

**Zelluläre Kontrolle adulter Neurogenese -
Expression und Funktion des VEGF-Rezeptor-1
(Flt-1) im adulten Säugerhirn**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Ina Mareike Wittko

geb. am 7. März 1978 in Kirn/Nahe

Mainz, 11. Dezember 2007

Diese Forschungsarbeit wurde gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Projekt PL158/5-3 im Rahmen des SPP 1109) und die German Israeli Foundation (GIF I-740).

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Februar 2008

**„Alle Vermehrung unseres Wissens endet nicht mit einem
Schlusspunkt, sondern mit Fragezeichen.“**

**- Hermann Hesse -
(1877-1962)**

1 Verzeichnisse

1.1 Inhaltsverzeichnis

1 Verzeichnisse	1
1.1 Inhaltsverzeichnis	1
1.2 Abbildungsverzeichnis	4
1.3 Abkürzungsverzeichnis	6
2 Einleitung	8
2.1 Überblick: Medizinische Relevanz adulter Neurogenese	8
2.2 Stammzellen	9
2.3 Neurogenese – Entstehung von Neuronen aus endogenen neuronalen Stammzellen des ZNS	10
2.3.1 Neurale Stammzellen des sich entwickelnden Säugerhirns	12
2.3.2 Neurale Stammzellen im adulten Gehirn – neurogene Regionen	13
2.3.2.1 Zelluläre Komposition der adulten Subventrikulären Zone (SVZ)	14
2.3.2.2 Der Rostralmigratorische Strom (RMS)	16
2.3.2.3 Entstehung neuer Interneurone im Olfaktorischen Bulbus (OB)	18
2.3.2.4 Adulte hippocampale Neurogenese	19
2.3.3 Zelluläre Regulation adulter Neurogenese - neurogene Nischen	20
2.3.3.1 Gliale Regulation adulter Neurogenese	20
2.3.3.2 Die Neurovaskuläre Nische	22
2.4 Der Vaskuläre Endothelzellwachstumsfaktor: Die VEGF-Familie und ihre Rezeptoren	22
2.4.1 Die Liganden des VEGF/VEGF-Rezeptor-Systems und ihre Rolle im vaskulären System	22
2.4.1.1 Vaskulärer Endothelzellwachstumsfaktor-A (VEGF-A)	23
2.4.1.2 Vaskulärer Endothelzellwachstumsfaktor-B (VEGF-B)	24
2.4.1.3 Plazenta-Wachstumsfaktor (PlGF)	25
2.4.2 Die VEGF-Rezeptoren	26
2.4.2.1 VEGF-Rezeptor-1 (Flt-1)	26
2.4.2.2 VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR-2)	27
2.4.2.3 Neuropiline (Nrp)	27
2.4.3 Das VEGF/VEGF-Rezeptorsystem in der Zellmigration	28
2.4.4 Die Rolle des VEGF/VEGF-Rezeptor-Systems in adulter Neurogenese	29
2.5 Zielsetzung der Arbeit:	32
3 Material und Methoden	33
3.1 Materialien	33
3.1.1 Geräte und Hilfsmittel	33
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	34
3.1.3 Verwendete Chemikalien	34
3.1.3.1 Spezielle Chemikalien und Lösungen:	34
3.1.3.2 Medikamente / Medizinische Präparate:	35
3.1.4 Häufig verwendete Lösungen	36

3.1.5	Verwendete Kits.....	37
3.1.6	Verwendete Antikörper:.....	37
3.1.6.1	Primärantikörper:.....	37
3.1.6.2	Immunglobuline (IgG):.....	38
3.1.6.3	Sekundärantikörper:.....	38
3.1.7	Verwendete Wachstumsfaktoren.....	38
3.1.8	Verwendete Enzyme.....	38
3.1.9	Verwendete Mausstämme.....	39
3.2	Methoden.....	39
3.2.1	Genotypisierungen:.....	39
3.2.1.1	Isolation genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien:.....	39
3.2.1.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR, modifiziert nach Mullis et al., 1986) ²⁹²	40
3.2.1.3	Nukleinsäuren in DNA-Agarosegelen durch Gelelektrophorese.....	41
3.2.2	In Vivo Versuche:.....	41
3.2.2.1	Analyse des genetischen Hintergrundes (Background-Analysis):.....	41
3.2.2.2	BrdU-Injektionen.....	41
3.2.2.3	Intrazerebroventrikuläre Infusion von VEGF-A via osmotischer Micro-Pumpen.....	42
3.2.3	Transkardiale Perfusion.....	42
3.2.4	Hirnpräparation:.....	43
3.2.5	In Vitro System:.....	43
3.2.5.1	Beschichten von Deckgläsern.....	43
3.2.5.2	Kultivierung von Explantaten der Subventrikulärzone.....	43
3.2.6	Herstellung von Gewebeschnitten.....	44
3.2.6.1	Herstellung von Gefrierschnitten am Gefriermikrotom.....	44
3.2.6.2	Herstellung von frei schwimmenden Dickschnitten am Gefriermikrotom.....	44
3.2.7	Fluoreszenzkernfärbung.....	45
3.2.8	Indirekte Immunfärbung.....	45
3.2.8.1	Nachweis bei indirekter Immunfluoreszenzfärbung.....	45
3.2.8.2	Nachweis Reaktion bei indirekter POD-Immunfärbung.....	46
3.2.9	BrdU-Detektion.....	46
3.2.9.1	Lichtmikroskopische Immunfärbung.....	46
3.2.9.2	BrdU-Dreifachimmunfluoreszenz.....	47
3.2.10	Auswertungen von Immunfärbungen:.....	47
3.2.10.1	Stereologische Quantifizierung BrdU-positiver Zellen.....	47
3.2.10.2	Fluoreszenzmikroskopie.....	48
3.2.10.3	Konfokale Analyse von BrdU-Dreifachfärbungen.....	48
3.2.10.4	Densitometrische Analyse (Doublecortin-Immunfluoreszenz).....	48
3.2.10.5	Bestimmung der Vaskularisierung.....	49
3.2.11	TUNEL.....	49
3.2.12	In situ- Hybridisierung (nach Schaeren-Wiemers, 1993 ²⁹⁵).....	50
3.2.12.1	Transformation von Bakterien.....	50
3.2.12.2	Plasmid-Präparation (Maxi-Präp).....	50
3.2.12.3	Herstellung der RNA-Sonden (In vitro-Transkription):.....	50
3.2.12.4	Dot Blot – Überprüfung der Sondenmarkierung:.....	51
3.2.12.5	Hybridisierungsreaktion:.....	51
3.2.13	ELISA.....	53
3.2.13.1	Herstellung der Hirnlysate:.....	53
3.2.13.2	Durchführung der ELISA:.....	53
3.2.14	Statistische Auswertungen.....	53
4	Ergebnisse.....	54
4.1	Genetischer Hintergrund und Alter der Versuchstiere.....	54

4.2	Expressionsanalyse des murinen VEGFR-1 (Flt-1) auf Protein- und RNA-Ebene im adulten Gehirn.....	54
4.2.1	Überprüfung der Spezifität der verwendeten Antikörper (Kontrollfärbungen).....	55
4.2.2	Nachweis des Rezeptors VEGFR-1 im adulten Maushirn.....	56
4.2.3	Analyse VEGFR-1-exprimierender Zellen im adulten ZNS.....	57
4.2.3.1	Koexpression von VEGFR-1 und dem glialen Marker anti-GFAP in neurogenen Regionen des adulten Maushirns.....	57
4.2.3.2	Spektralanalyse von Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen zum Ausschluss artifizieller Fluoreszenzüberlagerungen	63
4.2.3.3	Koexpression von VEGFR-1-RNA und dem glialen Marker anti-GFAP in neurogenen Regionen des adulten Maushirns.....	64
4.2.3.4	Expressionsvergleich des vaskulären Markers CD31 (PECAM-1) und VEGFR-1 in neurogenen Regionen des adulten Maushirns	65
4.2.3.5	Expressionsvergleich des für postmitotische Neurone charakteristischen Markers NeuN und VEGFR-1 in neurogenen Regionen des adulten Maushirns.....	66
4.2.3.6	Expressionsvergleich VEGFR-1 und Nestin in neurogenen Regionen des adulten Maushirns	67
4.2.3.7	Expressionsvergleich VEGFR-1 und dem Proliferationsmarker (PCNA) in neurogenen Regionen des adulten Maushirns.....	68
4.2.3.8	Expressionsvergleich VEGFR-1 beta-Catenin in neurogenen Regionen des adulten Maushirns.....	68
4.2.4	Expressionsnachweis des murinen VEGF-A auf Protein- und RNA-Ebene im adulten Gehirn.....	69
4.2.4.1	Nachweis von VEGF-A im adulten Maushirn auf Transkriptebeine	69
4.2.4.2	Zellspezifische Expressionsanalyse von VEGF-A im adulten Maushirn.....	70
4.2.5	Zusammenfassung der Expressionsdaten des VEGFR-1 im adulten ZNS der Maus.....	71
4.3	Untersuchungen zur Relevanz des VEGFR-1 für die adulte Neurogenese.....	72
4.3.1	Expression von VEGFA und des VEGFR-1 in Flt-1TK-/-.....	74
4.3.2	Vergleich des prozentualen Hirngewichts	74
4.3.3	Strategie zur Analyse der Relevanz des VEGFR-1 für verschiedene Prozesse adulter Neurogenese.....	75
4.3.3.1	Permanente Markierung "neugeborener" Zellen <i>in vivo</i> und stereologische Analyse	75
4.3.3.2	Zelltypspezifische Analyse BrdU-positiver Zellen.....	77
4.3.4	Proliferationskinetische Untersuchungen in der adulten SVZ und im RMS.....	78
4.3.4.1	Quantitative Analyse BrdU-positiver Zellen in SVZ und RMS 3 h nach BrdU-Applikation.....	78
4.3.4.2	Zelltypspezifische Analyse der BrdU-markierten Zellen 3 h nach BrdU-Gabe	78
4.3.4.3	Quantitative Analyse sich langsam teilender Zellen in SVZ 30 Tage nach BrdU-Applikation	81
4.3.5	Analyse der Migration neu entstandener Zellen in der adulten Neurogenese des olfaktorischen System.....	83
4.3.5.1	Quantitative Analyse BrdU-positiver Zellen in der SVZ und im RMS am Tag 0 und Tag 6.....	84
4.3.5.2	Zelltypspezifische Analyse der BrdU-markierten Zellen an Tag 6 BrdU-Gabe.....	84
4.3.5.3	Densiometrische Analyse zum Vergleich der DCX-Expression im RMS von Flt-1TK- und wt-Mäusen	86
4.3.5.4	Quantitative Analyse TUNEL-positiver Zellen.....	87
4.3.5.5	Quantitative Analyse BrdU-positiver Zellen im Corpus callosum am Tag 0 und Tag 6.....	88
4.3.5.6	Quantitative Analyse BrdU+-Zellen im OB am Tag 0 und Tag 6.....	90
4.3.6	Analyse der Migration und Differenzierung neu entstandener Zellen im adulten olfaktorischen Bulbus.....	93
4.3.6.1	Quantitative Analyse BrdU+-Zellen im OB am Tag 30.....	93
4.3.6.2	Zelltypspezifische Analyse der BrdU-markierten Zellen an Tag 30 nach BrdU-Gabe	95
4.3.7	Analyse des Volumens der einzelnen Schichten des adulten olfaktorischen Bulbus	97
4.3.8	Proliferationskinetische Untersuchungen im adulten Hippokampus	98
4.3.9	Zusammenfassung der <i>in vivo</i> -Analysen:.....	101
4.3.10	Vergleich der Migrationseigenschaften in Flt-1TK und wt-Mäusen <i>in vitro</i> (SVZ-Explantatkulturen).....	102

4.3.11	Quantitative Analyse des Proteins VEGF-A im Gehirn.....	104
4.3.12	Induktion des Phänotyps der Flt-1Tk ^{-/-} im Wildtyp	105
4.3.13	Vergleich der Vaskularisierung von Flt-1Tk ^{-/-} und wt-Mäusen.....	109
5	Diskussion.....	111
5.1	Differenzielle Expression des VEGFR-1 im adulten ZNS.....	111
5.1.1	Erhöhte VEGF-A Konzentration in Flt-1TK ^{-/-}	115
5.2	Funktionelle Untersuchungen zur Rolle des VEGFR-1 in der Regulation adulter Neurogenese	117
5.2.1	Einfluss des VEGFR-1 auf die Proliferation von neuraler Zellen im adulten ZNS.....	117
5.2.2	Erhöhte VEGF-A Mengen in Flt-1Tk ^{-/-} fördern die Migration neuraler Zellen im RMS	119
5.2.3	VEGF-A induzierte Veränderung der Migration im RMS resultiert in einer Volumenzunahme des OB	122
5.2.4	Einfluss des VEGFR-1 auf die neuronale Differenzierung im adulten Bulbus olfaktorius	122
5.2.5	Die Inhibition der Signaltransduktion des VEGFR-1 zeigt keinen Effekt auf adulte hippocampale Neurogenese	123
5.2.6	Zusammenfassung der Interpretation der Ergebnisse:.....	124
6	Zusammenfassung	126
7	Literaturverzeichnis.....	127
8	Danksagung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
9	Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Neurale Stammzellen und daraus entstehende Zelltypen (Klassisches Konzept)	11
Abb. 2:	Übersicht der neurogenen Regionen des adulten Säugerhirns.....	13
Abb. 3:	Schematische Darstellung der olfaktorischen Neurogenese	16
Abb. 4:	Schematische Darstellung der Rolle von Gliazellen in der Regulation adulter Neurogenese	21
Abb. 5:	VEGF/VEGF-Rezeptor-Familie.....	25
Abb. 6::	Primär- und Sekundärantikörperkontrollen zur Überprüfung der Spezifität der verwendeten Antikörper. .	55
Abb. 7:	Indirekte Immunfärbung des VEGFR-1 in neurogenen Regionen des adulten Maushirns.....	56
Abb. 8:	Immunhistochemische Analyse zur Koexpression von GFAP und VEGFR-1 in der SVZ an Frontalschnitten des adulten Maushirns.	58
Abb. 9:	Koexpression von GFAP und VEGFR-1 an Saggittalschnitten der adulten SVZ.	59
Abb. 10:	Kolokalisation von GFAP und VEGFR-1 im rostralen, lateralen Bereich der adulten SVZ.....	59
Abb. 11:	Doppelfärbungen des glialen Markers GFAP und dem VEGFR-1.	60
Abb. 12:	Koexpression von GFAP und VEGFR-1 an Saggittalschnitten des RMS.....	60
Abb. 13:	Koexpression von VEGFR-1 und GFAP im Corpus callosum (CC) der adulten Maus.	61
Abb. 14:	Koexpression von VEGFR-1 und GFAP im OB der adulten Maus.....	61
Abb. 15:	Koexpression von VEGFR-1 und GFAP im Hippokampus der adulten Maus.	62
Abb. 16:	Dreidimensionale Darstellung der Expression von VEGFR-1 und dem glialen Marker anti-GFAP innerhalb einer Zelle.....	63
Abb. 17:	Spektralanalyse zum Ausschluss falsch-positiver Fluoreszenzüberlagerungen.	63
Abb. 18:	Koexpression der mRNA des VEGFR-1 und GFAP im RMS der adulten Maus.	64

Abb. 19: Doppel- und Tripel-Markierungen des VEGFR-1, GFAP und des vaskulären Markers CD31 (PECAM-1) in der der SVZ und dem RMS.....	65
Abb. 20: Doppelmarkierungen des VEGFR-1 und neuronalen Markern im adulten ZNS.....	66
Abb. 21: Doppel-Immunfluoreszenz des VEGFR-1 und Nestin im adulten Maushirn.....	67
Abb. 22: Dreifachimmunfluoreszenzfärbung des VEGFR-1 mit dem Proliferationsmarker PCNA und vaskulären Marker PECAM-1 im adulten ZNS.....	68
Abb. 23: Doppelmarkierung von beta-Catenin und VEGFR-1.....	69
Abb. 24: Nachweis der VEGF-A mRNA im adulten Maushirn.....	70
Abb. 25: Komarkierung von VEGF-A und GFAP im Hirn der adulten Maus.....	71
Abb. 26: Zusammenfassung der Ergebnisse der Expressionsanalyse des VEGFR-1.....	72
Abb. 27: Schematische Darstellung der Deletion der Signaltransduktionsdomäne des VEGFR-1 in der transgenen Flt-1TK ^{-/-} Maus.....	73
Abb. 28: Vergleich des prozentualen Hirngewichts von Flt-1TK ^{-/-} und wt-Mäusen.....	74
Abb. 29: Darstellung der Strategie zur Analyse der Relevanz des VEGFR-1 für verschiedene Prozesse adulter Neurogenese.....	76
Abb. 30: Zelltypspezifische Analyse der BrdU-markierten Zellen mittels konfokaler Analyse von Dreifach-Immunfluoreszenzen.....	77
Abb. 31: Quantitative und volumetrische Analyse der SVZ und des RMS 3h nach einmaliger BrdU-Injektion (Single Shot).....	79
Abb. 32: Zelltypspezifische Analyse BrdU-markierter Zellen 3 h nach BrdU-Gabe mittels konfokaler Analyse von Dreifachimmunfluoreszenzen.....	80
Abb. 33: Prozentuale Verteilung der Markerexpression BrdU-markierter Zellen in der SVZ und im RMS nach 3h.....	81
Abb. 34: Quantitative Analyse BrdU-markierter Zellen in der SVZ am Tag 30 nach BrdU-Injektion.....	82
Abb. 35: Injektionsschema zur Untersuchung der Proliferation und Migration neuraler Vorläuferzellen mittels BrdU-Markierung.....	83
Abb. 36: Quantitative und Volumetrische Analyse der SVZ und des RMS am Tag 0 und Tag 6 nach BrdU-Injektion.....	85
Abb. 37: Zelltypspezifische Analyse der BrdU-markierten Zellen an Tag 0 und Tag 6 nach BrdU-Gabe mittels konfokaler Analyse von Dreifachimmunfluoreszenzen.....	86
Abb. 38: Densiometrische Analyse der DCX-Expression in Flt-1TK ^{-/-} und wt-Mäusen.....	87
Abb. 39: Vergleich der Apoptose in Flt-1 TK ^{-/-} und wt-Tieren mittels TUNEL.....	88
Abb. 40: Quantitative und Volumetrische Analyse BrdU-markierter Zellen im Corpus callosum (CC) am Tag 0 und Tag 6 nach BrdU-Injektion.....	89
Abb. 41: Quantitative Analyse BrdU-markierter Zellen im OB der letzten BrdU-Injektion (Tag 0).....	91
Abb. 42: Quantitative BrdU-markierter Zellen im OB am Tag 6 nach BrdU-Injektion.....	92
Abb. 43: Versuchsplan zur Analyse der adulten Neurogenese im OB.....	93
Abb. 44: Quantitative Analyse BrdU-markierter Zellen im OB am Tag 30 nach BrdU-Injektion.....	94
Abb. 45: Analyse der Differenzierung der Granulärzellen des OB in Flt-1TK ^{-/-} und wt-Mäusen.....	95
Abb. 46: Analyse der Differenzierung BrdU ⁺ -Zellen der Periglomerularzellschicht des OB in Flt-1TK ^{-/-} und wt-Mäusen.....	96
Abb. 47: Volumetrische Analyse des OB von Flt-1 TK ^{-/-} und wt-Tieren.....	97
Abb. 48: Versuchsplan zur Analyse der adulten Neurogenese im Hippokampus.....	98
Abb. 49: Quantitative Analyse BrdU-markierter Zellen im Hippokampus am Tag 0.....	99
Abb. 50: Quantitative Analyse BrdU-markierter Zellen im Hippokampus am Tag 30 nach BrdU-Gabe.....	100
Abb. 51: Volumetrische Analyse des Hippokampus von Flt-1TK ^{-/-} und wt-Tieren.....	100
Abb. 52: Übersicht der quantitativen Analysen BrdU-markierter Zellen in Flt-1TK ^{-/-} und wt-Mäusen in den unterschiedlichen Versuchsgruppen in verschiedenen Hirnregionen.....	101
Abb. 53: <i>In vitro</i> -Analyse der Migration von Zellen aus SVZ-Explantaten in Matrigel.....	103
Abb. 54: Quantitative Analyse des VEGF-A Proteins aus Gewebslysaten verschiedener Hirnregionen (ELISA).....	104
Abb. 55: Versuchsplan zur Analyse der adulten Neurogenese im Hippokampus.....	105
Abb. 56: Quantitative Analyse der SVZ am Tag 6 nach BrdU-Injektion und Implantation osmotischer Minipumpen.....	106
Abb. 57: Analyse des RMS am Tag 6 nach BrdU-Injektion und Implantation osmotischer Minipumpen.....	107

Abb. 58: Quantitative Analyse des OB am Tag 6 nach BrdU-Injektion und Implantation osmotischer Minipumpen.	108
Abb. 59: Analyse der Vaskularisierung von Flt-1Tk und wt-Mäusen in verschiedenen Hirnregionen.....	110
Abb. 60: Schematische Darstellung der Effekte der genetischen Inhibierung der Signaltransduktion des VEGFR-1 in Flt-1TK-/- im Vergleich zum wt-Mäusen.	124

1.3 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
<i>Aqua dest.</i>	<i>Aqua destillata</i>
bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2-deoxyuridine
CC	Corpus Callosum
Ctx	Cortex
d.h.	das heißt
DCX	Doublecortin
DG	Gyrus dentatus; dentate gyrus
DNA	Desoxyribonukleinsäure; desoxyribonucleic acid
E	Ependyma
EGF	epidermal growth factor
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
Fab	antigen-bindendes Fragment; fragment antigen binding)
FCS	fetal calf serum
FGF-I2	basic fibroblast growth factor
GCL	Granulärzellschicht
GFAP	Glial fibrillary acid protein
H	Hilus
h	human
IgG / M	Immunglobulin G / M
Lsg.	Lösung
LV	Lateralventrikel
M	molar
ML	Molekularzellschicht
mRNA	messenger ribonucleic acid
MW	Molekulargewicht; Molecular Weight
n.s.	nicht signifikant
NF	Neurofilament
Nrp	Neuropilin
OB	Bulbus olfaktorius
PB	Phosphatpuffer; phosphate buffer
PBS	Phosphatpuffer; phosphate buffered saline

Abkürzung	Bedeutung
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerasekettenreaktion; polymerase chain reaction
PECAM-1	platelet/endothelial cell adhesion molecule-1
PFA	Paraformaldehyd
PGL	Periglomerulärszellschicht; periglomerular cell layer
PL	Plexiformschicht; plexiform layer
PIGF	plazenta growth factor
RMS	Rostralmigratorischer Strom
RNA	Ribonukleinsäure; ribonucleic acid
rpm	Umdrehungen pro Minute; rounds per minute
RT	Raumtemperatur
Str	Striatum
SVZ	subventrikuläre Zone
TBS	Trispuffer; tris buffered saline
TH	Tyrosinhydroxylase
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-fluorescence nick end labelling
u. a.	unter anderem
UV	ultraviolett
v/v	volume per volume
VEGF-A/-B	vascular endothelial growth factor-A/-B
VEGFR-1/-2	vascular endothelial growth factor-1/-2
w/v	weight per volume
w/w	weight per weight
ZNS	zentrales Nervensystem

2 Einleitung

2.1 Überblick: Medizinische Relevanz adulter Neurogenese

Gewebsspezifische Stammzellen bieten einen Pool undifferenzierter Zellen, die in die verschiedenen Zelltypen eines Gewebes differenzieren können. Sie können durch Seneszenz oder Verletzung degenerierte und abgestorbene Zellen ersetzen und tragen somit erheblich zur Regeneration und Funktionserhaltung von Organen bei.¹ Für das Zentralnervensystem (ZNS) des adulten Säugers wurde jedoch bis in die zweite Hälfte des 20. Jahrhunderts angenommen, dass ihm die Fähigkeit zur Regeneration aus endogenen Stammzellen fehlt.^{2,3} Damit galten Verletzungen des ZNS, Hirninfarkte oder neurodegenerative Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson, die mit großen funktionellen Defiziten und Leiden des Betroffenen einhergehen, als unheilbar. In den letzten vier Jahrzehnten haben allerdings zahlreiche Studien Zellen mit Stammzeleigenschaften im adulten Säugerhirn identifiziert.⁴⁻¹⁰ Diese endogenen neuronalen Stammzellen des adulten Gehirns sind aufgrund ihres Regenerationspotential von großem therapeutischem Interesse. Bisherige Therapieansätze neurodegenerativer Erkrankungen beschränken sich meist auf Zelltransplantationsmethoden. Fötale Gewebe, primäre Zellen aus verschiedenen Geweben, embryonale Stammzellen oder transformierte und genetisch veränderte Zelllinien wurden bereits verwendet.^{11,12} Jede bisher entwickelte Methode ist jedoch limitiert durch Faktoren, wie schwerem Zugang zum zellulärem Ausgangsmaterial, ethischen Bedenken, fehlender Spezifität der transplantierten Zellen, immunologische Abstoßungsreaktionen oder zu geringer Effizienz. Endogen vorhandene neurale Stammzellen bergen Hoffnung auf neue, weniger invasive Zelltherapieansätze.

Im adulten ZNS werden nach Verletzungen, Infarkten oder Neurodegeneration endogene Stammzellen mobilisiert und in die betroffenen Regionen rekrutiert.¹³⁻²⁵ Basierend auf der Kontrolle dieses Prozesses könnten klinische Therapieansätze entwickelt werden. Klinische und experimentelle Erfahrungen zeigen, dass körpereigene regenerative Programme entweder nicht ausreichend aktiviert werden oder inhibitorische Prozesse gleichzeitig ablaufen.²⁶ Auch die Entstehung und Wiederentstehung von malignen

Tumoren wird seit kurzem mit Zellen mit Stammzeleigenschaften in Verbindung gebracht. Die lange Lebensdauer der Stammzellen macht diese anfälliger für genetische Mutationen und dafür Tumore zu initiieren.²⁷⁻³¹ So ist gleichfalls in der Krebstherapie die Kontrolle des Verhaltens der Tumor-Stammzellen essentielle Voraussetzung für langfristigen Heilungserfolg.

Die Kontrolle, Aktivierung und Rekrutierung endogener neuraler Stammzellen ist momentan aufgrund des zu geringen Kenntnisstandes über den genauen Mechanismus und die molekulare Regulation der Neubildung von Zellen des adulten ZNS noch nicht ausreichend möglich. Daher ist es von hoher wissenschaftlicher und medizinischer Bedeutung die Regulationsmechanismen der Prozesse der Nerven-neubildung im adulten Säugerhirn, ein Prozess der als „adulte Neurogenese“ bezeichnet wird, zunächst unter physiologischen Bedingungen zu entschlüsseln. In den letzten Jahren wurde in mehreren Studien ein Zusammenhang zwischen pathologischen Veränderungen des vaskulären Systems des ZNS, Neurodegeneration und der Aktivierung endogener, neuraler Stammzellen im Gehirn aufgezeigt.³²⁻³⁹ Für viele Faktoren, die bedeutsam für die Ausbildung und Erhaltung des Gefäßsystems sind, wurde eine zusätzliche neurogene Funktion beschrieben.^{34-36,40}

Die vorliegende Arbeit soll einen Baustein auf dem Weg zu einem besseren Verständnis der Funktion von vaskulären Faktoren in der Regulation von Prozessen der adulten Neurogenese liefern und somit zur Etablierung der Grundlagen zur Entwicklung neuer Therapieansätze beitragen.

2.2 Stammzellen

Stammzellen sind somatische Zellen und werden aufgrund ihres Differenzierungspotentials und des ihres Entstehungszeitpunkts in der Entwicklung unterschieden. Zellen der inneren Zellmasse, der Blastozyste, die sich beim Menschen wenige Tage nach der Befruchtung der Oozyte bildet und Zellen des Epiblasten, der nach Implantation des Embryos in den Uterus entsteht, werden als embryonale Stammzellen (ES-Zellen) bezeichnet. Sie sind in der Lage Zellen aller drei Keimblätter (Endoderm, Ektoderm und Mesoderm) und damit alle Zellen eines Organismus zu generieren, eine Eigenschaft die Pluri- oder Totipotenz genannt wird.⁴¹⁻⁴³ Nur wenige Zellen behalten diese Eigenschaft bei und werden zu primitiven Keimstammzellen und somit Teil des Reproduktionssystems. Die meisten Zellen erreichen während der

Entwicklung eine bestimmte Spezifizierung. Damit verlieren sie ihre Pluripotenz und gelten als determiniert. Diese gewebsspezifischen Stammzellen sind nur noch multipotent. Sie sind auf die Generierung von Zelltypen eines bestimmten Keimblattes beschränkt. Aus ihnen gehen Vorläuferzellen hervor, die lediglich Zellen eines Gewebetyps generieren. Weiter limitierte Vorläuferzellen sind bi- oder unipotent und generieren nur noch zwei oder gar eine Zellart. Sie vergrößern den Zellpool der direkten Vorläufer differenzierter Zelltypen und stellen das letzte Zellstadium mit mitotischer Aktivität vor der terminalen Differenzierung dar.^{44,45}

Stammzellen sind im Allgemeinen durch zwei besondere Eigenschaften charakterisiert: 1. durch ihre Fähigkeit zur unbegrenzten Reproduktion/Selbsterneuerung durch sich wiederholende Zellteilungen und 2. durch ihr Potential Vorläuferzellen verschiedener Zelltypen zu generieren.⁴⁵ Diese Eigenschaften basieren auf zwei unterschiedlichen Mechanismen der Zellteilung (Mitose). Bei der symmetrischen Teilung einer Stammzelle wird eine identische Kopie der Mutterzelle generiert. Durch asymmetrische Teilung hingegen entstehen eine Zelle mit Stammzelleigenschaften und eine Vorläuferzelle, die ebenfalls mitotische Aktivität aufweist, aber bereits determiniert ist und nur noch Zellen ihres eigenen Gewebetyps ausbilden kann.^{46,47} Die Vermehrung des Vorläuferzellpools durch Zellteilung wird als Proliferation bezeichnet.

2.3 Neurogenese – Entstehung von Neuronen aus endogenen neuralen Stammzellen des ZNS

Neurogenese basiert auf dem Vorhandensein neuraler Stammzellen im ZNS. Neurale Stammzellen sind undifferenzierte, multipotente Zellen, auf welche die Entwicklung des ZNS zurückgeht. Die Hauptcharakteristika dieser neuralen Stammzellen sind ihre Fähigkeit zur unbegrenzten Reproduktion und ihr Potential zur Generierung von Vorläuferzellen aller drei Hauptzelltypen des ZNS: Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten, ihre Multipotenz.^{48,49} (siehe Abb. 1)

Nachdem erste Studien Stammzellen des ZNS in vivo identifiziert hatten,^{6,50,51} wurde deren entwicklungsbiologische Plastizität in Transplantationsstudien aufgezeigt.^{50,52-54}

Parallel begann man ihr Expansions- und Differenzierungspotential in vitro zu untersuchen.^{8,55-57} Neurogenese bzw. adulte Neurogenese aus neuralen Stammzellen beruht auf einem sequenziellen, mehrschrittigen Prozess, bestehend aus asymmetrischer Teilung der Stammzellen und damit der Entstehung von Vorläuferzellen,

Proliferation der Vorläuferzellen, zunehmender Determinierung (Festlegung des Zellschicksals auf einen bestimmten Entwicklungsweg), Migration, Überleben und Differenzierung zum Neuron mit Ausbildung von Axonen und Dendriten und schließlich funktioneller Integration in bestehende Netzwerke.⁵⁸⁻⁶² Die Determinierung ist zunächst nicht morphologisch erkennbar, was die Erforschung von Faktoren, die diese Prozesse steuern und deren zeitliches und räumliches Wirkungsspektrum erschweren. Aus Transplantationsstudien geht eindeutig hervor, dass viele dieser Schritte im adulten Gehirn von Signalen der Mikroumgebung, die sich aus der Summe der Umgebungsfaktoren ergibt, beeinflusst werden.⁶³ Man spricht dabei von neurogenen Nischen, auf die später näher eingegangen wird (s. Kap. 2.3.3).

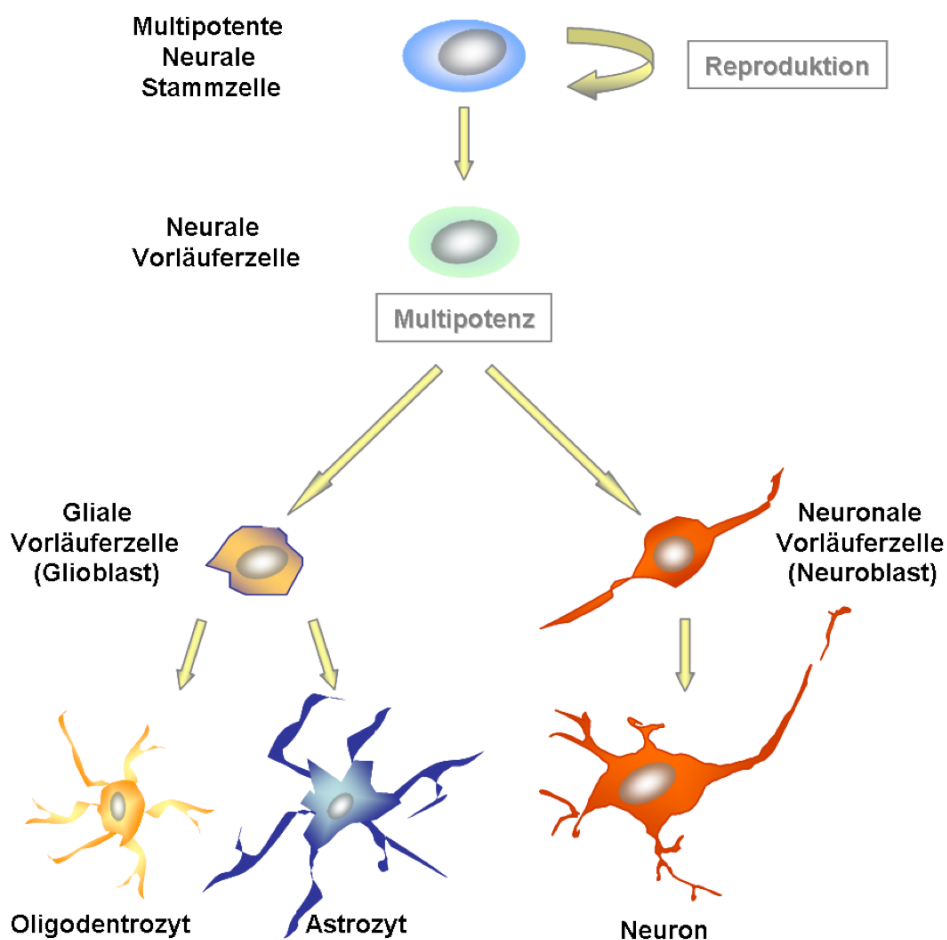


Abb. 1: Neurale Stammzellen und daraus entstehende Zelltypen (Klassisches Konzept)

Neurale Stammzellen sind multipotente Zellen, die sich durch ihre Fähigkeit zur Reproduktion und ihre Multipotenz auszeichnen. Aus primären neuralen Stammzellen entstehen aktive multipotente neuronale Vorläuferzellen, die unter Einfluss verschiedener Umgebungsfaktoren zu allen drei Zelltypen des ZNS differenzieren können.

2.3.1 Neurale Stammzellen des sich entwickelnden Säugerhirns

Die erste Stammzellpopulation des sich entwickelnden Säugerhirns ist in der ventrikulären Zone (VZ), der mehrschichtigen Wand der primordialen Ventrikel, lokalisiert. Aus diesen ersten Stammzellen bildet sich die Subventrikularzone (SVZ).⁶⁴ Dort entstehen durch massive Proliferation zahlreiche kortikale Vorläuferzellen, auf denen die Entwicklung des Vorderhirns basiert.^{65,66} Radiale Gliazellen, die aus den neuroepithelialen Zellen der Neuralrohrwand entstehen, sind multipotente, sich selbst erneuernde Zellen. Sie sind in größter Anzahl zur Hauptzeit der embryonalen Neurogenese vorhanden und fungieren einerseits als Vorläuferzellen im sich entwickelnden Säugerhirn. Andererseits dienen sie den neu gebildeten Neuronen als Richtungsweiser während ihrer Migration vom Ort ihres Entstehens, von der Ventrikulärzone, zu ihrer Endposition im Kortex.⁶⁷⁻⁷⁰ Im Laufe der Entwicklung kommt es zu einer drastischen Reduktion des Stammzellpools.⁷¹

Die Entstehung vieler neuronaler Zellpopulationen aus neuronalen, multipotenten Stammzellen des Neuroepithels wird in frühen Embryonalstadien vorwiegend von intrinsischen (genetisch determinierten) Mechanismen bestimmt. Neurone und Gliazellen entstehen in einer genauen zeitlichen Abfolge, in der zunächst Neurone hauptsächlich während der Embryonalentwicklung generiert werden, während der Großteil der Gliazellen erst später differenziert. Oligodendrozyten werden in spät-pränatalen und früh-postnatalen Stadien gebildet.^{8,50,71-74} Im Laufe der Entwicklung und im adulten Gehirn beeinflussen zunehmend extrinsische Faktoren die Entstehung und Reifung neuronaler Zellen. Die Konzentration von Wachstumsfaktoren, wie Epidermal Growth Factor (EGF),⁷⁵⁻⁷⁷ Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2),⁷⁸⁻⁸⁰ Nerve Growth Factor,⁵⁵ Bone Morphogenic Proteins (BMPs)⁸¹ und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)⁸²⁻⁸⁴ in der Umgebung der Vorläuferzellen trägt zur Entscheidung bei, ob eine Zelle in der Proliferationsphase verbleibt, also den Zellzyklus durchläuft oder in eine bestimmte Determinierungs- bzw. Differenzierungsphase eintritt. Auch Zell-Zell-Interaktionen benachbarter Zellen,^{85,86} Sauerstoffgehalt,^{87,88} Hormone^{89,90} und Neurotransmitter^{91,92} beeinflussen diese Prozesse.

