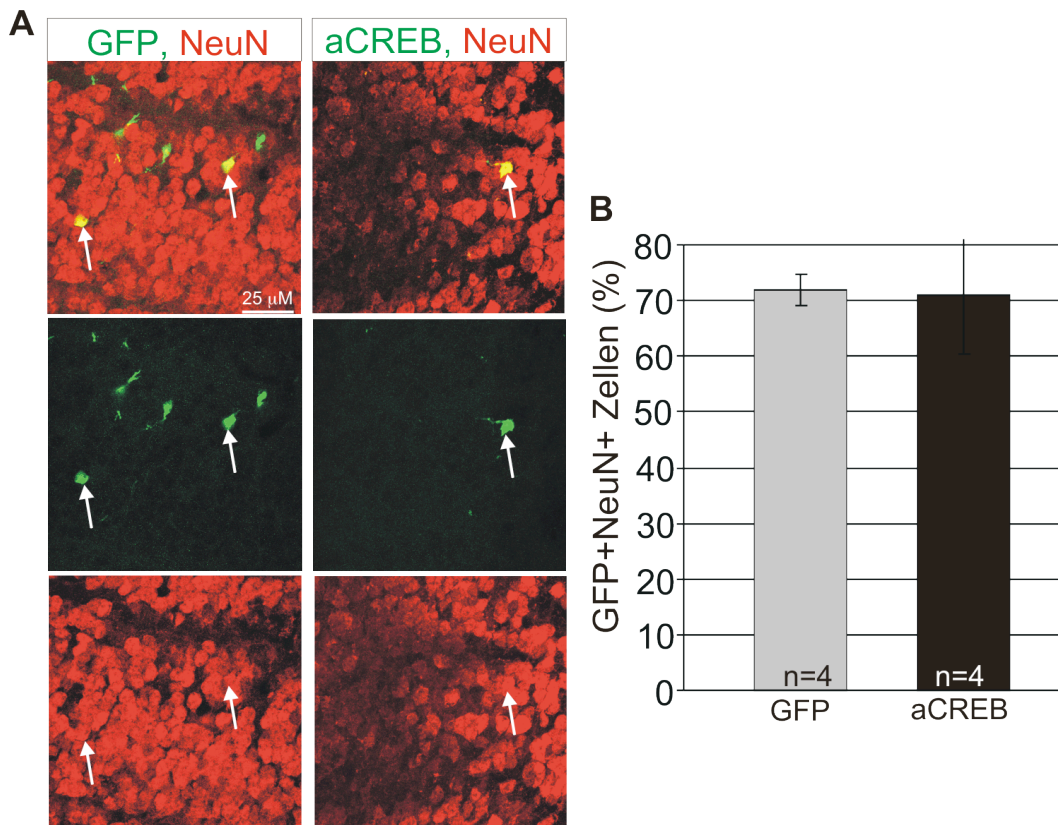


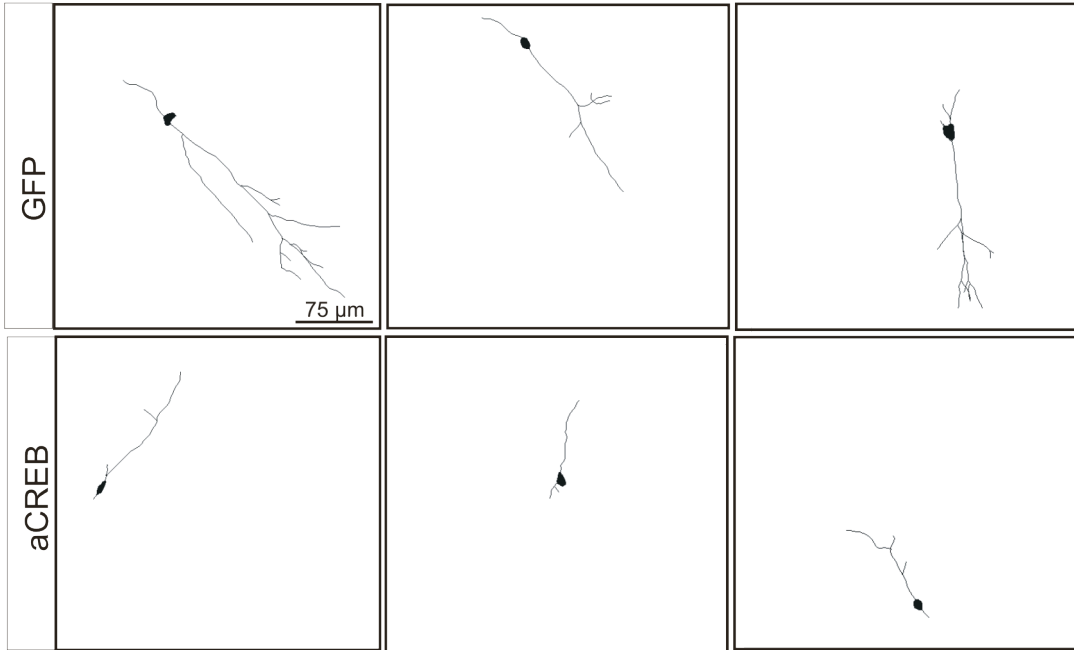
Abb. 24: NeuN-Expression in Zellen des OBs nach Inhibition des CREB-Signaltransduktionsweges (28 dpi). **A** Representative Beispiele für die NeuN-Expression im OB 28 dpi. **B** Statistische Analyse der NeuN-Expression in Zellen des OB 28 dpi. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der NeuN-Expression zwischen den GFP-transduzierten und den aCREB-transduzierten Zellen detektiert werden.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass diejenigen Zellen, die während ihrer Entwicklung im SVZ-OB-System eine „kritische Phase“ überlebt haben, in der sie auf CREB-Aktivität angewiesen sind, keine offensichtliche Beeinträchtigung in ihrem weiteren Differenzierungsprogramm hinsichtlich der Expression neuronaler Gene zeigen.

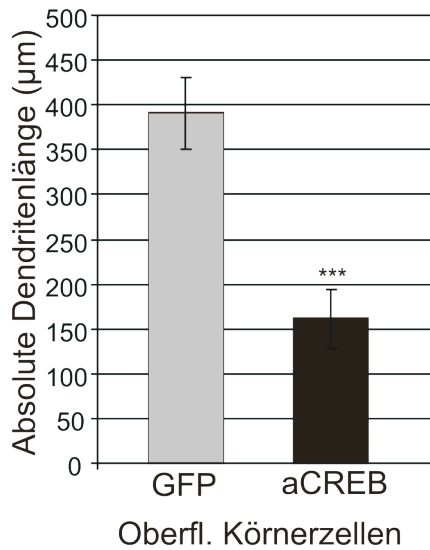
3.2.3.6 Die Morphologie des Dendritenbaums von 14 Tagen alten Zellen wird durch die Unterdrückung von CREB-Signalen stark beeinflusst.

Nachdem mit Hilfe der NeuN-Expression ermittelt werden konnte, dass aCREB-transduzierte Zellen, welche den OB erreichen, zu Neuronen ausreifen, da sie das neuronale Markerprotein NeuN exprimieren, sollte jetzt untersucht werden, ob sich diese in das neuronale Netzwerk des OBs integrieren. Es wurden lediglich Tiere 14 Tage nach der Injektion des aCREB / RFP-Virusgemisches bzw. des aCREB / RFP-Virusgemisches (Vergleiche hierzu Abb. 19) analysiert, da aus Untersuchungen von neugeborenen Zellen im SVZ-OB-System der Maus bekannt ist, dass Zellen in dieser Zeitspanne bereits exzitatorische und inhibitorische Signale von Nachbarzellen erhalten und folglich synaptisch integriert sind (zur Übersicht: Lledo und Saghatelvan, 2005). Die morphologische Analyse wurde auf neugebildete Zellen der äußeren Körnerzellschicht begrenzt. Diese Einschränkung erfolgte aus dem Grund, da die Zellen aufgrund ihrer Position im OB einfach zu definieren sind und sie eine sehr einheitliche Morphologie aufweisen. Da RFP ein schwächeres Ausbleichen während der konfokalen Aufnahme zeigte und die Zellmorphologie besser widerspiegelt als GFP, wurden zudem lediglich doppeltransduzierte Zellen analysiert. In Abb. 25 A sind repräsentative Zeichnungen einzelner doppeltransduzierter Zellen in der äußeren Körnerzellschicht dargestellt. aCREB / RFP-transduzierten Zellen zeigen im Vergleich mit den GFP / RFP-transduzierten Zellen einen stark verkürzten dendritischen Baum, so wie eine starke Reduktion in der Anzahl der Verzweigungen. Zur Ermittlung statistischer Daten wurde die Gesamtdendritenlänge der Zellen (Abb. 25 B) ermittelt und eine Schollanalyse zur Ermittlung der Anzahl der Verzweigungspunkte der Dendriten durchgeführt (Abb. 25 C). Die Gesamtdendritenlänge der aCREB-transduzierten Zellen betrug $161,35 \pm 32,43 \mu\text{m}$ und war somit signifikant ($p = 0,00041$) reduziert gegenüber der Gesamtdendritenlänge der GFP-transduzierten Zellen, welche $391,29 \pm 39,91 \mu\text{m}$ betrug (analysiert wurden 10-15 doppeltransduzierte Zellen aus jeweils 3 Tieren). Die Anzahl der Verzweigungspunkte der Dendriten ist nach der Unterdrückung von CREB-Signaltransduktionsweges im Vergleich zu der GFP / RFP-Kontrolle ebenfalls signifikant reduziert. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass sich die aCREB-transduzierten Zellen nicht vollständig in das neuronale Netzwerk integrieren, obwohl sie einen neuronalen Phänotyp aufweisen.

A



B



C

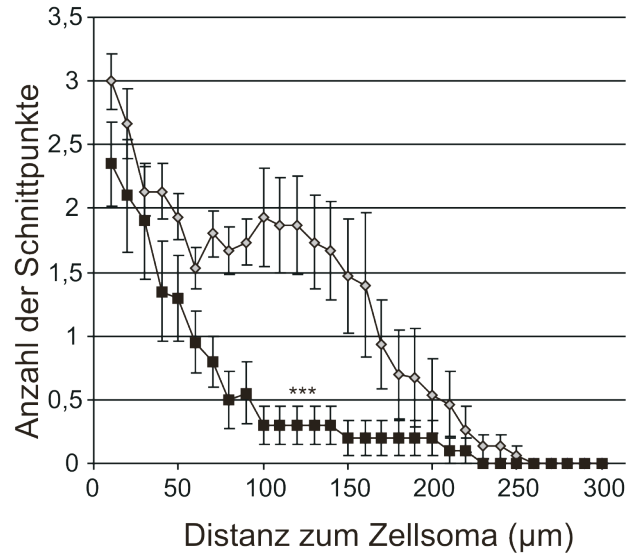


Abb. 25: Morphologische Analyse von doppeltransduzierter Körnerzellen der äußeren Körnerzellschicht des OBs. Die Zellen wurden zunächst mit den Antikörpern chicken-anti-GFP (1:500) und rabbit-anti-RFP (1:250) gefärbt und anschließend die drei-D-Rekonstruktion mit Hilfe von NeuronJ nachgezeichnet. **A** Repräsentative Zeichnungen der Morphologie einiger untersuchten doppeltransduzierten Zellen im OB. **B** Analyse der Gesamtdendritenlänge der transduzierten Zellen. aCREB-transduzierte Zellen haben einen signifikant verkleinerten Dendritenbaum im Vergleich zu den GFP-transduzierten Kontrollzellen. **C** Schollanalyse der transduzierten Zellen. Die nachgezeichnete drei-D-Rekonstruktion wurde einer Schollanalyse unterzogen (Distanz der Analyseradien 10 µm). aCREB-transduzierte Zellen weisen deutlich weniger Verzweigungspunkte als GFP-transduzierte Zellen auf. (schwarze Kästchen = aCREB, weiße Kästchen = GFP)

Zusammenfassend lässt sich aus den Analysen zur Unterdrückung von pCREB im SVZ-OB-System schließen, dass die Pax6-Expression sowie die DCX-Expression zu bestimmten Zeitpunkten während der adulten Neurogenese von CREB-Signalen abhängig sind. Einige Vorläuferzellen nehmen trotz der Unterdrückung der CREB-Signale neuronalen Charakter an, was sich in der Expression von NeuN widerspiegelt, sie sind allerdings anscheinend nicht in der Lage, sich vollständig in das schon vorhandene Netzwerk des OBs zu integrieren.

3.2.4 Überstimulation des CREB-Signaltransduktionsweges im SVZ-OB-System

3.2.4.1 Hat die konstitutive Stimulation von CREB Auswirkungen auf das stereotypische Differenzierungsprogramm der neugebildeten Zellen?

Um diese Frage zu klären, wurde zunächst ein erstes Experiment durchgeführt, in welchem adulte Mäuse mit einer Kombination aus dem CREBYF-Virus (konstitutiv aktive CREB-Mutante (Du et al., 2000) und einem RFP-Virus sowie einem GFP-Virus zusammen mit einem RFP-Virus durchgeführt wurde. Die Überlebenszeit der Zellen wurde für dieses erste Experiment auf zwei Überlebenszeitpunkte beschränkt (3 dpi, 14 dpi). Diese Zeitpunkte wurden aus dem Grund gewählt, da in den vorangegangenen Untersuchungen zur Inhibition des CREB-Signaltransduktionsweges eine Entwicklungsverzögerung der aCREB-transduzierten Zellen angenommen wurde. Diese Hypothese sollte durch die Analyse der DCX-Expression zu den genannten Analyzeitpunkten nach der Überstimulation des CREB-Signaltransduktionsweges belegt werden. Würde die Inhibition von CREB-Signalen zu einer Ausreifungsverzögerung der Zellen führen, welche sich in einer Verringerung der DCX-Expression in den aCREB-transduzierten Zellen zu diesem Zeitpunkt widerspiegelt, sollten durch die Überstimulation von CREB keine Unterschiede in der DCX-Expression auftreten, da unter Kontrollbedingungen die Aktivität des Transkriptionsfaktors hoch ist und die Mehrheit der Zellen ohnehin schon positiv für DCX ist. Nach 14 Tagen sollte die Expression von DCX unter

Standardbedingungen allmählich abnehmen. Würde die Überstimulation des CREB-Signaltransduktionsweges das Differenzierungsprogramm der Zellen beschleunigen, müssten zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zu den GFP-Kontrollzellen weniger CREBYF-transduzierte Zellen positiv für DCX sein. Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den CREBYF-injizierten Tieren, weder im RMS noch im OB. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengefasst. In Abbildung 27 sind repräsentative Aufnahmen transduzierter Zellen im RMS und im OB, sowie die in Tabelle 12 angegebenen Werte graphisch dargestellt.