2.3.2 Neurale Stammzellen im adulten Gehirn – neurogene Regionen

Die Proliferation neuraler Stammzellen im adulten Gehirn ist unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich auf zwei spezifische Hirnregionen limitiert: 1. die laterale, subependymale Region der SVZ, welche die Lateralventrikel (LV) des Telencephalons umschließt und 2. die Subgranulärzone im Gyrus dentatus des Hippokampus.^{5,58,59,93-97} (siehe Abb. 2) Während neurale Stammzellen der SVZ Vorläuferzellen aller drei Zelltypen des ZNS - Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten - generieren, wird das Differenzierungspotential hippocampaler Stammzellen und Stammzellen anderer Hirnregionen kontrovers diskutiert.⁹⁸⁻¹⁰²

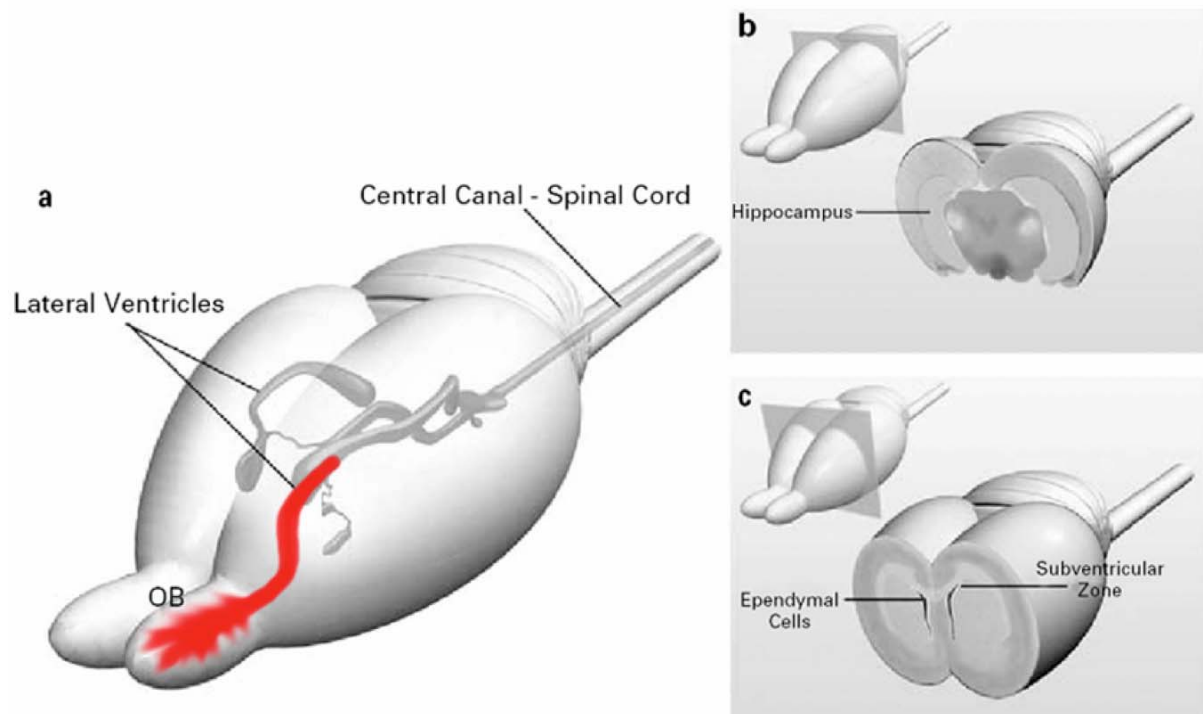


Abb. 2: Übersicht der neurogenen Regionen des adulten Säugerhirns

Im adulten Säugerhirn ist die Proliferation neuraler Stammzellen unter physiologischen Bedingungen auf zwei spezifische Hirnregionen limitiert: die Subgranulärzone im DG des Hippokampus (b) und die laterale, subependymale Region der SVZ, welche die LV des Telencephalons umschließt (c). In der SVZ entstandene neurale Vorläuferzellen migrieren entlang eines unidirektionalen Rostralmigratorischen Stromes RMS zum olfaktorischen Bulbus, wo sie zu olfaktorischen Interneuronen differenzieren. (modifiziert von Clarke, 2003)¹⁰³

In den beiden neurogenen Hauptregionen wurden Zellen, die GFAP (glial fibrillary acid protein; saures Gliafaserprotein) exprimieren, als Stammzellen identifiziert. Nach Abtöten aller proliferativer Zellen der SVZ mit dem zytostatischen Agens AraC (Cytosine- β -D-Arabinofuronosid) zeigten Doetsch et al. (1999)¹⁰⁴, dass GFAP-positive Zellen als erster Zelltyp wieder dort zu finden sind. Weiter konnte durch Reporter-genaktivität in vivo die

Abstammung von Neuronen von GFAP-positiven Zellen nachgewiesen werden.⁹⁵ Es wird postuliert, dass diese astrozytären Zellen mit Stammzeleigenschaften ontogenetisch von Radialgliazellen der ventrikulären Zone abstammen. Neurale Stammzellen würden so in einer direkten Entwicklungslinie von neuroepithelialen Zellen über Radialgliazellen zu astrozytären, adulten Stammzellen im Gehirn stehen.¹⁰⁵ Kontrovers dazu postulierten Johansson et al. (1999),¹⁰⁶ dass Ependymzellen die Stammzellen des adulten Gehirns seien. Auch Ependymzellen gehen aus Radialgliazellen hervor.¹⁰⁷ Die neu entstandenen Neurone sind funktional und werden in bestehende neuronale Netzwerke integriert.^{60,108,109}

Auch in Regionen des adulten Gehirns, die unter physiologischen Bedingungen eine sehr geringe neurogene Aktivität aufweisen, wurden neurale Stammzellen identifiziert und unter pathophysiologischen Veränderungen aktive Neurogenese beobachtet.^{13,20,22,100,110,111}

2.3.2.1 Zelluläre Komposition der adulten Subventrikulären Zone (SVZ)

Neuronale Vorläuferzellen (Neuroblasten) des olfaktorischen Systems, aus denen Neurone des olfaktorischen Bulbus (OB; Riechkolben) differenzieren, entstehen in der SVZ der lateralen Wand beider LV des Telenzephalons. Die SVZ ist per Definition die 1 bis 2 Zellkörper breite, an die Ependymschicht grenzende Zone, welche die Ventrikel auskleidet.¹¹² Die adulte SVZ ist ontogenetisch ein Überbleibsel der embryonalen SVZ.^{4,113-115} Die Ependyma, die aus der VZ des embryonalen Vorderhirns hervorgeht, besteht aus Zellen, die viele Zilien tragen, welche in das Ventrikellumen hineinreichen. Sie sind untereinander mit apikalen Zelladhäsionskomplexen verbunden und separieren das mit Liquor gefüllte Ventrikellumen vom Hirnparenchym.^{64,116} In den ersten Lebenswochen ist die SVZ der LV in zwei verschiedene Funktionsbereiche unterteilt. Diese Heterogenität geht im weiteren Leben verloren.¹¹⁷ In der caudal gelegenen Region findet zunächst hauptsächlich Gliogenese statt. Produzierte Gliazellen migrieren dorsal und caudal in das Corpus callosum. Im Unterschied dazu entstehen aus Stammzellen des anterioren Horns der LV, der anterioren SVZ, ausschließlich neuronale Vorläuferzellen.⁹⁴ Diese Neuroblasten zeigen einen neuronalen Phänotyp und exprimieren Marker, wie β -III-Tubulin (Tuj1) oder Doublecortin (DCX), behalten aber weiterhin ihre Teilungsfähigkeit bei.¹¹⁸

Zur Untersuchung adulter Neurogenese werden häufig Nager, vor allem Mäuse und Ratten, als Modellsystem verwendet. Die SVZ des adulten Nagerhirns zeigt eine

spezielle Anatomie, die in Abb. 3 schematisch dargestellt ist und sich in einigen Punkten von der des humanen Gehirns unterscheidet. Die heute meist verwendete Nomenklatur der Zelltypen der SVZ (A-, B-, und C-Zellen) wurde von Doetsch, Alvarez-Buylla *et al.* (1997)¹¹⁶ eingeführt. Stammzellen sind hier, wie bereits im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, GFAP-positive Zellen. Diese werden als B-Zellen bezeichnet. Diese mitotischen, neurogenen, GFAP-positiven Zellen sind meist uni- oder bipolar, während nicht-neurogene, ausdifferenzierte Astrozyten multiple Fortsätze aufweisen.¹¹⁹ B-Zellen werden in zwei Subtypen B1 und B2 unterteilt. B1-Zellen sind meist direkt an Ependymzellen (E-Zellen) grenzend, wo sie viele Fortsätze zu einer Lamina ausbilden, die die Ependyma von den migrierenden Neuroblasten (A-Zellen) trennt. Einzelne Fortsätze kommen in Kontakt mit dem Ventrikellumen, wo sie eine einzige Zilie ausbilden. B2-Zellen sind häufig an der Grenze zum anliegenden striatalen Parenchym gelegen. Ihre Fortsätze schirmen die migrierenden A-Zellen ab. Beide Subtypen weisen immunhistochemisch und ultrastrukturell astrozytäre Charakteristika auf. B-Zellen haben eine sehr geringe Teilungsrate. Aus ihnen gehen aktive, schnell proliferierende Vorläuferzellen, C-Zellen, hervor, welche wiederum die migrierenden, neuronalen Vorläuferzellen, die A-Zellen, generieren. Die Sequenz der Entwicklungsstadien adulter Neurogenese ist daher B-C-A. A-Zellen sind morphologisch durch ihr längliches Zellsoma mit 1 bis 2 Fortsätzen zu erkennen und sind untereinander durch kleine Adhäsionskomplexe verbunden. C-Zellen kommen sehr häufig in Klustern vor oder sind mit A-Zellen verbunden. Sie sind im Gegensatz zu A-Zellen nur in der SVZ und nicht im RMS zu finden.¹¹⁶

Im humanen Gehirn sind die Neuroblasten, die vermutlich homolog zu A-Zellen sind, in einer zellarmen Schicht lokalisiert, welche die Ependyma von der SVZ trennt. Der vorherrschende Zelltyp der SVZ sind die GFAP-positiven B-Zellen, wobei zwei verschiedene Typen mit unterschiedlicher Morphologie unterschieden werden. Sie sind linear, parallel zur Ependyma angeordnet. Daran angrenzend, zum Parenchym hin, befinden sich myelinisierte Fasern. Die sich schnell teilenden Vorläuferzellen, die eventuell den C-Zellen des Nagers entsprechen, sind zwischen den B-Zellen nahe dieser Myelinschicht zu finden.^{21,23,120}

2.3.2.2 Der Rostralmigratorische Strom (RMS)

Die meisten der in der adulten SVZ entstandenen Neuroblasten legen eine große Entfernung von mehreren Millimetern entlang eines speziellen, festgelegten Migrationspfades, dem Rostralmigratorischen Strom (RMS), zum OB zurück.^{94,121,122}

Die tangentielle Migration neuronaler Vorläuferzellen aus der SVZ unterscheidet sich in mehreren Aspekten von der klassischen radialen Migration im embryonalen zerebralen Kortex. Die in der SVZ entstandenen Neuroblasten proliferieren auch während ihrer

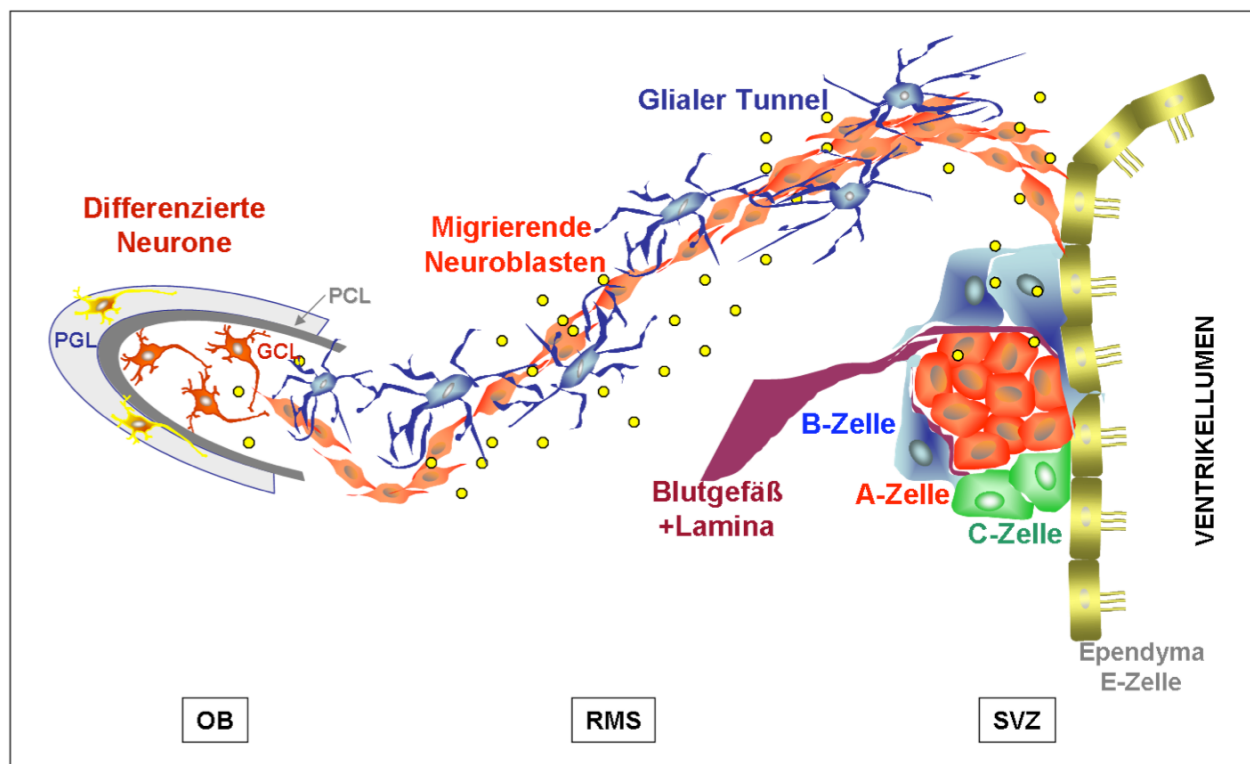


Abb. 3: Schematische Darstellung der olfaktorischen Neurogenese

In der SVZ entstehen aus GFAP-positiven Stammzellen (B-Zellen; blau) sich schnell-teilende neurale Vorläuferzellen (C-Zellen; grün). Aus diesen entstehen wiederum neuronale Vorläuferzellen (A-Zellen; rot) die entlang des RMS zum OB wandern. Der RMS ist von Gliazellen (dunkelblau) umgeben, die Faktoren sekretieren (gelb), welche die Migration der A-Zellen beeinflussen. Im OB angekommen, lösen sich die Zellen voneinander und migrieren einzeln, radial in die Granulärzellschicht. Einige Zellen wandern weiter nach außen, durch die Plexiformschicht (PCL) in die Periglomerulärzellschicht (PGL).

Wanderung im RMS,¹²³ wohingegen migrierende kortikale Neurone ausschließlich postmitotisch sind.¹²⁴ Während embryonale kortikale Neurone einzeln entlang radialer Gliazellen migrieren, wandern die Neuroblasten tangential, dicht aneinandergereiht aus der SVZ und in einer homotypischen Migrationsform, die auch als Kettenmigration bezeichnet wird, im RMS.¹²⁵ In dieser homotypischen Migration gleiten die Zellen dicht aneinander vorbei. Dabei dienen sie sich wechselseitig als Migrationssubstrat und geben

sich so gegenseitig die Wanderungsrichtung vor. Sie erreichen dabei eine Geschwindigkeit von bis zu 120 μm pro Stunde.^{67,94,115,126} Der genaue Mechanismus dieser Migrationsform ist jedoch noch nicht im Detail entschlüsselt.

Die Mehrzahl der migrierenden A-Zellen exprimieren die Proteine Polysialinsäure konjugiertes-neurales Zelladhäsionsmolekül (polysialic acid-conjugated neural cell adhesion molecule = PSA-NCAM) und Doublecortin (DCX). Beide sind für die Migration der Neuroblasten von Bedeutung. Mäuse, denen das Gen für PSA-NCAM fehlt, zeigen eine stark verminderte Migration, eine Akkumulation der Neuroblasten im Vorderhirn und einen kleineren OB.¹²⁷⁻¹³⁰ In der SVZ bilden PSA-NCAM-positive Zellen ein immenses Netzwerk aus. Die in Ketten angeordneten PSA-NCAM-exprimierenden Zellen sind meist longitudinal zum LV orientiert und eher im anterioren und dorsalen Bereich konzentriert, während sie medial nur vereinzelt vorkommen. Viele dieser Ketten münden in den RMS.¹¹⁷ Ein Knock-down von DCX-mRNA in Zellen aus der SVZ resultiert *in vitro* in einem zellautonomen und zellübergreifenden Migrationsdefekt.¹³¹ DCX polymerisiert und stabilisiert Mikrotubuli, was wahrscheinlich zur Elongation der Leitfortsätze wandernder Zellen und anschließend zur Translokation des Zellsomas führt.¹³²⁻¹³⁵ DCX ist vom Vorläuferzellstadium bis zur beginnenden neuronalen Differenzierung in den Leitfortsätzen der Neuroblasten exprimiert. Die DCX-Expression reflektiert somit neurogene Aktivität.¹³⁶

Neben diesen intrinsischen beeinflussen auch extrinsische Faktoren die homotypische Migration im RMS. Dies wird dadurch deutlich, dass diese Migration der A-Zellen im RMS sehr zielgerichtet ist und nur vergleichsweise wenige Zellen in benachbarte Gewebe, wie das Corpus callosum oder Striatum, abwandern.¹³⁷ Ähnlich der Ausbildung und Zielfindung von Axonen spielen hier chemorepulsive und chemoattraktive Faktoren eine bedeutende Rolle. Das Entfernen des OB, führt zu einer Reduktion der Proliferation und Migration der Neuroblasten, jedoch nicht zu einer vollständigen Inhibierung des Migrationsprozesses.¹³⁸ Dies impliziert, dass im OB über lange Strecken wirkende, chemoattraktive Faktoren synthetisiert werden, die aber nicht essentiell für die Orientierung im RMS sind. Stattdessen könnten über kurze Distanzen wirksame Signale zur Richtungsfindung nötige Chemogradienten aufbauen.¹³⁷

Die in Ketten angeordneten Neuroblasten werden auf ihrer Wanderung im RMS von einer Art glialem Tunnel umgeben, der aus einem Netzwerk aus Fortsätzen spezialisierter Astrozyten und Extrazellulärmatrix (EZM) besteht.^{139,140} Für diese Astrozyten wurden verschiedene Funktionen aufgezeigt. Zum einen haben sie eine

geringe Teilungsrate und fungieren möglicherweise im RMS und im OB als Vorläuferzellen.¹⁴¹ Zum Anderen modulieren sie über bidirektionale Signalwege mit den Neuroblasten deren Proliferation und Migration.^{91,139,142-144} (s. auch Kap. 2.3.3.1) Lim und Alvarez-Buylla (1999)¹⁴⁵ vermuten, dass Neuroblasten durch direkten Zellkontakt mit Gliazellen Signale erhalten, die sie von einer mobilen in eine immobile, mitotische Phase transferieren. In akuten Slice-Kulturmodellen wurde gezeigt, dass gliale Zellen durch Aufnahme von GABA die extrazelluläre Konzentration des Neurotransmitters und damit die Wanderungsgeschwindigkeit der Neuroblasten im RMS modulieren.^{142,146}

Der gliale Tunnel ist jedoch nicht unabdingbar für die homotypische Kettenmigration. Diese Migrationsform zum OB erfolgt im Nagerhirn bereits ab der Geburt, obwohl sich der gliale Tunnel nicht vor der dritten postnatalen Woche ausbildet. Zuvor formen gliale Fortsätze ein relativ homogenes Netzwerk.¹⁴⁷⁻¹⁴⁹ Des Weiteren können isolierte Zellen aus dem RMS *in vitro* unabhängig von Gliazellen migrieren.¹²⁵

Der humane OB ist vergleichsweise viel kleiner als der des Nagers. Lange konnte keine Kettenmigration oder eine Struktur ähnlich des Nager-RMS im humanen Hirn nachgewiesen werden.^{150,151} Eine aktuelle Studie von Curtis *et al.* (2007)¹⁵² zeigt nun die Existenz eines humanen RMS, der von der lateralen Extension der LV zum OB verläuft, aber anatomisch eine differente Zytoarchitektur zum Nagerhirn aufweist.

2.3.2.3 Entstehung neuer Interneurone im Olfaktorischen Bulbus (OB)

Im OB angekommen, verlassen die Neuroblasten den RMS und migrieren als Einzelzellen radial zu ihrer Endposition im OB (s. Abb. 3).^{94,153} Dieser Prozess ist u.a. abhängig vom Glykoprotein Reelin. Reelin wird von den Mitralzellen des OB, welche die Zielzellen interneuroner Vorläuferzellen sind, in die EZM sekretiert und initiiert die Umstellung von Kettenmigration zu einzelliger, radialer Migration.¹⁵⁴ Etwa zwei Wochen nach ihrer Entstehung in der SVZ exprimieren die neu entstandenen neuronalen Zellen im OB charakteristische Marker differenzierter Neurone (z.B. NeuN) und integrieren funktional als olfaktorische Interneurone in das bestehende Netzwerk.^{108,109} Interneurone des OB sind essentiell für die Prozessierung olfaktorischer Information, die im olfaktorischen Kortex verarbeitet wird.^{108,109} Es gibt viele verschiedene Interneuronklassen, die sich in ihrer räumlichen Verteilung, ihrer Morphologie und ihren neurochemischen und synaptischen Eigenschaften unterscheiden.¹⁵⁵⁻¹⁵⁷ In der Granulärzellschicht (granular cell layer; GCL) verbleiben 95% aller im OB ankommenden Neuroblasten und bilden einen GABAergen Phänotyp aus.¹⁵⁶ Einige (5%) migrieren

weiter radial durch die Plexiformschicht (PL) in die Periglomerulärzellschicht (PGL), in der sie zu GABAergen (50%) oder dopaminergen (10%, also 0,5% der Gesamtpopulation) inhibitorischen Interneuronen differenzieren.¹⁵⁸⁻¹⁶⁰ Terminal differenzierte dopaminerge Neurone können mit einem Antikörper, der gegen das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH) gerichtet ist, selektiv detektiert werden.¹⁶¹ Mehr als die Hälfte aller neuen Interneurone werden innerhalb eines Monats nach ihrer vollständigen Maturation apoptotisch.^{158,162}

Bisher ist nicht eindeutig geklärt, ob alle Interneuronsubtypen aus einer multipotenten Vorläuferzelle der SVZ entstehen und ob ihre Vorläuferzellen bereits determiniert sind bevor sie die SVZ verlassen oder erst im Laufe der Migration oder sogar erst im OB auf einen Subtyp spezifiziert werden.¹⁶³ Baker *et al.* (2001)¹⁶¹ demonstrierten die Determinierung einer Subpopulation migratorischer Zellen im RMS in dopaminerge Neurone. Darüber hinaus wurde von De Marchis *et al.* (2004)¹⁶⁴ gezeigt, dass eine Gruppe von Neuroblasten bereits im RMS vor Erreichen des OB einen GABAergen Phänotyp annimmt. Hack *et al.* (2005)¹⁶⁵ postulierten, dass adulte neurale Vorläufer aus der SVZ von einem weniger determinierten Status am Entstehungsort zu einem immer weiter determinierten Status transferieren je weiter sie auf ihrem Weg entlang des RMS zum OB fortschreiten. Sie zeigten auch, dass sich das Zellschicksal der Neurone der Periglomerulärzellschicht viel weiter rostral determiniert als das der Granulärzellen. Diese Regionalisierung ist zumindest teilweise auf Expression des Transkriptionsfaktors Pax6 zurückzuführen. Pax6 ist zudem essentiell für die Differenzierung dopaminerg Interneurone. In einer neuen Studie von Merkle *et al.* (2007)¹⁰¹ unterscheiden sich postnatale Stammzellen verschiedener Regionen der SVZ und des RMS in der Produktion neuronaler Subtypen olfaktorischer Interneurone. Die Ausbildung der verschiedenen Subtypen olfaktorischer Interneurone wird also parallel von sowohl intrinsischen Faktoren, die zu einer Vordeterminierung spezifischer Interneuronklassen führen, als auch von extrinsischen Faktoren reguliert.¹⁶³

2.3.2.4 Adulte hippocampale Neurogenese

Der Hippokampus ist eine bilaterale Struktur in den Temporallappen beider Hemisphären und hat eine bedeutende Rolle für Lern- und Gedächtnisvorgänge. Er besteht aus 4 Teilen: dem Gyrus dentatus (Dentate Gyrus; DG), dem Ammonshorn, dem Presubikulum und dem Subikulum. Hippokampale Neurogenese verläuft im Gegensatz zur olfaktorischen Neurogenese lokal sehr beschränkt. In Mäusen findet die Proliferation der

Vorläuferzellen, deren Migration und Differenzierung in Neurone im Hippokampus innerhalb eines Radius von ca. 100 µm statt. Die adulte hippocampale Neurogenese ist auf die Subgranulärzone (SGL) des DG beschränkt, eine dünne, stark vaskularisierte Zellschicht zwischen der Granulärzellschicht und dem Hilus. Dort entstehen neue Granulärzellen. Auch hier wurden GFAP-Zellen als Stammzellen beschrieben.¹⁶⁶ Nach Mitose verteilen sich die entstandenen Neuroblasten in der SGL und migrieren eine kurze Distanz entlang Radialglia-ähnlicher Zellen und neuronalen Fortsätzen in die Granulärzellschicht, wo sie den neuronalen Marker NeuN und in geringem Maße S100β (ein Kalzium-bindendes Protein und astrozytären Marker) exprimieren.^{58,167,168} Viele Zellen werden allerdings bereits in der SGL apoptotisch. Neugebildete Neurone sind funktional und werden in das bestehende Netzwerk integriert.⁶⁰

2.3.3 Zelluläre Regulation adulter Neurogenese - neurogene Nischen

Die Entscheidung ob eine Zelle im Stammzellstatus verbleibt oder zunehmend differenziert wird weitgehend durch ein Zusammenspiel externer Faktoren ihrer Mikroumgebung bestimmt.⁶³ Die interagierenden Zelltypen bilden die so genannte "Nische" aus.¹⁶⁹⁻¹⁷¹ Mehrere Schlüsselkomponenten neurogener Nischen sind bekannt, darunter astrozytäre Gliazellen, vaskuläre Zellen und Bestandteile der EZM.^{36,139,140,172-175} Gliazellen interagieren mit dem Gefäßsystem und formen ein glia-vaskuläres Netzwerk, das nicht nur Struktur und Architektur des Gehirns definiert, sondern obendrein intrazelluläre Kommunikationswege und Plastizität beeinflusst.

2.3.3.1 Gliale Regulation adulter Neurogenese

Gliazellen, speziell Astrozyten, der adulten SVZ und RMS beeinflussen die adulte Neurogenese aktiv in verschiedenen Stadien (Proliferation, Determinierung, Migration und Integration; s. auch Abb. 4).¹⁷² Sie fungieren als Richtungsweiser, als Sensoren und Regulatoren der Mikroumgebung und exprimieren Zytokine, Wachstumsfaktoren und Neurotransmitter als Antwort auf physiologische und pathologische Stimuli.¹⁷⁶⁻¹⁷⁸ Astrozyten exprimieren GFAP, was ein Bestandteil ihrer Intermediärfilamente des Zellsomas und der größeren Fortsätze ist.¹⁷⁶ In der SVZ dienen einige GFAP-positive Zellen als neurale Stammzellen, andere scheinen die Initiation der Migration von

Neuroblasten zu unterstützen. Die radialen Fortsätze von astroglialen Zellen im anterioren Bereich der SVZ sind stark polarisiert und in Richtung des RMS ausgerichtet.^{137,179} Auch neuronale Differenzierung, Synapsenausbildung und Integration unterliegen partiell glialer Kontrolle. In Ko-Kulturen förderten Astrozyten die Neurogenese adulter hippokampaler, neuraler Vorläuferzellen, während adulte Neurone die Differenzierung derselben Zellen in Oligodendrozyten steigerten.^{175,180} Integrine und Thrombospondine medieren den synaptogenen Effekt von Gliazellen auf unreife Neuronen.¹⁸¹⁻¹⁸⁴ Eine Vielzahl der Faktoren, die die adulte Neurogenese beeinflussen, ist glialen Ursprungs. Auch der neurotrophe Wachstumsfaktor VEGF-A wird im adulten Hirn von GFAP-positiven Zellen ausgeschüttet. Die VEGF/VEGF-Rezeptor-Familie und deren Wirkung auf Proliferation, Migration und Differenzierungspotential neuraler Vorläuferzellen sind im zweiten Abschnitt der Einleitung (Kap. 2.4) detailliert aufgeführt.

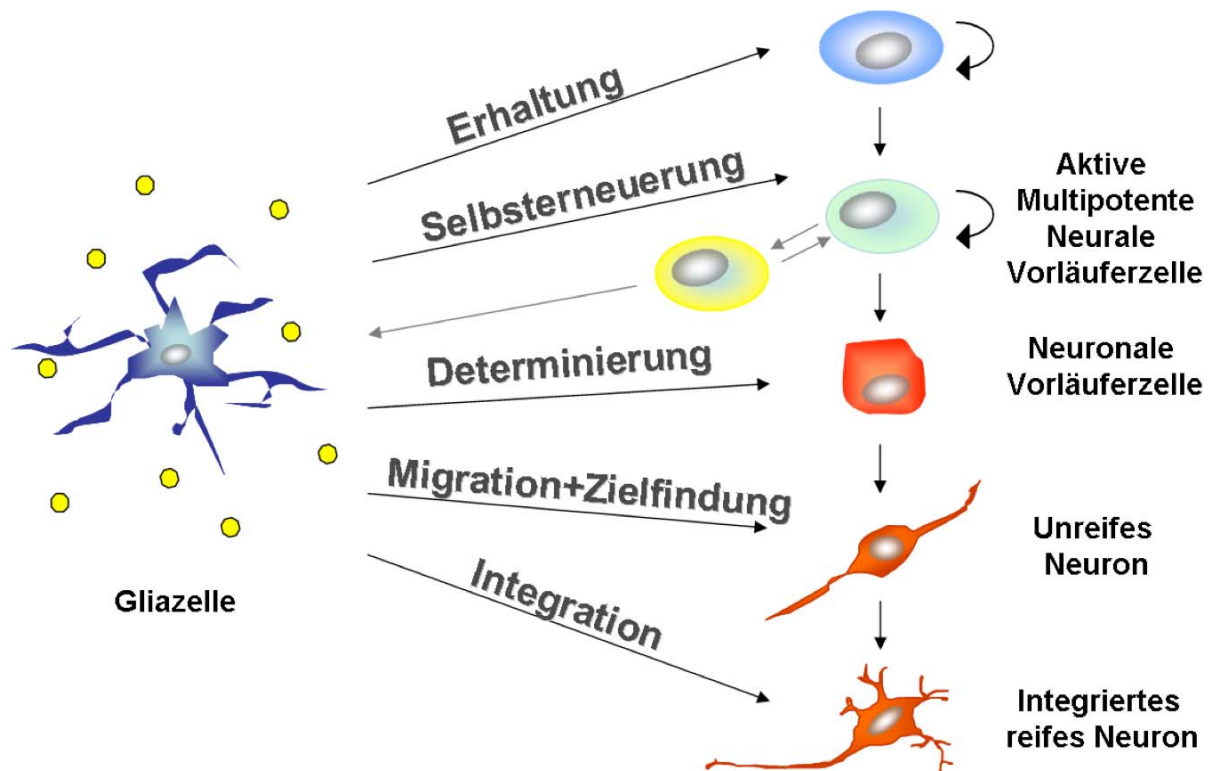


Abb. 4: Schematische Darstellung der Rolle von Gliazellen in der Regulation adulter Neurogenese

Die primäre neuronale Stammzelle (blau) wird zu einer mitotisch, aktiven neuronalen Vorläuferzelle (grün) aus der gliale (gelb) und neuronale (rot) Vorläuferzellen entstehen. Neuronale Vorläuferzellen differenzieren zum adulten Neuron. Verschiedene Prozesse der neuronalen Zellentwicklung, wie Erhaltung des Stammzellstatus, Aktivierung und Selbsterneuerung der Stammzellen, neuronale Determinierung, Migration und Richtungsfindung der Neuroblasten und funktionelle Integration reifer Neurone, werden von Gliazellen beeinflusst.

2.3.3.2 Die Neurovaskuläre Nische

Neuronale Vorläuferzellen sind in neurogenen Regionen des sich entwickelnden und des adulten Gehirns meist in der Nähe proliferierender Endothelzellen, also in der vaskulären Nische lokalisiert.^{173,185,186} Aus Zellteilung neu entstandene Zellen können permanent mit 5'Bromo-2-Deoxyuridin (BrdU) markiert und somit deren Lebensweg verfolgt werden.⁵⁹ BrdU ist ein Analogon zum endogenen Thymidin, mit dem es um den Einbau in die DNA konkurriert.¹⁸⁷ Palmer *et al.* (2000)¹⁷³ zeigten, dass unter physiologischen Bedingungen BrdU-positive Zellen im DG des Hippokampus in dichten Klustern um die Gefäße angeordnet sind. Viele dieser BrdU-markierten Zellen koexprimieren vaskuläre Marker, was darauf hindeutet, dass Neurogenese räumlich mit Angiogenese, der Ausbildung neuer Gefäße aus bereits vorhandenen, und Remodelierung der Gefäße verknüpft ist. Im OB sind Neuroblasten mit der EZM um perivaskuläre, astrozytäre Fortsätze assoziiert und nutzen die radial verlaufenden Gefäße als Migrationssubstrat und Richtungsweiser.¹⁸⁸

In Ko-Kulturversuchen zeigten Shen *et al.* (2004),¹⁸⁹ dass endotheliale Zellen, nicht aber glatte Muskelzellen lösliche Faktoren sekretieren, die das Selbsterneuerungspotential neuraler Stammzellen erhöhen, deren Differenzierung inhibieren und die Entstehung neuronaler Zellen fördern. Endothelzellen stimulierten in Ko-Kultur die Ausbildung zahlreicher Zellkontakte zwischen neuroepithelialen Zellen und gleichzeitig die Aktivierung von Notch und Hes-1, Faktoren, die im Selbsterneuerungs- und Überlebensprogramm von Stammzellen eine zentrale Rolle spielen.¹⁸⁹⁻¹⁹¹ Ferner wird die Differenzierung astrozytärer Vorläuferzellen durch von Endothelzellen synthetisierte Faktoren begünstigt.^{192,193}

2.4 Der Vaskuläre Endothelzellwachstumsfaktor: Die VEGF-Familie und ihre Rezeptoren

2.4.1 Die Liganden des VEGF/VEGF-Rezeptor-Systems und ihre Rolle im vaskulären System

Die VEGF-Familie besteht aus sechs homologen Faktoren: VEGF-A-E und Plazenta-Wachstumsfaktor (PlGF). Mitglieder der VEGF-Familie sind sezernierte Wachstumsfaktoren, die von essentieller Bedeutung für die Entwicklung des

Gefäßsystems sind. Während VEGF-A, -B, -D, -E und PlGF überwiegend auf das Wachstum von Blutgefäßen einwirken,^{194,195} hat VEGF-C eine maßgebliche Rolle in der Entwicklung und Homöostase des lymphatischen Systems.^{196,197} Neuer Studien zeigen eine zusätzliche direkte Wirkung von VEGF-A, -B und -C auf neurale Zellen.^{34,35,198} Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Rolle des VEGFR-1 in adulter Neurogenese. An VEGFR-1 binden nur VEGF-A, -B und PlGF, daher werden VEGF-C, -D und -E hier nicht weiter beschrieben. Ihre Funktionen sind in mehreren Review-Artikeln dargelegt.^{34,199-201}

2.4.1.1 Vaskulärer Endothelzellwachstumsfaktor-A (VEGF-A)

VEGF-A wurde 1983 als vaskulärer Permeabilitätsfaktor (VPF) in Tumoren entdeckt²⁰² und lange als endothelzell-spezifisches Mitogen klassifiziert.^{194,202-205} Im Gefäß- und Nervensystem ist VEGF-A der am besten beschriebene Faktor der VEGF-Familie. VEGF-A ist als Homodimer 46 kD groß.²⁰⁶ Das humane Gen für VEGF-A ist auf dem Chromosom 6p21.3 lokalisiert²⁰⁷ und besteht aus 8 Exonen einer Gesamtlänge von ca. 14kB.²⁰⁶ Durch alternatives Spleissen entstehen sechs Isoformen von VEGF-A (im humanen System: VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₄₅, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ und L-VEGF). VEGF₁₆₅ (in der Maus VEGF₁₆₄) ist die am häufigsten vorkommende Form.¹⁹⁵

VEGF-A induziert die Ausbildung von Blutgefäßen während der Entwicklung und im adulten Organismus, stimuliert die Proliferation von Endothelzellen, reguliert deren Migration und Spezialisierung und ist durch Reduktion der Apoptoserate Überlebensfaktor für neu gebildete Gefäße.^{34,36,194,195,198,208-212} In einer aktuellen Studie beschreiben Lee et al (2007)²¹³ eine endotheliale Expression von VEGF-A und eine autokrine Rolle in der vaskulären Homöostase des adulten Gehirns.

Gradienten von VEGF-A dienen als Wegweiser für sich ausbildende Blutgefäße.^{214,215} Diese entstehen einerseits durch starke Expression von VEGF-A in der Zielregion, andererseits durch die verschiedenen Bindungsaffinitäten der VEGF-Spleissvarianten an die EZM. Die Bindungsaffinitäten korrelieren mit dem Vorhandensein der Bindungsdomänen für Heparinsulfat-Proteoglykane, welche auf Zellmembranen und Bestandteilen der EZM lokalisiert sind. VEGF₁₂₁ fehlen diese Bindungsdomänen gänzlich und ist daher frei diffundierbar.²¹⁵ Im sich entwickelnden Säugerhirn wird VEGF-A von neuroektodermalen Zellen der Ventrikulärzone exprimiert. Der entstehende VEGF-Gradient dirigiert die Endothelzellen einwandernder Gefäße, welche die VEGF-Rezeptoren (VEGR-1 und -2) exprimieren. Außerdem beeinflusst VEGF-A die

Expression von $\alpha\beta 3$ -Integrin, einem endothelialen Rezeptor für Bestandteile der EZM, welcher die zur Migration nötige Interaktion zwischen EZM und Endothelzellen vermittelt.^{216,217}

Dass VEGF-A unabdingbar für die Ausbildung des vaskulären Systems ist, zeigt die früh-embryonale Letalität der Knock-Out (KO)-Maus am Embryonaltag 9, nach Deletion bereits eines VEGF-A-Allels. Die Embryonen sterben aufgrund eines missgebildeten Gefäßsystems im Embryo und im Dottersack.^{208,212,218} Raab *et al.* (2004) zeigten, dass eine spezifische homozygote Deletion von VEGF-A in neuronalen Zellen des sich entwickelnden Maushirns in gestörter Angiogenese und somit verminderter Vaskularisierung des Gehirns resultiert. Des Weiteren ist extensive Apoptose in ventrikelnahen Zellen die Folge. Vermutlich im kausalen Zusammenhang dazu weisen diese hirnspezifischen KO-Mäuse eine Verzögerung des Größenwachstums des Vorderhirns und einen stark abgeflachten verkleinerten Schädel auf, einen Phänotyp, der an den der Mikroenzephalie des Menschen erinnert.^{209,219}

Die Expression von VEGF wird von vielen Faktoren wie Hormonen und Wachstumsfaktoren, vor allem jedoch durch Sauerstoffkonzentrationen reguliert.¹⁹⁹ Hypoxie-induzierbare Faktoren (HIF1 α and HIF2 α) binden an ein Hypoxie-responsives Element (HRE) in der 5' Promotorregion²²⁰⁻²²³ Daher hat VEGF große Bedeutung in der Schlaganfall- und Krebsforschung und ist therapeutischer Ansatzpunkt für die Re-Vaskularisierung ischämischen Gewebes oder die Inhibierung der Vaskularisierung von Tumorgewebe.

2.4.1.2 Vaskulärer Endothelzellwachstumsfaktor-B (VEGF-B)

VEGF-B zeigt große Homologie zu VEGF-A. VEGF-B wird in zwei verschiedenen Isoformen exprimiert (VEGF-B₁₆₇ und VEGF-B₁₈₆)^{224,225}. Wie VEGF-A stimuliert VEGF-B die Proliferation von Endothelzellen *in vitro* und von Angiogenese *in vivo*^{224,226} allerdings mit geringerer Effektivität. Mäuse sind nach homozygoter Deletion des Gens für *vegfb* (VEGF-B -/-) überlebensfähig und fertil, zeigen aber Störungen in der Entwicklung und der Funktion des Herzens.^{227,228} VEGF-B ist daher nicht essentiell für die embryonale Vaskulogenese und Angiogenese. Pathologische Modelle haben allerdings eine Rolle für VEGF-B in der Remodelierung des Gefäßsystems²²⁹ und der Protektion des Gehirns nach Hirninfarkt aufgezeigt.²³⁰

2.4.1.3 Plazenta-Wachstumsfaktor (PlGF)

PlGF wurde erstmals (1991) in der humanen Plazenta entdeckt.²³¹ Es wurden die Spleiß-Varianten PlGF-1 bis -4 (PlGF₁₃₁, PlGF₁₅₂, PlGF₂₀₃, PlGF₂₂₄) identifiziert.²³¹⁻²³³ Carmeliet *et al.* (2001)²³⁴ zeigten, dass eine Defizienz von PlGF (PlGF^{-/-}) in Mäusen keinen Einfluss auf die embryonale Angiogenese hat. Die Deletion von PlGF unter pathologischen Bedingungen resultiert in verminderter Angiogenese, vermehrtem Austritt von Plasma aus den Gefäßen und gesteigertem Kollateralwachstum.²³⁴ Eine Überexpression von PlGF hingegen steigert die Angiogenese und die Permeabilität der Gefäße.²³⁵

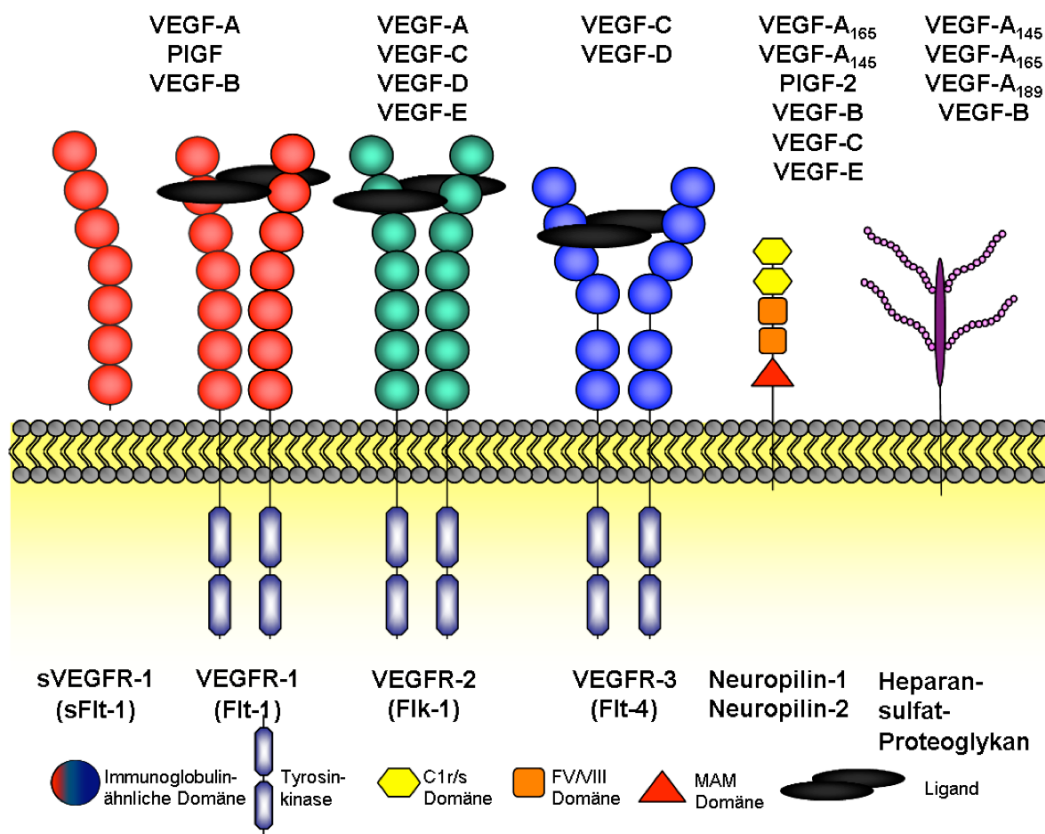


Abb. 5: VEGF/VEGF-Rezeptor-Familie.

Faktoren der VEGF-Familie binden an verschiedene Rezeptoren. Die Hauptrezeptoren sind die 3 Tyrosinkinase-Rezeptoren VEGFR-1-3. In der Maus wird VEGFR-1 auch als Flt-1, VEGFR-2 als Flk-1 und VEGFR-3 als Flt-4 bezeichnet. VEGF-Rezeptoren sind typische Rezeptortyrosinkinasen die aus extrazellulären immunoglobulinähnlichen Domänen, einer Transmembrandomäne und einer geteilten intrazellulären Tyrosinkinasedomäne bestehen. Ligandenbindung induziert die Dimerisierung der Rezeptoren. Der lösliche VEGFR-1 (soluble VEGFR-1; s-VEGFR-1; sFlt-1) ist eine sekretierte Spleiß-Variante des VEGFR-1. Heparansulfat-Proteoglykane binden und präsentieren VEGFs, während Neuropiline als VEGF-Korezeptoren agieren. Beide beeinflussen die Signaltransduktion der VEGF-Rezeptoren. (modifiziert von Raab und Plate, 2007)³⁴

2.4.2 Die VEGF-Rezeptoren

2.4.2.1 VEGF-Rezeptor-1 (Flt-1)

Zwei Formen des VEGFR-1 sind bekannt: Eine membrangebundene Form und eine kürzere, lösliche Form (soluble VEGFR-1; sVEGFR-1; sFlt-1). Im Gegensatz zu VEGFR-2 ist die Expression des VEGFR-1 wie die von VEGF-A durch Hypoxie induzierbar.²³⁶ VEGFR-1 zeigt, trotz seiner im Vergleich zu VEGFR-2 zehnfach höheren Bindungsaffinität zu VEGF-A, nur eine geringe Autophosphorylierung der Tyrosinkinasedomäne. Es wird angenommen, dass VEGFR-1 (Flt-1), vor allem die lösliche Form, seine biologische Wirkung hauptsächlich durch Regulation des frei verfügbaren VEGF-A ausführt und damit die Aktivierung der Signaltransduktion des VEGFR-2 kontrolliert.^{237,238} VEGFR-1 scheint regulierende und inhibierende Wirkungen auf vaskuläre Prozesse zu haben. Ein inhibierender Effekt wurde dadurch deutlich, dass Inaktivierung von VEGFR-1 (*flt-/-*) zu einer Vermehrung vaskulärer Vorläuferzellen und dadurch zu vaskulären Abnormalien führt.^{239,240}

Einige Studien zeigen eine Rolle der intrazellulären Signaltransduktion des VEGFR-1.^{241,242} So reguliert VEGFR-1 die Proliferation von Endothelzellen durch Aktivierung von Phospholipase C und den Mitogen-activated protein Kinase (MAPK)-Signalweg.²⁴³ VEGFR-1 Signaltransduktion wurde auch in der Mobilisierung und Migration von hämatopoetischen Zellen beschrieben^{244,245} Weiter wurde ein Einfluss auf die Zellteilung von Endothelzellen postuliert.²⁴⁶ Überdies lassen die negativen Folgen der Deletion von PIGF unter pathophysiologischen Bedingungen, wie Ischämie, Tumoren oder Entzündungen, auf eine Bedeutung der Signaltransduktion des VEGFR-1 schließen.^{199,234} Bindung von PIGF an VEGFR-1 amplifiziert VEGF-A-induzierte Angiogenese durch Transphosphorylierung von VEGFR-2.^{247,248} PIGF stimuliert die Autophosphorylierung bestimmter Tyrosinreste und damit die Expression spezieller Zielgene von VEGF-A. Funktionen und Signaltransduktionsmechanismen von VEGFR-1 könnten daher abhängig vom Entwicklungszeitpunkt, Zelltyp oder gebundenen Liganden variieren.²⁴⁹ Ferner scheint es mehrere Interaktionsmöglichkeiten zwischen beiden Rezeptoren zu geben, vor allem verstärkt durch die Ausbildung von VEGFR-1/-2 Heterodimeren.²⁴⁷

Konträr zum KO des gesamten VEGFR-1 beeinträchtigt die alleinige Deletion der intrazellulären Domäne (Flt-1TK^{-/-}) die Embryonalentwicklung und die Physiologie der

adulten Maus nicht.²⁵⁰ Die Signaltransduktion des VEGFR-1 scheint für die Entwicklung des Organismus nicht von entscheidender Bedeutung zu sein. Ist allerdings die Transmembrandomäne zusätzlich deletiert, kommt es teilweise zu embryonaler Letalität durch verminderte Gefäßentwicklung. Daher scheint die membrangebundene Ligandenbindungsdomäne von VEGFR-1 eine wichtige Funktion in der Regulierung des verfügbaren VEGF-A zu haben.²⁵¹

2.4.2.2 VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR-2)

VEGFR-2 wird als der Hauptrezeptor der Vermittlung mitogener, angiogener und permeabilitätssteigernder Signale von VEGF-A angesehen. Nach Ligandenbindung kommt es zu einer Dimerisierung und Autophosphorylierung liganden-spezifischer Tyrosinreste. Die phosphorylierten Tyrosinresten interagieren mit Adaptermolekülen oder Phosphatasen und initiieren eine Vielzahl von Signalwegen.^{252,253} Die Aktivierung des Phosphatidylinositol-3'-OH Kinase (PI3-Kinase)/Akt-Signalweg ist einer der Hauptsignalwege des VEGFR-2 und führt zur Steigerung der Zellproliferation und Angiogenese und Verminderung der Apoptose von Endothelzellen und *in vitro* auch von neuronalen Zellen.²⁵⁴⁻²⁵⁶ Die Signaltransduktion über die Enzyme p38 MAP-Kinase oder Fokale Adhäsionskinase (FAK) beeinflusst die Zellmigration.^{252,253}

2.4.2.3 Neuropiline (Nrp)

Nrp-1 ist ein oberflächenständiges Glykoprotein von 130-140 kD. Es wurde erstmals als Rezeptor für Semaphorin, einem chemorepulsiven Faktor in der Richtungsfindung von Axonen, beschrieben.²⁵⁷ Später wurden Nrp-1 und -2 dazu als isoform-spezifische Rezeptoren für VEGFs gezeigt. Nrp-1 hat Bindungsaffinitäten für VEGF₁₆₅, VEGF-B, PlGF-2 und einige VEGF-E-Formen, Nrp-2 hingegen für VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₆₅, PlGF-2 und VEGF-C.^{195,199} Neuropiline haben eine sehr kurze intrazelluläre Domäne, die nicht ausreichend für eine alleinige, unabhängige Signaltransduktion ist. Ihre Signaltransduktion verläuft durch Komplexbildung mit anderen Rezeptoren, u.a. aus der Familie der Plexine.¹⁹⁹ Ferner wurde eine Vermittlung von Signaltransduktion von Liganden der VEGF-Familie über Komplexe zwischen Nrp-1 und VEGFR-2^{258,259} und Nrp-1/VEGFR-1^{260,261} beschrieben. Überexpressions- und KO-Mausmodelle der Neuropiline lassen deren wichtige Rolle in der Entwicklung des vaskulären, neuronalen und lymphatischen Systems erkennen.²⁶²⁻²⁶⁴

2.4.3 Das VEGF/VEGF-Rezeptorsystem in der Zellmigration

Das VEGF/VEGF-Rezeptor-System wurde in der Regulation der Migration verschiedener Zellen beschrieben. Mäuse, die VEGF-A unter dem Promoter der Neuronspezifischen Enolase (NSE) überexprimieren, weisen nach zerebraler Ischämie eine gesteigerte Neurogeneserate in der SVZ und der näheren Umgebung des Infarktareals, sowie eine gesteigerte Rekrutierung neu gebildeter, kortikaler Neurone ins geschädigte Gebiet auf, was mit einer schnelleren Linderung neurologischer Defizite einhergeht.²⁶⁵ *In vitro* wird der chemoattraktive Effekt von VEGF-A auf neurale Vorläuferzellen über VEGFR-2 vermittelt und ist abhängig von der Präsenz von FGF-2.²⁶⁶

Auch IQGAP1, ein Zellgerüstprotein, vermittelt Signale von VEGF-A auf migrierende neurale Vorläuferzellen.²⁶⁷ Weiter ist die Migration der Zellsomata von Motorneuronen des Gesichtsnervs abhängig von Semaphorin-IIIa, einem Liganden von Nrp-1 und von VEGF-A. VEGFR-1, nicht aber VEGFR-2, wird in diesen Neuronen exprimiert, was Grund zur Annahme ist, dass VEGF-A eine Komplexbildung von VEGFR-1 und Nrp-1 auslöst und der Komplex das VEGF-A-Signal weiterleitet.²⁶⁸

VEGFR-1 ist darüber hinaus in die Migrationsmechanismen verschiedener anderer Zelltypen involviert. Die VEGF-A induzierte Migration adventitialer Fibroblasten wird über VEGFR-1 gesteuert.²⁶⁹ Außerdem wird VEGFR-1 von Monozyten des peripheren Blutes und Makrophagen exprimiert und vermittelt deren durch VEGF-A induzierte Migration.^{245,270,271} Auch in leukämische Zellen stimuliert die Aktivierung des VEGFR-1 die Migration. Entsprechend bewirkt die Neutralisierung des VEGFR-1, dass sich das Überleben dieser Zellen verlängert und hemmt deren Austritt aus dem Knochenmark.²⁷² In myelischen leukämischen Zellen wird dies durch Ausbildung eines makromolekularen Signalkomplexes aus VEGFR-1 mit einem spannungsgesteuerten Kaliumkanal und der β_1 -Untereinheit der Integrin-Rezeptoren gesteuert.²⁷³

VEGFR-1 ist darüberhinaus in die Wanderung von Endothelzellen und deren Zelladhäsion an die EZM involviert. VEGFR-1, vor allem die lösliche Form, agiert als EZM-Protein und mediiert die Migration und Chemotaxis von Endothelzellen durch Interaktion mit $\alpha_5\beta_1$ -Integrin. Dieser Prozess ist abhängig von Proteinsynthese und Sekretion, was aufzeigt, dass VEGFR-1 wohl über die Synthese und Sekretion spezieller EZM-Proteine auf die Mobilität von Endothelzellen wirkt.²⁷⁴

2.4.4 Die Rolle des VEGF/VEGF-Rezeptor-Systems in adulter Neurogenese

VEGF-A wird im adulten Gehirn von Neuronen, Astrozyten und Epithelzellen des Plexus choroideus (PC) exprimiert.^{83,267,275} Unter physiologischen Bedingungen ist nur in frühpostnatalen Stadien eine neuronale Expression von VEGF-A zu beobachten, die ab dem Postnataltag 13 in eine zunehmend rein gliale Expression übergeht.²⁷⁶ VEGF-A wird auch im adulten Gehirn vom PC in den Liquor der Ventrikel sekretiert und kann so auf Ependymzellen und die umliegenden Gewebe, wie die SVZ wirken.^{34,275} Nachdem VEGF-A lange als endothelzell-spezifisch angesehen wurde, postulierten Yang und Cepko (1996),²⁷⁷ basierend auf der Expression des VEGFR-2 in neuralen Vorläuferzellen der sich entwickelnden Retina, erstmals eine Rolle im sich entwickelnden ZNS. Ein direkter neurotropher Effekt von VEGF-A, mediiert durch den VEGFR-2, konnte kurz danach *in vitro*²⁷⁸ und später ebenso *in vivo*^{279,280} in der sich entwickelnden Retina bestätigt werden.

VEGF-A scheint direkte und indirekte Effekte auf die Neurogenese im adulten ZNS zu haben. Ein wichtiger Anhaltspunkt über die Koordination der Interaktionen von Angiogenese und neuronaler Plastizität durch VEGF-A wurde in einer Studie von Loissant *et al.* (2002)¹⁸⁶ am Gesangszentrum des Kanarienvogels entdeckt. Ein Testosteron-Implantat induzierte eine deutliche Steigerung der Angiogenese und der Expression von VEGF-A. VEGFR-2-positive Endothelzellen der neuen Gefäße produzierten den neurotrophen Faktor BDNF (Brain-derived neurotrophic factor), welcher wiederum die Migration von neuralen Zellen zum Gesangszentrum des Neostriatums förderte. Daneben wurde VEGF-A um Kluster proliferierender Zellen im Hippokampus, die um Blutkapillaren angeordnet sind, detektiert. Viele der proliferierenden Zellen exprimieren VEGFR-2.¹⁸⁵ Seitdem wurden Effekte von VEGF auf die adulte Neurogenese in zahlreichen Studien analysiert. VEGF-A wird *in vitro* in neuralen Stammzellen exprimiert,^{281,282} fördert deren Selbsterneuerungspotential und Proliferation und reduziert deren Apoptose über einen direkten Mechanismus. Infusion von VEGF-A in die LV von Ratten stimuliert die Proliferation neuraler und vaskulärer Zellen in der SVZ der LV und dem DG des Hippokampus.^{83,84} Ferner ist die Steigerung der hippokampalen Neurogenese nach physischer Betätigung abhängig von VEGF-A.²⁸³

Die Wirkung von VEGF-A ist dosisabhängig. Während geringe VEGF-Konzentrationen die Expression von VEGFR-1 und -2 erhöhen, aber nicht die Proliferation oder Apoptoserate ändern, vermindern hohe Dosen die Expression der Rezeptoren und die

Proliferation neuraler Stammzellen, begünstigen aber gleichzeitig die Differenzierung in Neurone.²⁸¹ Beides scheint über VEGFR-2 mediiert zu werden, da Inhibitoren für VEGFR-2 die Effekte blockieren.⁸³ Administration hoher VEGF-A-Dosen beeinflusst mehrere Zelltypen und führt zu einer Steigerung BrdU-positiver Neurone, Astrozyten und Endothelzellen.⁸⁴ Gabe von VEGF-A hat ferner einen mitogenen Effekt auf GFAP-positive Astroglia, die VEGF-A und die mRNA des VEGFR-1 exprimieren.²⁸⁴⁻²⁸⁷ In wieweit endogenes VEGF-A *in vivo* unter physiologischen Bedingungen direkt auf neurale Stammzellen der adulten SVZ einwirkt ist allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt. Im Hippokampus ist VEGF-A in die mit Lernen und Gedächtnisleistungen verbundene Neurogenese involviert. Nach Lernvorgängen wird VEGF-A im Hippokampus verstärkt exprimiert. Überexpression von VEGF-A in hippokampalen Neuronen steigert die Neurogenese und Angiogenese und verbessert kognitive Fähigkeiten.²⁸⁸ Entsprechend führt neurale Expression von dominant-negativem VEGFR-2 im Hippokampus zu einer starken Reduktion proliferierender Zellen und verminderter Lernfähigkeit,²⁸⁸ was ebenfalls auf einen direkten Effekt von VEGF-A auf neurale Zellen hinweist.

Die Expression der Rezeptoren VEGFR-1 und -2 in neuronalen Zellen unter physiologischen Bedingungen, ist in der Literatur äußerst divergent beschrieben. Obwohl mehrere Studien mRNA-Expression beider VEGF-Rezeptoren im embryonalen Hirn hauptsächlich in Endothelzellen zeigen, wurde im embryonalen Vorderhirn (E15) VEGFR-2 ebenso auf neuronalen Zellen detektiert, die zusätzlich oft auch VEGF-A exprimierten. Dies lässt autokrine und parakrine Effekte von VEGF-A auf das sich entwickelnde Nervensystem vermuten.²⁵⁴ Immunhistochemische Studien am Rattenhirn zeigen VEGFR-1 und -2 Expression in Neuronen des adulten ZNS. Yang *et al.* (2003)²⁸⁹ zeigten eine neuronale Expression des VEGFR-1 in den ersten beiden Lebenswochen in Kortex, Hippokampus und Striatum. In späteren Entwicklungsstadien ist VEGFR-1 kaum in Neuronen detektierbar. Die Anzahl der VEGFR-2-exprimierenden Neurone hingegen nimmt mit steigendem Alter zu und zeigt keine regionalen Unterschiede. Beide Rezeptoren sind auf neuronalen Vorläuferzellen exprimiert und ihre Expression wird durch Anwesenheit von FGF-2 gesteigert.^{266,267}

In adulter Neurogenese sind bisher keine Funktionen für VEGFR-1 bekannt. Auch für PlGF, was an VEGFR-1 und Neuropiline bindet, wurden bisher keine Effekte auf adulte Neurogenese beschrieben. Jedoch wird VEGF-B, was nicht an VEGFR-2, sondern nur an VEGFR-1 und Neuropilin-1 bindet, im adulten ZNS exprimiert und nach Ischämie

hochreguliert. Die Deletion von VEGF-B in Mäusen (VEGFB^{-/-}) bedingte ein größeres Infarktvolumen nach Okklusion der mittleren Zerebralarterie. Die Gabe von VEGF-B protegiert kortikale Neurone *in vitro*.²³⁰ Überdies steigert Administration von VEGF-B die Proliferation neuraler Vorläuferzellen in SVZ und Hippokampus und die Produktion neuronaler Zellen *in vitro* und *in vivo*. Übereinstimmend resultiert die Deletion von VEGF-B (VEGF-B^{-/-}) in reduzierter neurogener Aktivität im adulten Maus-ZNS, welche durch Infusion von VEGF-B wieder das physiologische Maß anheben werden konnte.²⁹⁰ Diese Daten sprechen für eine Rolle von VEGFR-1 in adulter Neurogenese auch unter physiologischen Bedingungen.

2.5 Zielsetzung der Arbeit:

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Regulation adulter Neurogenese durch Liganden-Rezeptorsysteme der VEGF-Familie zu untersuchen. Der Fokus lag hierbei auf der Rolle des VEGFR-1, für den bisher keine Funktionen in adulter Neurogenese bekannt sind. Allerdings stimuliert ein Ligand des VEGFR-1, VEGF-A, die Neurogenese *in vitro* und *in vivo*.^{83,84,266,280,288,291} Bisher wurde VEGFR-2 als Hauptrezeptor in der Vermittlung neurogener Signale von VEGF-A beschrieben.^{252,253} Aktuelle Studien zeigen jedoch einen neurogenen Effekt von VEGF-B,^{230,290} welches alleinig an VEGFR-1 und Neuropilin-1 bindet.²⁰⁰ Daraus resultierte unsere Hypothese, dass auch VEGFR-1 ein regulatorischer Faktor für Prozesse der adulten Neurogenese sein könnte.

Dieser Forschungsarbeit lagen folgende Fragestellungen zugrunde:

- 1) In welchen funktionellen Bereichen des adulten ZNS wird der VEGFR-1 exprimiert? Welche Zelltypen exprimieren VEGFR-1? Gibt die region- und zellspezifische Lokalisation des VEGFR-1 einen Hinweis auf die Funktion des Rezeptors in adulter Neurogenese?
- 2) Welche Rolle hat der VEGFR-1 in den Prozessen adulter Neurogenese, in
 - a) der Proliferation neuraler Stamm- und Vorläuferzellen?
 - b) dem Überleben von Zellen in den Regionen adulter Neurogenese?
 - c) der Migration neuraler Vorläuferzellen?
 - d) der neuronalen Differenzierung?
- 3) Welcher Mechanismus liegt den beobachteten Effekten der Inhibierung der Signaltransduktion des VEGFR-1 zugrunde?

Durch diese Arbeit soll das grundsätzliche Verständnis der Regulation adulter Neurogenese erweitert werden. Das Verständnis der zellulären und molekularen Kontrolle adulter Neurogenese unter physiologischen Bedingungen stellt die Grundlage für den therapeutischen Einsatz neurogenese-stimulierender Faktoren bzw. die endogene Stimulation neuraler Stammzellen bei neurodegenerativen Erkrankungen des ZNS dar.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte und Hilfsmittel

Gerät/Hilfsmittel	Typbezeichnung	Firma
Mikroskope		
Fluoreszenzmikroskop	BX 52	Olympus, Münster
Konfokales Mikroskop	Eclipse TE2000-E	Nikon, Düsseldorf
Konfokales System	Eclipse C1Si	Nikon, Düsseldorf
Mikroskop (Stereologie)	Axiphot	Carl Zeiss AG, Göttingen
inverses Fluoreszenzmikroskop	IX-70	Olympus, Münster
OP-Mikroskop	OPMI 1F-	Carl Zeiss AG, Göttingen
Binokulare	Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Göttingen
	SMZ1500	Nikon, Düsseldorf
Kameras		
Fluoreszenzmikroskop	U-CMAD-2	Olympus, Münster
Stereologie	HV-C20A	Hitachi, Feldkirch
Fluoreszenzmikroskop	DS-5Mc	Nikon, Düsseldorf
Binokular	DS-5M	Nikon, Düsseldorf
Inverses Mikroskop	Olympus IX 70	Olympus, Münster
Software		
Stereologie	Stereo Investigator 2000	MicroBrightField, Colchester, VT
Fluoreszenzmikroskopie	analySIS Image Processing	Soft Image System, Olympus, Münster
	NIS Elements Br	Nikon, Düsseldorf
Konfokale Mikroskopie	EZ-C1	Nikon, Düsseldorf
Bildbearbeitung/-auswertung	Image J	CIT, Bethesda, MA
	Photoshop® CS	Adobe® Systems, München
ELISA-Reader	Magellan™	Tecan, Salzburg
Geldokumentation	FluorChem™	Alpha Innotech, San Leandro, CA
Tabellenkalkulation	Excel® 2003	Microsoft®, Unterschleissheim
Kaltlichtlampen	KL 1500LCD	Schott, Mainz
	KL 1500 electronic	Carl Zeiss AG, Göttingen
Kryostate	CM 19099	Leica, Heidelberg
	HM 550	Microm Int., Walldorf

Gerät/Hilfsmittel	Typbezeichnung	Firma
Vibratom	VT 1000S	Leica, Heidelberg
PCR-Maschine	Robocycler Gradient 96	Stratagene, Cedar Creek TX
ELISA-Reader	Genios SpectraFluor+	Tecan, Salzburg
Geldokumentationssystem	Multi Image Light Cabinet	Alpha Innotech, San Leandro, CA
Zentrifugen	5417 C, 5415 D	Eppendorff, Hamburg
	Labofuge 400R, Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Thermomixer	5436	Eppendorf, Hamburg
Wasserbad	TW12	Julabo, Selbach
Feinwaage	TE313S-DS	Sartorius AG, Göttingen
Brutschrank	HERA cell 150	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Germinator	Dry Sterilizer	Cellpoint Scientific
Gewebehomogenisator	Ultra-Turrax T8	Janke & Kunkel, Staufen
Stereotaxierahmen	002337R	KOPF

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Vertreiber/Hersteller
Brain Infusion Kit II	Alzet®, DURECT Corp., Cupertino, USA
Deckgläschen	Menzel Gläser, Braunschweig
Millex-GV 0.22µm Filter	Millipore™, Billerica, MA
Nylonmembran, positiv geladen	Roche, Mannheim
Objektträger Superfrost®	Menzel Gläser, Braunschweig
Osmotische Micropumpen Model 1002	Alzet®, DURECT Corp., Cupertino, USA
Phase Lock Gel Heavy Gefäß	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 0,2-2ml	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Loctite Gewebekleber	Alzet®, DURECT Corp., Cupertino, USA

3.1.3 Verwendete Chemikalien

Lösungsmittel sowie Standardchemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Fluka Buchs Pharmacia (Freiburg), Merck (Darmstadt), Roth (Carlsbad, CA, CA) und Sigma (München) bezogen. Alle Salze, Säuren, Basen und Lösungsmittel besaßen p.a. Qualität oder wurden in ihrer konzentrierten oder reinsten Form verwendet.

3.1.3.1 Spezielle Chemikalien und Lösungen:

Produkt	Firma
Aqua-Polymount	PolyScience, Warrington, PA

Produkt	Firma
B27-Supplement	Invitrogen, Carlsbad, CA
BCIP, X-Phosphat (5-Brom-4-Chlor-3-Indoylphosphat)	Roche, Mannheim
Blockierungsreagenz (In situ-Hybridisierung)	Roche, Mannheim
BrdU (5-Bromo-2-deoxyuridine)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Complete EDTA-free (Proteinase Inhibitor Cocktail)	Roche, Mannheim
DAB (3,3'-Diaminobenzidin) SIGMA Fast™-Tabletten	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol-dihydrochlorid-hydrat) 300mM	Molecular Probes, Eugene, OA
Denhardts	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Dextransulfat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
DePeX-Einschlusmittel (Polysterol in Xylol)	Biochemika, Neu-Ulm
DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) F12	Gibco GmbH, Eggenstein
dNTP (10mM)	Invitrogen, Carlsbad, CA
Double Staining Enhancer	Zymed, San Francisco, CA
DTT (0,1M)	Invitrogen, Carlsbad, CA
Eserserum	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Hefe t-RNA	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Kanamycin	Carl Roth, Karlsruhe
NBT (4-Nitroblautetrazoliumchlorid)	Roche, Mannheim
Neurobasal A Medium	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Carlsbad, CA
Phosphate Buffer Saline (PBS) - nach Dulbecco	Biochrom AG, Berlin
Physiologische Kochsalzlösung 0,9%	Braun Melsungen AG, Melsungen
Poly-L-Ornithin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Salmon Sperm	Stratagene, Cedar Creek, TX
Tween-20	Invitrogen, Carlsbad, CA
Ziegenserum	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Toto®-3 iodide (642/669)	Molecular Probes, Eugene, OA
Matrigel	BD-Biosciences, Bedford, MA

3.1.3.2 Medikamente / Medizinische Präparate:

Präparat	Hersteller
Isofluoran®	Baxter, Unterschleissheim
Temgesic® (Buprenorphinhydrochlorid)	Essex pharma, München
Ketavet®	Pharmacia, Karlsruhe
Rompun®	Bayer Health Care, Leverkusen
Gentamycin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Albumin Fraktion V, Maus	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Bephanten®-Augensalbe	Roche, Mannheim

3.1.4 Häufig verwendete Lösungen

Für die Experimente wurden Standardlösungen in deionisiertem, ultrafiltriertem Wasser angesetzt, das von der Anlage Milli-Q Biocel A10 (Millipore, Eschborn) bezogen wurde. Hitzestabile Lösungen wurden zur Sterilisation autoklaviert, hitzeinstabile Lösungen sterilfiltriert (0,22/0,45 µm Porenweite, Millipore). Alle weiteren Lösungen sind zu den entsprechenden Experimenten angegeben.

Lösung	Zusammensetzung
Anästhesie-Cocktail:	2 ml Ketavet 0,5 ml Rompun 9 ml Physiologische Kochsalzlösung (Braun)
Blockierungslösung (ISH+TUNEL)	10% Blockreagenz (Roche, Mannheim) in DIG-1
Borate Buffer 5x	0.5 M Borsäure pH 8.5
DIG-1 (5x)	0,5 M Maleinsäure-dinatriumsalz-Dihydrat 0,75 M Natriumchlorid pH 7,5 einstellen
DIG-3 (5x)	0,1 M Tris Base 0,1 M Natriumchlorid 0,05 M Magnesiumchlorid
PBS (1M) 10x (Phosphate buffered saline)	0,137 M NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,4
Paraformaldehyd (PFA) 4% [w/v]	[w/v] in 0,1M PBS, pH 7,4
Phosphatpuffer (5x)	0,015 M NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 0,385 M Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O pH 7,4
Saccharoselösung 30 % [w/v]	400 ml 0.1M Phosphatpuffer (s.o.) 150 g Saccharose
SSC-Lösung 20x (Standard-Salzcitratlösung)	3 M NaCl 0,3 M Trisodium-Citrat
TBS (2M) 20x	1M Tris/Cl (1M) 1M Tris/Base (1M) 3M NaCl pH 7,4
TE (10x)	0,1 M Tris-Base 0,01 M EDTA pH 8

3.1.5 Verwendete Kits

Kit	Vertreiber/Hersteller
ApopTag Plus Apoptose-Kit	Chemicon, Temecula, CA
VectaStain ABC Kit	Vectors Labs, Burlingame, CA
AEC Substrate Kit	Vectors Labs, Burlingame, CA
MOM Kit- Mouse on mouse detection Kit	Vectors Labs, Burlingame, CA
Quantikine® Mouse VEGF ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, MN
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden

3.1.6 Verwendete Antikörper:

Für die immunhistochemische Färbung von Zellen und Geweben (siehe Kap. 3.2.8) wurden die folgenden Primär- und Sekundärantikörper verwendet:

3.1.6.1 Primärantikörper:

Antigen	Firma	Herkunft	Verd.	Verwendung/Marker
BrdU	Harlan-Seralab	Ratte	1:500	BrdU-Detektion
beta-Catenin	BD Biosciences	Maus	1:50	
CD31 (PECAM-1)	Pharmingen	Ratte	1:100	Vaskulärer Marker
DIG-AP	Roche		1:500	DIG-Detektion
Doublecortin	Chemicon	Meerschweinchen	1:500	Marker für neuronale Vorläuferzellen
Flt-1 H-225	Santa Cruz	Kaninchen	1:100	VEGFR-1
GFAP	Chemicon	Maus	1:400	Astrozytärer Marker
GFAP	Dako	Kaninchen	1:500	Astrozytärer Marker
Nestin	BD Biosciences	Maus	1:50	Marker für neurale Vorläuferzellen
NeuN	Chemicon	Maus	1:500	Neurone
Neurofilament 160	Sigma	Maus		Neurone
PCNA	Dianova	Maus	1:50	Proliferationsmarker (frühe G1- und S-Phase)
ss-3-Tubulin (Tuj-1)	Promega	Maus	1:50	Marker für neuronale Vorläuferzellen
Tyrosinhydroxylase (TH)	Calbiochem	Maus	1:500	Dopaminerge Neurone
VEGF A-20	Santa Cruz	Kaninchen	1:100	

3.1.6.2 Immunglobuline (IgG):

Immunglobulin-Lösungen wurden von der Firma Santa Cruz bezogen und in der gleichen Proteinkonzentration, wie der zu verwendende Primärantikörper eingesetzt.

3.1.6.3 Sekundärantikörper:

Bezeichnung	Konjugation	Hersteller/Vertreiber	Verd.
Ziege-anti-Maus IgG	Alexa Fluor® 488 Alexa Fluor® 568	Molecular Probes, Eugene, OA	1:200
Ziege-anti-Kaninchen IgG	Alexa Fluor® 488 Alexa Fluor® 568	Molecular Probes, Eugene, OA	1:200
Ziege-anti-Kaninchen IgG	Cy5	JacksonImmuno, West Grove, PA	1:200
Ziege-anti-Meerschweinchen IgG	Alexa Fluor® 568	Molecular Probes, Eugene, OA	1:200
Esel-anti-Kaninchen IgG	Alexa Fluor® 488 Alexa Fluor® 568	Molecular Probes, Eugene, OA	1:200
Esel-anti-Maus IgG	Alexa Fluor® 488 Alexa Fluor® 568	Molecular Probes, Eugene, OA	1:200
Ziege-anti-Ratte IgG	Alexa Fluor® 488 Alexa Fluor® 568	Molecular Probes, Eugene, OA	1:200
Ziege-anti-Maus IgG	Biotin	Vector Labs, Burlingame, CA	1:250
Ziege-anti-Kaninchen IgG	Biotin	Vectors Labs, Burlingame, CA	1:250

3.1.7 Verwendete Wachstumsfaktoren

Faktor / rekomb. Protein	Vertreiber/Hersteller
VEGF-A ₁₆₄ (Maus)	Reliatech, Braunschweig
VEGF-A ₁₆₄ (Maus)	R&D Systems, Minneapolis, MN
FGF-2	Cell Concepts, Umkirch

3.1.8 Verwendete Enzyme

Enzym	Vertreiber/Hersteller
Proteinase K	AppliChem, Darmstadt
Proteinase K (ISH)	Roche, Mannheim
DNAse I, RNAse frei	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
RNAse A	Qiagen, Hilden
Taq-DNA-Polymerase	Invitrogen, Carlsbad, CA, CA
EcoRI	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
BamHI	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
XbaI	MBI Fermentas, St. Leon-Roth

Enzym	Vertreiber/Hersteller
T7 RNA Polymerase	Roche, Mannheim
T3 RNA Polymerase	Roche, Mannheim

3.1.9 Verwendete Mausstämme

Alle verwendeten Tiere wurden in der Zentralen Forschungseinrichtung des Universitätsklinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main gezüchtet oder bei der Firma Charles River bestellt.

Kontrollmäuse/Wildtypmäuse: C57Bl/6 -Mäuse (Charles River, Sulzfeld)

Transgene Mäuse: Flt-1Tk (Hitsuraka *et al.*, 1998)²⁵⁰

Bei Flt-1TK^{-/-} Mäusen handelt es sich um „Knock-out“ (=KO) Mäuse, denen die intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne (TK) des VEGF-Rezeptors-1 (Flt-1) fehlt. Diese Mäuse wurden im Labor von M. Shibuya, Institute of Medical Science der Universität von Tokyo, Japan generiert und zur Verfügung gestellt. Die Ligandenbindung des Rezeptors ist durch den Verlust der intrazellulären Domäne nicht beeinträchtigt, jedoch findet keine Signaltransduktion mehr statt.^{241,250}

3.2 Methoden

Soweit nicht anders angegeben, erfolgten alle Reaktionsschritte bei Raumtemperatur (RT).

3.2.1 Genotypisierungen:

3.2.1.1 Isolation genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien:

Lösung	Zusammensetzung
	50 mM KCl 1,5 mM MgCl ₂ 10 mM Tris-HCl, pH 8.3 0,45% [v/v] NP-40 0,45% [v/v] Tween-20 100 µg/ml Proteinase K (frisch zugesetzt)

Zur Genotypisierung von Mäusen wurde ein ca. 0,5 cm langes Stück der Schwanzspitze mit sterilen Scheren abgeschnitten und in 500 µl Lysis-Puffer bis zur vollständigen Lyse

(ü. N.) bei 56°C geschüttelt. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurden die Proben 20 min bei 96°C gekocht, kurz auf Eis gekühlt und bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

3.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR, modifiziert nach Mullis et al., 1986)²⁹²

Lösung	Zusammensetzung
Reaktionsmix	2 µl 10 x PCR-Puffer (Promega); 1,2 µl 25 mM MgCl ₂ ; 0,4 µl 10 mM dNTPs; 0,4 µl 100 µM Flt1TK fw, 0,2 µl 100 µM Flt1TK neo 0,2 µl 100 µM Flt1TK rev 0,2 µl Taq-Polymerase ddH ₂ O ad 19 µl)

Die Identifikation von DNA-Bereichen erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Zur Genotypisierung der Flt-1TK-Mäuse wurden folgende Primer von Hitsuaka *et al.* (1998)²⁵⁰ von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen:

Primer	Basensequenz 5'>3'
Flt 1TK fw	5'- ACC CTC TGT ACC TGG TCA ATT GAT GCA AAG -3'
Flt 1TK rev	5'- TGC AAA CTC CCA CTT GCT GGC ATC ATA G -3'
Flt 1TK neo	5'- GCT AAA GCG CAT GCT CCA GAC TGC CTT G -3'

Es wurde 1 µl der DNA-Probe aus Kap. 3.2.1.1 mit 19 µl des Reaktionsmix gemischt und die Reaktion mit folgenden Temperaturen und Zyklen durchgeführt:

4 min 95°C	} 28 Zyklen
30 sek 95°C	
30 sek 60°C	
35 sek 72°C	
7 min 72°C	
4°C	

3.2.1.3 Nukleinsäuren in DNA-Agarosegelen durch Gelelektrophorese

Lösung	Zusammensetzung
Probenpuffer	0,25% [w/v] Bromphenolblau 0,25% [w/v] Xylenzanol 40% [w/v] Saccharose 0,1 M EDTA
TBE-Puffer 10x	0,89 M Tris Base 0,890 M Borsäure 0,025 M EDTA pH 8

Die Größenfraktionierung der PCR-Amplifikate erfolgte in horizontal laufenden 2%-igen Agarosegelen (2% Agarose [w/v] in TBE-Puffer). Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurde der Agarose-Lösung der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (1:10000) zugesetzt. Die Proben wurden 1:6 mit Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zur Größenidentifizierung der Fragmente wurde zusätzlich ein 100 bp Marker mit aufgetragen. Die Gele waren für ca. 45 min einer Spannung von 80mV/cm ausgesetzt: Die Visualisierung der Fragmente erfolgte auf einem UV-Transilluminator.

3.2.2 In Vivo Versuche:

Alle durchgeführten Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium genehmigt und erfolgten nach den Richtlinien der Europäischen Union und des Deutschen Tierschutzgesetzes.

3.2.2.1 Analyse des genetischen Hintergrundes (Background-Analysis):

Zur Analyse des genetischen Hintergrundes wurden Schwanzbiopsien in 70%-igem [v/v] Ethanol in H₂O auf Eis zu Charles River Laboratories, Research Models and Services, Kisslegg versandt.

3.2.2.2 BrdU-Injektionen

Kontrollmäusen und KO-Mäusen (C57Bl/6 und Flt-1TK^{-/-}) wurde einmalig oder an fünf aufeinander folgenden Tagen intraperitoneal Bromodeoxyuridin (BrdU; 50 mg/kg) injiziert. BrdU wurde täglich frisch in der Konzentration 10 mg/ml [w/v] in physiologischer Kochsalzlösung (0,9%) bei 37°C gelöst und permanent vor Lichteinfall geschützt.

3.2.2.3 Intrazerebroventrikuläre Infusion von VEGF-A via osmotischer Micro-Pumpen

Lösung	Zusammensetzung
Artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit (aCSF)	8.65 g NaCl 0.22 g KCl 0.21 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O 0.16 g MgCl ₂ x 6 H ₂ O 0.21 g Na ₂ HPO ₄ 0.03 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O ad 1 l dH ₂ O

In diesem Experiment wurde 8 Wochen alten, männlichen Mäusen (C57 Bl/6 und Flt-1TK/-) unter Narkose eine Kanüle stereotaktisch in das Gehirn implantiert, über welche mittels einer osmotischen Mini-Pumpe für 6 Tage Kontrolllösung (aCSF) oder VEGF-A (2 ng/μl in aCSF) mit einer Durchflussrate von 0,5 μl/h (= 12 μl pro Tag) in das Ventrikelsystem des Gehirns appliziert wird. Die Mäuse der VEGF-A Gruppe erhielten somit eine Dosis von 2,4 ng VEGF-A pro Tag. Zur Implantation der Mikro-Pumpen in die LV wurden die Tiere im narkotisierten Zustand in einen stereotaktischen Apparat eingespannt und die Augen zum Schutz mit Augensalbe versorgt. Über der Schädelkalotte wurde die Haut enthaart und auf ca. 1 cm eingeschnitten. An Hand der stereotaktischen Koordinaten (in mm von Bregma ausgehend: lateral -0,1; apikal -0,11; z 3,5) wurde ein Loch über dem linken LV gebohrt. In dieses wurde vorsichtig die Kanüle, an der die osmotische Pumpe über einen kleinen Schlauch verbunden ist, eingeführt und mit Gewebeklebstoff befestigt. Die Wunde wurde mit Antibiotika und Analgetikum versorgt und mit Klammern verschlossen. Zur Stabilisierung der Körpertemperatur verblieben die Tiere bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose auf einer warmen Heizmatte.

3.2.3 Transkardiale Perfusion

Zur Fixierung des Gehirns für die feingewebliche Untersuchung und um Blutzellen aus dem Gewebe zu waschen, die bei der Analyse von Immunfärbungen stören können, wurden Mäuse unter Narkose mit 4%-iger Paraformaldehydlösung perfundiert. Dazu wurde die Maus in Rückenlage an den Extremitäten fixiert, das Abdomen durch einen Medianschnitt bis zum Sternum geöffnet und Thoraxraum und Herz durch Durchtrennung der Rippen freigelegt. Zur Perfusion wurde eine Kanüle in den linken Ventrikel bis in die *Aorta ascendens* eingeführt und das rechte Atrium punktiert. Zunächst wurde mit physiologischer NaCl-Lösung das Blut aus den Gefäßen gespült,

bevor das Fixativ für 3 min durch das Gefäßsystem gepumpt wurde. Um die Gefäße nicht zu beschädigen wurde mit einer kontinuierlichen Durchflussrate von 8 ml/min gepumpt.

3.2.4 Hirnpräparation:

Zur Herstellung der Gewebeschnitte wurden Hirne aus Mäusen (s. Kap. 3.1.9) entnommen. Postnatale Tiere wurden durch zervikospinale Dislokation in Isofluran-Anästhesie getötet, dekapitiert und das Kopffell mit einem Skalpell in sagittaler Richtung durchtrennt. Vom Foramen magnum ausgehend wurde die Okzipitalschuppe mit einer Pinzette entfernt und der Schädelknochen durch Schnitte an der Mittellinie und den Seiten in frontaler Richtung durchtrennt bis das Schädeldach abgehoben werden konnte. Das Gehirn wurde vorsichtig von der Schädelbasisplatte gelöst, in eine Einbetttschale mit TissueTec überführt, auf Trockeneis tiefgefroren und bei -80°C gelagert. Bei Präparation nach transkardialer Perfusion (Kap. 3.2.3) wurden die Gewebe ü. N. in 4%-iger PFA-Lösung bei 4°C nachfixiert und zur Kryoprotektion in einer 30%-igen [w/v] Sacharose-Lösung bei 4°C aufbewahrt.