Aufgrund von Komplikationen während und nach der stereotaktischen Injektion der Versuchstiere ist die Anzahl der Versuchstiere in den einzelnen Gruppen sehr gering, daher kann dieses Experiment auch lediglich als vorläufig betrachtet werden. Es wurden aus diesem Grund keine Signifikanztests durchgeführt. Es zeigte sich keine Tendenz einer reduzierten oder gesteigerten Expression von DCX durch Stimulation des CREB-Signaltransduktionsweges im Vergleich zur GFP-Kontrolle.

Tabelle 12: Expression von DCX nach Überstimulation des CREB-Signaltransduktionsweges.

	GFP / RFP	CREBYF / RFP	
Days post injection (dpi)	GFP+ / DCX+ Zellen (%)	CREBYF+ / RFP+ Zellen (%)	p-Wert
3 (RMS)	63,37 +/- 4,10	83,66 +/- 6,99	nicht analysiert
14 (RMS)	76,06 +/- 2,56	53,97 +/- 16,04	nicht analysiert
14 (OB)	78,81 +/- 8,34	80,0 +/- 0,0	nicht analysiert

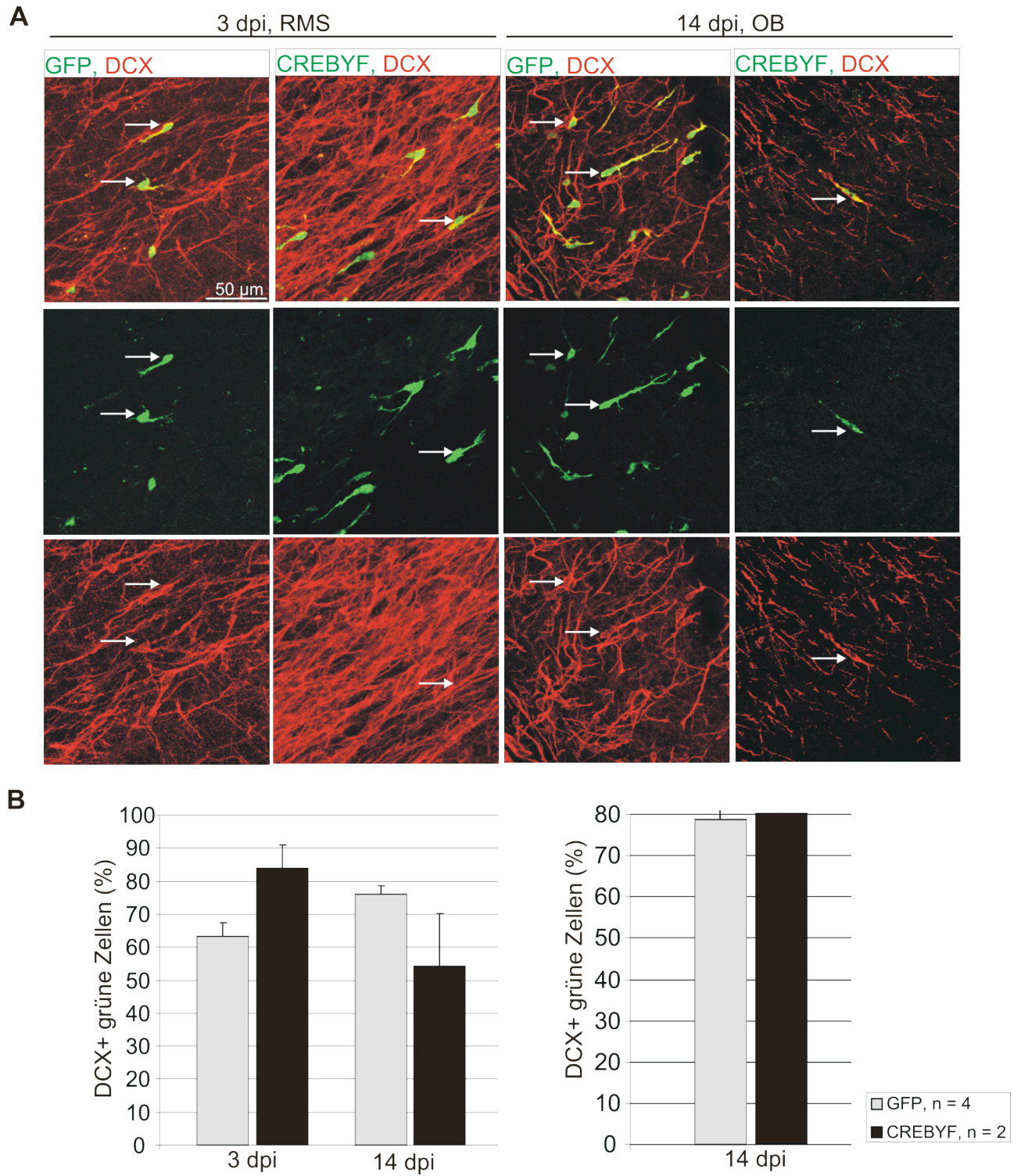


Abb. 27 : Überaktivierung des CREB-Signaltransduktionsweges in Zellen des RMS führt zu keinem Verlust der DCX-Expression in den infizierten Zellen. **A** Repräsentative Aufnahmen von Zellen des RMS und des OBs. Pfeile markieren DCX-positive Zellen. Verwendete Antikörper: chicken-anti-GFP (1:500) und goat-anti-DCX (1:250) **B** Statistische Analyse der transduzierten Zellen. Es zeigt sich weder im RMS (links) noch im OB Verringerung oder Steigerung der DCX-Expression durch die Überstimulation des CREB-Signaltransduktionsweges.

3.2.4.2 Die Überstimulation mit CREBYF hat keine Auswirkungen auf das Überleben der neugeborenen Zellen.

Da in den *loss-of-function* Experimenten ein verstärkter Zelltod der aCREB-positiven Zellen gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob die Überstimulation des CREB-Signalweges ebenfalls Auswirkungen auf das Überleben der infizierten Zellen hat. Es zeigte sich, dass CREBYF, weder im RMS noch im OB eine signifikante Auswirkung auf das Überleben der Zellen hat (Tabelle 13 und Abb. 27). Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte ergab sich ein Unterschied zwischen den zwei untersuchten Gruppen (Tabelle 13).

Tabelle 13: Analyse zum eventuellen Zelltod nach der Überstimulation des CREB-Signaltransduktionsweges.

	GFP / RFP	CREBYF / RFP	
<i>Days post injection</i> (dpi)	Gelbe / (rote+gelbe) Zellen (%)	Gelbe / (rote+gelbe) Zellen (%)	p-Wert
3 (RMS)	37,91 +/- 3,59	30,36 +/- 1,55	nicht analysiert
14 (RMS)	43,47 +/- 4,79	40,0 +/- 10,0	nicht analysiert
14 (OB)	42,35 +/- 4,68	16,6 +/- 16,6	nicht analysiert

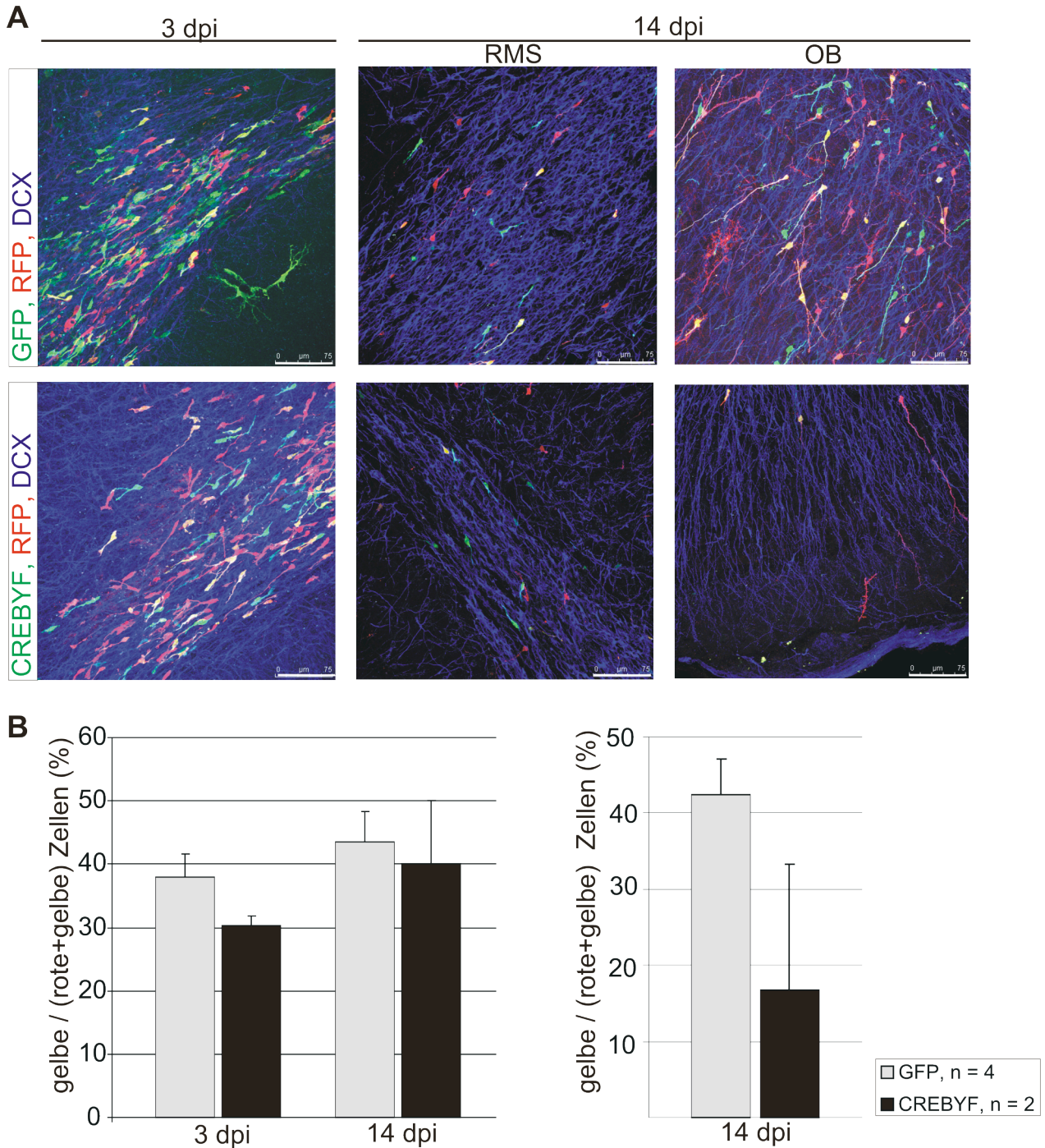


Abb. 27 : Überaktivierung des CREB-Signaltransduktionsweges in Zellen des RMS führt nicht zum Zelltod. **A** Repräsentative Aufnahmen von transduzierten Zellen des RMS und des OBs. Verwendete Antikörper: chicken-anti-GFP (1:500), rabbit-anti-RFP (1:250) und goat-anti-DCX (1:250) **B** Statistische Analyse des eventuellen Zelltodes der transduzierten Zellen. Es gibt keine direkt auffälligen Unterschiede im prozentualen Anteil der gelben Zellen zwischen den beiden Experimentellen Gruppen GFP / RFP und CREBYF / RFP.

3.3 Mögliche Interaktion von Signalwegen zur Generierung von dopaminergen Zellen

3.3.1 Interaktion von kanonischen Wnt-Signalen mit dem CREB-Signaltransduktionsweg

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Wnt1 Stimulation *in vitro* hinreichend ist, die dopaminerge Neurogenese zu steigern (siehe hierzu Kapitel 3.1.2). Im Gegensatz dazu stand der Befund, dass Überexpression von Wnt1 nur begrenzt die Bildung dopaminergener Neurone im SVZ-OB-System *in vivo* steigert (Kapitel 3.1.3). Eine mögliche Ursache für die Diskrepanz der *in vitro* und *in vivo* Wirkung von Wnt1 ist, dass der kanonische Wnt-Signalweg mit weiteren Signalwegen in der dopaminergen Neurogenese interagiert und dass die alleinige Stimulation des Wnt-Signalweges nicht ausreichend ist, die dopaminerge Neurogenese *in vivo* zu steigern. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde zur Rolle des CREB-Signalweges im SVZ-OB-System und die Beobachtung, dass das TH-Gen eine CREB-Bindungsstelle aufweist (Ghee et al., 1997), die die Expression von TH reguliert, weisen auf die Möglichkeit der Interaktion zwischen dem kanonischen Wnt-Signalweg mit dem CREB-Signaltransduktionsweg in der Bildung dopaminergener Neurone hin. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Histonacetyltransferase (HAT) CBP (CREB-Binde Protein) ein positiver Regulator des CREB-Signalweges in Vertebraten ist (Hecht et al, 2000; Miyagishi et al, 2000; Sun et al, 2000; Takemaru and Moon, 2000) und dass sowohl CBP (Teo et al., 2005) als auch p300 – ein weiterer Coaktivator von CREB (Li et al., 2007) mit β -Catenin interagieren. Somit besteht die Möglichkeit, dass der der CREB-Signalweg mit dem kanonischen Wnt-Signalweg während der Bildung neuer dopaminergener Interneurone nicht nur funktionell, sondern auch biochemisch interagiert. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden Immunfärbungen in der BATgal-Reportermaus (Maretto et al., 2003, siehe Kapitel 3.1.1) durchgeführt wobei gezeigt werden konnte, dass eine Subpopulation von neugebildeten Nervenzellen eine Überlappung zwischen pCREB und β -Galaktosidase zeigt (Abb. 28), was darauf hindeutet, dass in einer Subpopulation von neugebildeten Neuronen beide Signalwege aktiv sind.

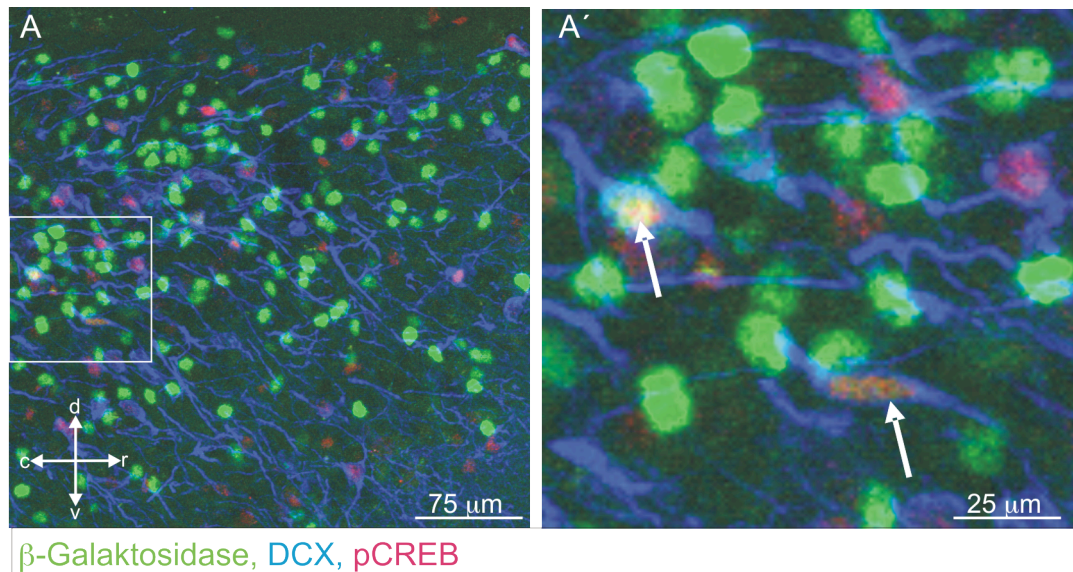


Abb. 28: Immunfluoreszenzfärbung zur Untersuchung einer eventuellen Interaktion zwischen dem kanonischen Wnt-Signalweg und pCREB. **A** pCREB-positive Zellen im RMS der BATgal-Reportermaus. **A'** Vergrößerung der Box in **A**. Weiße Pfeile markieren Zellen, in denen der kanonische Wnt Signalweg aktiviert ist und die gleichzeitig positiv für den Transkriptionsfaktor pCREB sind. Verwendete Antikörper: goat-anti- β -Galaktosidase (1:200), rabbit-anti-p-CREB (1:250) und goat-anti-DCX (1:250).

Um die Hypothese der Interaktion beider Signalwege während der dopaminergen Neurogenese weiter zu untersuchen, wurden Versuche *in vitro* an rNSZ durchgeführt. Die Stimulation der Adenylatzyklase durch Forskolin (FSK) führt zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), welche CREB phosphoryliert und den Transkriptionsfaktor somit in die aktive Form (pCREB) überführt. Die Adenylatzyklase wurde mit 5 μ m FSK in rNSZ stimuliert und Wnt1 gleichzeitig überexprimiert. Wie Abbildung 29 zu entnehmen ist, konnte hierdurch die Neubildung von TH-positiven Neuronen signifikant gesteigert werden, wobei FSK alleine keinen Einfluss auf die Bildung neuer TH-positiver Zellen hatte (rNSZ+Wnt1: Standardbedingungen 6,25 \pm 0,34%, FSK 21,38 \pm 0,99%, $p = 0,001$). Die Stimulation der Adenylatzyklase mit FSK hat weiterhin einen Neurogenese-Effekt auf beide Zelllinien (Abb. 29 B rNSZ: Standardbedingungen 0,2 \pm 0,36% MAP2ab-positive Zellen, FSK 1,0 \pm 0,56% MAP2ab-positive Zellen, $p = 0,017$; rNSZ+Wnt1: Standardbedingungen 2,0 \pm 1,34% MAP2ab-positive Zellen, FSK 3,21 \pm 2,19% MAP2ab-positive Zellen, $p = 0,00086$). Da FSK in DMSO gelöst ist, wurde ebenfalls eine DMSO-Kontrolle durchgeführt (Daten nicht in der Abbildung gezeigt) wobei sich Anzeichen fanden, dass DMSO einen leichten positiven Effekt auf die Neurogenese der rNSZ ausübt (Standardbedingungen: 0,22 \pm 0,36%, DMSO: 1,45 \pm 1,13%, $p = 0,053$). Eine

vermehrte Bildung von TH-positiven Zellen konnte durch die Applikation von DMSO nicht detektiert werden.

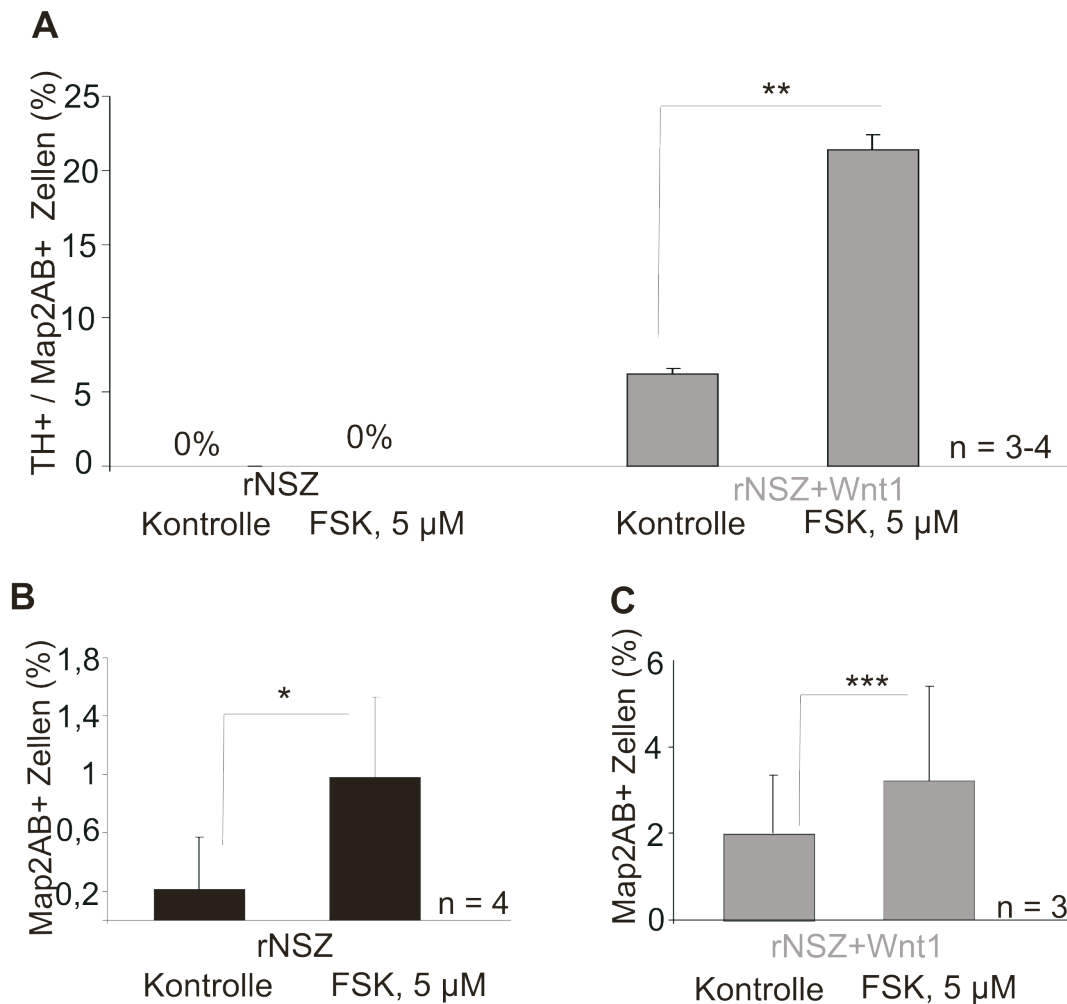


Abb. 29: Die rNSZ sowie die rNSZ-Wnt1-Zellen wurden über einen Zeitraum von vier Tagen durch den Entzug von FGF₂ differenziert. Ab dem dritten Tag wurden beide Zelllinien mit FSK (5 μ m) stimuliert. Stimulierung der Adenylatzyklase durch FSK steigert die Neurogenese *per se* und die Neubildung von TH+ Zellen zusammen mit Wnt1. Verwendete Antikörper: rabbit-anti-TH (1:500), mouse-anti-MAP2ab (1:200) und Dapi (1:10000) **A** FSK führt zur vermehrten Bildung von TH-positiven Neuronen in der rNSZ+Wnt1 Kultur. Weiterhin wurde ein allgemeiner neurogener Effekt von FSK auf beide Zelllinien beobachtet (**B, C**).

Anhand der erzielten Resultate aus der Immunfärbung auf Gehirnschnitten der BATgal-Reportermaus und dem Effekt, den die Aktivierung des CREB-Signaltransduktionsweges bei gleichzeitiger Stimulation des kanonischen Wnt-Signalweges *in vitro* ausübt, wird die Hypothese der Interaktion beider Signalwege bestärkt. Ob es tatsächlich *in vivo* zu einer solchen Interaktion kommt, wurde aufgrund der Komplexität der notwendigen Experimente noch nicht getestet.

4 Diskussion

4.1 Kanonische Wnt-Signale in der SVZ, dem RMS und dem OB und die Bildung neuer Interneurone des OBs.

In Säugetieren, einschließlich dem Menschen, werden während des gesamten Lebens olfaktorische Neurone neugebildet und ersetzt (Curtis et al., 2005). In Nagetieren erreichen täglich rund 30 000 neugebildete Körnerzellen den olfaktorischen Bulbus. Es werden jedoch nicht nur Körnerzellen gebildet (Ninkovic et al., 2007). Etwa 20% der gesamten Neuroblastenpopulation im SVZ-OB-System des erwachsenen Gehirns differenzieren in periglomeruläre Neurone des olfaktorischen Bulbus (Batista-Brito et al., 2008). Ziel der vorliegenden Dissertation war es, Signalkaskaden zu charakterisieren, die an der Differenzierung und Ausreifung von Vorläuferzellen in spezifische neuronale Subtypen beteiligt sind. Insbesondere sollte die Bildung dopaminergener Neurone aus adulten Stammzellen untersucht werden, da dopaminerge Nervenzellen aus therapeutischer Sicht eine große Relevanz haben. Während des Krankheitsverlaufes von *Morbus Parkinson* degenerieren zunehmend dopaminerge Neurone des Mittelhirns (zur Übersicht: Galvan et al., 2008). Bei der Parkinsonschen Krankheit handelt es sich um eine der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen, die in Deutschland etwa 1% der über 60-jährigen betrifft (<http://www.parkinson-vereinigung.de>). Aus diesem Grund ist die Analyse der dopaminergen Neurogenese speziell im adultem Gehirn von entscheidendem Interesse, da durch das Verständnis der molekularen Prozesse, die die Bildung von dopaminergen Nervenzellen aus Stammzellen steuern, neue Therapieansätze für den Zellersatz gefunden werden könnten. Die Analyse der dopaminergen Neurogenese im adulten Gehirn der Maus könnte für diese Zellersatztherapien weitere Anhaltspunkte liefern. Aus der Embryonalentwicklung der *Substantia nigra* von Hühner und Maus sind bereits eine Vielzahl an Signalmolekülen bekannt, die die Bildung dopaminergener Neurone des Mittelhirns kontrollieren (zur Übersicht: Prakash et al., 2007). Ein entscheidender Faktor in der Entwicklung von dopaminergen Neuronen des Mittelhirns ist Wnt1. Genetische Analysen von Wnt1 in der Maus haben gezeigt, dass dieses Protein an der Bildung der Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze beteiligt ist (MHB = *Mid-Hindbrain-Boundary*, McMahon and Bradley, 1990; Thomas et al., 1991). Weitergehende Untersuchungen

haben eindrücklich gezeigt, dass Wnt1 ein entscheidendes Signalmolekül für die Bildung von dopaminergen Neuronen des Mittelhirns ist (Ille et al., 2005; Rawal et al., 2003; zur Übersicht: Prakash & Wurst, 2006).