3.2.5 In Vitro System:

Sämtliche in der Zellkultur verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Greiner (Solingen), Nunc (Wiesbaden), Fisher Scientific (Nidderau, Sarstedt (Nümbrecht) und Brand (Wertheim) bezogen. Alle Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

3.2.5.1 Beschichten von Deckgläsern

Für die Migrationsversuche wurden Deckgläschen mit Poly-L-Ornithin-Lösung (1:6 in 1x PBS) ü. N. bei 37°C beschichtet und danach mehrfach mit 1x PBS gewaschen.

3.2.5.2 Kultivierung von Explantaten der Subventrikulärzone

Medium	Zusammensetzung
Medium für SVZ-Explantate	50 ml Neurobasal-A Medium 1 ml B27 100 µl/mg Strep 100 U/ml Pen 100 µl FGF (Endkonzentration 20 ng/ml)

Zur Untersuchung der Migration von Zellen aus der SVZ wurden die Hirne von Kontrollmäusen und Flt-1TK-/- entnommen und in 1x PBS mit dem Skalpell in saggittale Streifen (~1 mm) geschnitten. Aus dem anterioren Teil der LV wurden Stücke der SVZ herausgetrennt. Die SVZ-Explantate wurden in 60 µl Matrigel auf beschichtete Deckgläser gegeben. Nach Aushärten des Matrigels (~ 10 min) wurden die Explantate mit Migrationsmedium überschichtet. Dem Migrationsmedium wurde VEGF-A in der Konzentration 40 ng/ml zugegeben. Alle 2 Tage wurde die Hälfte des Mediums ausgewechselt und Wachstumsfaktor neu zugegeben. Die Explantate wurden zu verschiedenen Zeitpunkten am inversen Mikroskop fotografiert und Migrationsdistanzen unter Verwendung der Software ImageJ bestimmt.

3.2.6 Herstellung von Gewebeschnitten

3.2.6.1 Herstellung von Gefrierschnitten am Gefriermikrotom

Die 8-15 µm dicken Gefrierschnitte der Mäusehirne wurden an einem Gefriermikrotom bei -22°C angefertigt. Das tiefgefrorene Gewebe wurde auf einem Stahlzylinder mit einem Tropfen TissueTec in der gewünschten Schneiderichtung aufgeblickt. Die Schnitte, die gewünschten Hirnregionen enthielten, wurden auf durchnummerierte Objektträger transferiert. Nachdem die Präparate ü. N. bei RT oder für 1 h bei 50°C (für ISH) getrocknet waren, wurden sie bis zur weiteren Verwendung in dicht verschlossene Kunststoffboxen bei -20°C (IHC) oder -80°C (ISH) eingefroren. Für Färbungen mit dem Antikörper anti-Flt-1 oder TUNEL-Färbungen wurden die Präparate vor dem Einfrieren für 10 min Aceton bei -20°C fixiert und 1 h luftgetrocknet.

3.2.6.2 Herstellung von frei schwimmenden Dickschnitten am Gefriermikrotom

Lösung	Zusammensetzung
Kryoprotektionslösung (CPS)	250 ml Glycerin 250 ml Ethylenglykol 500 ml 1x Phosphatpuffer

Zur stereologischen Analyse wurden Serienschnitte für das Free-floating (frei schwimmende) Färbesystem angefertigt. Diese Methode hat den Vorteil, dass Reagenzien von beiden Seiten in den in Lösung frei schwimmenden Gefrierschnitt eindringen können. Die Schnittdicke betrug 40 µm. Die Gefrierschnitte wurden mit einem

Pinsel in 12 nummerierte Eppendorff-Gefäße mit Kryoprotektionslösung überführt, so dass in jedem Gefäß jeder 12. Schnitt zu liegen kam und die die Schnitte in einem Gefäß einen Abstand von 480 µm (12 x 40 µm) voneinander hatten.

3.2.7 Fluoreszenzkernfärbung

Zur Kernfärbung mit DAPI (0,5 µg/ml in 1x PBS) oder Toto®3 (1:1000) wurden je 50 µl der entsprechenden Lösung direkt auf den Schnitt oder die Zellen pipettiert und 10 min im Dunkeln inkubiert. Die Präparate wurden für 5 min in 1x PBS gewaschen und mit Aqua-Polymount eingedeckt.

3.2.8 Indirekte Immunfärbung

Indirekte immunhistochemische und Immunfluoreszenz-Färbungen erfolgten unter Verwendung des MOM–Mouse on mouse Detection Kit (Vector Labs).

Die aufgetauten Präparate wurden, je nach zu verwendendem Antikörper fixiert und 5 min in 1x PBS gewaschen. Die Präparate wurden 10 min in Methanol bei –20°C perforiert, erneut 2 x 5 min in 1x PBS gespült, für 1 h in einer feuchten Kammer mit MOM-Block (1 Tr./1,25 ml 1x PBS) inkubiert und danach für 5 min mit 1x PBS gewaschen. Es folgte eine 5-minütige Vorinkubation in MOM-Diluent (200 µl MOM-Diluent; 2,5 ml 1x PBS; 0,01% [v/v] Triton-X), bevor die in MOM-Diluent verdünnten Primärantikörper auf die Präparate pipettiert wurden. Für die Kontrollen wurde nur MOM-Diluent verwendet. Die Inkubation der Antikörperlösungen erfolgte bei 4 °C über Nacht. Mehrmaliges Waschen in 1x PBS entfernte ungebundene Primärantikörper.

3.2.8.1 Nachweis bei indirekter Immunfluoreszenzfärbung

Zur Detektion gebundener Primärantikörper wurden, nach mehrmaligem Spülen mit 1x PBS, mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Sekundärantikörper (verdünnt in MOM-Diluent (200 µl MOM-Diluent; 2,5 ml 1x PBS; 0,01% [v/v] Triton-X)) auf die Präparate pipettiert und in der feuchten Kammer für 1 h inkubiert. Danach wurden sie für 5 min in 1x PBS gewaschen und die Präparate in wässrigem Eindeckmedium eingedeckt.

3.2.8.2 Nachweis Reaktion bei indirekter POD-Immunfärbung

Der lichtmikroskopische Nachweis gebundener Primärantikörper erfolgte mit dem VectaStain-ABC-Elite-Kit und des AEC-Substrat-Kits (Vector Labs) indirekt über biotinylierte Sekundärantikörper. Die Färbung erfolgte nach Protokoll des Herstellers.

3.2.9 BrdU-Detektion

3.2.9.1 Lichtmikroskopische Immunfärbung

Lösung	Zusammensetzung
DAB-Färbelösung	1 Tablette Urea SIGMA Fast™ 1 Tablette DAB SIGMA Fast™ 0.04% NiCl in 1x TBS

Zur Bestimmung der Gesamtzahl der gefärbten Zellen einzelner Hirnregionen wurde jeder 4. (160 µm Intervall) oder 6. (240 µm Intervall) Schnitt einer Hemisphäre aus Kap. 3.2.6.2 gefärbt. Die frei schwimmenden Gefrierschnitte wurden 30 min in 0,6% [v/v] H₂O₂ in 1x TBS inkubiert, um unspezifische Reaktionen der Peroxidase zu minimieren und dann 3x 10 min in 1x TBS gewaschen. Folgende Reaktionsschritte dienen der DNA-Denaturierung, die zur Detektion BrdU-markierter Nuklei erforderlich ist: Inkubation Schnitte für 2 h in 50% Formamid/2x SSC bei 65°C, Spülen für 5 min in 2x SSC, Inkubation für 30 min in 2 M HCl bei 37°C und Waschen für 10 min in 0.1 M Borsäure, pH 8.5. Danach erfolgte ein 30-minütiger Blockierungsschritt in 3% Eselserum/1x TBS/0.1% Triton-X-100, bevor die Schnitte ü. N. mit dem anti-BrdU Primärantikörper aus der Ratte (1:500 in Blockierungslösung) bei 4°C inkubiert wurden. Nach mehrmaligem Waschen in 1x TBS wurden die Schnitte mit dem biotinylierten, gegen rattenspezifische Antigene gerichteten Sekundärantikörper für 1 h inkubiert. Die Schnitte wurden erneut 3x 10 min in TBS gewaschen und ein Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (VectaStain-ABC-Elite-Kit, Fa. Vectors Labs) für 1 h auf die Schnitte gegeben bevor die Visualisierung durch 8-minütige Inkubation mit DAB-Färbelösung erfolgte. Nach abschließenden Waschschritten in 1x TBS wurden die Schnitte in anatomischer Reihenfolge (lateral nach medial) auf Objektträger aufgezogen und ü. N. luftgetrocknet. Die Entwässerung erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 2x 5min 70%, 90%, 100% Ethanol in H₂O und Xylol) entwässert. Zur dauerhaften Haltbarkeit wurden sie mit DePeX-Einschlussmittel und einem Deckglas eingedeckt.

3.2.9.2 BrdU-Dreifachimmunfluoreszenz

Die BrdU-Dreifachimmunfluoreszenz-Färbung diente zur Analyse der Zelltypen und Entwicklungsstadien BrdU-positiver Zellen. Dabei wurde das Protokoll des ersten Versuchstages der BrdU-Detektion verwendet, der Peroxidase-Blockierungsschritt jedoch ausgelassen. Als Primärantikörper wurden je nach Fragestellung neben dem Ratte-anti-BrdU-Antikörper andere spezifische Marker verwendet. Dabei musste darauf geachtet werden, dass nicht mehr als ein Marker aus einer Spezies stammt. Nach Inkubation der Primärantikörper ü. N. bei 4°C auf dem Schüttler wurden die Schnitte 3x 10 min in 1x TBS gewaschen. Danach wurden sie für 1 h mit den fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert und erneut 3x 10 min in TBS gewaschen. Die Schnitte wurden in anatomischer Reihenfolge (lateral nach medial) auf Objektträger aufgezogen und mit Aqua-Polymount und Deckgläsern eingedeckt.

3.2.10 Auswertungen von Immunfärbungen:

Zur Minimierung von Fehlerquellen erfolgten alle Versuche „doppel-verblindet“, d. h. während der Durchführung der Experimente und während den Auswertungen war die Zugehörigkeit des Versuchstieres zu einer Versuchsgruppe numerisch verschlüsselt.

3.2.10.1 Stereologische Quantifizierung BrdU-positiver Zellen

Die Quantifizierung BrdU-positiver Zellen erfolgte mit einer systematischen, auf dem Zufallsprinzip beruhenden Methode, ähnlich der von Williams und Rakic (1988)²⁹³ und Gunderson *et al.* (1988)²⁹⁴. Dazu wurde ein halb-automatisches Stereologie-System (Stereoinvestigator®, MicroBrightField, Colchester, VT) verwendet, welches ausgewählte Areale in zufällig angeordnete Zählquadrate unterteilt und aus den gezählten Bereichen statistisch die Gesamtzellzahl des Gesamtareals berechnet. Zur Volumetrie wurde die Fläche mit der Distanz zum nächsten Schnitt multipliziert.

Positive Zellen, die an der obersten Fokusebene oder der lateralen Ausschlusslinien der vorgegebenen Zählquadrate lagen, wurden nicht mitgezählt. Da die Anzahl BrdU-positiver Zellen im Hippokampus vergleichsweise gering und die SVZ ein sehr schmales Areal ist, wurden in diesen beiden Regionen keine Zählrahmen verwendet. Zur Auswertung des OB wurden alle Schnitte in denen der OB zu sehen war verwendet. Bei Auswertung des Hippokampus, der SVZ und des Corpus callosum wurde der zu analysierende Bereich an Hand anatomischer Strukturen bestimmt. Der jeweils erste.

verwendete Schnitt war der, auf dem der dorsale Dentate Gyrus sich von seinem ventralen Part erstmals separiert zeigt.

3.2.10.2 Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszente Signale wurden mit dem Konfokalen Mikroskop analysiert. Um Fluoreszenzüberlagerungen zu vermeiden wurden die Fluoreszenzen sequentiell aufgenommen, wobei jedem Kanal nur Laserlicht einer Wellenlänge (488 nm, 568 nm oder 647 nm) zugeordnet war. Um falsch-positive Signale übereinander liegender Zellen auszuschließen wurden Pinhole-Einstellungen verwendet, die einer optischen Dicke von weniger als 30 μm entsprachen. Zur eindeutigen Überprüfung einer Kolo-kalisation wurden die Zellen entlang ihrer gesamten Z-Achse analysiert.

3.2.10.3 Konfokale Analyse von BrdU-Dreifachfärbungen

Um die Prozentzahl bestimmter Zelltypen BrdU-positiver Zellen zu bestimmen wurde jeweils jeder 6. Schnitt, wie in Kap 3.2.9.2 beschrieben, mit den entsprechenden Markern gefärbt. In jeder analysierten Region wurden pro Hirn 50 BrdU-positive Zellen auf Kolo-kalisation mit einem der verwendeten Markern untersucht. Die Auswertung erfolgte am Konfokalen Mikroskop. BrdU-positive Zellen wurden im Zufallsprinzip ausgewählt und stammten aus mindestens 3 verschiedenen Schnitten. Die erhaltenen Prozentzahlen jeder Gruppe wurden mit der entsprechenden, aus der stereologischen Auswertungen (Kap. 3.2.10.1) errechneten Gesamtzahl der BrdU-positiven Zellen multipliziert und damit die Gesamtzahl aller BrdU+-Zellen eines bestimmten Zelltyps pro Struktur und Tier erhalten.

3.2.10.4 Densiometrische Analyse (Doublecortin-Immunfluoreszenz)

Zur Analyse der Dichte DCX-positiver Zellen im RMS wurde ein densiometrisches Verfahren angewendet. Hierbei wurde zunächst ein fluoreszenzmikroskopisches Bild des RMS aufgenommen. Die Aufnahmeparameter (Belichtungszeit, Pinhole, Gain) wurden bei jeder Aufnahme gleichgehalten. Unter Verwendung der Software Photoshop® (Adobe) wurde die Farbinformation verworfen (8-Bit-Graustufen), das Areal umrandet und die entsprechende optische Dichte (OD) abgelesen. Das Hintergrundrauschen wurde jeweils an einer ungefärbten Stelle am Rand des Schnitts bestimmt und vom

erhaltenen OD-Wert subtrahiert. Es wurde in jedem Tier genau der Schnitt zur Analyse ausgewählt in dem der RMS in seiner Gesamtlänge sichtbar war.

3.2.10.5 Bestimmung der Vaskularisierung

Zum Vergleich der Gefäßanzahl in den Flt-1TK^{-/-} und Kontrolltieren wurden Serienschnittschnitte (3.2.6.1) mit dem endothelzellspezifischen Antikörper CD31 angefärbt (Kap. 3.2.8). Die verschiedenen Areale wurden am Fluoreszenzmikroskop fotografiert, wobei die Aufnahmeparameter (Belichtungszeit, Pinhole, Gain) bei jeder Aufnahme gleichgehalten wurden. Unter Verwendung eines institutseigenen Makros im Programm NIS Elements BR (Nikon) wurde die Gefäßzahl automatisch errechnet. Pro Tier und Areal wurden mindestens 6 Aufnahmen analysiert.

3.2.11 TUNEL

Apoptotische Zellen wurden durch Nachweis fragmentierter DNA mit TUNEL (= Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP fluorescence nick end labelling) visualisiert. Zur TUNEL-Färbung an Gefrierschnitten (Kap. 3.2.6) wurde das Apoptosis Detection Kit (Chemicon) verwendet. Dazu wurden Aceton-fixierte Gefrierschnitte (Kap. 3.2.6.1) zunächst für 20 min bei -20°C mit Aceton und nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS erneut für je 5 min mit 1%-iger PFA-Lösung fixiert. Die Präparate wurden in 1x PBS gewaschen und für 10 min in Ethanol/Essigsäure (2:1 [v/v]) bei -20°C permeabilisiert. Nach erneutem Waschen in 1x PBS wurde für 10 sec Equilibrierungspuffer auf die Schnitte gegeben und diese anschließend 1 h in TdT-Lösung (TdT-Enzym/ TUNEL-dilution Buffer/ Reaktionspuffer 1:2:7 [v/v/v]) inkubiert. Durch Inkubation für 10 min in Stopp-Puffer (Stopp-/Wasch-Puffer 1:35 [v/v] in H₂O) wurde die Reaktion abgestoppt. Nach Waschen mit 1x TBS wurden die Schnitte für 30 min in DIG-2 inkubiert. Für eine lichtmikroskopische Entwicklung wurde Anti-DIG-AP (1:500 [v/v]) in DIG-2 1 h auf den Schnitten belassen. Nach mehrmaligem Waschen mit 1x TBS wurden die TUNEL-positive Zellen durch Zugabe von NBT/BCIP-Färbelösung visualisiert. Nach abschließendem Spülen in 1x TBS wurden die gefärbten Präparate mit Aqua-Polymount eingedeckt.

3.2.12 *In situ*-Hybridisierung (nach Schaeren-Wiemers, 1993²⁹⁵)

Der Nachweis der mRNA des VEGFR-1 auf Hirngefrierschnitten (Kap.3.2.6.1) erfolgte durch nicht-radioaktive *In situ*-Hybridisierung über Digoxigenin-markierte cRNA-Sonden. Um eine Degradation von RNA durch RNAsen zu verhindern, wurden alle verwendeten Puffer und Lösungen mit DEPC-versetztem Wasser angesetzt, sämtliche Gefäße sterilisiert und ausschließlich mit Handschuhen gearbeitet.

3.2.12.1 Transformation von Bakterien

Medium	Vertreiber/Hersteller
LB-Medium nach Herstellerangabe + Ampicillin (50 µg/ml, frisch zugegeben)	Invitrogen, Carlsbad, CA
LB-Agar (5-10 mg/ml LB Medium)	Invitrogen, Carlsbad, CA

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurde diese in chemisch kompetente Bakterien E.coli DH5α (Invitrogen, Carlsbad, USA) eingebracht. Dazu wurden 10 ng Plasmid-DNA zu 100 µl der Bakterien gegeben und das Gemisch 20 min auf Eis inkubiert. Nach anschließendem Hitzeschock (42°C für 90 sec) erfolgte eine weitere 10-minütige Inkubation auf Eis. Danach wurden 50 µl der Suspension auf vorgewärmte LB-Agarplatten mit Ampicillin (50 µg/ml) ausgestrichen und ü. N. bei 37°C inkubiert. LB-Medium wurde mit von der Platte „gepickten Kolonien“ angeimpft und ü. N. bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurden 200 µl ml in 100 ml LB-Medium gegeben und diese ü. N. bei 37°C und 220 rpm kultiviert.

3.2.12.2 Plasmid-Präparation (Maxi-Präp)

Zur Isolation von Plasmid-DNA wurde ein sog. „Maxi-Präp“ unter Verwendung des Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

3.2.12.3 Herstellung der RNA-Sonden (In vitro-Transkription):

Transkript	Plasmid	Hersteller/Referenz
VEGF-A	pVEGF1	Breier <i>et al.</i> , 1992 ²⁷⁵
VEGFR-1	mflt20 dXBa	Breier <i>et al.</i> , 1995 ²⁹⁶

Lösung	Zusammensetzung
<i>In vitro</i> -Transkriptions-Ansatz/ Labeling-Ansatz	2 µl DIG-NTP-Labeling Mix 2 µl 10 x Transkriptionspuffer 2 µl T3- oder T7-RNA-Polymerase 1 µl RNase-Inhibitor

Zur Herstellung der Sonden wurden jeweils 10 µg des Plasmids mit den entsprechenden Enzymen linearisiert und mit einer Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Nach Präzipitation (1/10 Volumen 3 M Na-Ac, pH 5,2, 2,5 Volumen 100% Ethanol, -20°C) wurde die Plasmid-DNA in H₂O gelöst. Zur *In vitro*-Transkription wurde 1 µg der linearisierten Plasmid-DNA (in 14 µl H₂O) in den Labelling-Ansatz gegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert. Übrige DNA wurde durch 15-minütige Behandlung mit DNaseI eliminiert und die Reaktion durch Zugabe von 2 µl EDTA (0,2 M, pH 8) gestoppt. Die synthetisierte RNA-Sonde wurde ü. N. mit 0,1 Vol. 4 M LiCl / 3 Vol. 100% Ethanol bei -20°C präzipitiert. Nach Zentrifugation für 30 min bei 16000 rpm bei 4°C wurde das Pellet mit eiskaltem 70%igen Ethanol gewaschen und in 50 µl DEPC-H₂O, 1 µl RNase-Inhibitor und 1 µl 0,1 M DTT resuspendiert. Die RNA-Sonde wurde 30 min bei 37°C unter Schütteln gelöst, auf eine Konzentration von 200 ng/ml eingestellt und bei -80°C eingefroren.

3.2.12.4 Dot Blot – Überprüfung der Sondenmarkierung:

Zur Prüfung der Markierungseffizienz der Sonden wurde ein Dot Blot durchgeführt. Dazu wurden 1µl der markierten Sonden in verschiedenen Verdünnungen auf eine Nylon Membran aufgetragen und in einem UV-Crosslinker bestrahlt. Danach wurde 5 min in DIG-1 und 30 min in DIG-2 gewaschen, bevor eine 30-minütige Inkubation mit einem an Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelten anti-DIG-Antikörper (anti-DIG-AP; 1: 500 in DIG-2) erfolgte. Nach zweimaligem Waschen in DIG-1 für 15 min wurde die Membran 5 min in DIG-3 gelegt und danach mit NBT/BCIP-Färbelösung (je 3,5µl pro ml Dig-3) bei 37°C entwickelt und abschließend in 1x PBS gewaschen.

3.2.12.5 Hybridisierungsreaktion:

Lösung	Zusammensetzung
DIG-3/PVA (ISH)	10% [w/w] Polyvinylalkohol in DEPC 0,1 M Tris Base 0,1 M NaCl ₂ 0,05 M MgCl ₂

Lösung	Zusammensetzung
Färbelösung für ISH	1ml DIG-3/PVA 3,5 µl NBT (Roche, Mannheim) 3,5 µl BCIP (Roche, Mannheim)
Hybridisierungsmix (ISH)	5 ml deionisiertes Formamid 2 ml 20 x SSC 1 ml Dextransulfat (50%) 1 ml 50 x Denhardts 0,05 ml 20% SDS 0,5 ml Hefe-t-RNA (10 mg/ml) 0,25 ml Salmon Sperm (10 mg/ml)

Die zu verwendenden Gefrierschnitte (s. Kap. 3.2.6) wurden aufgetaut, ihre Position auf der Rückseite des Objektträgers markiert und für 5 min in 1 x PBS gewaschen. Nach einer HCl-Behandlung (0,2 M HCl in DEPC- H₂O) für 10min und Waschen mit 1 x PBS erfolgte ein 10-minütiger Proteinverdau mit 50 µl Proteinase K (14 mg/ml) in 70 ml TE-Puffer. Anschließend wurden die Schnitte zur Inaktivierung der Proteinase K für 5 min in 0,1 M Glycin (in 1x PBS) gegeben. Nach weiterem Waschen in 1 x PBS für 5 min wurde mit 4%iger PFA-Lösung 5 min nachfixiert. Die Schnitte wurden erneut in 1 x PBS gespült und 10 min in 0,1 M Triethanolamin und 0,25% [v/v] Essigsäureanhydrid acetyliert. Nach zwei Waschschritten à 5 min in 2 x SSC erfolgte die Vorhybridisierung mit je 100 µl Hybridisierungsmix pro Schnitt für 3 - 5 h in einer feuchten Kammer. Für die eigentliche Hybridisierungsreaktion wurde die 1 µl der jeweiligen Sonde (1 ng/µl) mit 9 µl DEPC-H₂O und 190 µl Hybridisierungsmix vermischt, 3 min bei 95 °C denaturiert und für 1 min auf Eis abgekühlt. Die Schnitte wurden mit je 85 µl der Sonde (sense bzw. antisense) überschichtet und mit Deckgläsern abgedeckt. Nach Inkubation über Nacht bei 68°C wurden die Deckgläschen in 2 x SSC (48°C) abgelöst und die Objektträger 2x 30 min in 0,2x SSC bei 70°C und anschließend in 2x SSC für 5 min stringent gewaschen. Danach wurden die Schnitte 5 min in DIG-1 und 30 min in DIG-2 inkubiert. Zum Nachweis der gebundenen Sonden erfolgte eine Inkubation mit 100 µl anti-DIG-Antikörper (1:500 in DIG-2) pro Schnitt für 1 h. Die Schnitte wurden 3 x 15 min in DIG-1 und dann 10 min in DIG-3 gestellt. Zur Entwicklung wurden die Objektträger in Färbelösung bei 30°C bis zur gewünschten Farbintensität inkubiert und die Reaktion in 3 x 5 min in 1 x PBS gestoppt. Um nachfolgend eine Kolokalisation der VEGFR-1 mRNA mit GFAP aufzuzeigen, wurden die Schnitte 30 min mit Double-Staining Enhancer (Zymed) inkubiert, 3x 5 min in PBS gewaschen und wie in Kap.3.2.8 gefärbt und lichtmikroskopisch entwickelt.

3.2.13 ELISA

Zur quantitativen Analyse und Vergleich der VEGF-Konzentration in verschiedenen Gehirnregionen der Flt-1TK- und Kontrollmäusen wurde der Quantikine® Mouse VEGF ELISA Kit (R&D, Systems) eingesetzt. In einem so genannten Sandwich-Prinzip können damit im Zelllysat vorhandene VEGF -Moleküle detektiert werden.

3.2.13.1 Herstellung der Hirnlysate:

Lösung	Zusammensetzung
Hirn-Lysispuffer	100 mM NaCl 20 mM Tris, pH 7,5 20 mM EDTA 1 Complete Proteinase-Inhibitor Tablette / 25ml,

Zur Herstellung der Proteinlysate aus Gehirnen adulter Kontroll- und Flt-1TK-Mäuse wurden die Gewebestücke in Lysispuffer gegeben und mit einem Mixer (Ultra Turrax) homogenisiert. Nach 1-minütiger Inkubation auf Eis wurde der Gewebsbrei für 15 min bei 1600 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden bei -80°C gelagert.

3.2.13.2 Durchführung der ELISA:

Die ELISA wurden exakt nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden ausschließlich Reagenzien des Kits verwendet. Die Enzym-Aktivität kann aufgrund des Substratumsatzes photometrisch bei 450 nm im ELISA-Reader gemessen werden. Die Umrechnung der erhaltenen OD-Werte in Proteinmengen erfolgte anhand der gemessenen Standardgerade.

3.2.14 Statistische Auswertungen

Zur statistischen Analyse wurde der ungepaarte, zweiseitige Student's T-Test für unverbundene Stichproben angewendet. Die Berechnung erfolgte mit Microsoft Excel®. Ein p-Wert von < 0,05 wurde als signifikant, ein p-Wert von < 0,005 als hochsignifikant betrachtet. Daten in Graphen wurden als Mittelwerte aufgeführt +/- Standardabweichungen.

4 Ergebnisse

Ziel der in dieser Arbeit dargelegten Versuche war es die Bedeutung des angiogenen Wachstumsfaktors VEGF-A auf Mechanismen der adulten Neurogenese zu erforschen. Der Fokus lag hier auf der Rolle des VEGFR-1. Dazu wurde zunächst eine detaillierte Beschreibung der regionalen Verteilung des VEGFR-1 im adulten Maushirn durchgeführt. Die Erforschung einer eventuellen Funktion der VEGFR-1-Signaltransduktion in der adulten Neurogenese und der Migration neu gebildeter neuraler Vorläuferzellen erfolgte an transgenen Mäusen (Flt-1TK^{-/-}), bei denen die Intrazellulärdomäne des VEGFR-1 deletiert ist.

4.1 Genetischer Hintergrund und Alter der Versuchstiere

Genetisch verschiedene Mausrassen zeigen unterschiedlich starke neurogene Aktivität im adulten Hirn. Abhängig vom genetischen Hintergrund variieren u.a. die Proliferationsaktivität, die neuronale Differenzierung, die Gliogenese oder die Zellüberlebensfähigkeit. Weiter differieren in verschiedenen Mauslinien die angiogenen Reaktionen auf hypoxische Stimuli und die Expression vaskulärer Faktoren.^{297,298}

Die Analyse des genetischen Hintergrunds der hier verwendeten transgenen Mäuse, den Flt-1Tk^{-/-}, wurde von der Firma Charles River Laboratories durchgeführt. Die Chromosomenanalyse der Flt-1TK^{-/-} zeigte eine mehr als 94 %-ige Übereinstimmung mit Mäusen des Stammes C57Bl/6. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden C57Bl/6-Mäuse für alle Versuche als Wildtyp- bzw. Kontrollmäuse (wt) gewählt. Da der Fokus dieser Arbeit auf der Erforschung der Rolle des VEGFR-1 in der Regulation adulter Neurogenese lag, wurden in dieser Studie Mäuse im Alter von 6-16 Wochen verwendet.

4.2 Expressionsanalyse des murinen VEGFR-1 (Flt-1) auf Protein- und RNA-Ebene im adulten Gehirn

Eine detaillierte Analyse des Expressionsmusters des VEGFR-1 im adulten Mäusehirn diente zunächst dazu, sowohl die Lokalisierung des Rezeptors in den einzelnen Hirnregionen, als auch in speziellen Zelltypen zu untersuchen. In den folgenden

Experimenten erfolgte der Nachweis des VEGFR-1-Proteins über indirekte Immunfärbungen mit dem Antikörper anti-VEGFR-1 H-225 der Firma Santa Cruz, dessen Epitop gegen die Aminosäuren²³⁻²⁴⁷ der Extrazellulärdomäne von VEGFR-1 gerichtet ist. Zusätzlich wurde der VEGFR-1 auf RNA-Ebene mittels *In situ* Hybridisierung visualisiert. Die Untersuchung der zelltypspezifischen VEGFR-1 Expression erfolgte mit Doppel- und Dreifachmarkierungen mit Markern verschiedener Zelltypen an Hirngefrierschnitten des adulten Gehirns. Die Auswertung erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf den Neurogenen Regionen des adulten ZNS.

4.2.1 Überprüfung der Spezifität der verwendeten Antikörper (Kontrollfärbungen)

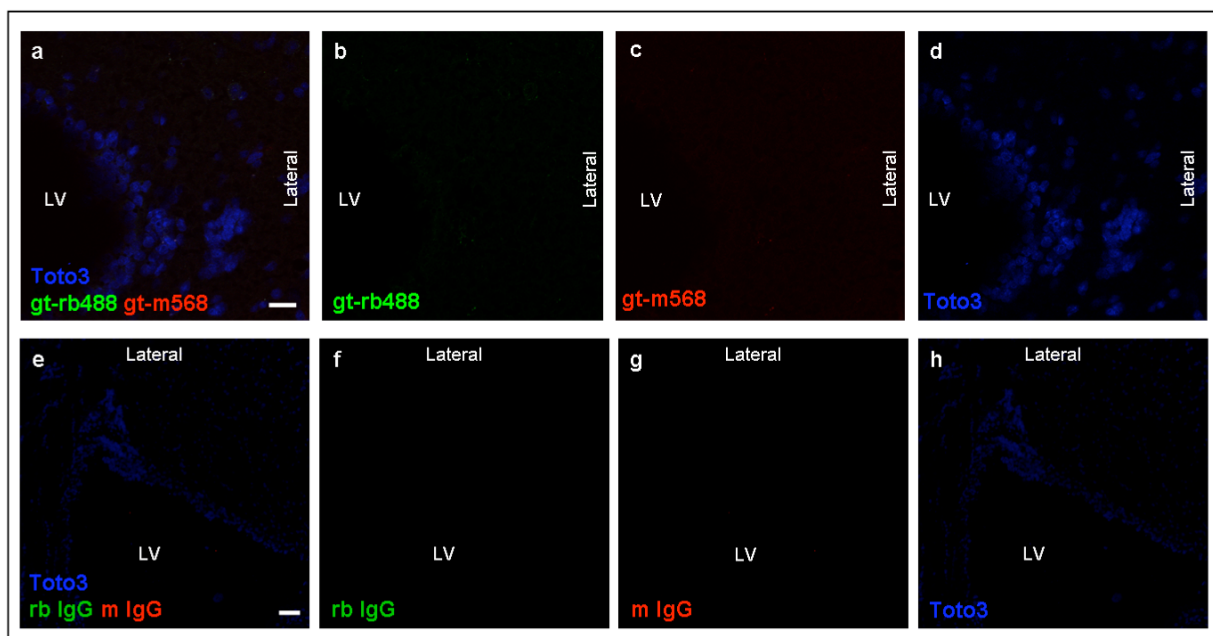


Abb. 6:: Primär- und Sekundärantikörperkontrollen zur Überprüfung der Spezifität der verwendeten Antikörper.

Bei Kontrollfärbungen für fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper gerichtet gegen Kaninchen b) und Maus c), als auch bei Inkubation mit Kaninchen f) und Maus-IgGs g) kein Fluoreszenzsignal erhalten. d)+h) zeigen Kernfärbungen der fotografierten Areale. Messbalken: a)-d) 20µm; e)-h) 50µm.

Zur Überprüfung der Spezifität der verwendeten Antikörper wurde mit jedem Färbedurchgang ein Schnitt zur Sekundärantikörperkontrolle mitgeführt, bei der Primärantikörper durch Verdünnungslösung ersetzt wurde. Ein so erhaltenes Fluoreszenzsignal würde auf ein Artefakt durch unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers hinweisen. Des Weiteren diente ein Immunglobulin G (IgG)-Kontrollfärbung zum Ausschluss einer unspezifischen Bindung der Primärantikörper. Hierbei ersetzen Immunglobuline der entsprechenden Spezies den Primärantikörper.

Sowohl die Sekundärantikörperkontrollen der gegen Kaninchen- und Maus- IgG gerichteten fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper, wie auch die Primärantikörperkontrollen mit Maus- und Kaninchen IgGs zeigten keine Fluoreszenzsignale auf Hirngefrierschnitten (Abb. 6 und 7d). So konnte eine Hintergrundfärbung durch unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers ausgeschlossen werden.

4.2.2 Nachweis des Rezeptors VEGFR-1 im adulten Maushirn

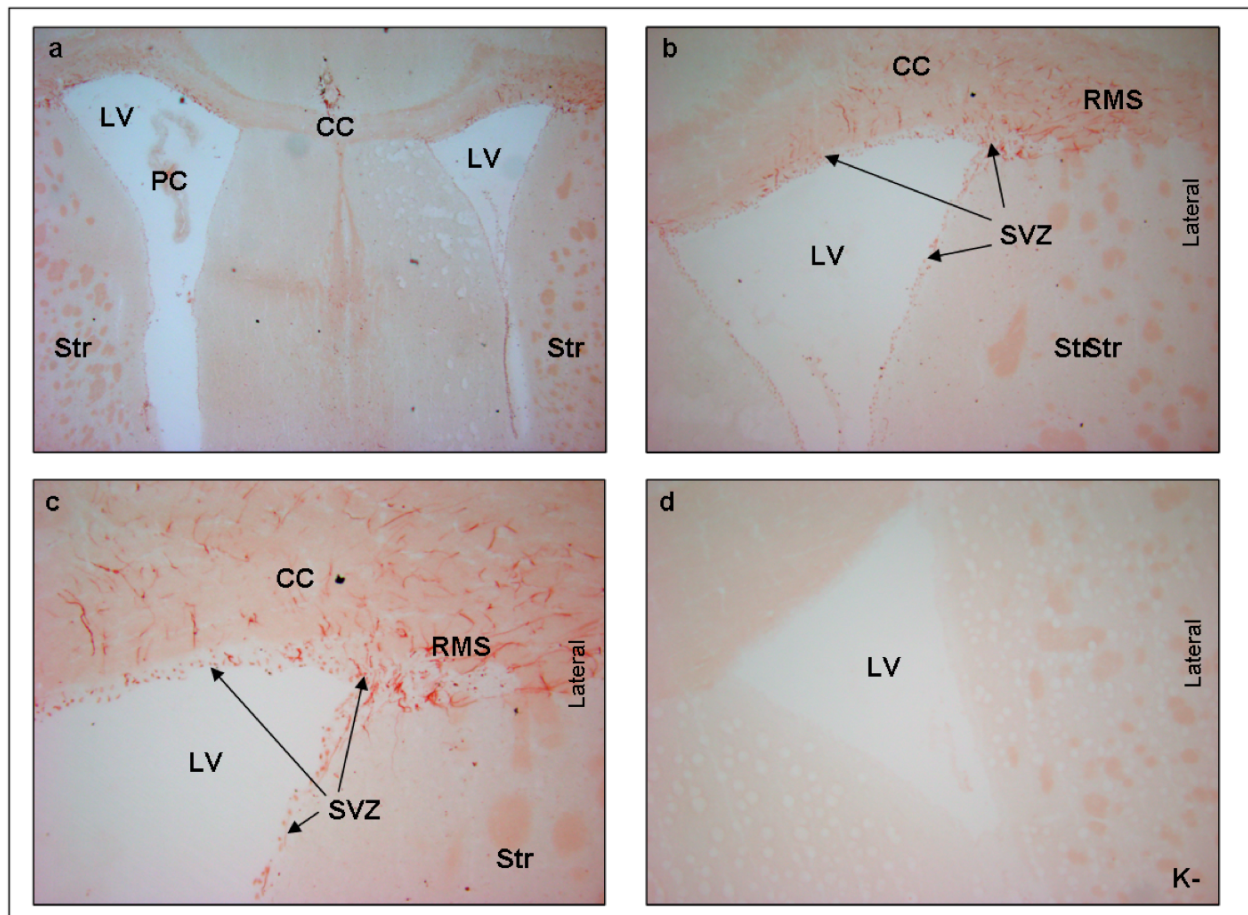


Abb. 7: Indirekte Immunfärbung des VEGFR-1 in neurogenen Regionen des adulten Maushirns.

a)-c) Im adulten Maushirn zeigt der -VEGFR-1 Antikörper eine VEGFR-1 Expression in der SVZ und subependymalen Zone der LV, sowie am lateralen Ecke des LV im dort beginnenden RMS und im CC. d) Sekundärantikörper-Negativkontrolle zeigt keine Hintergrundfärbung. Messbalken: a: 500µm, b+d: 200µm, c: 100µm. CC: Corpus callosum; LV: Lateralventrikel; PC: Plexus choroideus; RMS: Rostralmigratorischer Strom; Str: Striatum; SVZ: Subventrikulären Zone.

Immunhistochemische Färbungen an Gefrierschnitten adulter Mäusehirne weisen eine starke Expression von VEGFR-1 in den neurogenen Regionen des adulten Maushirns auf. VEGFR-1 wird in der subependymalen und subventrikulären Zone der Lateralventrikel (LV), vor allem in der lateralen Ecke des LV, dem Entstehungspunkt des RMS exprimiert (Abb. 7 a-c). Auch im gesamten RMS bis hin zum Zentrum des OB, im

Hippokampus, im CC und in der SVZ des III. Ventrikels wurde die Expression von VEGFR-1 nachgewiesen. Interessant ist hierbei, dass sich je nach Region differentielle Expressionsmuster aufzeigten. In der SVZ und der Ependyma war das Färbesignal teilweise punktförmig, wohingegen ein fädiges Expressionsmuster sowohl in der SVZ, als auch in benachbarten Arealen ausserhalb der SVZ (Abb. 7 b,c), vor allem aber im RMS und im OB sichtbar wurde. In gefäßähnlichen Strukturen war nur sehr vereinzelt Expression des VEGF-R1 nachweisbar. VEGFR-1 wird somit vor allem in neurogenen Regionen des adulten Maushirns exprimiert, was eine Funktion in adulter Neurogenese vermuten lässt.

4.2.3 Analyse VEGFR-1-exprimierender Zellen im adulten ZNS

Um weitere Hinweise auf mögliche Funktionen des VEGFR-1 in den Regionen adulter Neurogenese zu erhalten, wurden die VEGFR-1-exprimierenden Zellen des adulten Hirns näher charakterisiert. Doppelmarkierungen auf Protein- und RNA-Ebene (Immunfluoreszenzfärbungen und *In situ* Hybridisierung mit anschließender immunhistochemischer Färbung) dienten der Erforschung möglicher Koexpressionen von VEGFR-1 mit zelltypspezifischen Markern. Dazu wurden Antikörper gegen GFAP, als charakteristischer Marker für gliale Zelltypen, verschiedene Marker für neuronale Vorläuferzellen (anti-Doublecortin; anti-DCX und anti- β -III-Tubulin; Tuj-1), Marker für differenzierte Neurone (NeuN und anti-Neurofilament; anti-NF), für proliferative Zellen (PCNA) und vaskuläre Marker (CD-31; PECAM-1) eingesetzt. Färbungen mit dem verwendeten Antikörper anti-VEGFR-1 H-225 benötigten sehr spezielle Fixierungsbedingungen zur Detektion des VEGFR-1. Diese waren häufig mit den Bedingungen zur Färbung mit anderen Markern nicht vereinbar. Aufgrund dessen waren Doppelmarkierungen nur mit einer limitierten Anzahl von Antikörpern möglich. Keine der weiteren getesteten gegen VEGFR-1 gerichteten Antikörper zeigte ein spezifisches Signal in immunhistochemischen Färbungen.