Zusätzlich haben Transplantationsexperimente im adulten Mausgehirn gezeigt, dass derzeit noch nicht identifizierte extrinsische Faktoren im SVZ-OB-System vorliegen, die die Differenzierung von adulten Stammzellen in dopaminerge periglomeruläre OB-Interneuronen steuern (Suhonen et al., 1996). Shimogori und Kollegen (2004) konnten mit Hilfe von *in situ* Hybridsierungen zeigen, dass Wnt1 RNA in der Subventrikulären Zone der lateralen Ventrikel von Mäusen im Alter von 20 Tagen vorhanden ist. Welche Funktion Wnt1 auf die dort vorhandenen Stamm- und Vorläuferzellen ausübt, ist bisher nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese getestet, dass Wnt-Proteine an der Bildung neuer dopaminergere Neurone des erwachsenen olfaktorischen Bulbus beteiligt sind und somit extrinsische Faktoren zur Regulation der adulten Neurogenese darstellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Wnt1 im gesamten SVZ-OB-System exprimiert wird. Weiterhin fanden sich bei der Analyse der BATgal-Reportermaus Hinweise darauf, dass der kanonische Wnt-Signalweg während der Neurogenese im SVZ-OB-System in einem Prozentsatz der Zellen aktiv ist, was darauf hindeutet, dass Wnt1 eine Subpopulation an neugeborenen Zellen stimulieren könnte und hierüber Einfluss auf die Neubildung dopaminergere Neurone aus Stammzellen des SVZ-OB-Systems nehmen könnte. Tatsächlich fanden sich Hinweise, dass die Überexpression von Wnt1 *in vitro* die Proliferation von adulten neuralen Stammzellen anregt. Ein besonders wichtiger Befund ist die Beobachtung, dass die Überexpression von Wnt1 *in vitro* ausreichend ist, die Bildung von TH-positiven Nervenzellen aus adulten neuralen Stammzellen zu stimulieren. Zudem konnte in den Wnt1 behandelten Stammzellkulturen die Expression von AADC, einem weiteren Enzym der dopaminergen Biosynthese, nachgewiesen werden. Diese Befunde weisen darauf hin, dass Wnt1 die dopaminerge Neurogenese aus adulten neuralen Stammzellen und auch die Proliferation von Stammzellen stimulieren kann. Ähnliche Resultate wurden 2007 durch Morris und Kollegen erzielt. In ihren Studien konnten sie zeigen, dass die Zellen der SVZ nach einem ischämischen Schlaganfall der Maus stark zu proliferieren beginnen und in die geschädigte Region migrieren. Dieses Phänomen konnte mit einer gesteigerten Wnt/ β -Catenin-Aktivität in der SVZ korreliert werden. Zusätzlich zu den *in vivo*

Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurden auch *in vitro* Experimente durchgeführt. Die Forscher konnten zeigen, dass im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant mehr Neurosphären aus der SVZ der Schlaganfall-Mäuse isoliert werden konnten. Auch durch Adachi und Kollegen (2007) konnte die Abhängigkeit der Proliferation in der SVZ vom β -Catenin Signalweg gezeigt werden. Bei den im Rahmen dieser Doktorarbeit erzielten Ergebnissen handelt es sich um ein ganz ähnliches Phänomen. Da die Neurosphären jedoch isoliert wurden, bevor sie vermehrt mit Wnt1 stimuliert wurden unterscheiden sich die Wnt1-überexprimierenden Neurosphären nicht in ihrer Anzahl von den Kontrollneurosphären sondern in ihrer Größe. Da beide Neurosphärenkulturen gleich behandelt wurden, ist nicht davon auszugehen, dass in einer Kultur Zellen aggregiert haben und in der anderen nicht. Aus Untersuchungen während der neuralen Entwicklung von Mäusen ist bekannt, dass Wnt-Proteine eine Rolle in der Stammzellerhaltung, der Proliferation, der Differenzierung und der Migration der sich entwickelnden Neurone spielen (Ille und Sommer, 2005; Fre et al., 2009). Wnt1 übernimmt demzufolge unterschiedliche Funktionen während der Ausreifung neuer Neurone. So kann auf der einen Seite die Proliferation von mesencephalen Stammzellen gesteigert werden, wie auch auf der anderen Seite die Differenzierung mesencephaler Stammzellen in dopaminerge Neurone begünstigt werden. Dies könnte auch in den hier gezeigten Untersuchungen der Fall sein.

Dass Wnt1 die dopaminerge Neurogenese induzieren kann, wurde durch die Generierung neuer TH-positiver Neurone in der hippokampalen Stammzellkultur gezeigt. Die verwendeten hippokampalen Stammzellen bilden *per se* keine dopaminergen Neuronen, tun dies jedoch durch die Überexpression von Wnt1. Aus Experimenten während der Embryonalentwicklung der Maus ist bekannt, dass Wnt1 ein komplexes genetisches Netzwerk reguliert, das die Bildung von dopaminergen Mittelhirnneuronen kontrolliert (Prakash et al., 2006). Untersuchungen von Castelo-Branco (2005) haben ebenfalls die Beteiligung von Wnt1 an der dopaminergen Differenzierung im Mittelhirn gezeigt.

Überraschenderweise wurde im Gegensatz zu den ausgeprägten Effekten von Wnt1 auf die Neurogenese *in vitro*, nur ein geringer Effekt des Proteins auf die Neurogenese *in vivo* beobachtet: Mäuse, in denen Wnt1 im SVZ-OB-System überexprimiert wurde, zeigten nur geringe Hinweise auf eine gesteigerte Proliferation von Stammzellen oder Neuroblasten und eine nur gering gesteigerte Bildung neuer

dopaminergem Neurone. Diese Diskrepanz zwischen den Ergebnissen lässt sich darauf zurückführen, dass das Zeitfenster für die Analyse falsch gewählt wurde. Aus Markierungs-Experimenten mit ^3H -Thymidin von Bayer (1983) ist bekannt, dass sich ein Plateau in der Bildung neuer dopaminergem Interneurone des OBs im adulten Gehirn nach ca. zwei Monaten einstellt. Zu diesem Zeitpunkt macht der Anteil an dopaminergem Zellen zur gesamten neugebildeten Population an OB-Neuronen 5% aus (Winner et al., 2002). Die von mir durchgeführten Experimente endeten nach 28 Tagen und somit war dieses Plateau noch nicht erreicht. Es wäre interessant in der Zukunft zu charakterisieren, ob die Generierung von neuen dopaminergem Neuronen zu einem späteren Zeitpunkt gesteigert ist.

Um die Wirkung von Wnt1 auf die Proliferation *in vivo* genauer zu charakterisieren, wären zusätzliche Analysen zu früheren Zeitpunkten nach der Injektion notwendig gewesen. 28 Tage nach ihrem Entstehen hat ein Großteil der neugeborenen Zellen bereits den OB erreicht und exprimiert NeuN. Diese Zellen sind bereits postmitotisch und werden in das neuronale Netzwerk des Olfaktorischen Bulbus integriert (zur Übersicht: Zhao et al., 2006; Lledo et al., 2005). Die kritische Phase in welcher die Entscheidung über Leben und Tod der neugebildeten Neurone getroffen wird liegt zwischen 14-28 Tagen (Lledo et al., 2005) und ist somit ebenfalls zum Analysezeitpunkt bereits abgeschlossen. Eventuell ist aufgrund dieser Umstände der Effekt den das Wnt1-Protein auf die Proliferation der Neuroblasten ausübt *in vivo* nach 28 Tagen nicht mehr quantifizierbar. Unabhängig vom Analysezeitpunkt kann die Diskrepanz zwischen den *in vitro* und den *in vivo* erzielten Ergebnisse zur Generierung neuer dopaminergem Neurone ebenfalls daran liegen, dass es weitere interagierende Signalwege gibt, die für die Bildung neuer dopaminergem Neurone notwendig sind. Untersuchungen von Caselo-Branco (2003) haben belegt, dass für die Generierung von dopaminergem Neuronen unterschiedliche Wnt-Proteine zusammenarbeiten, dabei ist es von entscheidender Wichtigkeit, dass die Zellen zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt durch unterschiedliche Wnt-Proteine stimuliert werden. Ein Zusammenwirken unterschiedlicher Wnt-Proteine in der adulten Generierung neuer dopaminergem Neurone ist denkbar, da ebenfalls Wnt3-RNA in Bereichen der SVZ-OB-Systems nachgewiesen werden konnte.

Aus der embryonalen Neurogenese dopaminergem Neuronen des Mittelhirns ist weiterhin bekannt, dass eine Vielzahl an extrinsischen sowie auch intrinsischen Faktoren in diesen Prozess involviert sind (Alberi et al., 2004, Blum, 1998, Farkas et

al., 2003, Hwang et al., 2003, Maxwell et al., 2005, Nunes et al., 2003, Simon et al., 2001, Smidt et al., 2000, Smidt et al., 2004, van den Munckhof et al., 2003, Zetterstrom et al., 1997). Dies legt die Vermutung nahe, dass auch im adulten Gehirn mehrere Signalwege an der Generierung neuer dopaminergere Interneurone des OBs beteiligt sind. Für das erwachsene Mausgehirn ist beispielsweise bekannt, dass Pax6 entscheidend an der Generierung neuer dopaminergere Neurone des olfaktorischen Bulbus aus Stammzellen des SVZ-OB-Systems beteiligt ist (Hack et al., 2003). Ebenso wird die Neurogenese von dopaminergere periglomerulären Interneuronen des OBs zusätzlich durch Dix2 kontrolliert (Brill et al., 2009). Im letzten Kapitel der vorliegenden Arbeit werde ich Möglichkeiten der Interaktion verschiedener Signalwege für die Generierung neuer dopaminergere Neruone des OBs diskutieren. Ein Signalweg, der dabei von besonderem Interesse war, ist der *cAMP response element binding protein*-Signalweg (CREB-Signalweg). Es war bereits bekannt, dass der Transkriptionsfaktor CREB die Expression von TH regulieren kann (Ghee et al., 1997). Somit stellt der CREB-Signalweg einen möglichen Interaktionspartner für den Wnt/ β -Catenin-Signalweg während der Bildung neuer dopaminergere Neurone im adulten OB dar. Zunächst wurde jedoch die Funktion des CREB-Signaltransduktionsweges im adulten neurogenen System untersucht.

.

4.2 Bedeutung des CREB-Signaltransduktionsweges für die Neurogenese im SVZ-OB-System

Der *cAMP response element binding protein*-Signalweg (CREB-Signalweg) ist in viele verschiedene Arten der neuronalen Plastizität involviert (zur Übersicht: Carlezon et al., 2005). Der aktivitätsabhängig regulierte Transkriptionsfaktor wird sowohl in Signalkaskaden einiger Transmitterwege aktiviert, wie auch durch weitere Faktoren wie Wachstumsfaktoren (Vergleiche hierzu Kapitel 1.4). Unterschiedliche Transmittersysteme wie beispielsweise GABA und Glutamat (Platel et al. 2008), 5-HT und Dopamin (Hitochi et al., 2007), Wachstumsfaktoren wie EGF, FGF (Kuhn et al., 1997) und BDNF (Galvao et al., 2008) beeinflussen die Proliferation, die Migration und die Differenzierung von neugebildeten Neuronen im SVZ-OB-System. Vorhergehende Arbeiten haben zudem gezeigt, dass diese Faktoren zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB führen können. Tatsächlich haben Giachino et al. (2005) gezeigt, dass der CREB Signalweg in Zellen des SZ-OB-Systems während der tangentialen Migration aktiv ist und dass die Aktivität des CREB-Signaltransduktionsweges in Zellen, welche in das neurale Netzwerk integriert sind, stark abnimmt. Weiterhin fanden sich erste Hinweise auf einen Einfluss des CREB-Signalwegs auf das Überleben und die Ausreifung neugeborener Neurone. Allerdings konnte die genaue Funktion des CREB-Signalwegs für die Neurogenese nicht vollständig aufgeklärt werden, da der CREB Signalweg in der Studie von Giacchino und Kollegen nicht spezifisch in endogenen Stammzellen des SVZ-OB-Systems und ihren Nachkommen blockiert wurde. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die genaue Funktion des CREB-Signaltransduktionsweges während der adulten Neurogenese im SVZ-OB-System zu bestimmen. Diese Fragestellung wurde mit Hilfe von Retrovirus-vermitteltem Gentransfer bearbeitet. Der retrovirale Gentransfer erlaubt die gezielte genetische Manipulation einzelner Stammzellen und ihrer Nachkommen. Umliegende Zellen, die nicht der neurogenen „*Lineage*“ angehören werden weitestgehend nicht von dem Virus transduziert. Somit können Zell-autonome Mechanismen untersucht werden.

Mittels Immunfärbungen konnte bestätigt werden, dass der CREB-Signaltransduktionsweg vor allem in neugeborene Zellen im RMS aktiv ist solange die Zellen positiv für das Microtubulin-assoziierte Protein *Doublecortin* (DCX) sind. Hingegen ist CREB nicht aktiv in neugebildete Neuronen, welche in das neuronale

Netzwerk des Olfaktorischen Bulbus integriert sind. Nach Inhibition des CREB-Signaltransduktionsweges in den neugeborenen Zellen wurde eine signifikante Reduktion der Anzahl der infizierten Zellen nach dem siebten Tag im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Des Weiteren konnte durch Analysen der Markerproteine DCX und Pax6 belegt werden, dass die Expression beider Proteine ab dem siebten Tag durch die Inhibition von CREB-Signalen reduziert ist. Einige aCREB-transduzierte Zellen überleben diesen Entwicklungszeitraum dennoch und erreichen den OB. In den neuen Zellen des OBs konnte detektiert werden, dass die aCREB-transduzierten Zellen 28 Tage nach ihrem entstehen noch DCX exprimieren, wohingegen die Kontrollzellen die Expression des Neuroblastenmarkerproteins bereits reduziert haben. Weiterhin wurde belegt, dass die aCREB-transduzierten Zellen neuronalen Charakter annehmen, was sich in der Expression von NeuN widerspiegelt. Allerdings zeigen die Zellen, in welchen der CREB-Signaltransduktionsweg inhibiert ist, starke Einschränkungen in der Ausbildung eines Dendritenbaumes und somit ihrer synaptischen Integration.

Die Veränderungen im genetischen Differenzierungsprogramm der Zellen und die Einschränkung der synaptischen Integration der CREB-inhibierten Zellen könnten schließlich zu dem beobachteten Zelltod führen. Allerdings besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass sich die Unterdrückung des CREB-Signaltransduktionsweges auf die Proliferation der transduzierten Zellen auswirkt und somit die Anzahl der aCREB-transduzierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen abnimmt. Tatsächlich haben Grimm und Kollegen (2009) Hinweise auf die Notwendigkeit der CREB-Phosphorylierung für die Proliferation von SVZ-Vorläuferzellen *in vitro* gefunden. Gegen einen starken Effekt der CREB-Inhibition auf die Proliferation spricht allerdings, dass sich die Gesamtzahl der transduzierten Zellen nach der CREB-Inhibition über die Zeit verringert bzw. der Anteil von aCREB-transduzierten Zellen in den Doppelinjektionsversuchen kontinuierlich abnimmt und nur sehr wenige doppelt transduzierte Zellen zu späteren Zeitpunkten auffindbar sind. Aufgrund der Injektionskoordinaten für den RMS kann man davon ausgehen, dass die Proliferation lediglich noch eine untergeordnete Rolle spielt, da die Zellen relativ weit *rostral* transduziert wurden. Zudem haben Jagasia und Kollegen (2009) gezeigt, dass die Inhibition des CREB-Signalweges in neuronalen Stammzellen des Hippokampus keinen Einfluss auf die Proliferation nimmt. Zusammenfassend spricht dies eher für die Möglichkeit, dass Zellen, in denen der CREB-Signaltransduktionsweg unterdrückt

wurde, vermehrt sterben. Dies ist in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Giachino et al. (2005), die ebenfalls nach der Unterdrückung von pCREB-Signalen einen Zelltod in Kultur beobachteten. Der in der hier vorliegenden Studie belegte Zelltod der CREB-inhibierten Zellen könnte dabei seine Ursache in den gezeigten Veränderungen des genetischen Differenzierungsprogramms haben.