4.2.3.1 Koexpression von VEGFR-1 und dem glialen Marker anti-GFAP in neurogenen Regionen des adulten Maushirns

Astrozyten sind Gliazellen und exprimieren charakteristischerweise GFAP (Saures Gliafaserprotein; Glial fibrillary acidic protein), ein 49,84 kD großes Intermediärfilament, spezifisch für Gliazellen. Die fädigen Färbesignale, die der immunhistochemische Nachweis mit dem anti-VEGFR-1 Antikörper zeigte (Abb. 7 a-c), ließen eine Expression

des VEGFR-1 in Gliazellen vermuten. Zur Überprüfung einer glialen VEGFR-1 Expression wurden fluoreszente Doppelmarkierungen mit anti-GFAP und anti-VEGFR-1-Antikörpern durchgeführt. Diese zeigten, wie erwartet eine Koexpression im überwiegenden Teil der VEGFR-1-positiven Zellen in den Regionen adulter Neurogenese, der SVZ, dem RMS, dem OB, dem Hippokampus und im CC. Auch in der Fluoreszenzfärbung war das differentielle Expressionsmuster des VEGFR-1 sichtbar. Während das fädige Expressionsmuster in und ausserhalb der SVZ eindeutig mit der GFAP-Färbung korrelierte, war die punktuelle Expression am Ventrikelrand nicht mit der GFAP-Färbung überlagert (Abb. 8). Die GFAP/VEGFR-1-positiven Zellen sind in der SVZ der LV überwiegend in der lateralen und dorsalen Wand lokalisiert, aber auch medial und um den III. Ventrikel zu finden.

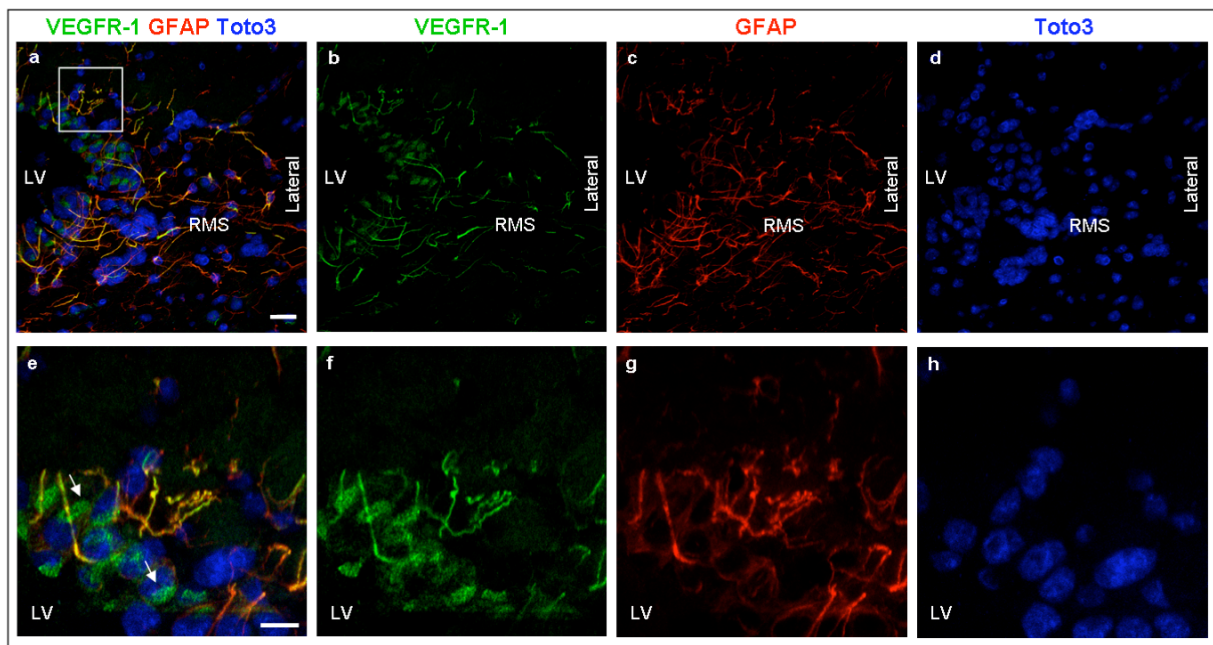


Abb. 8: Immunohistochemische Analyse zur Koexpression von GFAP und VEGFR-1 in der SVZ an Frontalschnitten des adulten Maushirns.

a-d) Ausserhalb der SVZ und im RMS sind die fädigen Expressionsmuster des anti-VEGFR-1 H-225 (grün) mit GFAP (rot) kolokalisiert. Gezeigt ist hier die laterale Ecke des LV. Die punktuelle VEGFR-1 Expression (grün; weisse Pfeile) in der SVZ korreliert nicht mit GFAP (a+e). Toto3 markiert die Nuklei (blau) e-h) Zeigen eine Vergrösserung des in a) eingezeichneten Ausschnitts. Messbalken: a-d) 10 μ m; e-h) 20 μ m.

In Saggittalschnitten wurde die überwiegende Anzahl glialer, VEGFR-1-exprimierender Zellen der SVZ im frontalen Bereich der LV detektiert. (Abb. 9)

Abb. 10 zeigt GFAP und VEGFR-1 koexprimierende Einzelzellen, ohne oder mit nur einem sichtbaren Fortsatz direkt am Ventrikelrand, also vermutlich in der Ependyma, die in der lateralen Wand des LV lokalisiert waren.

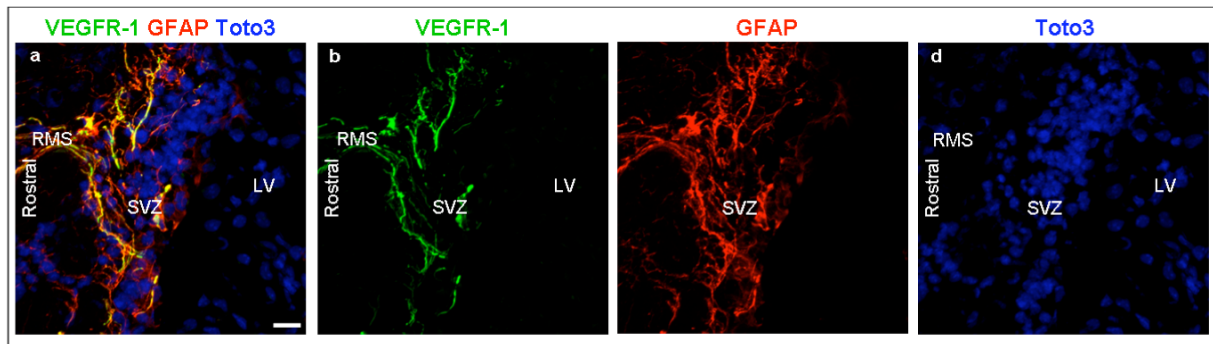


Abb. 9: Koexpression von GFAP und VEGFR-1 an Saggittalschnitten der adulten SVZ.

a-d) Kolokalisation von VEGFR-1 und GFAP ist hauptsächlich rostral zu finden. Messbalken: 20µm, LV: Lateralventrikel

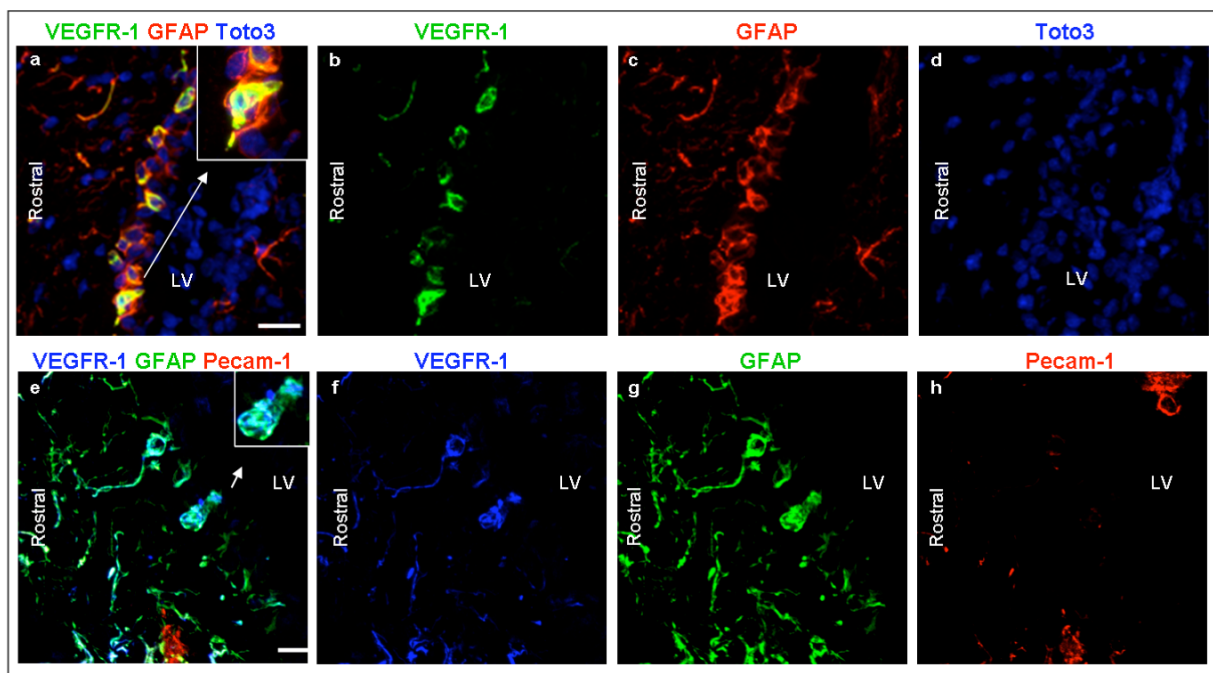


Abb. 10: Kolokalisation von GFAP und VEGFR-1 im rostralen, lateralen Bereich der adulten SVZ.

a-d) In Saggittalschnitten, aus weit lateraler Region wurde zusätzlich eine Kolokalisation von VEGFR-1 und GFAP in einzelnen Zellen (im Inset vergrößert dargestellt) ohne typische astrozytäre Morphologie am Ventrikelrand beobachtet. Messbalken: a-d) 20µm; e-h) 10µm. LV: Lateralventrikel

Die meisten neuronalen Vorläuferzellen aus der SVZ migrieren entlang eines speziellen festgelegten Migrationspfades, dem RMS, zum OB.^{94,121,122} Astrozyten bilden einen Tunnel aus, der die wandernden Neuroblasten umgibt. Viele der GFAP-positiven Zellen entlang des gesamten RMS exprimieren den VEGFR-1 (Abb. 11 und 12). Färbung für VEGFR-1 zeigt sich fast ausschließlich in GFAP+ Zellen, was für eine Expression des VEGFR-1 in den Astrozyten des glialen Tunnels des RMS spricht. Vergrößerungen der Aufnahmen des RMS demonstrieren, dass GFAP und VEGFR-1 sowohl im Zellsoma als auch in den Zellfortsätzen koexprimiert sind. (Abb. 12 i-k)

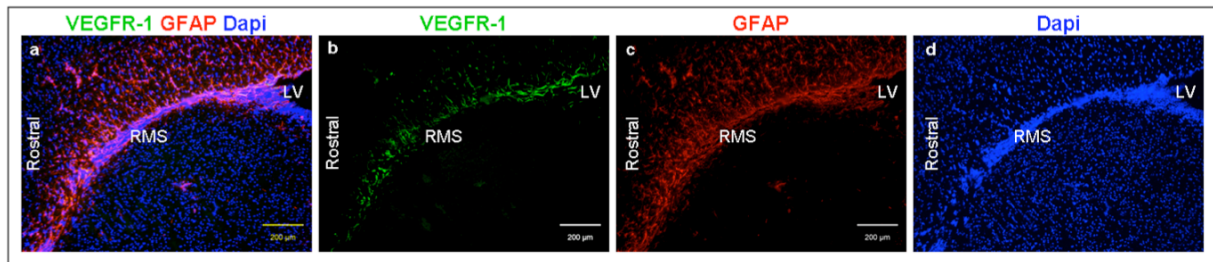


Abb. 11: Doppelfärbungen des glialen Markers GFAP und dem VEGFR-1.

Die Doppelmarkierung zeigt VEGFR-1-Expression (grün) in vielen GFAP-positiven Zellen (rot) an der anterioren Spitze des LVs und entlang des gesamten RMS. Dapi markiert die Nuklei (blau) Messbalken: 200µm.

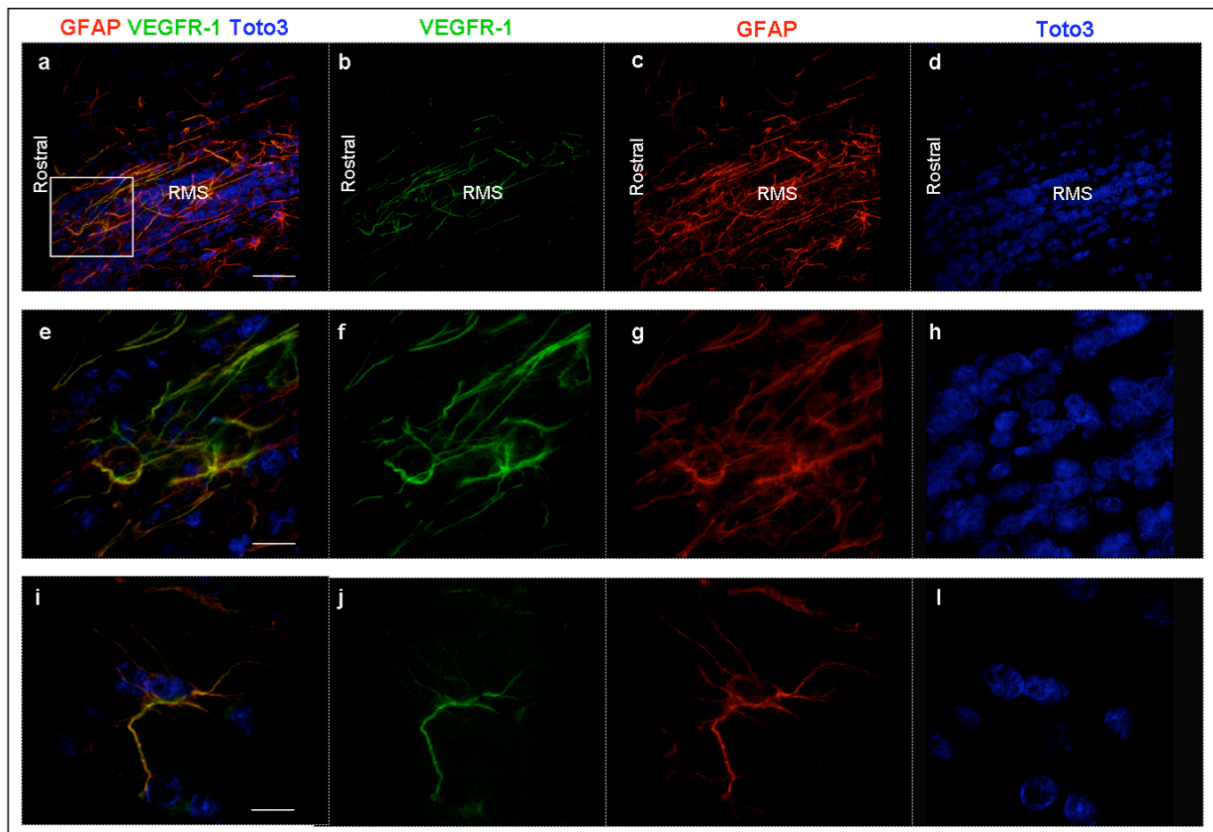


Abb. 12: Koexpression von GFAP und VEGFR-1 an Saggittalschnitten des RMS.

a-d) Im RMS koexprimiert VEGFR-1-positive Zellen (grün) den GFAP (rot), vor allem in den Fortsätzen. e-h) Zeigen eine Vergrößerung des in a) eingezeichneten Ausschnitts. i-h) Zeigen exemplarisch eine für VEGFR-1 und GFAP positive Einzellzelle. Toto3 färbt die Nuklei (blau). Messbalken: a-d) 50µm; e-h) 25µm; i-h) 10µm.

Ausserhalb der neurogenen Regionen konnte auch im CC eine intensive Färbung mit dem anti-VEGFR-1-Antikörper beobachtet werden. Einige Zellen aus der SVZ verlassen während ihrer Wanderung den RMS und wandern ins CC ein.^{299,300} Im CC, waren es ebenfalls GFAP-positive Zellen, die den VEGFR-1 exprimieren (Abb. 13). VEGFR-1 wird entlang der Migrationswege neu gebildeter neuraler Zellen im adulten in glialen Zellen exprimiert.

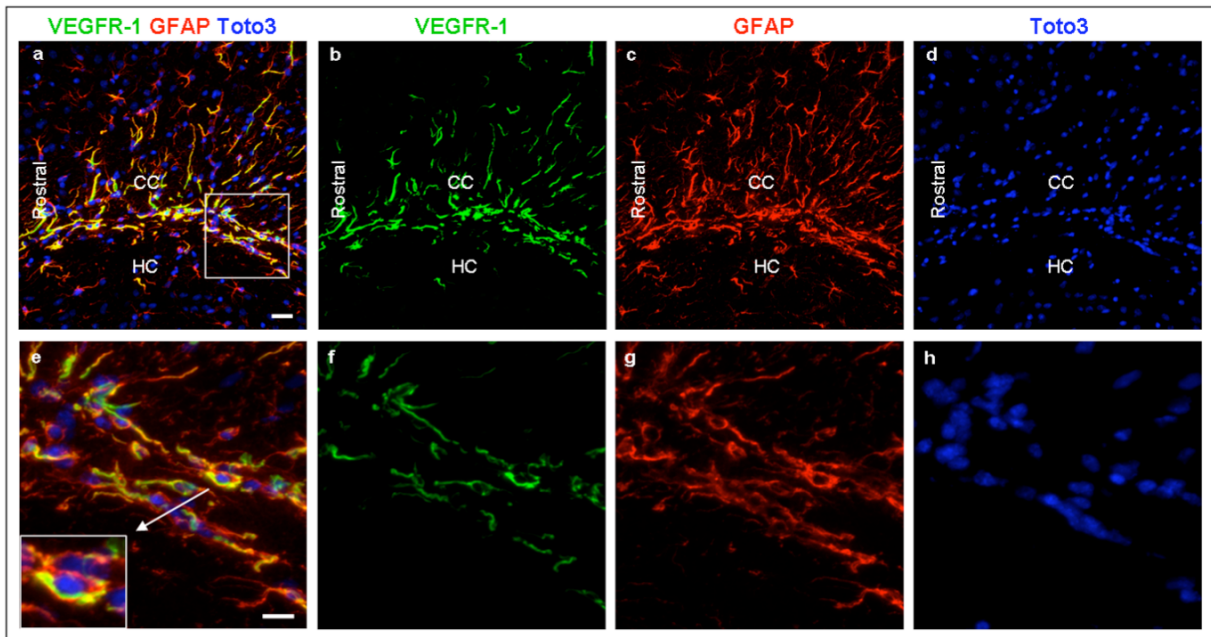


Abb. 13: Koexpression von VEGFR-1 und GFAP im Corpus callosum (CC) der adulten Maus.

a)-d) Zahlreiche GFAP-positive Zellen (rot) im CC exprimieren den VEGFR-1 (grün). e-h) Vergrößerung des in a) markierten Ausschnitts. Das Inset in e) zeigt in einer weiteren Vergrößerung deutlich die Expression von GFAP und VEGFR-1 innerhalb derselben Zelle. Toto3 markiert die Nuklei (blau). Messbalken: a)-d) 20 μm ; e)-h) 10 μm . HC: Hippokampus.

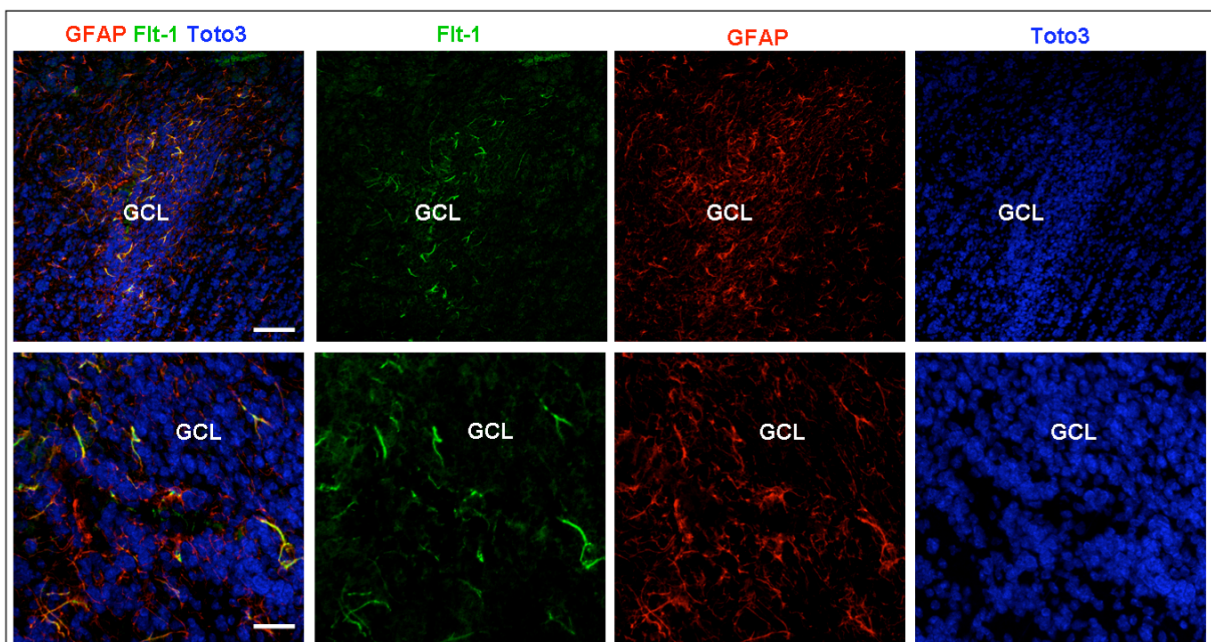


Abb. 14: Koexpression von VEGFR-1 und GFAP im OB der adulten Maus.

VEGFR-1 (grün) wird im OB überwiegend in der GCL exprimiert (b+f). Die Überlagerung der Einzelfluoreszenzaufnahmen zeigt, dass VEGFR-1 fast ausschließlich in GFAP-positiven Zellen (rot) nachweisbar ist. (e). Nuklei sind mit Toto3 markiert (blau). Messbalken: a)-d) 50 μm ; e)-h) 30 μm . GCL: Granulärzellschicht.

Das Zielareal der meisten in der SVZ entstandenen Neuroblasten ist der OB. Im OB wird VEGFR-1 hauptsächlich in der Granulärzellschicht (GCL) exprimiert. Dort zeigen einige Gliazellen ein positives Färbesignal mit dem anti-VEGFR-1 H225 (Abb. 14). Die Anzahl der VEGFR-1-exprimierenden Zellen erscheint hier geringer als in der SVZ, im RMS und im CC.

Neben der SVZ/RMS/OB-Region ist der Hippokampus die zweite neurogene Zone des adulten Säugerhirns. Im Hippokampus gibt es weniger den VEGFR-1 exprimierende Zellen als in der SVZ, im RMS und im CC. Doppelfärbungen zeigen, dass VEGFR-1 auch hier fast ausschließlich auf GFAP-positive Zellen beschränkt ist. (Abb. 15)

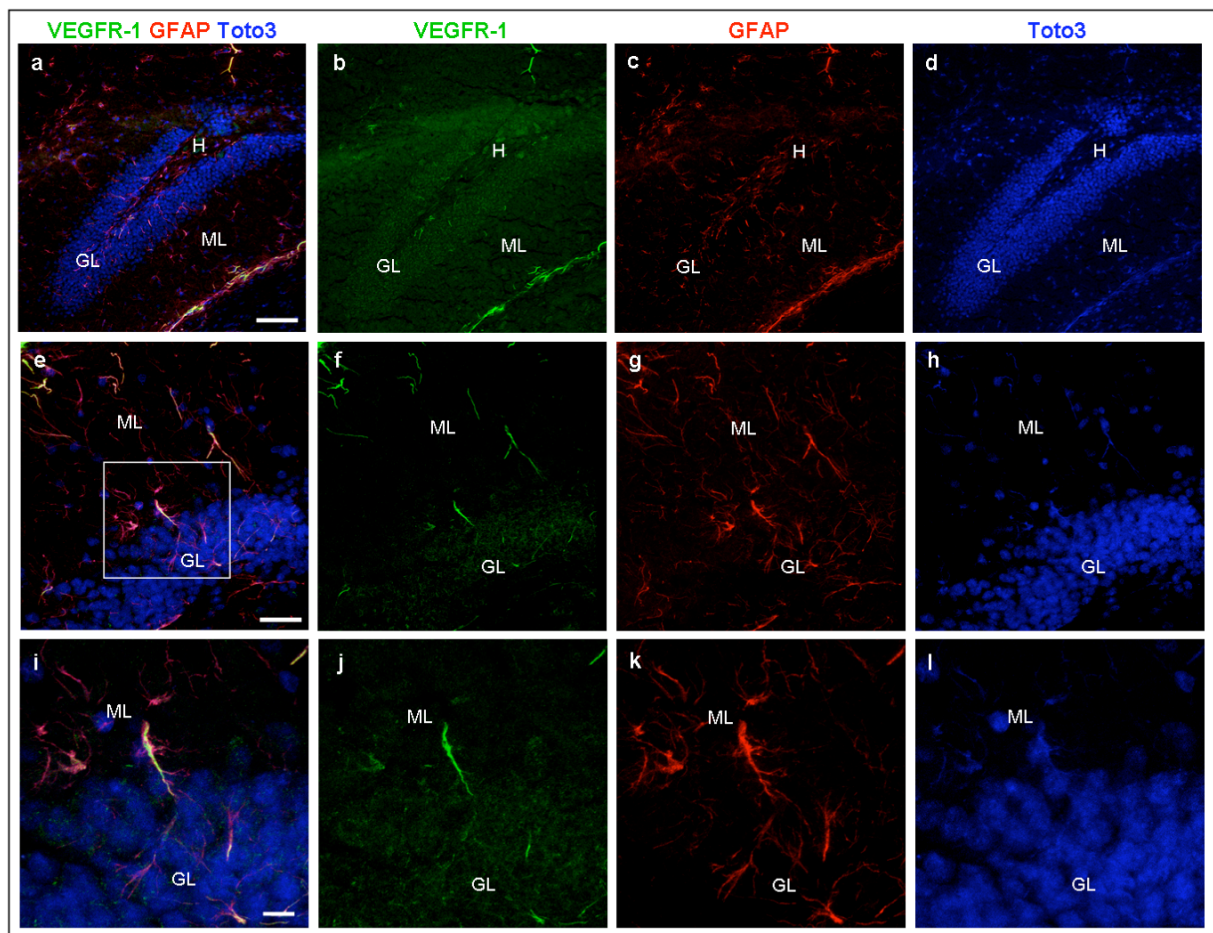


Abb. 15: Koexpression von VEGFR-1 und GFAP im Hippokampus der adulten Maus. VEGFR-1-positive Zellen (grün) sind vorwiegend in der Molekularzellschicht lokalisiert (b,f,j). Die VEGFR-1-Expression ist fast ausschließlich auf GFAP-positive Zellen (rot) beschränkt (a,d,h). Toto3 markiert die Nuklei (blau). Messbalken: a)-d) 100µm; e)-h) 50µm; i)-l) 20µm. GCL: Granulärzellschicht; H: Hilus; ML: Molekularzellschicht.

Die Kolokalisation von VEGFR-1 und GFAP innerhalb einer Zelle wurde in allen Bereichen durch konfokale Aufnahmen einzelner Zellen auf dreidimensionaler Ebene überprüft. In Abb. 16 ist eine dreidimensionale Darstellung der Koexpression von

VEGFR-1 und dem glialen Marker anti-GFAP im RMS an Saggittalschnitten des adulten Maushirns exemplarisch dargestellt. Diese Kolo­kalisierung wurde in allen neuro­genen Regionen beobachtet. Auffällig ist, dass die VEGFR-1 Expression sich in den GFAP-positiven Zellen sowohl im Soma befand, als auch bis in die dickeren Zellfortsätze erstreckte. Kleinere Fortsätze waren oft GFAP-positiv, zeigten aber keine Expression des VEGFR-1. (siehe auch Abb. 12 i-k; 13 e-g und 16).

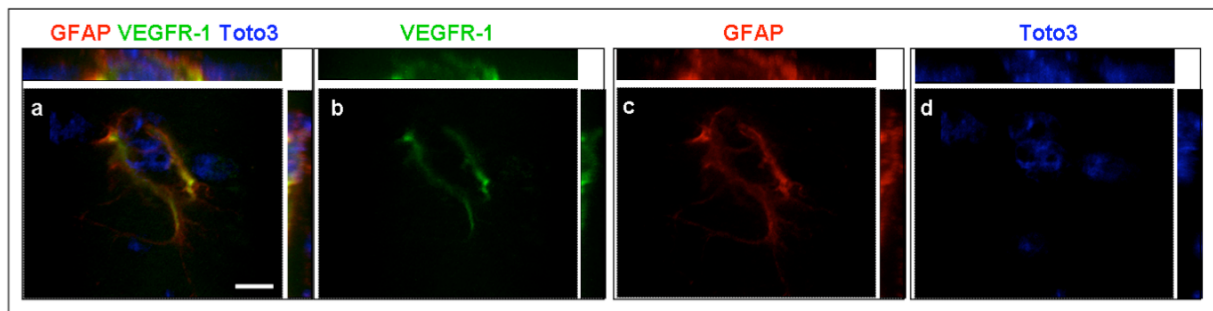


Abb. 16: Dreidimensionale Darstellung der Expression von VEGFR-1 und dem glialen Marker anti-GFAP innerhalb einer Zelle.

Dreidimensionale Darstellung der Farb­signale des anti-VEGFR-1 H-225 (b; grün) und des anti-GFAP-Antikörpers (c; rot). Die Überlagerung beider Fluoreszenz­signale zeigt eine Expression von VEGFR-1 und GFAP in derselben Zelle des RMS (a). Toto3 markiert die Nuklei (blau). Messbalken: 8 μ m.

4.2.3.2 Spektralanalyse von Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen zum Ausschluss artifizieller Fluoreszenzüberlagerungen

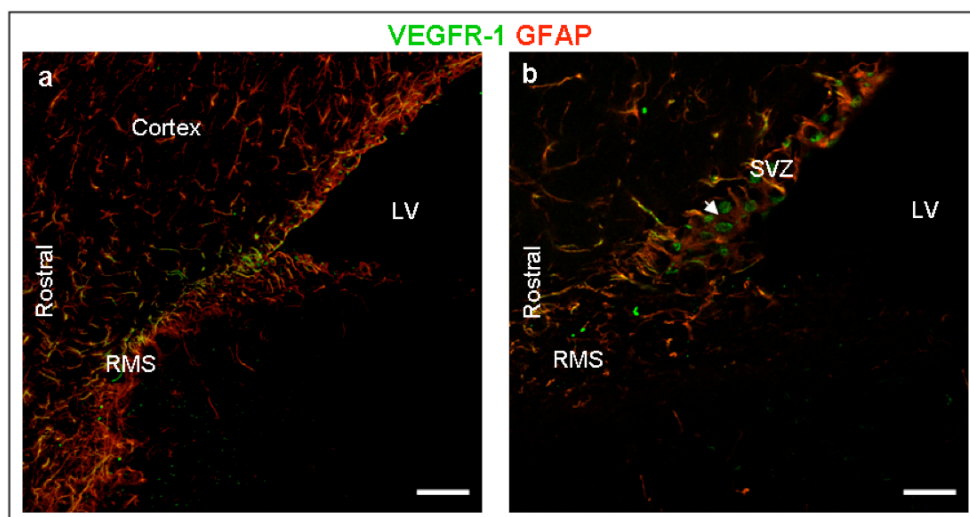


Abb. 17: Spektralanalyse zum Ausschluss falsch-positiver Fluoreszenzüberlagerungen.

a-b) Die Spektralanalyse der VEGFR-1/GFAP-Doppelmarkierung zeigt deutlich eine Kolo­kalisierung beider Farb­signale. b) Allerdings kolokalisiert die punktuellere VEGFR-1-Expression (grün) in der SVZ (weißer Pfeil) nicht mit GFAP (rot). Messbalken: a) 100 μ m; b) 50 μ m.

Fluoreszenz Signale wurden mit dem konfokalen Mikroskop analysiert. Zur Vermeidung artifizierlicher Fluoreszenzüberlagerungen wurden die Fluoreszenzen sequentiell aufgenommen. Um falsch-positive Signale übereinander liegender Zellen auszuschließen wurden kleinstmögliche Pinhole-Einstellungen verwendet. Zur eindeutigen Überprüfung einer Kolo-kalisation erfolgte die Analyse der Zellen entlang ihrer gesamten Z-Achse, also dreidimensional. Aufnahmen der Fluoreszenzsignale im Spektralmodus (Abb. 17) dienten einer elektronischen Auftrennung der einzelnen Farbsignale (spectral unmixing). Diese schloss eine Vermischung der einzelnen Fluoreszenzsignale („durchbluten“) aus und bestätigte die Überlagerung der Färbesignale des anti-VEGFR-1- und anti-GFAP-Antikörpers in den fädigen Strukturen der neurogenen Regionen. Hier wird ebenso erneut deutlich, dass die punktuelle Expression des VEGFR-1 in der SVZ nicht in GFAP-positiven Zellen lokalisiert ist.

4.2.3.3 Koexpression von VEGFR-1-RNA und dem glialen Marker anti-GFAP in neurogenen Regionen des adulten Maushirns

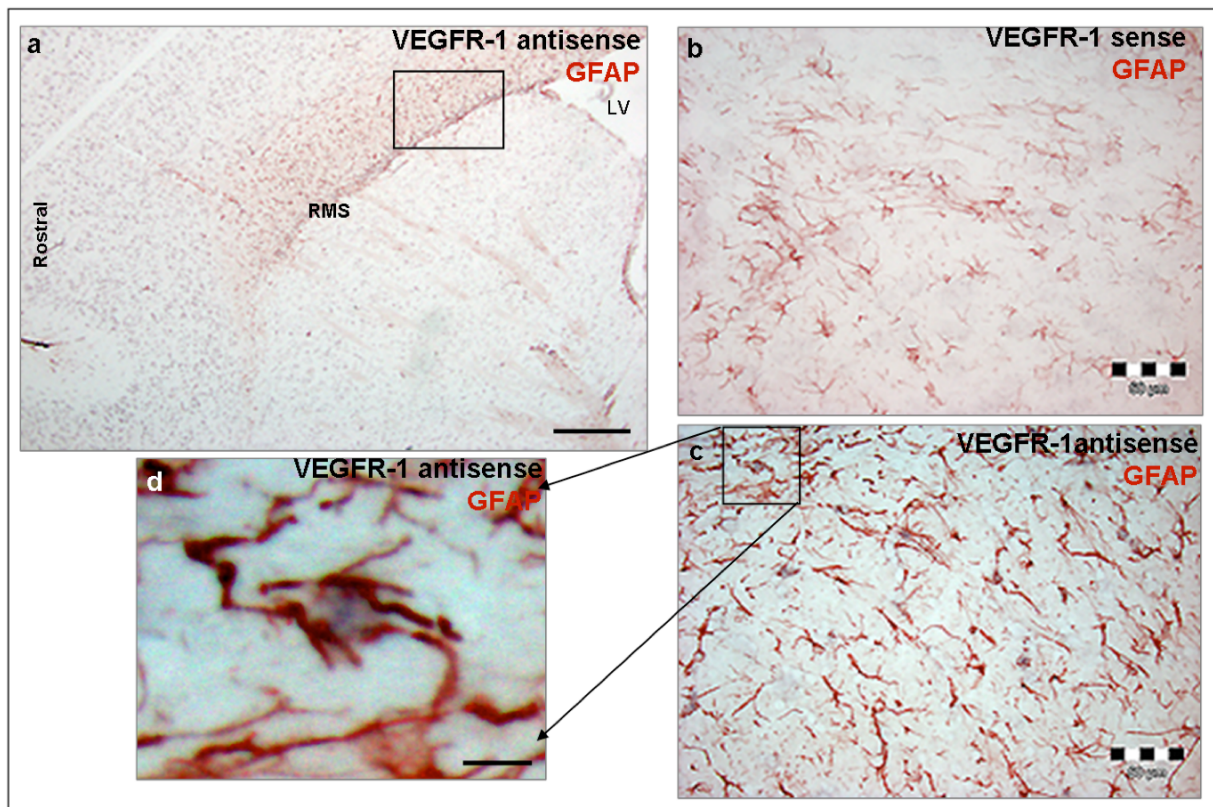


Abb. 18: Koexpression der mRNA des VEGFR-1 und GFAP im RMS der adulten Maus.

VEGFR-1 mRNA (violett) ist in GFAP-positiven (rot) Zellen detektierbar. a) + c) zeigen mRNA des VEGFR-1 in mit anti-GFAP gefärbten Zellen im Bereich des RMS. c) ist eine Ausschnittsvergrößerung des gekennzeichneten Bereichs in a). d) Ist eine Vergrößerung des umrahmten Bereichs in c) und zeigt deutlich die Kolo-kalisation des VEGFR-1-Transkripts und GFAP-Proteins. Die sense-Probe in b) dient der Negativkontrolle und zeigt keine Hintergrundfärbung für VEGFR-1. Messbalken: a) 200 µm; b)+c) 80 µm; d) 10 µm.

Die Detektion der mRNA des VEGFR-1 erfolgte über *In situ* Hybridisierungen mit den in Breier *et al.* (1995)²⁹⁶ veröffentlichten Sonden. Die VEGFR-1 mRNA war wie das Protein, im RMS, der SVZ, dem OB, dem CC und Hippokampus nachweisbar. Eine auf die *In situ* Hybridisierung folgende indirekte Immunfärbung mit anti-GFAP bestätigt die Ergebnisse der Doppelimmunfärbungen. Die den VEGFR-1 kodierende mRNA ist wie das Protein fast ausschließlich in GFAP-positiven Zellen lokalisiert (Abb. 18a).

4.2.3.4 Expressionsvergleich des vaskulären Markers CD31 (PECAM-1) und VEGFR-1 in neurogenen Regionen des adulten Maushirns

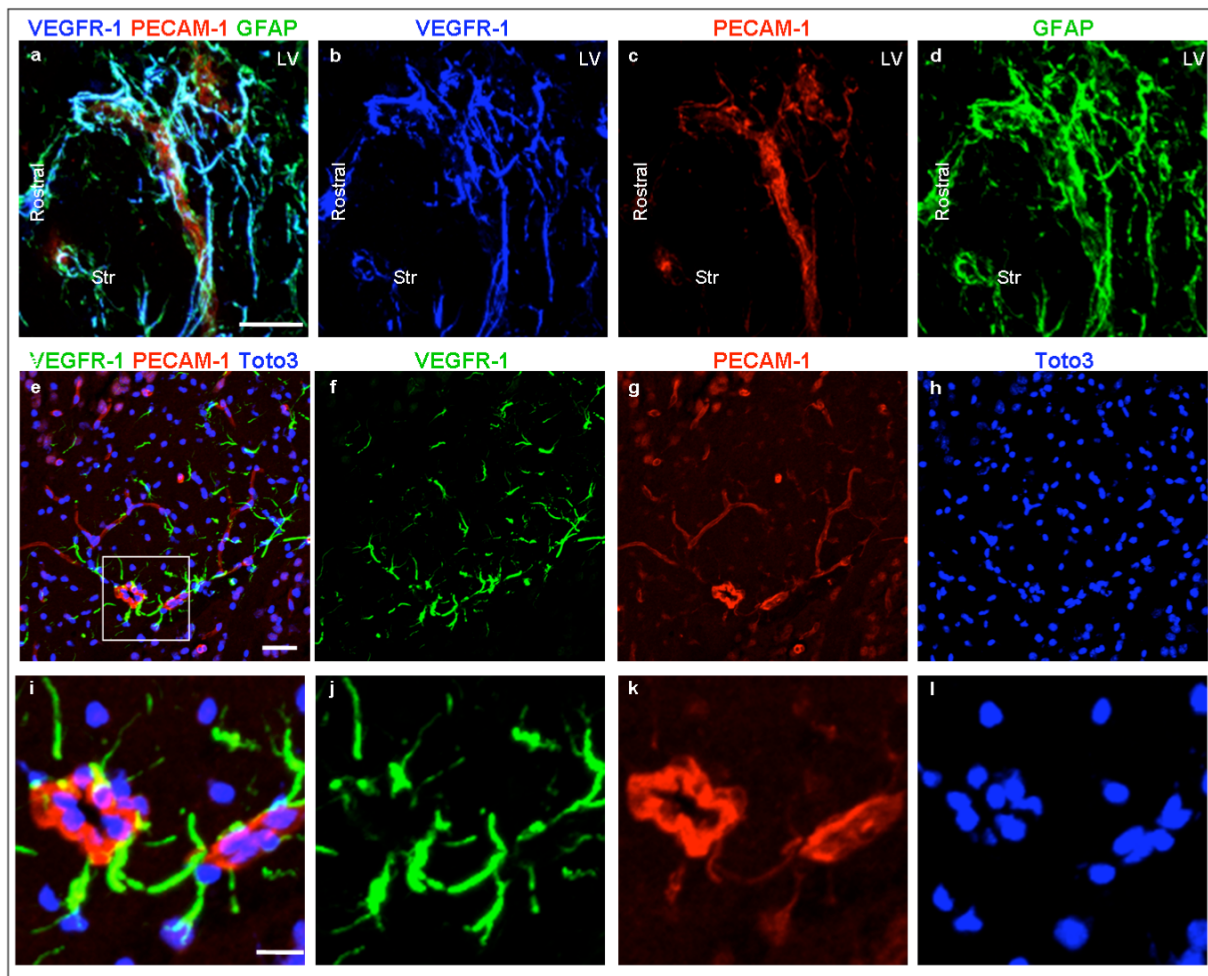


Abb. 19: Doppel- und Tripel-Markierungen des VEGFR-1, GFAP und des vaskulären Markers CD31 (PECAM-1) in der der SVZ und dem RMS.

a) e) i) Fluoreszenzsignale des anti-VEGFR-1 Antikörpers und des vaskulären Markers CD31 (PECAM-1) zeigen, keine Expression des VEGFR-1 in Zellen des adulten vaskulären Systems. a) VEGFR-1+/GFAP+- Zellen umgeben die Gefäße (a). VEGFR-1-positive Zellen berühren angeschnittene Gefäße (e+i). i) ist eine Ausschnittsvergrößerung des in e) markierten Areals. Messbalken: a-d) 30µm; e-h) 20 µm; i-l) 10 µm

Das VEGF/VEGF-Rezeptor-System hat eine große Bedeutung für das vaskuläre System im Säuger. Zur Analyse einer möglichen Expression des VEGFR-1 in vaskulären Zellen,

wurde eine Fluoreszenzdoppelmarkierung mit dem für Endothelzellen charakteristischen Marker CD31 (PECAM-1; Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1) durchgeführt. VEGFR-1 konnte nur sehr selten in einzelnen, mit PECAM-1 visualisierten Gefäßstrukturen in neurogenen Regionen des adulten Maushirns beobachtet werden. Jedoch waren VEGFR-1+/GFAP+-Zellen oft nahe und um Gefäße lokalisiert (Abb. 19 a-d). VEGFR-1-positive Zellfortsätze berühren die Gefäße. Abb. 3 zeigt einen Ausschnitt der SVZ und des RMS. Dies weist auf einen möglichen Effekt auf die neurogene vaskuläre Nische oder/und gliale Nische hin.