Neugeborene Zellen des SVZ-OB-Systems exprimieren unter Standardbedingungen etwa ab dem dritten Tag nach ihrem Entstehen DCX bis zu dem kritischen Intervall zwischen 14 bis 28 Tage. In diesem Zeitintervall erlischt die Expression von DCX allmählich und es wird NeuN exprimiert (Coulliard-Depres et al., 2005; zur Übersicht: Zhao et al., 2008). Während der frühen Phase ihrer Entwicklung scheint die Expression von DCX der neugeborenen Zellen des SVZ-OB-Systems von der Aktivität von pCREB abhängig zu sein. Eine Verminderung der DCX-Expression in den neugebildeten Zellen hat schwerwiegende Folgen für die Zellen. Sie sind in ihrer Migration entlang des RMS behindert und in der Ausbildung ihres neuronalen Phänotyps eingeschränkt (Koizumi et al., 2006). Diese Beeinträchtigung der Zellen könnte in Folge zum Zelltod führen. Ebenfalls die Expression des *paired-domain homeobox* Transkriptionsfaktor Pax6 ist in dieser frühen Phase der Differenzierung durch den Einfluss der CREB-Inhibition vermindert. Bekannt ist aus Analysen der Neuroblasten durch Hack et al. (2005), dass die Mehrzahl der im RMS befindlichen Zellen positiv für Pax6 ist. Pax6 ist ein direktes Zielgen von pCREB, was mit Hilfe von Microarrays in der Maus gezeigt wurde (Conkright et al., 2003). Im SVZ-OB-System besitzt Pax6 eine duale Funktion: zum Einen ist der Transkriptionsfaktor für die Differenzierung der Neuroblasten im RMS *per se* verantwortlich; zum Anderen scheint der Transkriptionsfaktor für die Neubildung von periglomerularen Neuronen (Brill et al., 2008) und für die Erhaltung von dopaminergen periglomerularen Neuronen des OBs erforderlich zu sein, da alle TH-positiven periglomerularen Neurone Pax6 exprimieren (Hack et al., 2005). Analysen des Pax6-Promotors sagen voraus, dass pCREB an den Pax6-Promotor binden kann (welcher mindestens 3 vorhergesagte CRE-Bindestellen aufweist). Durch die experimentelle Inhibition des Transkriptionsfaktors im SVZ-OB-System konnte die adulte Neurogenese stark vermindert werden (Hack et al., 2005), somit kann ebenfalls der Verlust der Pax6-Aktivität in den CREB-inhibierten Zellen zum Zelltod führen.

Insgesamt weisen der Verlust der Expression von DCX und Pax6 darauf hin, dass CREB in dieser frühen Phase der Entwicklung der neugeborenen Zellen im SVZ-OB-

System für die Aufrechterhaltung der neuronalen Genexpression notwendig ist. Wird diese Genexpression durch den Verlust von CREB-Signalen gestört kommt es zu einem frühen Absterben der Zellen. Jedoch überleben einige CREB-inhibierten Zellen diesen Entwicklungszeitraum und erreichen den OB, wo sie interessanterweise auch 28 Tage nach der Injektion der Viren noch zu einem hohen Prozentsatz DCX exprimieren. Die Expression von DCX scheint zu diesem Zeitpunkt folglich nicht mehr von der pCREB-Aktivität abhängig zu sein. DCX wird vornehmlich von unreifen Neuronen exprimiert. Der Verlust der DCX-Expression unter physiologischen Bedingungen findet zwischen Tag 14 bis 28 nach ihrem Entstehen statt und korreliert mit der Ausbildung synaptischer Verbindungen und mit dem Aufkommen glutamatergen Inputs (Carlezon et al., 20003). Nur wenige der untersuchten GFP-transduzierten Kontrollzellen sind nach 28 Tagen noch DCX-positiv. Die vermehrte Expression von DCX in den 28 Tage alten CREB-inhibierten Zellen, führt zu zwei Schlussfolgerungen: Die DCX-Expression ist zu diesem Zeitpunkt CREB-unabhängig oder die Zellen zeigen eine Reifeverzögerung. Die Reifeverzögerung der CREB-inhibierten Zellen und der stark erhöhte Zelltod könnten darauf hin deuten, dass die synaptischen Eingänge, welche die Zellen während ihrer Differenzierung erhalten durch die Unterdrückung von CREB-Signalen nicht in nötigem Umfang in den Zellen verarbeitet werden können, was zu einer Verzögerung ihrer Ausreifung führen könnte. Die CREB-abhängige Dendritogenese beginnt am 14. Tag. Da CREB ein aktivitätsabhängig-regulierter Transkriptionsfaktor ist, liegt die Vermutung nahe, dass Transmittersignale bzw. neuronale Aktivität die Aktivität von CREB regulieren bzw. dass CREB-Signale die neuronale Aktivität in zelluläre / molekulare Programme umsetzen, die für die Erhaltung des neuronalen Phänotyps, die morphologische Entwicklung und das Überleben notwendig sind. Dieses Ergebnis wird durch eine weitere kürzlich von unserer Arbeitsgruppe veröffentlichten Studie gestützt (Jagasia et al., 2009). In den durchgeführten Experimenten konnte für das Überleben der neugeborenen Zellen im *Gyrus dentatus* eine Abhängigkeit von pCREB gezeigt werden. Ebenso ist die Erhaltung des neuronalen Phänotyps abhängig von CREB-Signalen, da durch Inhibition des CREB-Signaltransduktionsweges die CREB-inhibierten Zellen eine signifikante Reduzierung in der DCX-Expression verglichen mit den Kontrollzellen zeigten. Die Autoren konnten ebenfalls eine eingeschränkte Ausbildung eines Dendritenbaums der Zellen, in denen der CREB-Signalweg inhibiert war detektieren. Diese Ergebnisse stehen

teilweise im Einklang mit den hier gezeigten. In den Untersuchungen von Jagasia und Kollegen (2009) konnte des Weiteren belegt werden, dass der CREB-Signaltransduktionsweg in den untersuchten Neuroblasten durch das Wirken des Neurotransmitters GABA vermittelt wird. Neugeborene Zellen im SVZ-OB-System erhalten ab Tag 14 nach ihrem Entstehen GABAerge synaptische Eingänge. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass die neugeborenen Zellen zu dieser Zeit auf die Aktivität von CREB angewiesen sind um die synaptischen Eingänge aus der neuronalen Umgebung verarbeiten zu können.

In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von CREB und die Abhängigkeit der Neurogenese von CREB auf Zeitpunkte fallen, zu denen die neugeborenen Zellen bereits Signale aus der Umgebung erhalten. Es handelt sich dabei um exzitatorische GABA-Signale (Wang et al., 2003) und um ebenfalls exzitatorische Glutamat-Signale über AMPA-Rezeptoren (Platel et al., 2007) welche bereits ab dem siebten Tag nach dem Entstehen der Zellen nachweisbar sind. Diese frühen synaptischen Eingänge sind entscheidend für die vollständige Ausreifung der neugeborenen Zellen. Zu einem späteren Zeitpunkt in der Entwicklung erhalten die Zellen weitere Transmittersignale und werden in das neuronale Netzwerk synaptisch integriert (Toni et al., 2008 zur Übersicht: Lledo et al., 2005). Dies geschieht etwa am 14. Tag der Zellen. Da die molekulare Umsetzung der frühen synaptischen Eingänge durch die Inhibition der CREB-Aktivität wahrscheinlich gestört ist, kann dies zu den Beeinträchtigungen in der morphologischen Integration in das neuronale Netzwerk des OB und schließlich zum Zelltod führen.

Somit ergibt sich folgendes Modell für die Rolle von CREB in der Neurogenese im SVZ-OB-System. CREB beeinflusst die Neurogenese in 2 Phasen. In der frühen Phase kontrolliert CREB die Erhaltung des neuronalen Phänotyps. Die neuronale Schicksalsbestimmung und die Induktion neuronaler Gene wie Pax6 und DCX verläuft zunächst unabhängig von CREB. Jedoch ist ab dem siebten Tag CREB notwendig für die Erhaltung des neuronalen Phänotyps. Als Konsequenz des Verlustes der neuronalen Eigenschaften sterben diese Zellen zwischen dem 7. und 14. Tag ab. Um den 14. Tag integrieren neugeborene Zellen in das neuronale Netzwerk des OBs (Lledo et al., 2003). Auch für diesen Prozess ist CREB notwendig. Der Verlust von CREB führt zu einer verzögerten Ausreifung bzw. einer fehlerhaften

Ausbildung von Dendriten, was unter Umständen zu einem weiteren Verlust von neugeborenen Zellen beitragen könnte.

Nach diesen Untersuchungen steht weiterhin die Frage im Raum, ob die Stimulation von CREB ausreichend ist die Ausreifung und die Integration bzw. das Überleben der Zellen zu stimulieren. Die hier durchgeführten ersten Experimente zur konstitutiven Aktivierung des CREB-Signaltransduktionsweges geben hierüber keinen eindeutigen Aufschluss. Nach der Injektion sind einige Versuchstiere verstorben, so dass die Anzahl an Tieren für eine statistische Auswertung zu gering ist. Um die Auswirkung der konstitutiven CREB-Aktivierung während der adulten Neurogenese nachvollziehen zu können werden die Experimente daher in der Zukunft wiederholt.

Ob pCREB eine Funktion während der Neubildung von dopaminergen Neuronen ausübt, wird im folgenden Kapitel diskutiert.

4.3 Mögliche Interaktions-Signalwege zur Generierung von dopaminergen Neuronen

Der Wnt/ β -Catenin Signalweg kann mit verschiedenen weiteren Signalkaskaden interagieren (Shitashige et al., 2008). Aus den in Kapitel 3.1.3 beschriebenen Experimenten zur Überexpression von Wnt1 kann geschlossen werden, dass das Wnt1-Proteine *in vivo* nicht ausreichend ist, dopaminerge Neurone aus Vorläuferzellen zu generieren. In der Folge wurde daher die Frage überprüft, ob der Wnt/ β -Catenin Signalweg mit dem pCREB-Signaltransduktionsweg bei der Generierung dopaminergener Neurone interagieren könnte. rNSZ zeigten durch die gleichzeitige Expression von Wnt1 und der Stimulation des pCREB-Signalweges durch Applikation des Agonisten der Adenylatzyklase, Forskolin (FSK), einen starken Anstieg in der Generierung neuer dopaminergener Zellen, dies deutet auf eine mögliche Interaktion beider Signalwege hin. Tatsächlich konnte *in vivo* eine geringe Anzahl an Neuroblasten identifiziert werden, in denen sowohl der Wnt/ β -Catenin Signalweg als auch der CREB-Signalweg aktiv ist. Vorausgegangene BrdU-Experimente haben gezeigt, dass lediglich etwa 5% der neugebildeten Neurone der SVZ zu dopaminergen periglomerularen Interneurone werden (Alvarez-Buylla et al., 2008, Winner et al., 2002). Dies bestärkt die Hypothese, dass der CREB-Signalweg mit dem Wnt/ β -Catenin Signalweg auch *in vivo* zur Bildung neuer dopaminergener Neurone interagieren könnte, da nur ein geringer Anteil der neuronalen Vorläuferzellen Aktivität beider Signalwege zeigt.

Es ist bekannt, dass AP-1, CREB und CBP über entsprechende Bindestellen am Promotor die Expression von TH, dem ersten und limitierenden Enzym in der Dopaminsynthese regulieren (Ghee et al., 1998). Dies könnte erklären warum die Anzahl an TH-positiven MAP2ab-positiven Neuronen *in vitro* durch die Stimulation der PKA steigt. Da die dopaminerge Neurogenese *in vivo* jedoch nur durch die gleichzeitige Stimulation der Zellen mit einem kanonischen Wnt-Protein gesteigert wird, unterstreicht dies die Annahme, dass beide Signalwege eventuell interagieren. Bisher ist eine solche Interaktion noch nicht bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass die beiden Cofaktoren CBP und p300 mit dem Transkriptionskomplex aus β -Catenin/TCF/LEF interagieren können (Shitashige et al., 2008), jedoch gibt es keine Anhaltspunkte dass pCREB direkt mit dem Wnt/ β -Catenin Signalweg interagieren könnte. Es konnte *in vitro* belegt werden, dass eine solche Interaktion denkbar ist.

Die gezeigten *in vitro* Studien sind die Grundlage für künftige *in vivo* Untersuchungen, die diese Hypothese beleuchten sollen.

Da die Überexpression des Wnt1-Proteins *in vivo* nicht hinreichend ist dopaminerge Neurone des OBs zu generieren wurden Pilotstudien durchgeführt, die die Hypothese untersuchen, ob unterschiedliche Wnt-Proteine zusammenwirken, um diesen Phänotyp zu generieren. Ein Zusammenwirken unterschiedlicher Wnt-Protein in der embryonalen Neurogenese von dopaminergen Mittelhirnneuronen konnte bereits durch Arbeiten von Castelo-Branco und Kollegen (2003) gezeigt werden. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass Wnt1, Wnt3a und Wnt5a zusammen die Entwicklung von dopaminergen Neuronen des Mittelhirns regulieren. In der vorliegenden Arbeit konnte bereits die RNA für Wnt3 im SVZ-OB-System nachgewiesen werden. Weitere Arbeitsgruppen zeigten dass Wnt5a eine entscheidende Rolle in der Neurogenese von dopaminergen Neuronen des Mittelhirns spielt (Schulte et al., 2005; Andersson et al., 2008). Experimente in hämatopoetischen Stammzellen der Maus haben gezeigt, dass die Bindung von Wnt5a an den entsprechenden Rezeptor eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzt, die kanonische Wnt-Signale inhibieren (Nemeth et al., 2007). In transgenen Mäusen, die eGFP unter dem TH-Promotor exprimieren, wurde beobachtet, dass der TH-Promotor im RMS bereits zu einem Zeitpunkt aktiv ist zu dem noch kein TH-Protein exprimiert wird. Dies legt die Vermutung nahe dass neugeborene Neurone bereits in einem späten Abschnitt des RMS als dopaminerg determiniert werden, jedoch das TH-Protein erst gebildet wird, wenn die Zellen ihre finale Position im Glomerulus eingenommen haben (Saino-Saito, 2008). Dies ist im Hinblick auf die Aktivität des kanonischen Wnt Signalweges ein sehr interessanter Punkt, da in den durchgeführten Färbungen in der BATgal Reportermaus zu keiner Zeit Reporter-positive, TH-positive periglomerulare Neurone gefunden werden konnten (Daten nicht gezeigt). Dieser terminale Differenzierungsschritt scheint also mit dem Verlust der Wnt/ β -Catenin Aktivität einherzugehen. Dieser Umstand könnte für einen Signalweg sprechen, der antagonistisch zum Wnt/ β -Catenin Signalweg zu einem Zeitpunkt aktiv ist, wenn die neugeborenen Zellen den OB bereits erreicht haben, und die terminale Differenzierung in dopaminerge Neurone stimuliert. Experimente in hämatopoethischen Stammzellen der Maus haben gezeigt, dass die Bindung von Wnt5a an den entsprechenden Rezeptor eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzt, die zur Inhibition des Wnt/ β -Catenin Signalweges führt (Nemeth et al., 2007).

In Abbildung 30 sind radioaktive *In Situ* Hybridisierungen (rISH) für TH und Wnt5a dargestellt. Die RNA für TH ist bereits in Zellen, die sich in der Körnerzellschicht des OB befinden vorhanden. Das RNA für Wnt5a (Abb. 30 untere Hälfte) kann in ähnlichen Regionen nachgewiesen werden.

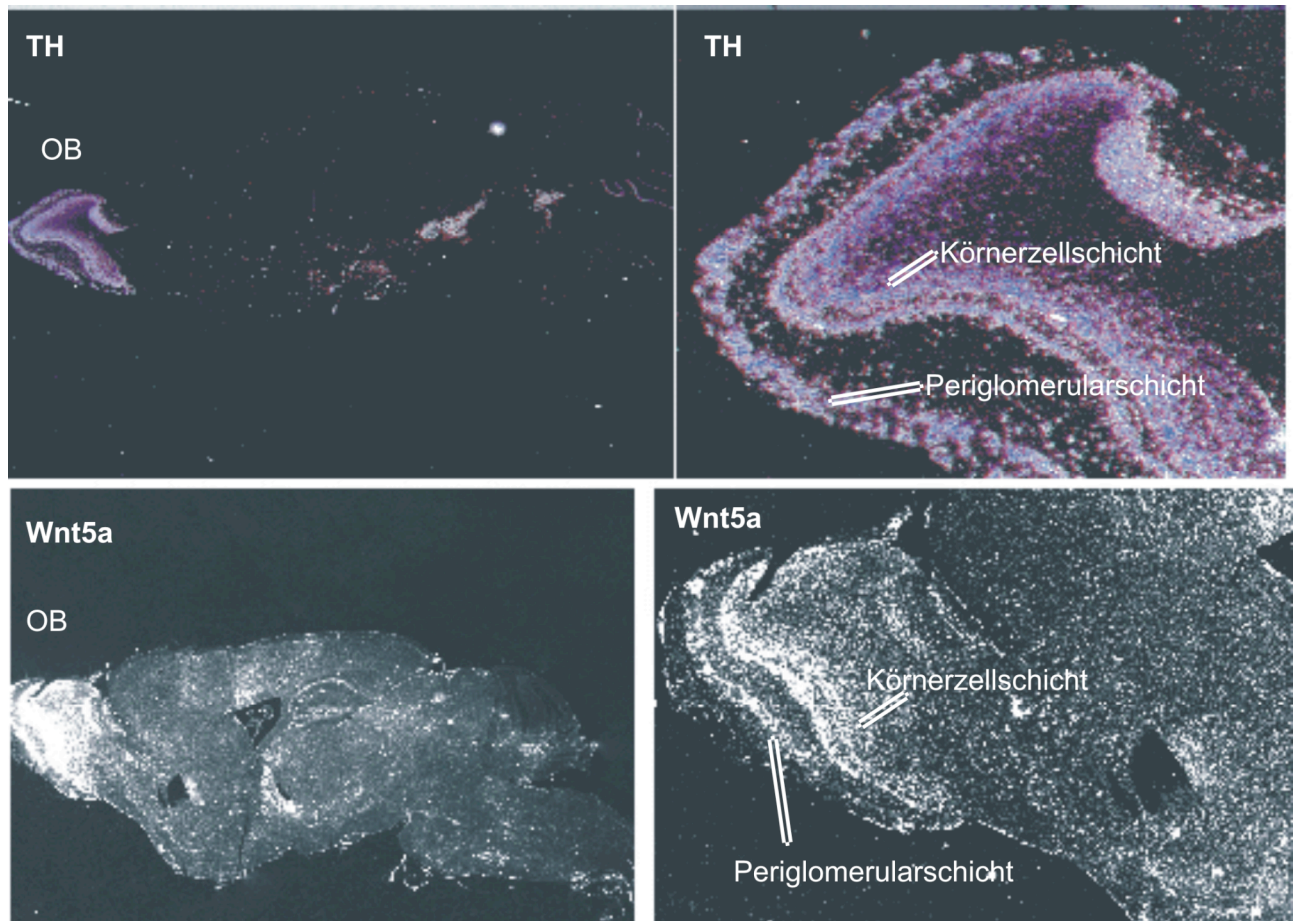


Abb.30: rISH für TH und Wnt5a im Sagittalschnitt des adulten Mausgehirns. Die obere Reihen zeigt Ausnahmen der TH-ISH, die untere zeigt Wnt5a. Im OB liegt die RNA für TH und Wnt5a in gleichen Bereichen vor. Ein Teil der Körnerzellschicht und ebenfalls die Periglomerularschicht ist positiv für beide RNAs (markierte Zonen).

Da sowohl die RNA für TH als auch für Wnt5a in den Glomeruli, sowie in Teilen der Körnerzellschicht des OB nachweisbar ist, ist eine Interaktion zwischen beiden Signalkaskaden denkbar. In Untersuchungen die, die Embryonalentwicklung der *Substantia nigra* betrafen konnte eine solche Interaktion bereits nachgewiesen werden (Andersson et al., 2008).

Ob und wie der Wnt1, Wnt5a und CREB Signalwege bei der Bildung neuer dopaminergere Interneurone für den OB zusammenwirken, muss in zukünftigen Studien geklärt werden.

5 Relevanz der durchgeführten Untersuchungen

Viele verschiedene neurodegenerative Erkrankungen wie beispielsweise *Morbus Alzheimer* oder *Morbus Parkinson* führen zu dem Verlust von Neuronen. Die Parkinsonsche Krankheit führt zum Verlust von dopaminergen Neuronen des Mittelhirns und hat schwerwiegende Folgen für die Erkrankten (zur Übersicht: Galvan et al., 2008). Diese Folgen spiegeln sich in der motorischen Leistungsfähigkeit der Patienten wieder, die mit dem Krankheitsverlauf abnimmt und dem Stärker werden der seelischen Einschränkungen. Oft führt die Krankheit zu Depressionen bei den Patienten, was sich auf den Dopaminmangel im Gehirn zurückführen lässt (zur Übersicht: Lees et al., 2009). Diese Symptome könne in gewissen Grenzen durch die orale Gabe von Dopaminpräparaten behandelt werden (zur Übersicht: Yamamoto et al., 2008). Die Krankheit an sich kann hierdurch allerdings nicht geheilt werden. Eine Möglichkeit für die Heilung dieser Krankheit besteht darin, die verlorenen Neurone im Mittelhirn der Patienten zu ersetzen. Diese Zellersatztherapie kann dadurch durchgeführt werden, dass endogene Stammzellen zur Bildung neuer dopaminergener Neurone angeregt werden oder durch die *in vitro* Generierung von dopaminergen Neuronen und die Transplantation selbiger. In der Region der *Substantia nigra* konnten neurale Vorläuferzellen nachgewiesen (Lie et al., 2002) werden. Diese Zellen bieten somit eine gute Möglichkeit für die endogene Neubildung dopaminergener Neurone. Für die Therapie mit *in vitro* für die Transplantation gezüchteten dopaminergen Neuronen wurden bereits erste Ergebnisse im Menschen vorgestellt (Lindvall et al., 2009), allerdings besteht hierbei die Schwierigkeit, dass es bisher noch nicht gelang eine rein dopaminerge Zellkultur zu generieren. Die Transplantation einer gemischten Kultur aus Stammzellen, Vorläuferzellen, Gliazellen und ausgereiften Neuronen, von denen ein gewisser Prozentsatz den Transmitter Dopamin benutzt stellt ein großes Risiko für die Patienten dar, da die Gefahr besteht, dass sich Tumore bilden könnten. Es ist also von großer Wichtigkeit zu verstehen wie neue Neurone aus Stammzellen im erwachsenen Gehirn generiert werden können und insbesondere die Mechanismen zu charakterisieren, die die dopaminerge Schicksalsdeterminierung regulieren. Die vorliegende Doktorarbeit soll mit der Grundlagenforschung zur Bildung neuer dopaminergener Neurone im adulten Gehirn zum Verständnis dieser komplexen molekularen und genetischen Prozesse beitragen. Eine weitere Schwierigkeit der Zellersatztherapie liegt darin, dass es nicht

ausreichend ist neue Neurone zu generieren, sondern dass diese neuen Zellen sinnvoll an die entsprechenden Stellen im erwachsenen Gehirn in das bestehende neuronale Netzwerk integriert werden müssen. Dies bedeutet, dass die neugebildeten Neurone vollständig wie die schon vorhandenen Zellen synaptisch verknüpft werden müssen, um ihre Funktion ausüben zu können. Die vorliegende Doktorarbeit beschreibt hierzu einen CREB-abhängigen Mechanismus für die synaptische Integration neuer Neurone in das neuronale Netzwerk des Olfaktorischen Bulbus.

Es ist von großer Bedeutung die Prozesse zu verstehen, welche die Schicksalsdeterminierung und die Integration neugeborener Neurone im adulten Gehirn regulieren, da dieses Wissen in Zukunft die Therapiemöglichkeiten von Krankheiten wie beispielsweise *Morbus Parkinson* erweitern könnte.

6 Zusammenfassung

In zwei Bereichen des adulten Gehirns werden während des gesamten Lebens neue Neurone gebildet. Diese adulte Neurogenese beschränkt sich auf die Subgranuläre Zone des *Gyrus Dentatus* des Hippokampus und die Subventrikuläre Zone (SVZ) des lateralen Ventrikels. In der SVZ werden neue Neurone für den Olfaktorischen Bulbus (OB) generiert. Die Neubildung von Nervenzellen unterliegt strengen Regulationsmechanismen. Es konnte belegt werden, dass der kanonische Wnt-Signalweg im SVZ-OB-System aktiv ist und *in vitro* die dopaminerge Neurogenese von adulten Stammzellen steigern kann. *In vivo* sind die Effekte der Steigerung der Wnt/ β -Catenin Aktivität auf die dopaminerge Neurogenese gering. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass neben Wnt-Proteinen weitere regulatorische Mechanismen an der Bildung neuer dopaminergener Neurone des OBs beteiligt sind. Im Zuge dieser Hypothese wurde ein weiterer Signalweg, der *cAMP response element binding protein* (CREB) Signalweg während der Neubildung von Neuronen des OBs untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die phosphorylierte und somit die aktive Form des Transkriptionsfaktors, pCREB, in den Neuroblasten des rostralen Migrationsstromes aktiv ist und die neugeborenen Neurone nach ihrer Integration in das neuronale Netzwerk nicht mehr auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors angewiesen zu sein scheinen. Durch die Unterdrückung des CREB-Signaltransduktionsweges wurde das Differenzierungsprogramm der Neuroblasten drei Tage nach ihrem Entstehen nicht beeinflusst. Am siebten Tag zeigten die Zellen, in denen der CREB-Signalweg unterdrückt war jedoch eine prozentual geringere Expression von DCX und Pax6. Zu diesem Zeitpunkt waren bereits viele aCREB-transduzierte Zellen abgestorben. Es scheint demnach so zu sein, dass in einer sehr frühen Phase die Expression der Differenzierungsgene unabhängig von CREB verläuft, ab dem siebten Tag jedoch abhängig von der pCREB-Aktivität wird. Einige der aCREB-transduzierten Zellen erreichen den OB, wo sie neuronalen Charakter annehmen, sich jedoch nicht vollständig in das neuronale Netzwerk des OBs integrieren. Somit konnte gezeigt werden, dass ebenfalls die Integration neugeborener Neurone in das bestehende Netzwerk des OBs von pCREB abhängig zu sein scheint.

In der vorliegenden Dissertation konnten zwei wichtige Regulationsmechanismen, die extrinsische Regulation der Differenzierung über den Wnt/ β -Catenin Signalweg

und die intrinsische Regulation über pCREB, in der adulten Neurogenese entschlüsselt werden. Zudem wurden erste Hinweise gefunden, dass der Wnt- und der CREB-Signalweg in der dopaminergen Neurogenese zusammenwirken. Diese Pilotexperimente bilden die Grundlage für zukünftige Studien, in denen eine Interaktion beider Signalwege während der Bildung neuer dopaminerg periglomerularer Neurone des Olfaktorischen Bulbus *in vivo* untersucht wird.