4.2.3.5 Expressionsvergleich des für postmitotische Neurone charakteristischen Markers NeuN und VEGFR-1 in neurogenen Regionen des adulten Maushirns

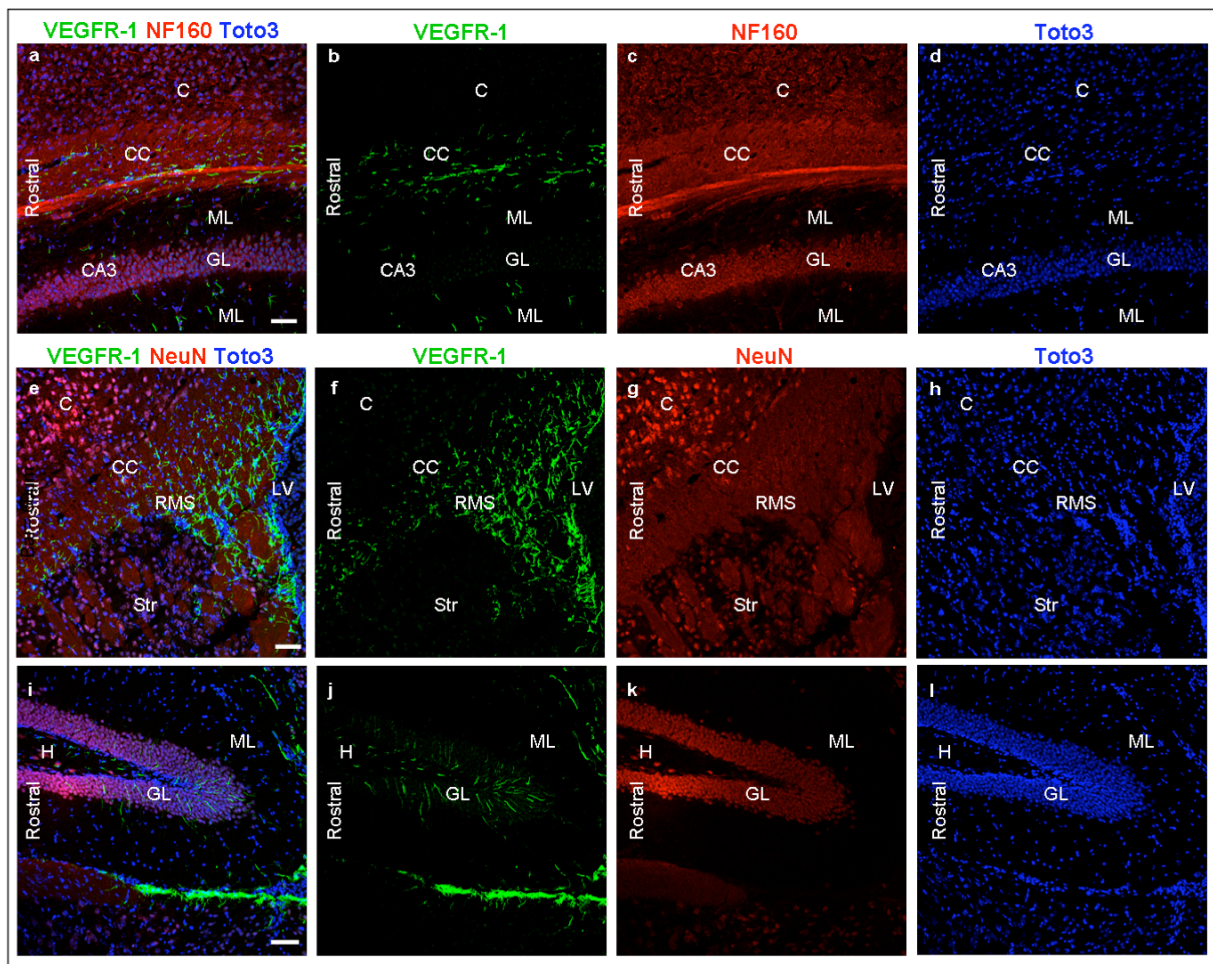


Abb. 20: Doppelmarkierungen des VEGFR-1 und neuronalen Markern im adulten ZNS.

a-d) Zellen die Färbesignale des neuronalen Markers NeuN (rot) aufweisen, zeigen keine Expression von VEGFR-1 (blau). e-i) Auch NF160 (rot) kolokalisiert nicht mit VEGFR-1 (blau). Messbalken: a-l) 60 μ m. CC: Corpus callosum; Str: Striatum; C: Cortex; GCL: Granulärzellschicht; H: Hilus; ML: Molekularzellschicht.

Postmitotische Neurone können durch verschiedene charakteristische Marker visualisiert werden. Einer dieser Marker NeuN färbt den Nukleus und teilweise das Zellsoma an, während der Antikörper gegen NF160 die Neuriten markiert.³⁰¹ Doppelfärbungen von NeuN oder NF160 mit anti-VEGFR-1 (Abb. 20) lassen eine Expression von VEGFR-1 in postmitotischen Neuronen ausschließen.

4.2.3.6 Expressionsvergleich VEGFR-1 und Nestin in neurogenen Regionen des adulten Maushirns

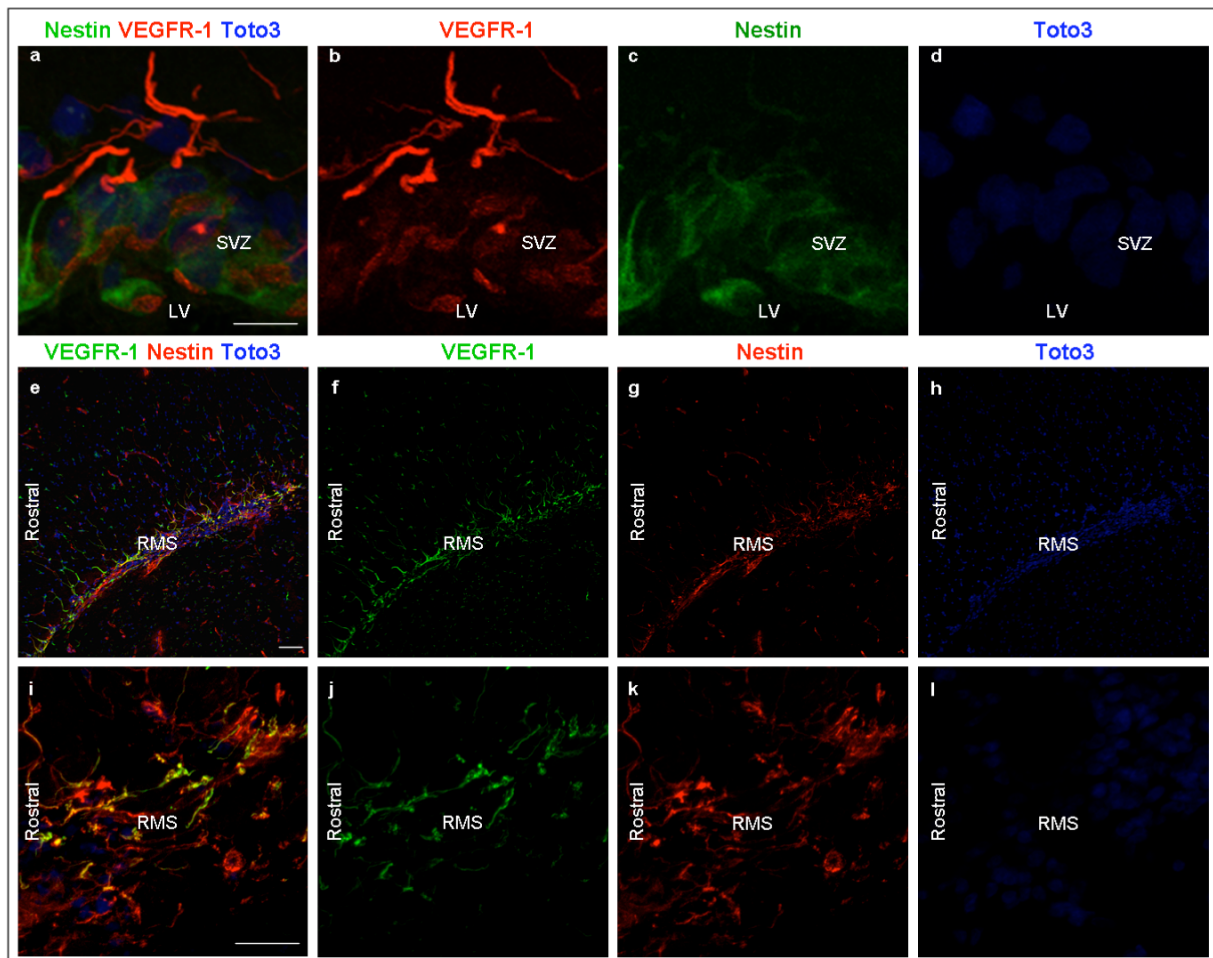


Abb. 21: Doppel-Immunfluoreszenz des VEGFR-1 und Nestin im adulten Maushirn.

a-d) Fortsätze, die den VEGFR-1 (rot) exprimieren, reichen an Nestin-positive Zellen (grün) der SVZ heran. e-l) Zellen, die VEGFR-1 exprimieren, sind benachbart zu Nestin-exprimierenden Zellen (rot) im RMS. Toto3 markiert die Nuklei (blau). Messbalken: a-d) 10 μ m; e-h) 50 μ m; i-l) 20 μ m.

Die Identifikation neuraler Stammzellen im adulten Gehirn ist bislang noch schwierig und die Marker umstritten. Zahlreiche Studien verwenden Nestin, ein Intermediärfilamentprotein der Klasse VI als Marker für adulte neurale Stammzellen.^{51,75,302} Nestin wird von

Zellen der SVZ und des RMS exprimiert. Abb. 21 zeigt, dass VEGFR-1-positive Zellen sich benachbart zu Nestin-positiven Zellen befinden. Gelbe Farbsignale durch Überlagerung der roten und grünen Fluoreszenzsignale sind sichtbar. Eine eindeutige Koexpression innerhalb einer Zelle konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. VEGFR-1 wird somit wahrscheinlich nicht in Nestin-positiven Vorläuferzellen exprimiert.

4.2.3.7 Expressionsvergleich VEGFR-1 und dem Proliferationsmarker (PCNA) in neurogenen Regionen des adulten Maushirns

PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), auch als „Cyclin“ bekannt, ist ein Hilfsprotein der delta-DNA-Polymerase welches in früher G1-Phase und S-Phase des Zellzyklus exprimiert wird. In der späten S-Phase ist PCNA hauptsächlich in den Nukleoli detektierbar und wird als Marker für mitotische Zellen verwendet.³⁰³ Ko-Markierung von PCNA mit dem VEGFR-1 zeigen keine Überlagerung (Abb. 22). VEGFR-1 wird nicht in proliferierenden Zellen exprimiert.

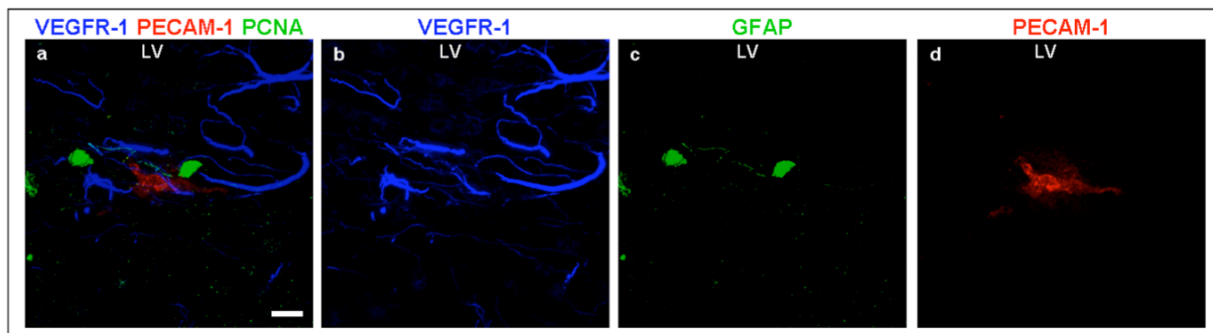


Abb. 22: Dreifachimmunfluoreszenzfärbung des VEGFR-1 mit dem Proliferationsmarker PCNA und vaskulären Marker PECAM-1 im adulten ZNS.

a)-d) Expression von VEGFR-1 ist nicht in proliferierenden Zellen nachweisbar. Proliferationsaktive Zellen sind oft in der Nähe von Gefäßen (rot) zu finden. Messbalken: 10 μ m

4.2.3.8 Expressionsvergleich VEGFR-1 beta-Catenin in neurogenen Regionen des adulten Maushirns

Der Wnt/beta-Catenin-Signalweg ist in die Regulierung der Proliferation neuraler Vorläuferzellen involviert. Aktives beta-Catenin akkumuliert im Zytoplasma und tritt in den Nukleus ein. Somit ist nukleäres beta-Catenin ein potentieller Indikator für Proliferation.³⁰⁴ Doppelmarkierungen von VEGFR-1 und beta-Catenin, welches in der Ependyma exprimiert wird, zeigen das VEGFR-1-positive Fortsätze bis in die SVZ und Ependyma reichen und die beta-Catenin+-Zellen berühren. (Abb. 23) Zudem sind die punktförmigen Signale des anti-VEGFR-1-Antikörpers in den beta-Catenin-positiven

Zellen lokalisiert (Abb. 23 e). Da kein eindeutig nukleäres beta-Catenin-Signal in Fluoreszenzmarkierungen sichtbar war, lassen diese Färbungen keine Rückschlüsse auf VEGFR-1 Expression in aktiv proliferierenden Vorläuferzellen zu.

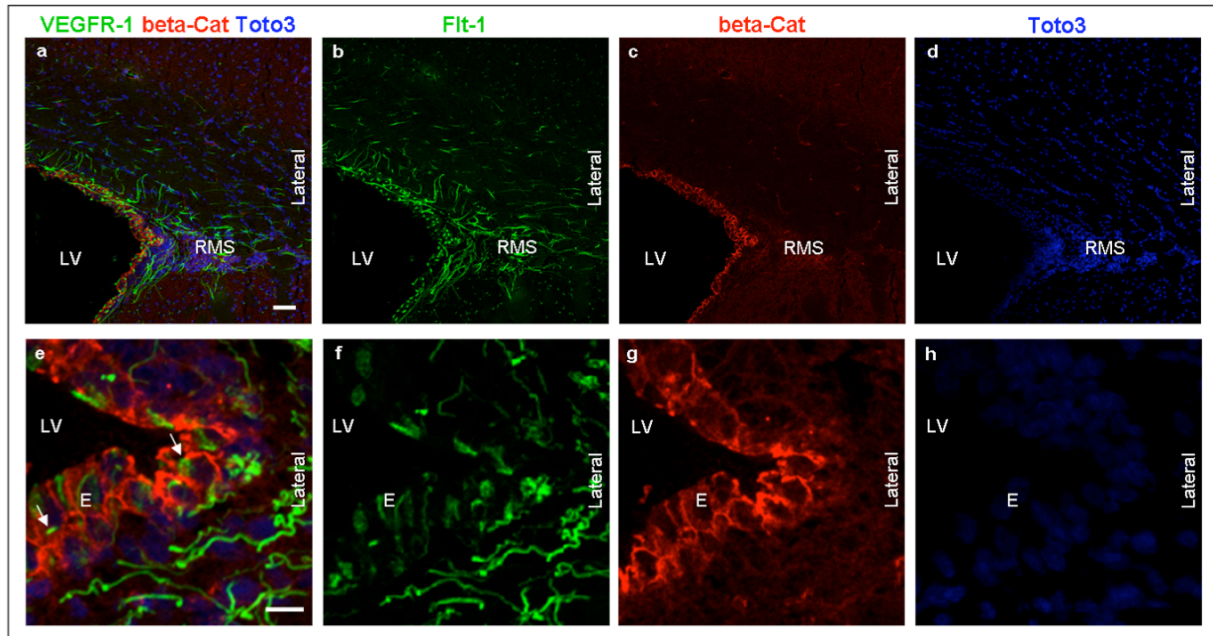


Abb. 23: Doppelmarkierung von beta-Catenin und VEGFR-1.

VEGFR-1 positive Fortsätze (grün; Pfeile in e) berühren beta-Catenin+-Zellen (rot) in der Ependyma der LV. Die Nuklei sind mit Toto3 (blau) markiert. Messbalken: a-d) 50µm; e-h) 20µm. E: Ependyma.

4.2.4 Expressionsnachweis des murinen VEGF-A auf Protein- und RNA-Ebene im adulten Gehirn

4.2.4.1 Nachweis von VEGF-A im adulten Maushirn auf Transkriptebene

Der Nachweis, der den Wachstumsfaktor VEGF-A kodierenden mRNA, erfolgte mittels *In situ* Hybridisierung, unter Verwendung der von Breier *et al.* (1992)²⁷⁵ veröffentlichten RNA-Sonden. Transkripte von VEGF-A wurden im gesamten Hirn detektiert. Die RNA-Expression konnte im Striatum, Cortex und in der GCL des Hippokampus nachgewiesen werden. Auch in der GCL und der PGL des OB wird VEGF-A auf RNA-Ebene exprimiert. Besonders zu beachten ist, dass vor allem an der rostralen Wand der LV in der SVZ und im Entstehungsareal des RMS eine starke Färbung der VEGF-A mRNA zu sehen ist (Abb. 24). Es ist bekannt, dass der Plexus choroideus im LV VEGF-A sezerniert. Er zeigt ein starkes positives Signal und dient als Positivkontrolle. Die Negativkontrolle war ungefärbt.

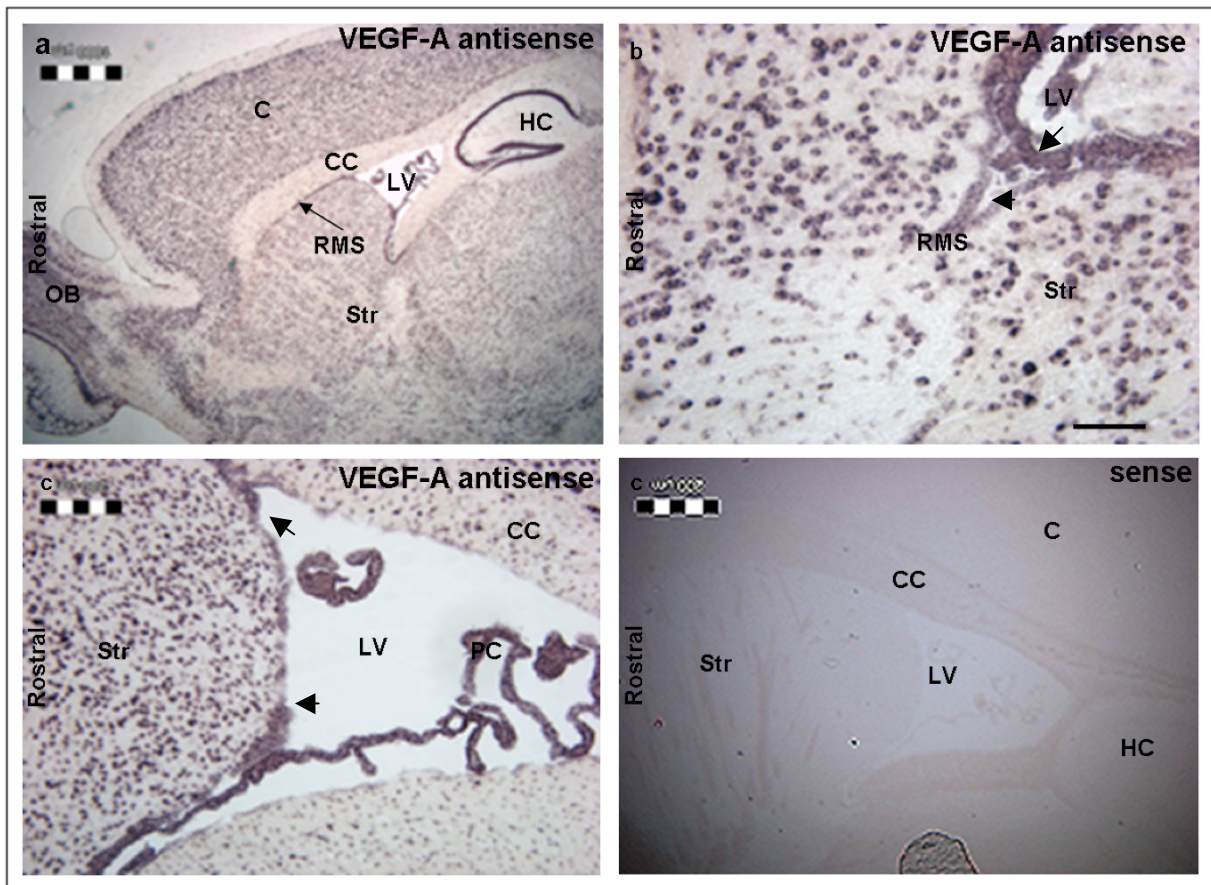


Abb. 24: Nachweis der VEGF-A mRNA im adulten Maushirn.

a) Übersicht der VEGF-A-mRNA im Saggittalschnitt. b) VEGF-A-Transkripte sind in der SVZ und im RMS sichtbar. c) VEGF-A-mRNA ist vor allem an der rostralen Wand des LVs detektierbar (Pfeil). d) Sense, Negativkontrolle. Bar: a) 1mm; b) 100 μ m c)+d) 200 μ m. CC: callosum; Str: Striatum; C: Cortex; HC: Hippocampus, PC: Plexus choroideus

4.2.4.2 Zellspezifische Expressionsanalyse von VEGF-A im adulten Maushirn

VEGF-A ist durch indirekte Immunfärbung hauptsächlich im Plexus choroideus und in der SVZ der LV und im RMS detektierbar. In der SVZ und im RMS kolokalisiert VEGF-A mit dem glialen Marker GFAP. (Abb. 25) VEGF-A wird somit wie VEGFR-1 überwiegend in GFAP-positiven Zellen in Regionen adulten Neurogenese exprimiert.

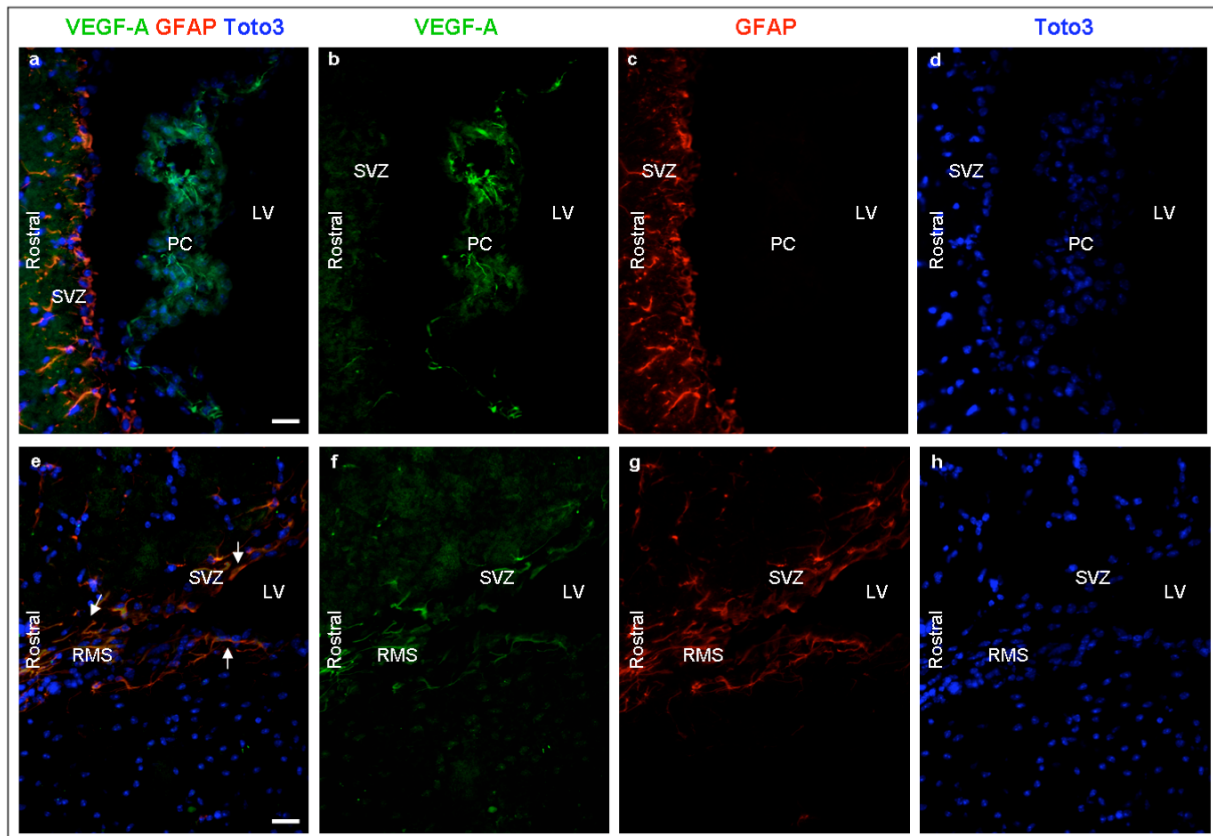


Abb. 25: Komarkierung von VEGF-A und GFAP im Hirn der adulten Maus.

VEGF-A ist vor allem im Plexus choroideus, in der SVZ der LV und im RMS detektierbar (a,b,f ,e). In der SVZ und im RMS kolokalisiert das VEGF-A-Färbesignal überwiegend mit GFAP-Expression. (a+ e Pfeile). Messbalken: 20µm. CC: callosum; LV: Lateralventrikel; Str: Striatum; PC: Plexus choroideus.

4.2.5 Zusammenfassung der Expressionsdaten des VEGFR-1 im adulten ZNS der Maus

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in Abb. 26 zusammengefasst dargestellt und zeigen erstmals die Expression des VEGFR-1 in Regionen adulter Neurogenese im murinen ZNS. VEGFR-1 ist in der SVZ, dem RMS, dem Hippokampus, dem OB und dem CC fast ausschließlich in GFAP-positiven Zellen exprimiert. VEGFR-1- und GFAP-doppeltmarkierte Zellen sind häufig in der Nähe von Gefäßen lokalisiert. Fortsätze, in denen der VEGFR-1 lokalisiert ist, berühren Gefäße und Nestin⁺- oder beta-Catenin⁺-Zellen der SVZ und des RMS. Nur wenige Endothelzellen weisen eine VEGFR-1-Färbung auf. Postmitotische Neurone sind nicht VEGFR-1-positiv.

Ergebnisse der Expressionsanalysen des VEGFR-1

a	wt	b	VEGFR-1
SVZ	x	GFAP	x
RMS	x	Nestin	-
OB	x	NeuN	-
CC	x	Neurofilament	-
HC	x	PCNA	-
Ctx	-	beta-Catenin	-
Striatum	-	TuJ1	-
III. Ventrikel	x		
Cerebellum	-		

Abb. 26: Zusammenfassung der Ergebnisse der Expressionsanalyse des VEGFR-1

a) Darstellung der Ergebnisse der regionspezifischen Expression des VEGFR-1. b) Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der Koexpressionsstudien von VEGFR-1 mit anderen Markerproteinen an Gefrierschnitten des adulten Maushirns.

4.3 Untersuchungen zur Relevanz des VEGFR-1 für die adulte Neurogenese

Die VEGFR-1 Expression in den Regionen neurogener Aktivität im adulten Säugerhirn ist, wie im vorangegangenen Kapitel gezeigt, hauptsächlich in Gliazellen lokalisiert. So exprimieren GFAP-positive Zellen des RMS, der SVZ und des OB den Rezeptor VEGFR-1. Adulte Neurogenese wird physiologisch von intrinsischen und extrinsischen Faktoren reguliert.³⁰⁵ Diese Faktoren treten als Regulatoren in den verschiedenen Prozessen der Neurogenese im adulten Hirn auf. Viele dieser Faktoren werden von Gliazellen synthetisiert und in den extrazellulären Raum sekretiert. Es ist bekannt, dass gliale Zellen die Proliferation neuraler Vorläuferzellen, als auch die Migration von Neuroblasten zum OB beeinflussen.¹⁷² Die einzelnen Faktoren und die genauen Wirkmechanismen sind allerdings noch nicht im Detail entschlüsselt.

Die Erforschung der Rolle des VEGFR-1 auf die Neurogenese des adulten Gehirns erfolgte über Analysen der transgene Mauslinie Flt-1TK-/-²⁵⁰ mit Erlaubnis von M.

Shibuya, Institute of Medical Science der Universität von Tokyo (Japan). In Flt-1TK^{-/-} ist die Signaltransduktion des VEGFR-1 genetisch inhibiert (Abb. 27). Diese Mäuse exprimieren nur die Extrazellulär- und Transmembrandomäne des VEGFR-1 Rezeptors. Die zur Signaltransduktion essentielle intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne ist deletiert. In dieser Maus ist der VEGFR-1 jedoch trotzdem zur Ligandenbindung fähig.²⁵⁰

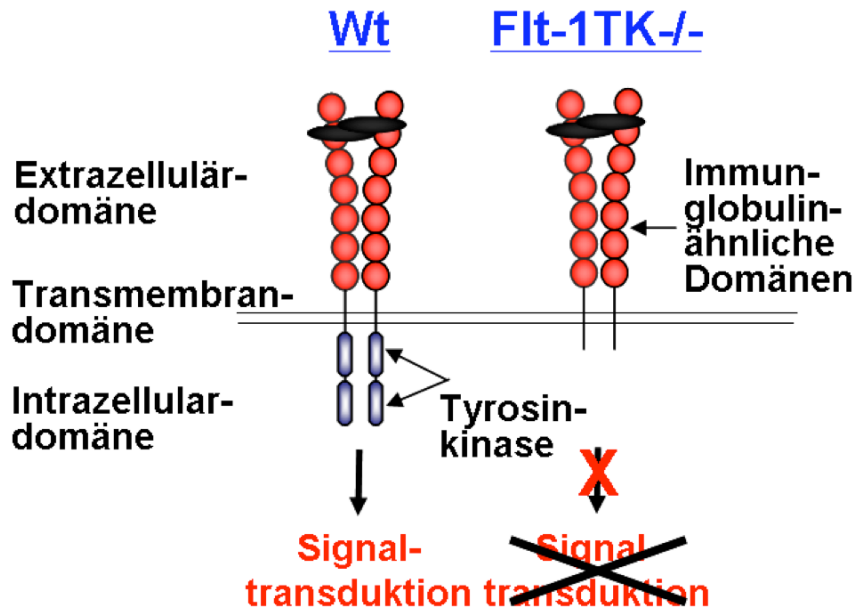


Abb. 27: Schematische Darstellung der Deletion der Signaltransduktionsdomäne des VEGFR-1 in der transgenen Flt-1TK^{-/-} Maus.

In Flt-1TK^{-/-} Mäusen ist die Intrazellulärdomäne des VEGFR-1 genetisch deletiert und dadurch die Signaltransduktion dieses Rezeptors inhibiert. Die Extrazellulärdomäne und Transmembrandomäne des Rezeptors sind in Flt-1TK^{-/-} Mäusen wie in wt-Mäusen vorhanden. Die Ligandenbindung ist daher in den Flt-1TK^{-/-} unbeeinträchtigt.^{250,251}

Zur Analyse einer Funktion des VEGFR-1 auf die verschiedenen Prozesse der adulten Neurogenese wurden nacheinander die Proliferation von Zellen in den Regionen adulten Neurogenese, sowie die Migration dieser neu gebildeten Zellen zu ihrem Bestimmungsort und die Differenzierung am Zielort untersucht. Proliferationskinetische Untersuchungen in Flt-1TK^{-/-} und wt-Mäusen dienten dem quantitativen Nachweis mitotischer Zellen.

Neurogene Aktivität ist altersabhängig und nimmt mit steigendem Alter ab.^{5,59} Auch Umweltbedingungen³⁰⁶ und physische Aktivität^{307,308} beeinflussen die Proliferation und die Neurogenese. Daher hatten die Versuchstiere beider Gruppen immer ein vergleichbares Alter und wurden in Käfigen gleicher Größe und Ausstattung und möglichst in Gruppen gehalten.

4.3.1 Expression von VEGFA und des VEGFR-1 in Flt-1TK-/-

Die in Kapitel 4.1 an Gehirngefrierschnitten von wt-Mäusen dargestellte Expressionsanalyse des VEGFR-1 zeigte auch an Gefrierschnitten der Hirne von Flt-1TK-/- identische Ergebnisse. Auch in Flt-1TK-/- war der VEGFR-1 fast ausschließlich in GFAP-positiven Zellen exprimiert. Auch die anderen verwendeten Marker wiesen in den Flt-1TK-/- keine Differenz in der Expression zum wt auf. Die Deletion der Tyrosinkinasedomäne des VEGFR-1 hat somit keinen Einfluss auf das Expressionsmuster des Rezeptors selbst. Auch das Expressionsmuster des Liganden VEGF-A in den Flt-1TK-/- Mäusen stimmte mit dem des wt überein. In Flt-1TK-/- war VEGF-A gleichfalls im Plexus choroideus und in GFAP-positiven Zellen, vor allem um die LV und im RMS detektierbar. VEGF-A wird somit in Flt-1TK-/- in den gleichen Hirnarealen und Zelltypen exprimiert.

4.3.2 Vergleich des prozentualen Hirngewichts

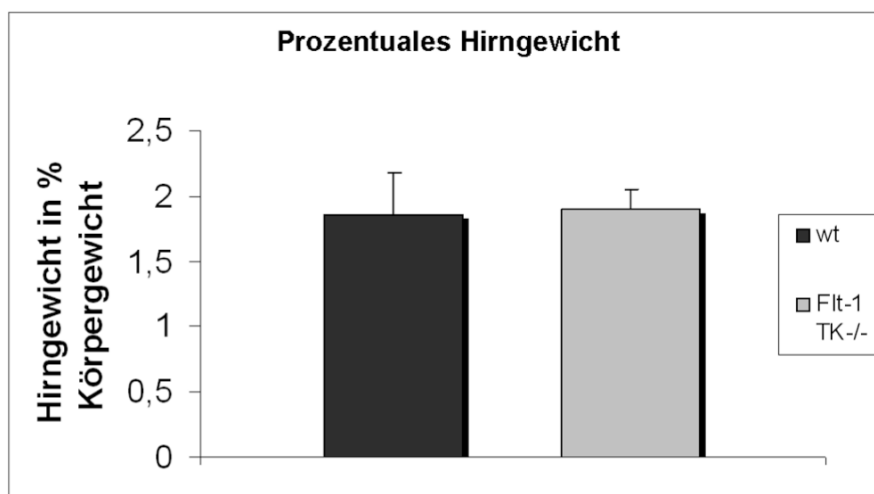


Abb. 28: Vergleich des prozentualen Hirngewichts von Flt-1TK-/- und wt-Mäusen.

Die Mäuse wurden vor Versuchsbeginn gewogen. Nach Perfusion wurde das Gewicht des entnommenen Gehirns ermittelt und das prozentuale Hirngewicht errechnet. Flt-1TK-/-Mäuse haben ein vergleichbares Hirngewicht in Relation zu ihrem Körpergewicht zu wt-Mäusen. n=11

Eine starke Beeinträchtigung der Gehirnentwicklung bzw. adulter Neurogenese könnte zu einer Größenzunahme oder -abnahme des Gehirns führen. Die Bestimmung des prozentualen Hirngewichts, also des Hirngewichts pro kg Körpergewicht, ergab keinen Unterschied zwischen beiden Genotypen (Abb. 28)

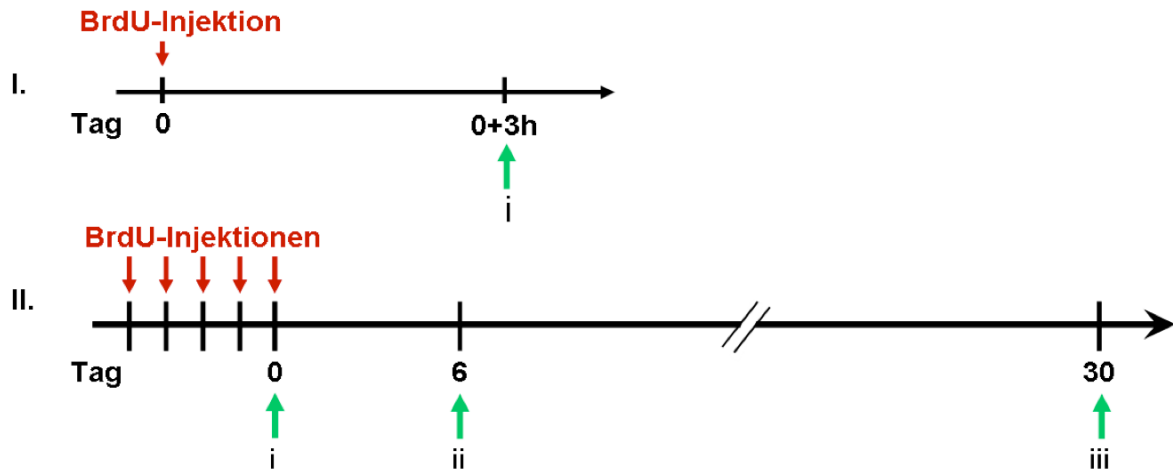
4.3.3 Strategie zur Analyse der Relevanz des VEGFR-1 für verschiedene Prozesse adulter Neurogenese.

4.3.3.1 Permanente Markierung “neugeborener” Zellen *in vivo* und stereologische Analyse

Voraussetzung für die Untersuchung adulter Neurogenese ist es neu gebildete Zellen im adulten Gehirn zu identifizieren und durch permanente Markierung auf ihrem Lebensweg verfolgen zu können. Die Detektion und Markierung proliferierender Zellen erfolgte über die von Gratzner (1982)³⁰⁹ entwickelte Nachweismethode unter Verwendung des synthetischen Thymidinanalogon 5´Bromo-2´desoxy-Uridin (BrdU) mit darauf folgender immunhistochemischer Detektion. BrdU leitet sich vom Uridin ab, welches anstatt der DNA-Pyrimidinbase Thymidin Bestandteil der RNA ist. BrdU konkurriert in der S-Phase des Zellzyklus mit Thymidin um den Einbau in den neu synthetisierten DNA-Strang, ohne die Transkriptionsmechanismen zu stören. Es kann systemisch appliziert werden. In replizierende Zellen inkorporiertes BrdU ist monatelang (in Mäusen bis zu einem Jahr) immunhistochemisch detektierbar. Damit ist es möglich, Zellen, die zum Zeitpunkt der BrdU-Gabe entstanden sind, in ihrer Entwicklung zu verfolgen. In Kombination mit spezifischen Markern können Entwicklungsstadien der BrdU-markierten Zellen und die Differenzierung in verschiedene Zelltypen beobachtet werden.^{59,187,310} Die Anzahl der BrdU-markierten Zellen ist abhängig von der administrierten Dosis.³¹¹ Um zuverlässige Ergebnisse zu erzielen und die Varianzen innerhalb der Gruppen möglichst gering zu halten, wurde die administrierte Menge BrdU exakt an das Körpergewicht der einzelnen Versuchstiere angeglichen. Die Injektion von BrdU (50 µg pro g Körpergewicht) erfolgte intraperitoneal einmalig oder an fünf aufeinander folgenden Tagen. Die verschiedenen Versuchsgruppen wurden je nach Fragestellung nach unterschiedlich langen Zeiträumen nach der letzten BrdU-Injektion analysiert. Die genaue Strategie zur Analyse der Relevanz des VEGFR-1 für die verschiedenen Prozesse ist in Abb. 29 dargestellt.