7 Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatzyklase
ATF-1	activating transcription factor 1
β-TRCP	β-transducing repeat-containing protein
BrdU	Bromodesoxy Uridin
c	caudal
CAG	CMV-chicken β-actin promotor
CBP	CREB-binding-protein
CK1	Casein Kinase 1
CMV	early promotor des Cytomegalovirus
cpM	counts per Minute
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element binding protein
CREM	cAMP response element modulator
d	dorsal
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DCX	Doublecortin
DOX	Doxycyclin
dpi	days post injction
Dsh	Disheveled
EGF	epthelial growth factor
F	Phenylalanin
FGF	fibrillary growth factor
FSK	Forskolin
Fz-Rezeptor	Frizzeled-Rezeptor
GABA	γ-Aminobuttersäure
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GFP	green fluorescent protein
GSK3	Glykogen Synthetase Kinase 3
HAT	Histon Acetyl Transferase
HC	Hippokampus
IRES	internal ribosomal entry side
LEF	lymphoid enhancer factor

LRP protein	low-density lipoprotein receptor (LDLR)-related
LTR	long terminal repeat
LV	lateraler Ventrikel
MHB	Mid-Hindbrain-Boundary
OB	Olfaktorischer Bulbus
PAX6	paireddomain homeobox transkription factor 6
PBS	Phosphat buffered saline
PCP	planar-cell-polarity
pCREB	phosphoryliertes CREB
PDGF	Platelet-derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase vom Typ A
PSA-NCAM	polysialic-acidic-neural cell adhesion molecule
r	rostral
RFP	red fluorescent protein
rISH	radioaktive in situ Hybridisierung
RMS	rostraler Migrationsstrom
rNSZ	neurale Stammzellen aus der Ratte
SGZ	Subgranuläre Zone
Shh	Sonic hedgehog
SVZ	Subventrikuläre Zone
TRB	Tris-buffered saline
TCF	T-cell factor
TGF	transforming growth factor
TH	Tyrosinhydroxylase
v	ventral
Wnt	wingless
WRPE	Woodchick Hepatitisvirus posttranskriptionale Regulationseinheit
Y	Tyrosin

8 Literaturverzeichnis

- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R (1997) beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 16:3797-3804.
- Adachi K, Mirzadeh Z, Sakaguchi M, Yamashita T, Nikolcheva T, Gotoh Y, Peltz G, Gong L, Kawase T, Alvarez-Buylla A, Okano H, Sawamoto K (2007) Beta-catenin signaling promotes proliferation of progenitor cells in the adult mouse subventricular zone. *Stem Cells* 25: 2827-2836.
- Ahlenius H, Visan V, Kokaia M, Lindvall O, Kokaia Z (2009) Neural stem and progenitor cells retain their potential for proliferation and differentiation into functional neurons despite lower number in aged brain. *J Neurosci* 29:4408-4419.
- Ahn S, Olive M, Aggarwal S, Krylov D, Ginty DD, Vinson C (1998) A dominant-negative inhibitor of CREB reveals that it is a general mediator of stimulus-dependent transcription of c-fos. *Mol Cell Biol* 18:967-977.
- Alberi L, Sgado P, Simon HH (2004) Engrailed genes are cell-autonomously required to prevent apoptosis in mesencephalic dopaminergic neurons. *Development* 131:3229-3236.
- Alonso M, Viollet C, Gabellec MM, Meas-Yedid V, Olivo-Marin JC, Lledo PM (2006) Olfactory discrimination learning increases the survival of adult-born neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 26:10508-10513.
- Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319-335.
- Altman J, Das GD (1967) Postnatal neurogenesis in the guinea-pig. *Nature* 214:1098-1101.
- Alvarez-Buylla A, Lois C (1995) Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates. *Stem Cells* 13:263-272.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22:629-634.
- Alvarez-Buylla A, Kohwi M, Nguyen TM, Merkle FT (2008) The heterogeneity of adult neural stem cells and the emerging complexity of their niche. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73:357-365.
- Andersson ER, Prakash N, Cajanek L, Minina E, Bryja V, Bryjova L, Yamaguchi TP, Hall AC, Wurst W, Arenas E (2008) Wnt5a regulates ventral midbrain

- morphogenesis and the development of A9-A10 dopaminergic cells in vivo. *PLoS One* 3:e3517.
- Andrews GL, Yun K, Rubenstein JL, Mastick GS (2003) Dlx transcription factors regulate differentiation of dopaminergic neurons of the ventral thalamus. *Mol Cell Neurosci* 23:107-120.
- Arenas E (2005) Engineering a dopaminergic phenotype in stem/precursor cells: role of Nurr1, glia-derived signals, and Wnts. *Ann N Y Acad Sci* 1049:51-66.
- Bannister AJ, Schneider R, Kouzarides T (2002) Histone methylation: dynamic or static? *Cell* 109:801-806.
- Batista-Brito R, Close J, Machold R, Fishell G (2008) The distinct temporal origins of olfactory bulb interneuron subtypes. *J Neurosci* 28:3966-3975.
- Bayer SA (1983) 3H-thymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb. *Exp Brain Res* 50:329-340.
- Bergami M, Berninger B, Canossa M (2009) Conditional deletion of TrkB alters adult hippocampal neurogenesis and anxiety-related behavior. *Commun Integr Biol* 2:14-16.
- Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W (1996) Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382:638-642.
- Biffi A, Naldini L (2005) Gene therapy of storage disorders by retroviral and lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 16:1133-1142.
- Blum M (1998) A null mutation in TGF-alpha leads to a reduction in midbrain dopaminergic neurons in the substantia nigra. *Nat Neurosci* 1:374-377.
- Bolteus AJ, Garganta C, Bordey A (2005) Assays for measuring extracellular GABA levels and cell migration rate in acute slices. *Brain Res Brain Res Protoc* 14:126-134.
- Brill MS, Snappyan M, Wohlfrom H, Ninkovic J, Jawerka M, Mastick GS, Ashery-Padan R, Saghatelian A, Berninger B, Gotz M (2008) A dlx2- and pax6-dependent transcriptional code for periglomerular neuron specification in the adult olfactory bulb. *J Neurosci* 28:6439-6452.
- Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo PM (2003) Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci* 6:507-518.

- Carleton A, Rochefort C, Morante-Oria J, Desmaisons D, Vincent JD, Gheusi G, Lledo PM (2002) Making scents of olfactory neurogenesis. *J Physiol Paris* 96:115-122.
- Carlezon WA, Jr., Duman RS, Nestler EJ (2005) The many faces of CREB. *Trends Neurosci* 28:436-445.
- Carr VM, Farbman AI (1992) Ablation of the olfactory bulb up-regulates the rate of neurogenesis and induces precocious cell death in olfactory epithelium. *Exp Neurol* 115:55-59.
- Castelo-Branco G, Wagner J, Rodriguez FJ, Kele J, Sousa K, Rawal N, Pasolli HA, Fuchs E, Kitajewski J, Arenas E (2003) Differential regulation of midbrain dopaminergic neuron development by Wnt-1, Wnt-3a, and Wnt-5a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12747-12752.
- Chi CL, Martinez S, Wurst W, Martin GR (2003) The isthmic organizer signal FGF8 is required for cell survival in the prospective midbrain and cerebellum. *Development* 130: 2633-2644.
- Conkright MD, Guzman E, Flechner L, Su AI, Hogenesch JB, Montminy M (2003) Genome-wide analysis of CREB target genes reveals a core promoter requirement for cAMP responsiveness. *Mol Cell* 11:1101-1108.
- Consiglio A, Gritti A, Dolcetta D, Follenzi A, Bordignon C, Gage FH, Vescovi AL, Naldini L (2004) Robust in vivo gene transfer into adult mammalian neural stem cells by lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:14835-14840.
- Corotto FS, Henegar JR, Maruniak JA (1994) Odor deprivation leads to reduced neurogenesis and reduced neuronal survival in the olfactory bulb of the adult mouse. *Neuroscience* 61:739-744.
- Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG, Aigner L (2005) Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci* 21:1-14.
- Cremer H, Lange R, Christoph A, Plomann M, Vopper G, Roes J, Brown R, Baldwin S, Kraemer P, Scheff S, et al. (1994) Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* 367:455-459.
- Curtis MA, Penney EB, Pearson J, Dragunow M, Connor B, Faull RL (2005) The distribution of progenitor cells in the subependymal layer of the lateral ventricle in the normal and Huntington's disease human brain. *J Neurosci* 132: 777-788.

- Dash PK, Karl KA, Colicos MA, Prywes R, Kandel ER (1991) cAMP response element-binding protein is activated by Ca²⁺/calmodulin- as well as cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5061-5065.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17:5046-5061.
- Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2002) EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36:1021-1034.
- Du K, Asahara H, Jhala US, Wagner BL, Montminy M (2000) Characterization of a CREB gain-of-function mutant with constitutive transcriptional activity in vivo. *Mol Cell Biol* 20:4320-4327.
- Dworkin S, Malaterre J, Hollande F, Darcy PK, Ramsay RG, Mantamadiotis T (2009) cAMP Response Element Binding Protein Is Required for Mouse Neural Progenitor Cell Survival and Expansion. *Stem Cells* 27:1347-1357.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn A M, Nordborg C, Peterson DA, Gage, F H (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *NatMed* 4: 1313-1317
- Farkas LM, Dunker N, Roussa E, Unsicker K, Kriegstein K (2003) Transforming growth factor-beta(s) are essential for the development of midbrain dopaminergic neurons in vitro and in vivo. *J Neurosci* 23:5178-5186.
- Fre S, Vignjevic D, Schoumacher M, Duffy SL, Janssen KP, Robine S, Louvard D (2008) Epithelial morphogenesis and intestinal cancer: new insights in signaling mechanisms. *Adv Cancer Res* 100:85-111.
- Fuerer C, Nusse R, Ten Berge D (2008) Wnt signalling in development and disease. Max Delbruck Center for Molecular Medicine meeting on Wnt signaling in Development and Disease. *EMBO Rep* 9:134-138.
- Galvan A, Wichmann T (2008) Pathophysiology of parkinsonism. *Clin Neurophysiol* 119:1459-1474.
- Galvao RP, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2008) Brain-derived neurotrophic factor signaling does not stimulate subventricular zone neurogenesis in adult mice and rats. *J Neurosci* 28:13368-13383.

- Garthe A, Behr J, Kempermann G (2009) Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS One* 4:e5464.
- Ghee M, Baker H, Miller JC, Ziff EB (1998) AP-1, CREB and CBP transcription factors differentially regulate the tyrosine hydroxylase gene. *Brain Res Mol Brain Res* 55:101-114.
- Giachino C, De Marchis S, Giampietro C, Parlato R, Perroteau I, Schutz G, Fasolo A, Peretto P (2005) cAMP response element-binding protein regulates differentiation and survival of newborn neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 25:10105-10118.
- Giles RH, van Es JH, Clevers H (2003) Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1653:1-24.
- Grimm I, Messemer N, Stanke M, Gachet C, Zimmermann H (2009) Coordinate pathways for nucleotide and EGF signaling in cultured adult neural progenitor cells. *J Cell Sci* 122:2524-2533.
- Hack MA, Saghatelian A, de Chevigny A, Pfeifer A, Ashery-Padan R, Lledo PM, Gotz M (2005) Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nat Neurosci* 8:865-872.
- Hack MA, Sugimori M, Lundberg C, Nakafuku M, Gotz M (2004) Regionalization and fate specification in neurospheres: the role of Olig2 and Pax6. *Mol Cell Neurosci* 25:664-678.
- Hecht A, Vleminckx K, Stemmler MP, van Roy F, Kemler R (2000) The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates. *EMBO J* 19:1839-1850.
- Hirabayashi Y, Itoh Y, Tabata H, Nakajima K, Akiyama T, Masuyama N, Gotoh Y (2004) The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development* 131:2791-2801.
- Hwang DY, Ardayfio P, Kang UJ, Semina EV, Kim KS (2003) Selective loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra of Pitx3-deficient aphakia mice. *Brain Res Mol Brain Res* 114:123-131.
- Ille F, Sommer L (2005) Wnt signaling: multiple functions in neural development. *Cell Mol Life Sci* 62:1100-1108.
- Jagasia R, Steib K, Englberger E, Herold S, Faus-Kessler T, Saxe M, Gage FH, Song H, Lie DC (2009) GABA-cAMP response element-binding protein

- signaling regulates maturation and survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* 29:7966-7977.
- Jessberger S, Gage FH (2008) Stem-cell-associated structural and functional plasticity in the aging hippocampus. *Psychol Aging* 23:684-691.
- Jessberger S, Toni N, Clemenson GD, Jr., Ray J, Gage FH (2008) Directed differentiation of hippocampal stem/progenitor cells in the adult brain. *Nat Neurosci* 11:888-893.
- Kaneko N, Sawamoto K (2009) Adult neurogenesis and its alteration under pathological conditions. *Neurosci Res* 63:155-164.
- Kaplan MS, Hinds JW (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197:1092-1094.
- Katoh M (2005) WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review). *Oncol Rep* 14:1583-1588.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493-495.
- Kempermann G, Gage FH (2002) Genetic determinants of adult hippocampal neurogenesis correlate with acquisition, but not probe trial performance, in the water maze task. *Eur J Neurosci* 16:129-136.
- Kim WR, Kim Y, Eun B, Park OH, Kim H, Kim K, Park CH, Vinsant S, Oppenheim RW (2007) Impaired migration in the rostral migratory stream but spared olfactory function after the elimination of programmed cell death in Bax knock-out mice. *J Neurosci* 27: 14392-14403.
- Koizumi H, Higginbotham H, Poon T, Tanaka T, Brinkman BC, Gleeson JG (2006) Doublecortin maintains bipolar shape and nuclear translocation during migration in the adult forebrain *Nat Neurosci* 9: 779-786
- Kohl Z, Kandasamy M, Winner B, Aigner R, Gross C, Couillard-Despres S, Bogdahn U, Aigner L, Winkler J (2007) Physical activity fails to rescue hippocampal neurogenesis deficits in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Brain Res* 1155:24-33.
- Kohn AD, Moon RT (2005) Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium* 38:439-446.
- Kohwi M, Osumi N, Rubenstein JL, Alvarez-Buylla A (2005) Pax6 is required for making specific subpopulations of granule and periglomerular neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 25:6997-7003.

- Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH (1997) Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* 17:5820-5829.
- Lee KJ, Kim SJ, Kim SW, Choi SH, Shin YC, Park SH, Moon BH, Cho E, Lee MS, Chun BG, Shin KH (2006) Chronic mild stress decreases survival, but not proliferation, of new-born cells in adult rat hippocampus. *Exp Mol Med* 38:44-54.
- Lees AJ, Hardy J, Revesz T (2009) Parkinson's disease. *Lancet* 373:2055-2066.
- Li D, Chen N, McMichael AJ, Screaton GR, Xu XN (2008) Generation and characterisation of CD1d tetramer produced by a lentiviral expression system. *J Immunol Methods* 330:57-63.
- Li GD, Fang JX, Chen HZ, Luo J, Zheng ZH, Shen YM, Wu Q (2007) Negative regulation of transcription coactivator p300 by orphan receptor TR3. *Nucleic Acids Res* 35:7348-7359.
- Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Desire L, Mira H, Consiglio A, Lein ES, Jessberger S, Lansford H, Dearie AR, Gage FH (2005) Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* 437:1370-1375.
- Lie DC, Dziewczapolski G, Willhoite AR, Kaspar BK, Shults CW, Gage FH (2002) The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *J Neurosci* 22:6639-6649.
- Lindvall O, Kokaia Z (2009) Prospects of stem cell therapy for replacing dopamine neurons in Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci* 30: 260-7.
- Liu X, Wang Q, Haydar TF, Bordey A (2005) Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci* 8:1179-1187.
- Liu YP, Lang BT, Baskaya MK, Dempsey RJ, Vemuganti R (2009) The potential of neural stem cells to repair stroke-induced brain damage. *Acta Neuropathol* 117:469-480.
- Lledo PM, Saghatelian A (2005) Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: joining the network, life-death decisions, and the effects of sensory experience. *Trends Neurosci* 28:248-254.
- Lledo PM, Gheusi G, Vincent JD (2005) Information processing in the mammalian olfactory system. *Physiol Rev* 85:281-317.

- Lois C, Alvarez-Buylla A (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145-1148.
- Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1996) Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271:978-981.
- Lonze BE, Ginty DD (2002) Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35:605-623.
- Maretto S, Cordenonsi M, Dupont S, Braghetta P, Broccoli V, Hassan AB, Volpin D, Bressan GM, Piccolo S (2003) Mapping Wnt/beta-catenin signaling during mouse development and in colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3299-3304.
- Maxwell SL, Li M (2005) Midbrain dopaminergic development in vivo and in vitro from embryonic stem cells. *J Anat* 207:209-218.
- Mayr B, Montminy M (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:599-609.
- Megason SG, McMahon AP (2002) A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. *Development* 129:2087-2098.
- Mendoza-Torreblanca JG, Martinez-Martinez E, Tapia-Rodriguez M, Ramirez-Hernandez R, Gutierrez-Ospina G (2008) The rostral migratory stream is a neurogenic niche that predominantly engenders periglomerular cells: in vivo evidence in the adult rat brain. *Neurosci Res* 60:289-299.
- Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C, Gonzalez-Perez O, Rowitch D, Alvarez-Buylla A (2006) Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci* 26:7907-7918.
- Merkle FT, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A (2007) Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science* 317: 381-384
- Ming GL, Song H (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 28:223-250.
- Mochizuki H, Schwartz JP, Tanaka K, Brady RO, Reiser J (1998) High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells. *J Virol* 72:8873-8883.
- Miyagishi M, Fujii R, Hatta M, Yoshida E, Araya N, Nagafuchi A, Ishihara S, Nakajima T, Fukamizu A (2000) Regulation of Lef-mediated transcription and p53-dependent pathway by associating beta-catenin with CBP/p300. *J Biol Chem* 275:35170-35175.

- Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destree O, Clevers H (1996) XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 86:391-399.
- Montminy MR, Bilezikjian LM (1987) Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature* 328:175-178.
- Moon RT (2004) Teaching resource. Canonical Wnt/beta-catenin signaling. *Sci STKE* 2004:tr5.
- Morris DC, Zhang ZG, Wang Y, Zhang RL, Gregg S, Liu XS, Chopp M (2007) Wnt expression in the adult rat subventricular zone after stroke. *Neurosci Lett* 418:170-174.
- Mouret A, Gheusi G, Gabellec MM, de Chaumont F, Olivo-Marin JC, Lledo PM (2008) Learning and survival of newly generated neurons: when time matters. *J Neurosci* 28:11511-11516.
- Nakashima A, Katagiri T, Tamura M (2005) Cross-talk between Wnt and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) signaling in differentiation pathway of C2C12 myoblasts. *J Biol Chem* 280:37660-37668.
- Nemeth MJ, Topol L, Anderson SM, Yang Y, Bodine DM (2007) Wnt5a inhibits canonical Wnt signaling in hematopoietic stem cells and enhances repopulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15436-15441.
- Ninkovic J, Mori T, Gotz M (2007) Distinct modes of neuron addition in adult mouse neurogenesis. *J Neurosci* 27:10906-10911.
- Nordheim A (1994) Transcription factors. CREB takes CBP to tango. *Nature* 370:177-178.
- Nunes I, Tovmasian LT, Silva RM, Burke RE, Goff SP (2003) Pitx3 is required for development of substantia nigra dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4245-4250.
- Ono K, Tomasiewicz H, Magnuson T, Rutishauser U (1994) N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. *Neuron* 13:595-609.
- Ortega-Perez I, Murray K, Lledo PM (2007) The how and why of adult neurogenesis. *J Mol Histol* 38:555-562.
- Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sanchez P, Brionne TC, Herzberg CD, Gitton Y, Carleton A, Alvarez-Buylla A, Ruiz i Altaba A (2005) Sonic hedgehog controls

- stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* 132: 335-344
- Gage, F. H., Parmar M, Sjoberg A, Bjorklund A, Kokaia Z (2003) Phenotypic and molecular identity of cells in the adult subventricular zone. *in vivo* and after expansion *in vitro*. *Mol Cell Neurosci* 24:741-752.
- Petreau L, Alvarez-Buylla A (2002) Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci* 22:6106-6113.
- Platel JC, Lacar B, Bordey A (2007) GABA and glutamate signaling: homeostatic control of adult forebrain neurogenesis. *J Mol Histol* 38:303-311.
- Prakash N, Wurst W (2007) A Wnt signal regulates stem cell fate and differentiation *in vivo*. *Neurodegener Dis* 4:333-338.
- Prakash N, Brodski C, Naserke T, Puelles E, Gogoi R, Hall A, Panhuysen M, Echevarria D, Sussel L, Weisenhorn DM, Martinez S, Arenas E, Simeone A, Wurst W (2006) A Wnt1-regulated genetic network controls the identity and fate of midbrain-dopaminergic progenitors *in vivo*. *Development* 133: 89-98.
- Ramezani A, Hawley RG (2002b) Overview of the HIV-1 Lentiviral Vector System. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 16:Unit 16 21.
- Ramezani A, Ma XZ, Nazari R, Joshi S (2002) Development and testing of retroviral vectors expressing multimeric hammerhead ribozymes targeted against all major clades of HIV-1. *Front Biosci* 7:a29-36.
- Rawal N et al. (2003) New parkin mutations and atypical phenotypes in families with autosomal recessive parkinsonism. *Neurology* 60:1378-1381.
- Rhodes JS, van Praag H, Jeffrey S, Girard I, Mitchell GS, Garland T, Jr., Gage FH (2003) Exercise increases hippocampal neurogenesis to high levels but does not improve spatial learning in mice bred for increased voluntary wheel running. *Behav Neurosci* 117:1006-1016.
- Rocheffort C, Gheusi G, Vincent JD, Lledo PM (2002) Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *J Neurosci* 22:2679-2689.
- Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, Murcia NS, Garcia-Verdugo JM, Marin O, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M, Okano H, Alvarez-Buylla A (2006) New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 311:629-632.

- Saino-Saito S (2008) Visualization of spatiotemporal differentiation of dopaminergic interneurons in adult mouse olfactory bulb using transgenic mice. *Anat Sci Int* 83:228-231.
- Schulte G, Bryja V, Rawal N, Castelo-Branco G, Sousa KM, Arenas E (2005) Purified Wnt-5a increases differentiation of midbrain dopaminergic cells and dishevelled phosphorylation. *J Neurochem* 92:1550-1553.
- Sheng M, Thompson MA, Greenberg ME (1991) CREB: a Ca²⁺-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science* 252:1427-1430.
- Shimogori T, VanSant J, Paik E, Grove EA (2004) Members of the Wnt, Fz, and Frp gene families expressed in postnatal mouse cerebral cortex. *J Comp Neurol* 473:496-510.
- Shitashige M, Hirohashi S, Yamada T (2008) Wnt signaling inside the nucleus. *Cancer Sci* 99:631-637.
- Siebzehnruhl FA, Blumcke I (2008) Neurogenesis in the human hippocampus and its relevance to temporal lobe epilepsies. *Epilepsia* 49 Suppl 5:55-65.
- Simon HH, Saueressig H, Wurst W, Goulding MD, O'Leary DD (2001) Fate of midbrain dopaminergic neurons controlled by the engrailed genes. *J Neurosci* 21:3126-3134.
- Smidt MP, Smits SM, Burbach JP (2003) Molecular mechanisms underlying midbrain dopamine neuron development and function. *Eur J Pharmacol* 480:75-88.
- Smidt MP, Asbreuk CH, Cox JJ, Chen H, Johnson RL, Burbach JP (2000) A second independent pathway for development of mesencephalic dopaminergic neurons requires Lmx1b. *Nat Neurosci* 3:337-341.
- Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D, Dixon RA (1994) Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem* 63:101-132.
- Sun H, Lu J, Xu X, Jin S, Wang X, Wei L, Dong M, Huang B (2005) Histone acetyltransferase activity of p300 enhances the activation of IL-18 promoter. *J Cell Biochem* 94:566-572.
- Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, Gage FH (1996) Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature* 383:624-627.
- Takemaru KI, Moon RT (2000) The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *J Cell Biol* 149:249-254.

- Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, Hess F, Saint-Jeannet JP, He X (2000) LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407:530-535.
- Tashiro A, Zhao C, Gage FH (2006) Retrovirus-mediated single-cell gene knockout technique in adult newborn neurons in vivo. *Nat Protoc* 1:3049-3055.
- Teo JL, Ma H, Nguyen C, Lam C, Kahn M (2005) Specific inhibition of CBP/beta-catenin interaction rescues defects in neuronal differentiation caused by a presenilin-1 mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12171-12176.
- Thomas KR, Musci TS, Neumann PE, Capecchi MR (1991) Swaying is a mutant allele of the proto-oncogene Wnt-1. *Cell* 67:969-976.
- Thomas RM, Peterson DA (2008) Even neural stem cells get the blues: evidence for a molecular link between modulation of adult neurogenesis and depression. *Gene Expr* 14:183-193.
- Toni N, Laplagne DA, Zhao C, Lombardi G, Ribak CE, Gage FH, Schinder AF (2008) Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat Neurosci* 11:901-907.
- van den Munckhof P, Luk KC, Ste-Marie L, Montgomery J, Blanchet PJ, Sadikot AF, Drouin J (2003) Pitx3 is required for motor activity and for survival of a subset of midbrain dopaminergic neurons. *Development* 130:2535-2542.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH (1999) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2:266-270.
- Vollmayr B, Mahlstedt MM, Henn FA (2007) Neurogenesis and depression: what animal models tell us about the link. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 257:300-303.
- Wachowiak M, Shipley MT (2006) Coding and synaptic processing of sensory information in the glomerular layer of the olfactory bulb. *Semin Cell Dev Biol* 17:411-423.
- Wachs FP, Winner B, Couillard-Despres S, Schiller T, Aigner R, Winkler J, Bogdahn U, Aigner L (2006) Transforming growth factor-beta1 is a negative modulator of adult neurogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:358-370.
- Wang DD, Krueger DD, Bordey A (2003) GABA depolarizes neuronal progenitors of the postnatal subventricular zone via GABAA receptor activation. *J Physiol* 550:785-800.

- Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K, O'Keefe L, Schwartz S, Vaizel-Ohayon D, Schejter E, Tomlinson A, DiNardo S (2000) arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wntless signalling. *Nature* 407:527-530.
- Winner B, Cooper-Kuhn CM, Aigner R, Winkler J, Kuhn HG (2002) Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 16:1681-1689.
- Winner B, Lie DC, Rockenstein E, Aigner R, Aigner L, Masliah E, Kuhn HG, Winkler J (2004) Human wild-type alpha-synuclein impairs neurogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:1155-1166.
- Yamaguchi M, Mori K (2005) Critical period for sensory experience-dependent survival of newly generated granule cells in the adult mouse olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9697-9702.
- Yamaguchi M, Saito H, Suzuki M, Mori K (2000) Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-GFP transgenic mice. *Neuroreport* 11:1991-1996.
- Yamamoto M, Schapira AH (2008) Dopamine agonists in Parkinson's disease. *Expert Rev Neurother* 8:671-677.
- Zetterstrom RH, Solomin L, Jansson L, Hoffer BJ, Olson L, Perlmann T (1997) Dopamine neuron agenesis in *Nurr1*-deficient mice. *Science* 276:248-250.
- Zhao B, Zhong M, Jin K (2008a) Neurogenesis and neurodegenerative diseases in human. *Panminerva Med* 50:55-64.
- Zhao C, Deng W, Gage FH (2008b) Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132:645-660.
- Zhao C, Teng EM, Summers RG, Jr., Ming GL, Gage FH (2006) Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 26:3-11.
- Zheng W, Nowakowski RS, Vaccarino FM (2004) Fibroblast growth factor 2 is required for maintaining the neural stem cell pool in the mouse brain subventricular zone. *Dev Neurosci* 26:181-196.

9 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Wurst für die Möglichkeit zur Erlangung des Dokortitels am Institut für Entwicklungsgenetik.

Herzlichsten Dank an Herrn Dr. Chichung Lie für die Betreuung während meiner Promotionszeit und viele inspirierende Gespräche, sowie aufbauende Worte.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. Ravi Jagasia für die starke Unterstützung und viele kreative Raucherpausen bedanken.

Zusätzlich gilt mein Dank Frau Katrin Wassmer, Bärbel Eble-Müllerschön sowie Miriam Homburg für die Unterstützung in technischen Belangen.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „adulte Neurogenese“ für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Sowie den Mitarbeitern des Instituts für Entwicklungsgenetik.

Besonderer Dank gilt ebenfalls meinem Bruder Sascha Herold für die kreative Hilfe (Danke für die hübsche Maus!) und der Unterstützung während kritischer Phasen in der Kinderbetreuung.

Natürlich möchte ich mich auch bei meinen Eltern, meinen Brüdern & Großeltern für die mentale Unterstützung bedanken.

Besonderer Dank gilt meinem Lebenspartner Robin Zur Nieden, der mir stets hilfe reich zur Seite stand und meinem Sohn Elijah Zur Nieden für sein Lachen.

10 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegt Arbeit mit dem Titel:

Regulationsmechanismen für die adulte Neurogenese von Interneuronen des olfaktorischen Bulbus.

Im Helmholtzzentrum München, Institut für Entwicklungsgenetik, Arbeitsgruppe Adulte Neurogenese

Unter der Anleitung und Betreuung durch Herrn Prof. Dr. W. Wurst und Herrn Dr. D. C. Lie ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Sabine Herold