Die gewählte sagittale Schneiderichtung ermöglichte die Analyse des RMS in seiner gesamten Länge. Die Visualisierung der BrdU-markierten Zellen erfolgte über indirekte Immunfärbung. Zur Vermeidung von Variationen der Färbeintensitäten wurden die Schnitte jeweils aller miteinander zu vergleichenden Tiere stets gleichzeitig gefärbt. Auswertungen erfolgten nach stereologischem Prinzip (s. Kap. 3.2.10.1). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (SD) vom Mittelwert dar.

Strategie zur Untersuchung einer funktionellen Rolle des VEGFR-1 in der Regulierung der verschiedenen Prozesse adulter Neurogenese



	Analysiertes Areal	Analyse der Rolle des VEGFR-1 auf
I. i) 3 h		
	SVZ	Proliferation
	RMS	Proliferation
II. i) Tag 0		
	SVZ	Proliferation in der SVZ + Migration aus der SVZ
	RMS	Migration im RMS + Proliferation im RMS
	OB	Migration: Erreichen des OB + Radiale Migration im OB
	CC	Migration: Abwanderung aus dem RMS + Proliferation im CC
	HC	Proliferation im HC (+Migration)
II. ii) Tag 6		
	SVZ	Migration aus der SVZ
	RMS	Migration im RMS
	OB	Migration: Erreichen des OB + Radiale Migration im OB
	CC	Migration: Abwanderung aus dem RMS
II. iii) Tag 30		
	SVZ	Überleben immobil, sich langsam teilender Zellen der SVZ
	HC	Überleben im HC, Einwandern in die Schichten des OB

Abb. 29: Darstellung der Strategie zur Analyse der Relevanz des VEGFR-1 für verschiedene Prozesse adulter Neurogenese.

I. Zur Analyse der Proliferation einer Zellpopulation unabhängig von Migrationseffekten wurden die Tiere einmalig mit BrdU injiziert und nach 3 h analysiert. II. Mehrmalige BrdU-Injektionen dienten der Markierung einer größeren Zellzahl. Die Perfusionen an unterschiedlichen Zeitpunkten ermöglichten die Analyse der Relevanz des VEGFR-1 in der Zellmigration, dem Überleben und der terminalen Differenzierung in verschiedenen Hirnarealen.

4.3.3.2 Zelltypspezifische Analyse BrdU-positiver Zellen

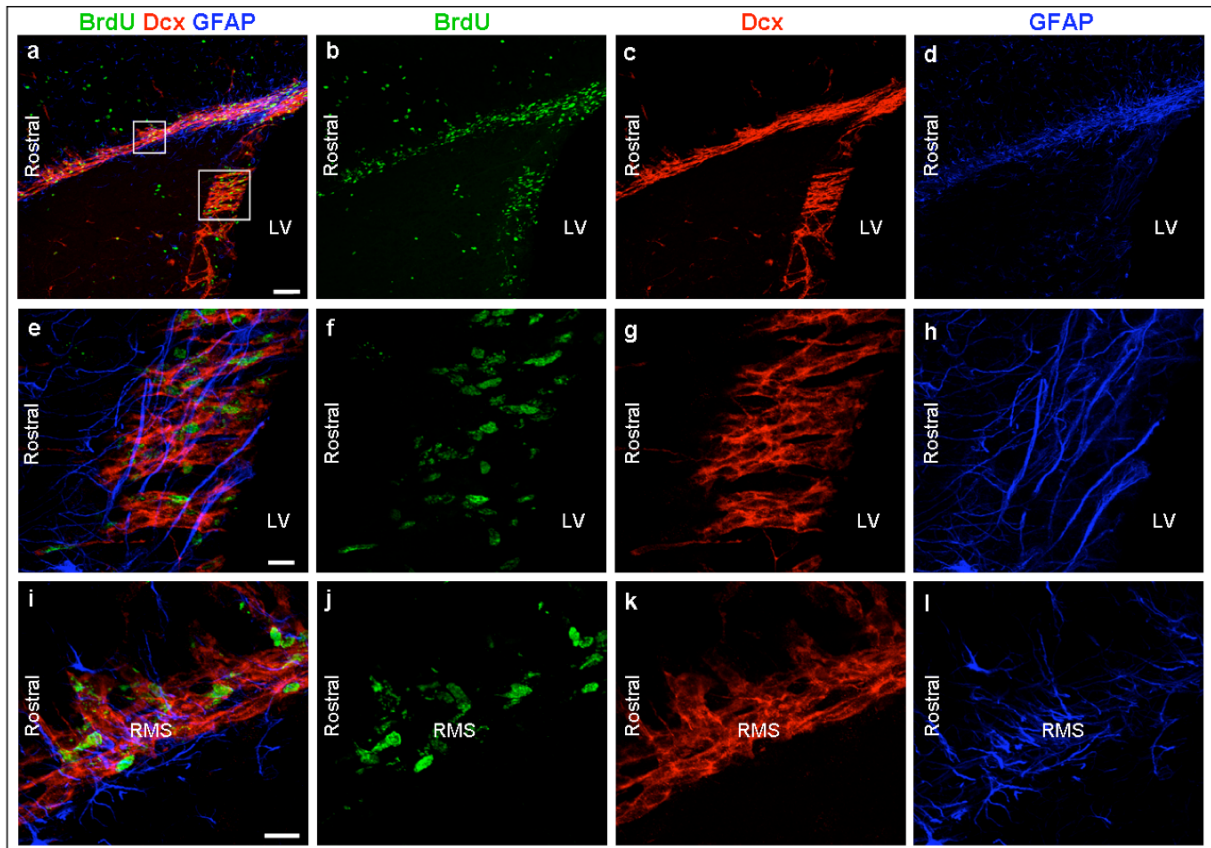


Abb. 30: Zelltypspezifische Analyse der BrdU-markierten Zellen mittels konfokaler Analyse von Dreifach-Immunfluoreszenzen.

Dreifachmarkierungen erfolgten an Saggittalschnitten der Hirne von Mäusen, denen zuvor BrdU appliziert worden war. Färbungen mit anti-BrdU (grün), anti-GFAP (blau) und anti-DCX (rot) Antikörpern wurden konfokal ausgewertet. a) zeigt eine Übersicht der SVZ und des RMS. b) eine Ausschnittvergrößerung der anterioren SVZ und c) einen Bereich im RMS. Messbalken: a)-d) 60 μm ; e)-l) 10 μm .

Die Bestimmung der Zelltypen BrdU-positiver Zellen erfolgte durch Auswertungen von Dreifachmarkierungen des VEGFR-1 mit zelltypspezifischen Markern in der SVZ und im RMS. Dazu wurde GFAP als charakteristischer Marker für gliale Zellen und Doublecortin (DCX), was vom Vorläuferzellstadium bis zur beginnenden neuronalen Differenzierung in den Neuroblasten exprimiert wird, eingesetzt.¹³⁴⁻¹³⁶ Die Koexpression von DCX reflektiert hier somit neurogene Aktivität. Die am konfokalen Mikroskop ausgewerteten Doppelmarkierungen sind in Abb. 30 exemplarisch dargestellt.

Die Analyse des Effektes der Inhibierung der VEGFR-1-Signaltransduktion auf die Differenzierung der BrdU-positiven Zellen im OB, erfolgte mit den neuronalen Markern NeuN und Tyrosinhydroxylase und dem glialen Marker GFAP. Pro Versuchstier und untersuchtem Areal wurden jeweils 100 BrdU+-Zellen auf Komarkierung untersucht. Mit

der zuvor ermittelten Gesamtzahl BrdU-positiver Zellen eines Areals konnte die Gesamtzahl der BrdU-markierten Zellen, die einen bestimmten Marker exprimieren, berechnet werden.

4.3.4 Proliferationskinetische Untersuchungen in der adulten SVZ und im RMS

Die Expression des VEGFR-1 in der adulten SVZ der LV und im RMS deutet auf eine mögliche Funktion in Prozessen der adulten Neurogenese hin. Um dies zu analysieren wurde den Flt-1-TK^{-/-} und wt-Kontrollmäusen einmalig BrdU intraperitoneal appliziert. Die Bioverfügbarkeit von BrdU beträgt ca. 2 h.³¹² Um diesen Zeitraum voll zu nutzen erfolgte die Perfusion jedes Tieres exakt 3 h nach Injektion.

4.3.4.1 Quantitative Analyse BrdU-positiver Zellen in SVZ und RMS 3 h nach BrdU-Applikation

Stereologische Analyse von Flt-1TK^{-/-} und wt zeigt 3 h nach BrdU-Injektion eine geringe, aber signifikante Erhöhung BrdU-markierter Zellen in der SVZ der transgenen Tiere. Diese haben somit eine höhere Proliferationsrate als wt-Mäuse (Abb. 31 a). Diese geringe Erhöhung wirkte sich nicht signifikant auf die Zelldichte BrdU-positiver in der SVZ aus (Abb. 31 b). Auch gab es keine Unterschiede der Volumina der SVZ beider Genotypen. Im RMS war die Proliferationsaktivität niedriger als in der SVZ. Dort zeigte sich keine Differenz zwischen beiden Genotypen in der Zahl neu entstandener Zellen, der Zelldichte der BrdU⁺-Zellen und den Volumina. Im OB waren nur sehr vereinzelt BrdU-positive Zellen sichtbar.

4.3.4.2 Zelltypspezifische Analyse der BrdU-markierten Zellen 3 h nach BrdU-Gabe

Dreifachmarkierungen des VEGFR-1 mit zelltypspezifischen Markern zeigten in Flt-1TK^{-/-} eine signifikant erhöhte Anzahl DCX-exprimierender, BrdU-positiver Zellen in der SVZ. Die Anzahl BrdU-positiver Zellen, die nicht DCX oder GFAP exprimieren, war hingegen signifikant vermindert. Im RMS unterschieden sich Flt-1TK^{-/-} und wt in der Markerexpression BrdU-positiver Zellen nicht. In der SVZ ist somit in den Flt-1TK^{-/-} die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen erhöht. (Abb. 32)

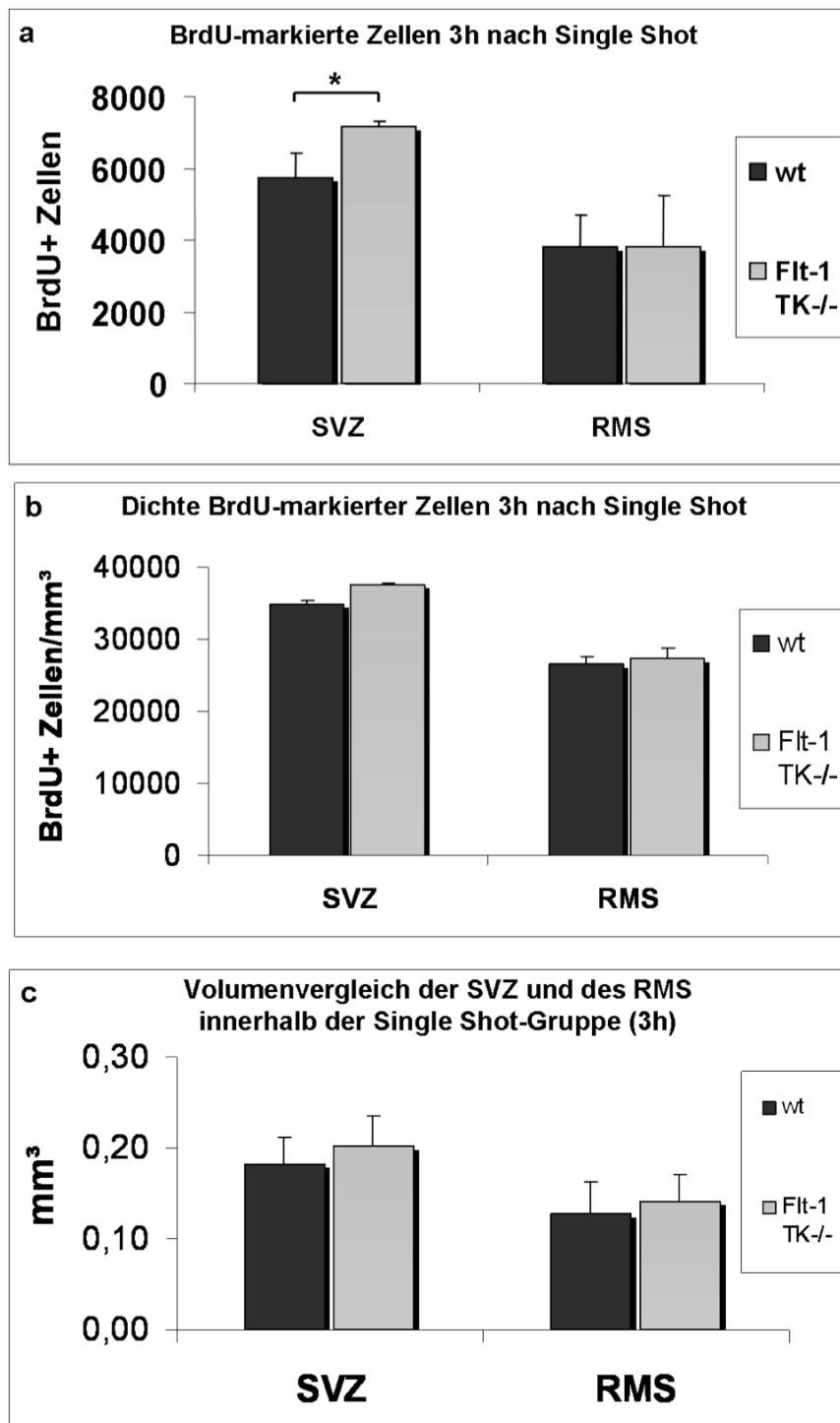


Abb. 31: Quantitative und volumetrische Analyse der SVZ und des RMS 3h nach einmaliger BrdU-Injektion (Single Shot).

Flt-1TK-/- und wt Tiere wurden einmalig mit BrdU injiziert, nach 3 h getötet und BrdU+-Zellen und Volumina in Serienschritten der Gehirne stereologisch ausgewertet. a) In Flt-1TK-/- befanden sich mehr BrdU+-Zellen in der SVZ, * $p < 0,02$. Im RMS hingegen war die Anzahl gleich. b) Zelldichten beider Genotypen waren ähnlich. c) Die beiden Gruppen zeigten keine Differenz der Volumina von SVZ und RMS. SVZ: Flt-1 TK-/- = 3, wt = 4; RMS: Flt-1 TK-/- = 4, wt = 5.

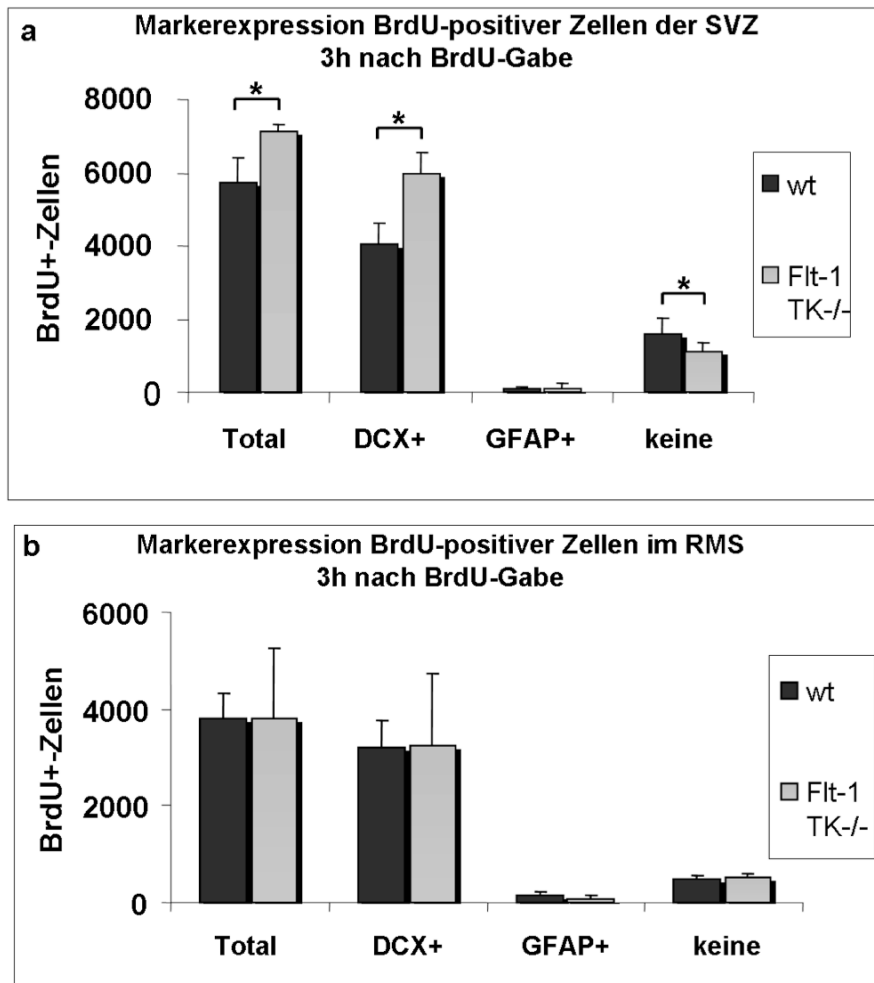


Abb. 32: Zelltypspezifische Analyse BrdU-markierter Zellen 3 h nach BrdU-Gabe mittels konfokaler Analyse von Dreifachimmunfluoreszenzen.

Flt-1TK^{-/-} und wt Tiere wurden 3 h nach einmaliger BrdU-Gabe perfundiert und Dreifachmarkierungen mit anti-BrdU, anti-GFAP und anti-DCX Antikörpern konfokal ausgewertet. a) In Flt-1TK^{-/-} befanden sich signifikant mehr BrdU⁺-Zellen als in wt-Tieren. Parallel ist die Anzahl der DCX-exprimierender BrdU gefärbter Zellen erhöht. Die Anzahl BrdU-positiver Zellen, die nicht DCX oder GFAP exprimieren, ist hingegen vermindert. * $p < 0,05$ b) Im RMS sind keine Unterschiede zwischen Flt-1TK^{-/-} und wt in der Zelltypspezifischen BrdU-Expression messbar. $n=4$.

Nicht nur die Gesamtzahl der DCX-exprimierenden und der alleinig BrdU-markierten war verändert. (Abb. 32) Auch die Betrachtung der prozentualen Verteilung innerhalb des SVZ zeigte eine anteilige Erhöhung der DCX/BrdU-gefärbten Zellen und eine Verminderung der nur BrdU-markierten Zellen in den Flt-1 TK^{-/-} im Vergleich zu wt-Tieren. (Abb. 33)

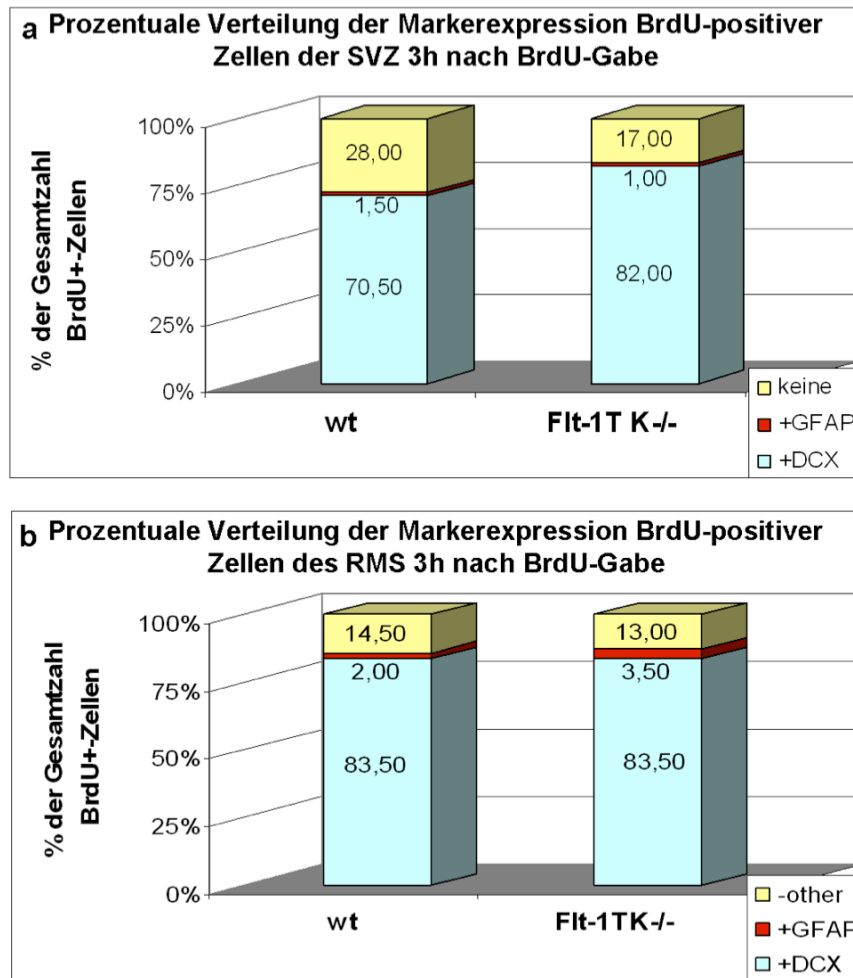


Abb. 33: Prozentuale Verteilung der Markerexpression BrdU-markierter Zellen in der SVZ und im RMS nach 3h. a) In Flt-1TK^{-/-} war der Anteil DCX-exprimierender BrdU⁺⁺-Zellen im Vergleich zu wt-Tieren erhöht. $p=0,025$. Parallel ist die Anzahl der BrdU-positiver Zellen, die nicht DCX oder GFAP exprimieren, vermindert. $p=0,026$. b) Im RMS gibt es keine Unterschiede. n: Flt-1TK^{-/-}=4; wt=5.

4.3.4.3 Quantitative Analyse sich langsam teilender Zellen in SVZ 30 Tage nach BrdU-Applikation

Neurale Stammzellen in der SVZ sind mitotisch aktiv, haben aber eine sehr geringe Teilungsrates und sind immobil. Stammzellen, die sich in der Zeit der BrdU-Gabe geteilt und somit BrdU inkorporiert haben, sollten daher nach 30 Tagen, wenn alle markierten Vorläuferzellen bereits aus der SVZ migriert sind, dort noch detektierbar sein. Um die Anzahl dieser sich langsam teilender Zellen in Flt-1TK^{-/-} und wt-Mäusen zu vergleichen, wurden beide Gruppen an fünf aufeinander folgenden Tagen mit BrdU injiziert und an Tag 30 perfundiert (Abb.34 a). Die Zahl der nach 30 Tagen noch in der SVZ befindlichen BrdU⁺-Zellen war zwar im Mittel in den Flt-1TK^{-/-} tendenziell erhöht, die Differenz war jedoch nicht signifikant (Abb. 34 a). Dies zeigt, dass die Deletion der Intrazellulärdomäne

des VEGFR-1 keinen Effekt auf das Überleben sich langsam teilender, immobiler Zellen der SVZ hat.

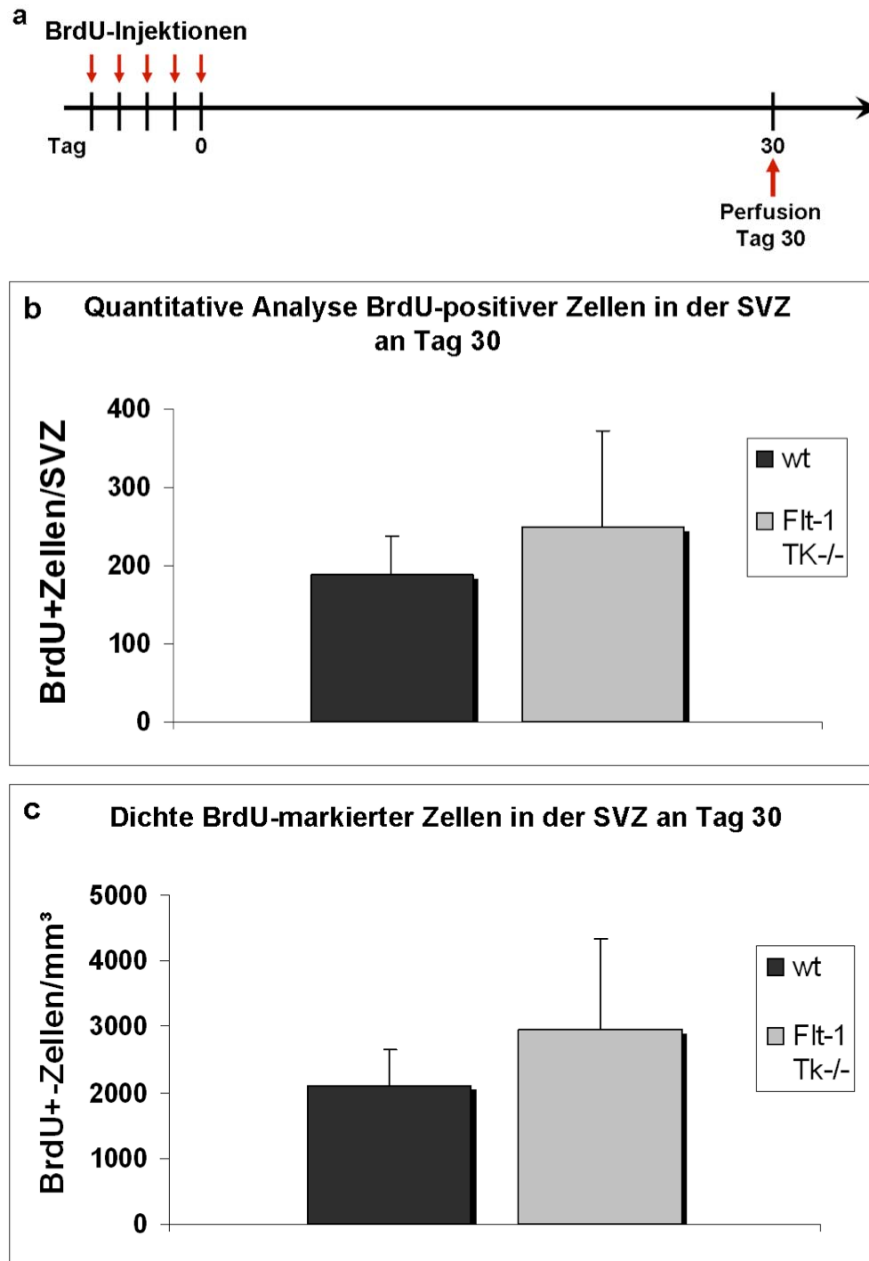


Abb. 34: Quantitative Analyse BrdU-markierter Zellen in der SVZ am Tag 30 nach BrdU-Injektion.

a) Versuchsaufbau: Flt-1TK^{-/-} und wt Tiere wurden an fünf aufeinander folgenden Tagen mit BrdU injiziert und an Tag 30 analysiert. b)+c) Tendenziell hatten Flt-1TK^{-/-} eine höhere Anzahl und eine größere Zelldichte BrdU-markierter Zellen nach 30 Tagen in der SVZ als wt-Mäuse. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. n: Flt-1TK^{-/-}=7, wt=4.

4.3.5 Analyse der Migration neu entstandener Zellen in der adulten Neurogenese des olfaktorischen System

Aufgrund der Expression des VEGFR-1 entlang des gesamten RMS war es von großem Interesse die Rolle des VEGFR-1 auf das Migrationsverhalten neu entstandener Zellen des olfaktorischen Systems genauer zu erforschen. Intraperitoneale Applikation von BrdU an fünf aufeinander folgenden Tagen markierten eine größere Zellzahl, was die Feststellung von Unterschieden zwischen den Genotypen erleichtert. Die Versuchstiere wurden, wie in Abb. 35 und 29 dargestellt, an verschiedenen Zeitpunkten nach der letzten Injektion perfundiert. Die Perfusion der ersten Versuchsgruppe erfolgte am Tag 0 exakt 3 h nach der letzten BrdU-Injektion. Diese Gruppe diente zur Analyse der Rolle des VEGFR-1 für den Eintritt der Zellen in den RMS. Die zweite Versuchsgruppe wurde 6 Tage nach der letzten BrdU-Gabe perfundiert, um die zu diesem Zeitpunkt im RMS befindlichen Zellen und damit deren Migrationsverhalten im RMS zu analysieren.

In der 0-Tage- und der 6-Tage- Versuchsgruppe wurden folgende Areale untersucht:

- die SVZ auf proliferierende, noch in der SVZ lokalisierte Zellen (B-, C-, und A-Zellen);
- der RMS hauptsächlich auf migrierende Zellen (A-Zellen);
- der OB auf Zellen, die bereits am Bestimmungsort ankamen.

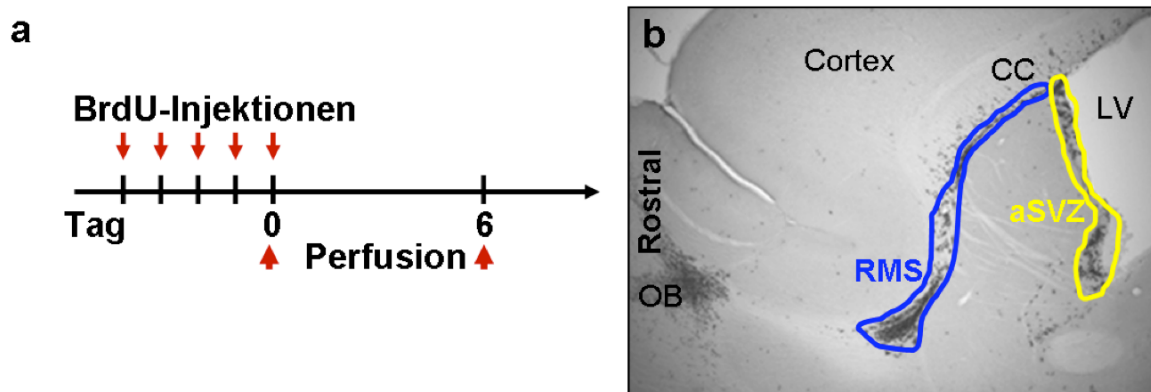


Abb. 35: Injektionsschema zur Untersuchung der Proliferation und Migration neuraler Vorläuferzellen mittels BrdU-Markierung.

a) Mäusen beider Genotypen wurde an 5 aufeinander folgenden Tagen BrdU injiziert. Eine Versuchsgruppe wurden am Tag 0, die zweite Gruppe an Tag 6 nach der letzten BrdU-Gabe perfundiert. Es wurden Serienschritte angefertigt und BrdU immunhistochemisch detektiert. Danach wurde wie in b) exemplarisch dargestellt die SVZ (gelb) und der RMS (blau) umrandet und stereologisch ausgewertet.

In der SVZ entstandene Zellen wandern innerhalb von 14 Tagen von der SVZ entlang des RMS zum OB. Jedoch proliferieren Neuroblasten, wie im vorangegangenen Kapitel gezeigt, auch während ihrer Migration im RMS. Im RMS entstandenen Zellen legen eine

geringere Distanz zum OB zurück, wodurch auch zu frühen Zeitpunkten BrdU-positive Zellen im OB detektiert werden können. Eine weitere Versuchsgruppe, die nach 30 Tagen perfundiert wurde, diente der Untersuchung der neuronalen Differenzierung im OB, worauf in Kapitel 4.3.6 eingegangen wird.

4.3.5.1 Quantitative Analyse BrdU-positiver Zellen in der SVZ und im RMS am Tag 0 und Tag 6

Stereologische Analysen zeigten eine vergleichbare Anzahl und Dichte BrdU-positiver Zellen in der SVZ und im RMS beider Genotypen am Tag 0. Auch am Tag 6 waren Zellzahl und Zelldichte BrdU-markierter Zellen in der SVZ vergleichbar. (Abb. 35 b) Erstaunlicherweise zeigte sich an Tag 6 im RMS der Flt-1TK^{-/-} eine hoch signifikante Reduktion der Zellzahl um fast die Hälfte (im Mittel 47,97%) und der Zelldichte (um 35,38%) der BrdU⁺-Zellen. (Abb. 35 a) Während kein Unterschied in den Volumina der SVZ an beiden Tagen zwischen den beiden Genotypen detektierbar war, war der RMS in Flt-1TK^{-/-} Mäusen an Tag 0 und Tag 6 hochsignifikant um 43,81% (ausgehend von den ermittelten Mittelwerten) in Relation zu wt-Mäusen verkleinert. (Abb. 35 c) Obwohl in Flt-1TK^{-/-}, wie im Kapitel 4.3.4 dargelegt, die Proliferation in der SVZ erhöht war, hatten diese im Vergleich zum wt am Tag 6 weniger BrdU-positive Zellen im RMS, ohne dass eine Akkumulation der Zellen in der SVZ zu beobachten war.

4.3.5.2 Zelltypspezifische Analyse der BrdU-markierten Zellen an Tag 6 BrdU-Gabe

Die Analyse der Zelltypen BrdU-markierter Zellen erfolgte wie in Kap. 4.3.4.2 über Dreifach-Markierungen mit anti-BrdU, anti-GFAP und anti-DCX. Konfokale Auswertungen zeigten im RMS eine signifikante Reduktion in der Zahl DCX-exprimierender, BrdU-positiver Zellen in Flt-1TK^{-/-} im Vergleich zum wt (Abb. 37 b). Diese Reduktion betrug im Mittel 40,75 %. In der SVZ waren keine signifikanten Unterschiede in den Zelltypen BrdU-markierter Zellen zwischen Flt-1TK^{-/-} und wt sichtbar (Abb. 37 a). Trotz der Zunahme der Proliferation, DCX-exprimierender Zellen in der SVZ in Flt-1TK^{-/-} gegenüber dem wt (Kap. 4.3.4.2), zeigen Flt-1TK^{-/-} weniger BrdU-positive Neuroblasten im RMS als wt-Tiere.

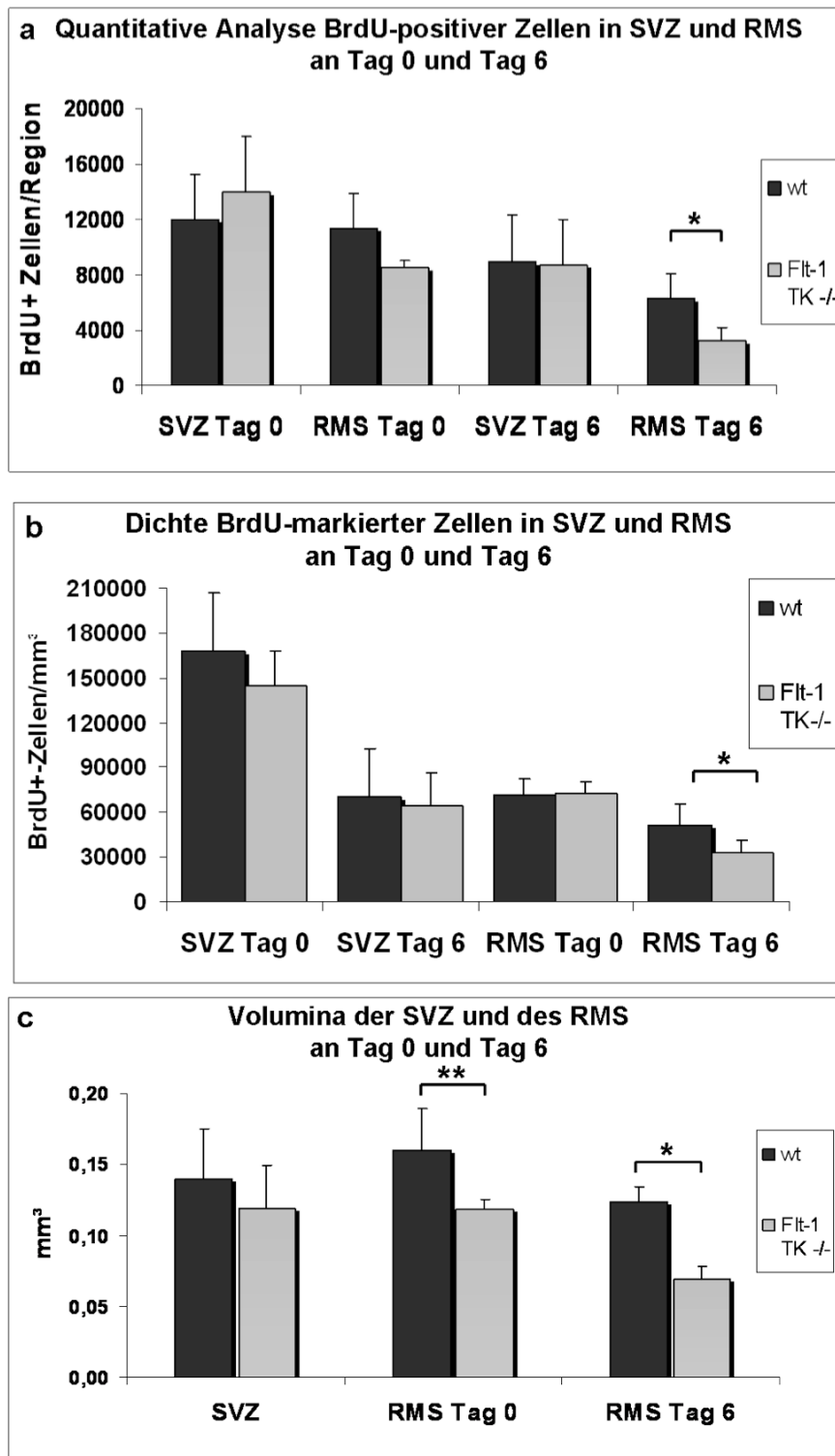


Abb. 36: Quantitative und Volumetrische Analyse der SVZ und des RMS am Tag 0 und Tag 6

a, b) An Tag 0 waren Anzahl und Dichte BrdU-positiver Zellen in der SVZ und im RMS in Flt-1TK und wt vergleichbar. An Tag 6 jedoch waren Anzahl und Dichte BrdU+-Zellen im RMS der Flt-1TK im Vergleich zum wt hoch signifikant reduziert. In der SVZ hingegen waren Zellzahl und Dichte BrdU-markierter Zellen in Flt-1TK und wt gleich. c) Volumina der SVZ beider Genotypen waren ähnlich. Der RMS war in Flt-1TK-/- an Tag 0 und Tag 6 signifikant kleiner als in wt-Mäusen. n: SVZ Tag 0: Flt-1TK-/- = 5, wt= 7; RMS Tag 0: : Flt-1TK-/- = 4, wt= 7; SVZ und RMS Tag 6: Flt-1TK-/- = 11, wt= 10. a: * $p < 0,0003$ b: * $p < 0,001$ c: $p < 0,0006$; ** $p < 0,03$

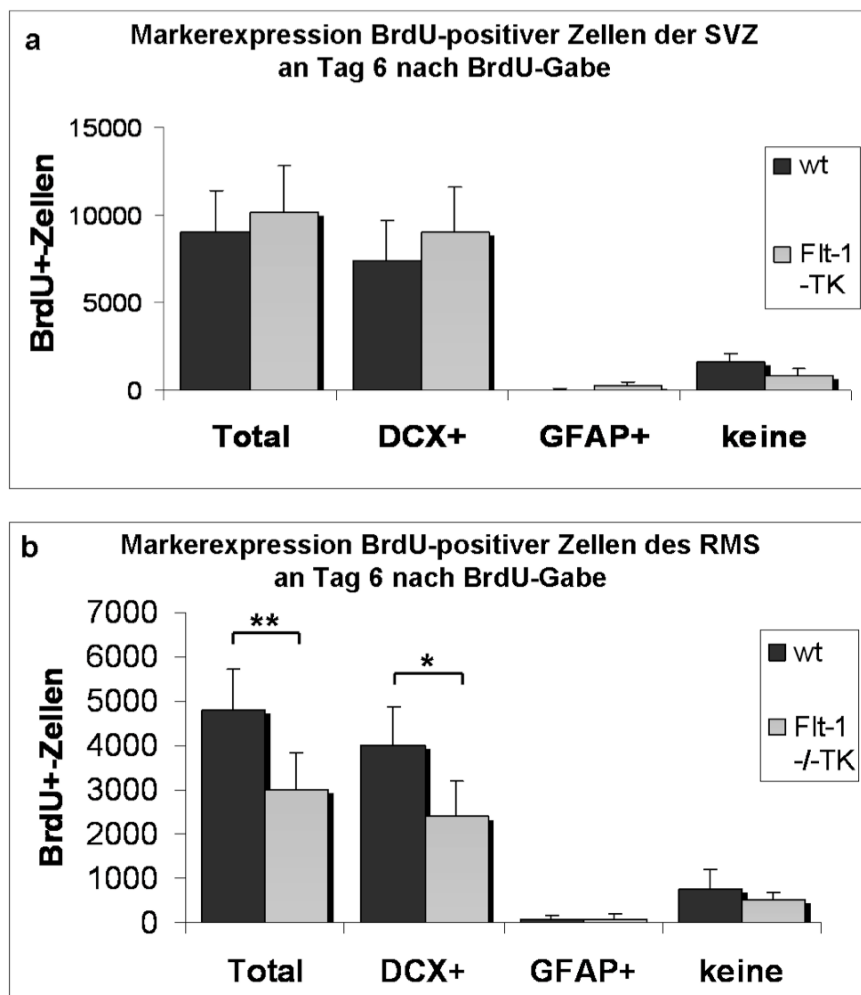


Abb. 37: Zelltypspezifische Analyse der BrdU-markierten Zellen an Tag 0 und Tag 6 nach BrdU-Gabe mittels konfokaler Analyse von Dreifachimmunfluoreszenzen.

Flt-1TK^{-/-} und wt Tiere wurden an fünf aufeinander folgenden Tagen mit BrdU injiziert und an Tag 0 oder Tag 6 analysiert. a) Dreifachmarkierungen mit anti-BrdU, anti-GFAP und anti-DCX zeigten keine Unterschiede zwischen Flt-1TK^{-/-} und wt in der zelltypspezifischen BrdU-Expression. b) Im RMS befanden sich signifikant weniger DCX-exprimierende, BrdU-positive Zellen in Flt-1TK^{-/-} als in wt-Tieren. * $p < 0,03$; ** $p < 0,02$. n: Tag 0 SVZ: Flt-1TK^{-/-}= 5, wt= 7; Tag 0 RMS: Flt-1TK^{-/-}= 4, wt= 7; Tag 6 SVZ und RMS: Flt-1TK^{-/-}= 11, wt= 10.

4.3.5.3 Densiometrische Analyse zum Vergleich der DCX-Expression im RMS von Flt-1TK^{-/-} und wt-Mäusen

Die in den vorangegangenen Abschnitten erhaltenen Ergebnisse warfen die Frage auf, ob nicht nur DCX-exprimierende, BrdU-positiver Zellen in Flt-1TK^{-/-} im Vergleich zum wt reduziert sind, sondern ob die DCX-Expression auch generell vermindert ist. Mit anti-DCX gefärbte Zellen zeigen eine filamentöse Morphologie und sind daher schwer zu quantifizieren. Um dieses Problem zu umgehen, erfolgte eine densiometrische Analyse der Fluoreszenzmarkierung von DCX. Dazu wurde jeweils der Saggittalschnitt

ausgewählt, auf dem der RMS in seiner gesamten Länge zu sehen war. Das Bild wurde in 8-Bit-Graustufen-Modus konvertiert und ein Rahmen über den RMS gelegt, der bei allen Versuchstieren die gleiche Größe hatte und mit Hilfe des Programms Photoshop die Färbeintensität als optische Dichte (OD) gemessen. An einer ungefärbten Stelle wurde die Hintergrundfärbung gemessen und von dem für den RMS erhaltenen OD-Wert subtrahiert. Tatsächlich zeigten Gefrierschnitte der Flt-1TK-/-Tiere eine geringere Färbeintensität nach Immunfluoreszenzmarkierung von DCX als Schnitte von wt-Tieren (Abb. 38). Dies weist darauf hin, dass sich im Vergleich zum wt in den Flt-1TK-/- weniger DXC-positive Zellen gleichzeitig im RMS befinden.

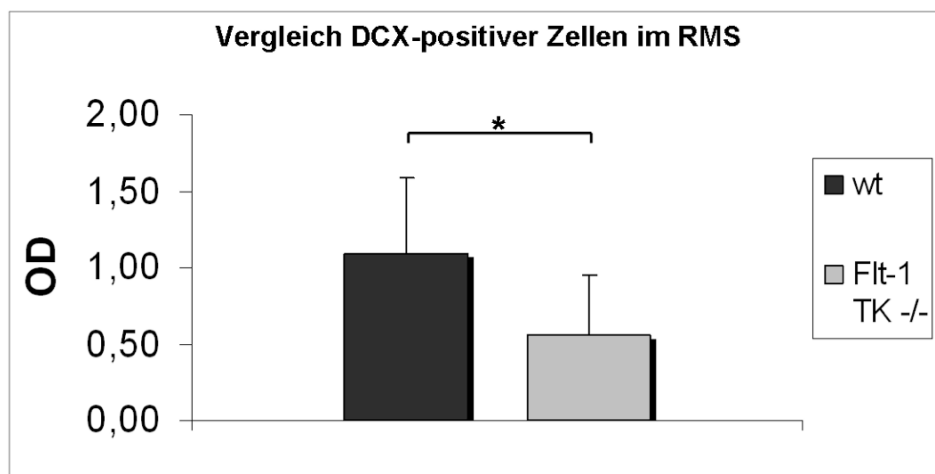


Abb. 38: Densiometrische Analyse der DCX-Expression in Flt-1TK-/- und wt-Mäusen.

DCX wurde an Sagittalschnitten von Gehirnen von Flt-1TK-/- und wt-Mäusen mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung visualisiert. Nach Verwerfen der Farbinformation wurde ein Bereich identischer Größe im RMS densiometrisch ausgemessen. Die optische Dichte (OD) der DCX-Färbung in Flt-1TK-/- ist signifikant reduziert. * $p=0,03$. n: Flt-1TK-/- = 9; wt = 6.

4.3.5.4 Quantitative Analyse TUNEL-positiver Zellen

In der SVZ der Flt-1TK-/-Mäuse war die Zahl der BrdU+-Zellen im RMS an Tag 6 gegenüber dem wt stark reduziert. Gleichzeitig war die Proliferation in diesen Tieren in der SVZ im Vergleich zum wt erhöht. Dies warf die Frage auf, ob die transgenen Tiere eine höhere Apoptoserate aufweisen. Die Visualisierung apoptotischer Zellen erfolgte durch TUNEL-Färbung an seriellen Gefrierschnitten. In SVZ und RMS war kein Unterschied in der Anzahl TUNEL-positiver Zellen erkennbar (Abb. 39). Eine Differenz in der Apoptoserate kann somit nicht Ursache für die Reduktion der BrdU-markierten Zellen an Tag 6 im RMS der Flt-1TK-/- sein.

Im OB war die Anzahl TUNEL-gefärbter Zellen deutlich erhöht. Allerdings waren die Standardabweichungen hier sehr hoch und die Differenz nicht statistisch signifikant. Versuchsbedingt konnte der Ansatz nicht wiederholt werden.

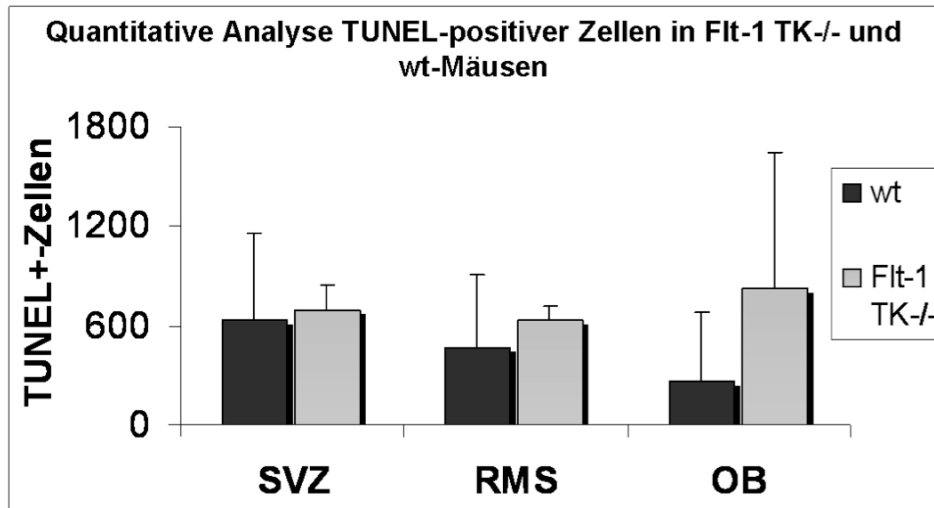


Abb. 39: Vergleich der Apoptose in Flt-1 TK-/- und wt-Tieren mittels TUNEL.

An Serienschnitten wurden apoptotische Zellen mit TUNEL-Färbung visualisiert und in SVZ, RMS und OB quantifiziert. In SVZ und RMS war die Anzahl TUNEL-positiver Zellen vergleichbar. Im OB war die mittlere Anzahl TUNEL-positiver Zellen in den Flt-TK-/- tendenziell höher als im wt. Die Differenz war jedoch nicht statistisch signifikant. n=3.

4.3.5.5 Quantitative Analyse BrdU-positiver Zellen im Corpus callosum am Tag 0 und Tag 6

Eine weitere mögliche Ursache für die starke Reduktion der BrdU+-Zellen im RMS der Flt-1TK-/- ist eine Differenz zwischen beiden Genotypen in der Abwanderung der BrdU-markierten Zellen aus dem RMS. Auf den Serienschnitten war keine Abwanderung BrdU+-Zellen ins anliegende Striatum sichtbar. Jedoch scheinen viele Zellen in das darüber liegende CC zu migrieren. Es ist bekannt, dass diese teilweise zu Oligodendrozyten differenzieren.^{299,300} Am Tag 0 waren tendenziell - jedoch nicht signifikant weniger der BrdU-positive Zellen im CC der Flt-1TK-/- als im wt sichtbar. Am Tag 6 war die Anzahl und Dichte BrdU-positiver Zellen im CC der Flt-1TK-/- gegenüber dem wt signifikant reduziert (Abb. 40 a, b). Das Volumen des CC war in beiden Genotypen vergleichbar (Abb 40 c). In den Flt-1Tk-/- scheinen somit weniger BrdU-positive Zellen ins CC einzuwandern als im wt.

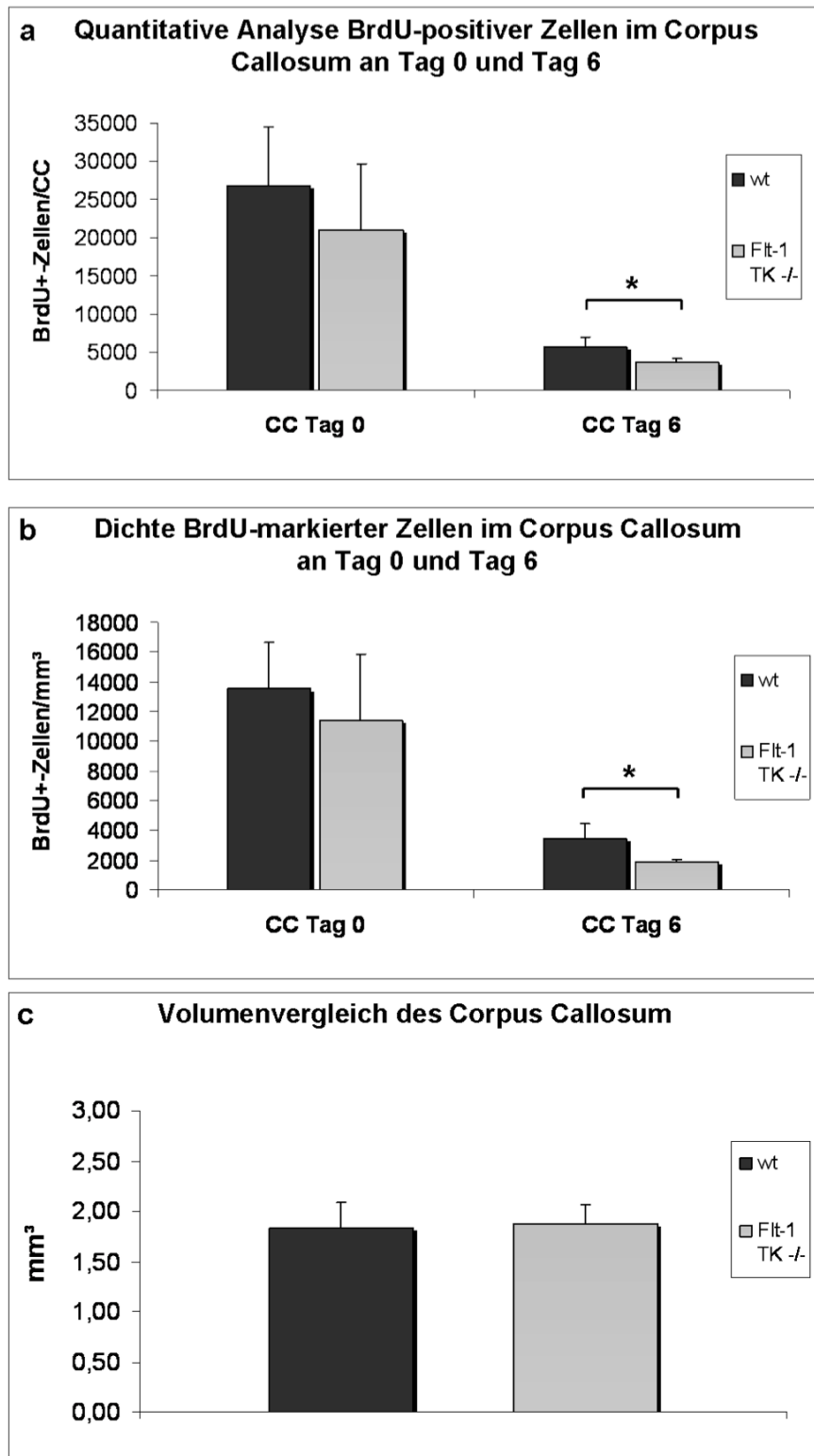


Abb. 40: Quantitative und Volumetrische Analyse BrdU-markierter Zellen im Corpus callosum (CC) am Tag 0 und Tag 6 nach BrdU-Injektion.

Flt-1TK^{-/-} und wt Tiere wurden an fünf aufeinander folgenden Tagen mit BrdU injiziert und an Tag 0 oder Tag 6 analysiert. a, b) An Tag 0 waren Anzahl und Dichte BrdU-positiver Zellen im CC beider Genotypen vergleichbar. Am Tag 6 waren Zellzahl und -dichte BrdU-markierter Zellen im CC signifikant im Vergleich zu wt-Mäusen reduziert. n: Tag 0: Flt-1TK^{-/-}= 5, wt= 7; Tag 6: Flt-1TK^{-/-}= 4, wt= 5. a: *p=0,034 b: *p=0,023 c) Volumina des CC beider Genotypen waren gleich. n: Flt-1TK^{-/-}= 9, wt= 10.

4.3.5.6 Quantitative Analyse BrdU+-Zellen im OB am Tag 0 und Tag 6

Ein Großteil der in der SVZ entstandenen Neuroblasten legt die komplette Entfernung entlang des RMS zum OB zurück.^{94,121,122} Dort angekommen, verlassen sie den RMS und migrieren als Einzelzellen radial in die verschiedenen Schichten des OB.^{94,153} In Kap. 4.3.4.1 wurde bereits erwähnt, dass im OB fast keine Proliferation zu beobachten war. Daher sind die dort lokalisierten BrdU-markierte Zellen mit großer Wahrscheinlichkeit über den RMS in den OB eingewandert. In allen 3 Schichten des OB (Granulärzellschicht, GCL; Plexiformschicht, PL und Periglomerulärzellschicht, PGL) wurden die BrdU-markierten Zellen quantitativ analysiert. Die GCL, in der 95% aller eingewanderten Neuroblasten verbleiben, wurde mit Hilfe von Zählrahmen stereologisch ausgezählt und statistisch auf die Gesamtfläche hochgerechnet. In den anderen beiden Schichten wurden aufgrund geringerer Zellzahlen alle Zellen gezählt. Multipliziert mit dem Abstand der Serienschritte ergaben sich die Gesamtzellzahlen pro OB.

Im OB der Flt-TK-/- waren am Tag 0 und Tag 6 im Mittel mehr BrdU-markierte Zellen vorhanden (Abb. 41 a und 42 a). Der Unterschied erreicht jedoch nicht statistische Signifikanz. Es zeigten sich aber signifikante Differenzen in der Anzahl BrdU-positiver Zellen der äußeren Schichten des OB. An Tag 0 konnten bereits signifikant mehr BrdU-positiv Zellen in der PL beobachtet werden (Abb. 42 b). Diese Differenz nahm mit steigender Versuchsdauer zu und war an Tag 6 hochsignifikant, was gleichzeitig zu einer signifikanten Erhöhung der Zelldichte der markierten Zellen in der PL um 59,17% (im Mittel) führte (Abb. 42 b). Die prozentuale Verteilung der BrdU-markierten Zellen auf die einzelnen Schichten des OB war an Tag 0 in beiden Genotypen vergleichbar (Abb. 41 c). An Tag 6 hingegen war der prozentuale Anteil der BrdU+-Zellen der PL hochsignifikant erhöht (Abb. 42 c).

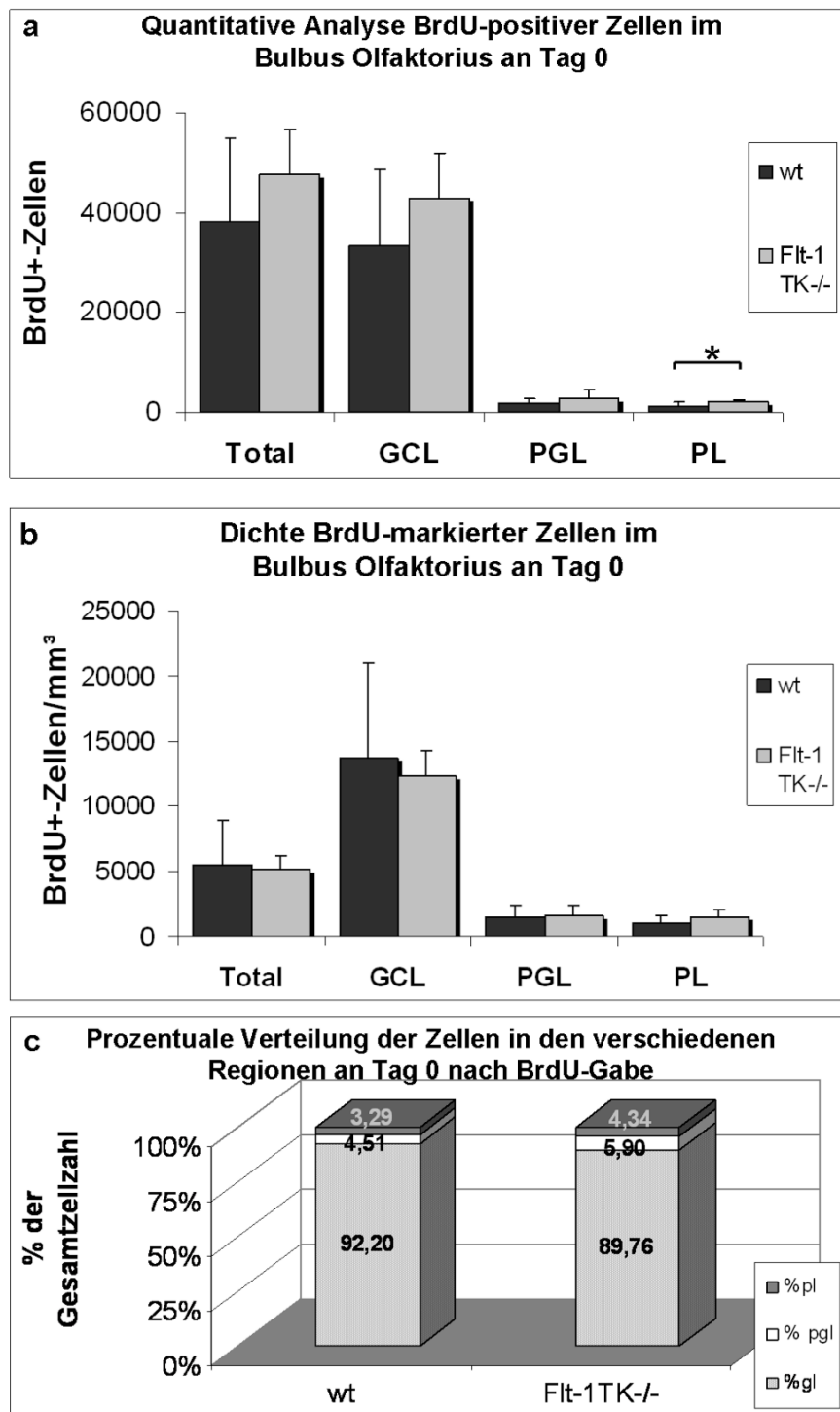


Abb. 41: Quantitative Analyse BrdU-markierter Zellen im OB der letzten BrdU-Injektion (Tag 0).

Flt-1TK-/- und wt Tiere wurden an fünf aufeinander folgenden Tagen mit BrdU injiziert und an Tag 0 analysiert. a) Tendenziell hatten Flt-1TK-/- mehr BrdU-markierte Zellen im OB. In der Gesamtzahl war dies nicht signifikant. In Flt-1TK-/- waren signifikant mehr BrdU-markierte Zellen in der PL des OB lokalisiert als im wt. * $p=0,041$. b) Es gab keinen Unterschied in der Dichte BrdU-positiver Zellen. c) Die prozentuale Verteilung der BrdU-positiven Zellen auf die verschiedenen Schichten war vergleichbar. n: Flt-1TK-/- = 5, wt = 7.

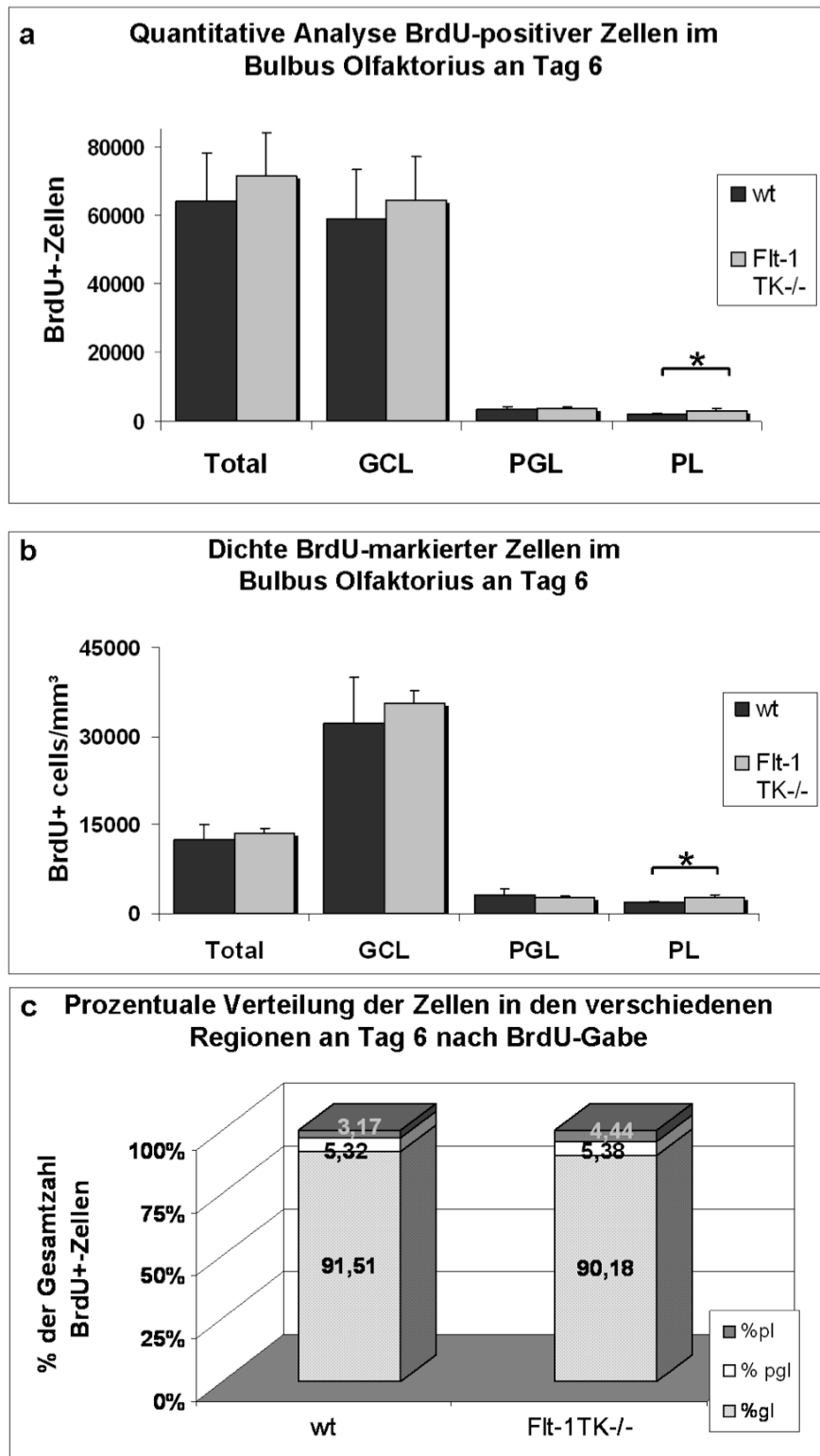


Abb. 42: Quantitative BrdU-markierter Zellen im OB am Tag 6 nach BrdU-Injektion.

FIt-1TK-/- und wt Tiere wurden an fünf aufeinander folgenden Tagen mit BrdU injiziert und an Tag 6 analysiert. a) Tendenziell hatten FIt-1TK-/- mehr BrdU-markierte Zellen im OB. In der Gesamtzahl war dies nicht signifikant. In FIt-1 TK war, im Vergleich zum wt, die Anzahl der BrdU-positiven Zellen in der PL des OB hochsignifikant erhöht. * $p=0,0047$. b) Auch die Dichte BrdU-positiver Zellen in der PL war signifikant erhöht. * $p=0,006$ c) Der prozentuale Anteil der BrdU-positiven Zellen der PL bezogen auf die Gesamtzellzahl war in FIt-1TK-/- hochsignifikant höher als im wt. * $p=0,003$. n: FIt-1TK-/-=4, wt=6.

4.3.6 Analyse der Migration und Differenzierung neu entstandener Zellen im adulten olfaktorischen Bulbus

Neurogenese besteht aus einem mehrschrittigen Prozess, zu dem nach der asymmetrischen Teilung der Stammzellen, der Proliferation, Migration und Überleben der Vorläuferzellen auch die Differenzierung zum Neuron gehört.⁵⁸⁻⁶² Es ist bekannt, dass VEGF-A *in vitro* die neuronale Differenzierung beeinflusst.²⁸¹ Nach einem Monat erreicht in der GCL die neuronale Differenzierung ihr Maximum. In der PGL ist die Zahl neu gebildeter Neurone danach rückläufig.¹⁵⁹ Aus diesem Grund erfolgte, zur Untersuchung einer möglichen Relevanz der Signaltransduktion des VEGFR-1 in diesem Prozess, die Perfusion dieser Versuchsgruppe nach 30 Tagen (Abb. 43). Die BrdU-positiven Zellen der verschiedenen Schichten des OB von Flt-1TK^{-/-} und wt wurden quantifiziert und eine Rolle des VEGFR-1 auf die terminale Differenzierung in Neurone und Gliazellen mittels Dreifachimmunfluoreszenzfärbungen mit charakteristischen Markern analysiert.

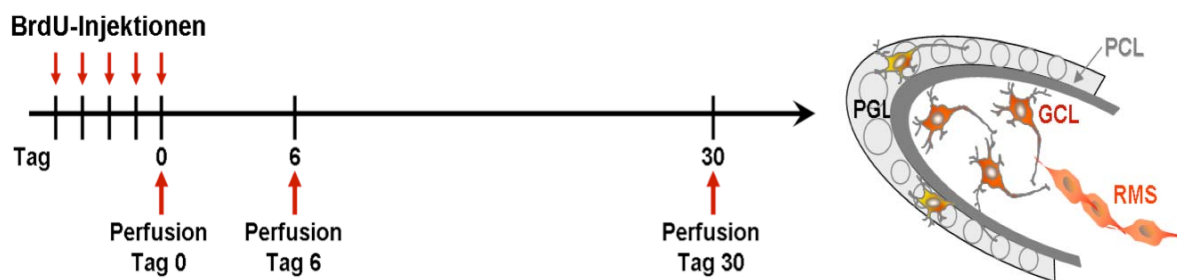


Abb. 43: Versuchsplan zur Analyse der adulten Neurogenese im OB.

Mäuse beider Genotypen (wt und Flt-1TK^{-/-}) wurden an fünf aufeinander folgenden Tagen mit BrdU injiziert und an Tag 30 nach der letzten BrdU-Gabe perfundiert. Es wurden Serienschritte angefertigt und BrdU immunhistochemisch detektiert. Danach wurden die verschiedenen Schichten des OB (rechts) stereologisch ausgewertet. GCL: Granulärzellschicht, PL: Plexiformschicht, PGL: Periglomerulärzellschicht, RMS: Rostralmigratorischer Strom.

4.3.6.1 Quantitative Analyse BrdU⁺-Zellen im OB am Tag 30

Stereologische Analyse des OB an Tag 30 zeigte stets mehr BrdU-positive Zellen (im Mittel) im OB der Flt-1TK^{-/-} als im wt. Jedoch erreichten diese Werte keine statistische Signifikanz. In der PL der Flt-1TK^{-/-} war die Differenz der BrdU-markierter Zellen zum wt an Tag 30 noch größer als an Tag 0 und Tag 6. Flt-1TK^{-/-}-Tiere hatten mehr als doppelt so viele (226,25% des wt im Mittel) BrdU-markierte Zellen in der PL als wt-Mäuse. Auch in der PGL war die Anzahl BrdU⁺-Zellen gegenüber dem wt verdoppelt (im Mittel 200,85% des wt; Abb. 44 a).

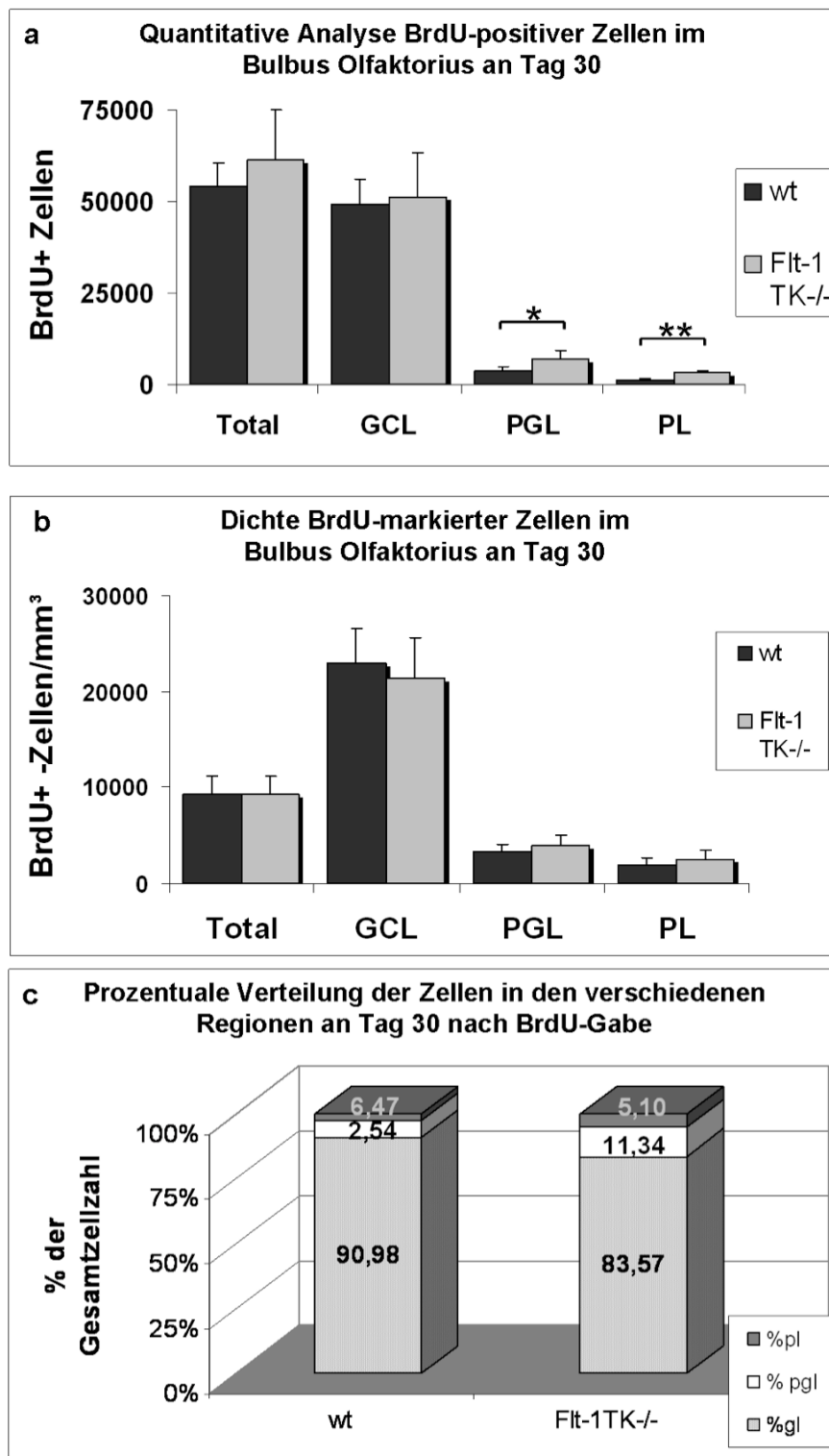


Abb. 44: Quantitative Analyse BrdU-markierter Zellen im OB am Tag 30 nach BrdU-Injektion.

a) Tendenziell hatten Flt-1TK-/- mehr BrdU-markierte Zellen im OB. In der Gesamtzahl war dies nicht signifikant. In Flt-1TK-/- war die Zahl BrdU-markierter Zellen, im Vergleich zum wt, in der PGL signifikant und in der PL hochsignifikant erhöht. * $p=0,017$, ** $p=0,00018$. b) Die Dichte BrdU-positiver Zellen beider Genotypen war vergleichbar. c) Der prozentuale Anteil BrdU-positiver Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl war in der PL hochsignifikant und in

der PGL signifikant erhöht. In der GCL war er hingegen hochsignifikant reduziert. GCL: $p=0,004$; PGL: $p=0,014$; PL: $p=0,00035$. $n=5$.

Die Dichte BrdU-positiver Zellen beider Genotypen war in allen Zellschichten vergleichbar (Abb. 44 b). Der prozentuale Anteil BrdU-positiver Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl war an Tag 30 in der PL hochsignifikant und in der PGL signifikant erhöht. Im Gegenzug dazu war er in der GCL hochsignifikant reduziert (Abb. 44 c).

4.3.6.2 Zelltypspezifische Analyse der BrdU-markierten Zellen an Tag 30 nach BrdU-Gabe

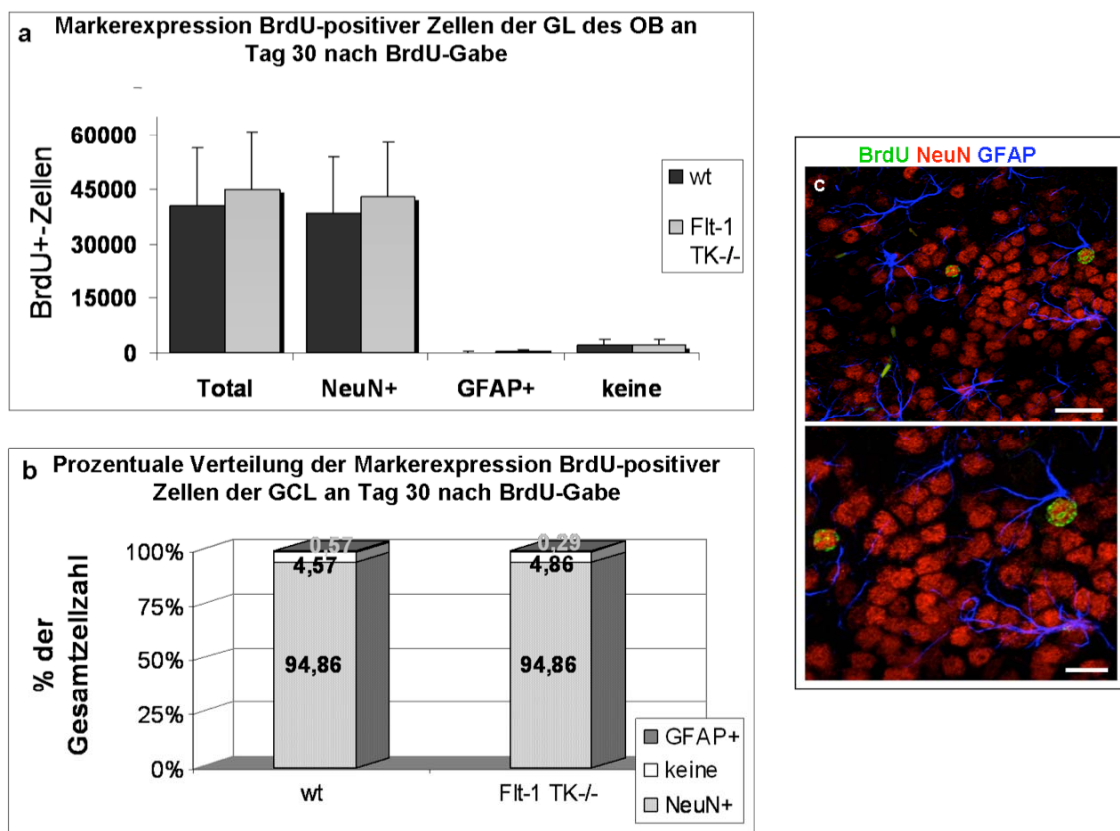


Abb. 45: Analyse der Differenzierung der Granulärzellen des OB in Flt-1TK^{-/-} und wt-Mäusen.

Flt-1TK^{-/-} und wt Tiere wurden an fünf aufeinander folgenden Tagen mit BrdU injiziert und an Tag 30 analysiert. a) Konfokale Analyse von Dreifachfluoreszenzfärbungen mit anti-BrdU, NeuN und anti-GFAP zeigte keinen Unterschied in neuronaler oder glialer Differenzierung in der GCL zwischen beiden Genotypen. $n=7$. b) Die prozentuale Verteilung der BrdU⁺-zellen auf die verschiedenen Marker war gleich. c) Exemplarischer Ausschnitte BrdU/NeuN-koexprimierender Zellen in der GCL des OB. Messbalken: oben: 20 μm ; unten: 10 μm .

Da ~95% aller eingewanderten Neuroblasten in der GCL verbleiben,^{156,158-160} erfolgte zunächst die Analyse der Differenzierung in dieser Schicht durch Dreifachmarkierungen mit dem neuronalen Marker NeuN und glialen Marker GFAP. Die Anzahl BrdU-positiver Zellen, die NeuN exprimierten, war in beiden Gruppen vergleichbar. Auch die Zahl

GFAP-exprimierender BrdU-positiver Zellen stimmte in wt und transgenen Tieren überein (Abb. 45). In der PGL nehmen 10% aller neu entstandenen Neurone einen dopaminergen Phänotyp an.¹⁵⁸⁻¹⁶⁰ Die selektive Erhöhung der Zellzahl in der PL und PGL könnte so auf eine gesteigerte dopaminerge Differenzierung zurückzuführen sein. Dopaminerge Neurone sind mit einem Antikörper gegen das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH) selektiv detektierbar.¹⁶¹ Zur Analyse einer Rolle des VEGFR-1-Signalwegs in der neuronalen und dopaminergen Differenzierung dienten Dreifachfluoreszenzfärbungen mit anti-TH, NeuN und anti-BrdU. Die konfokale Auswertung zeigte eine signifikante Zunahme NeuN-positiver Zellen in der PGL der Flt-1TK^{-/-} gegenüber dem wt (Abb. 46 a)

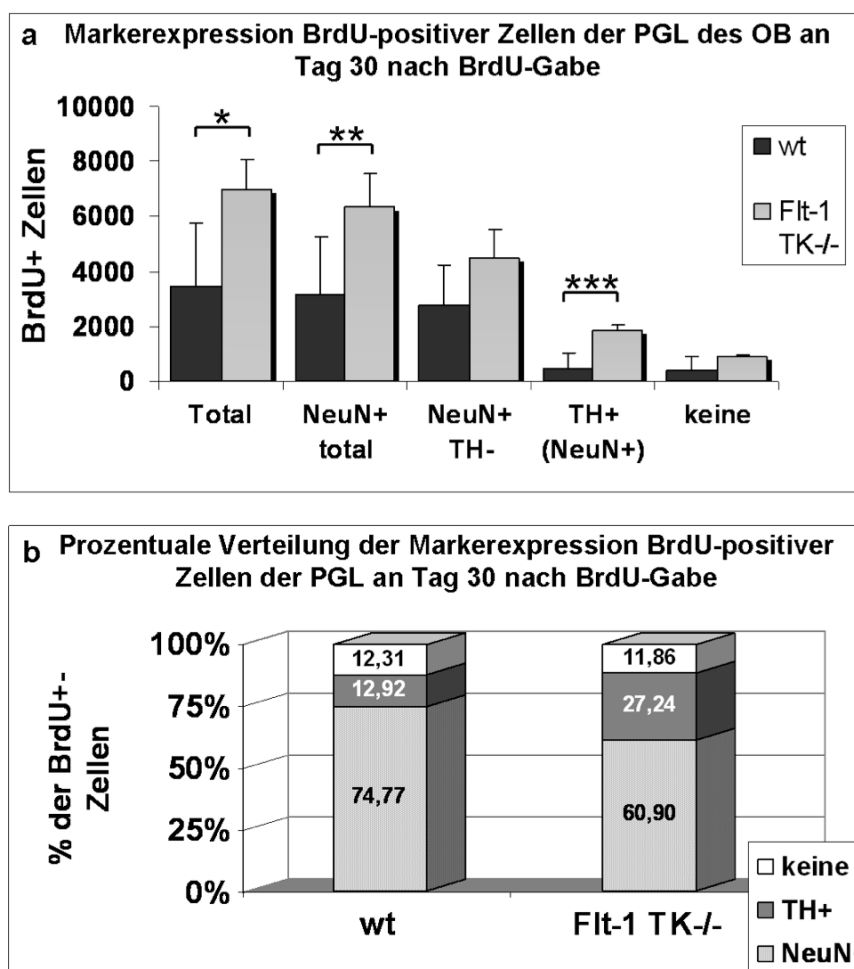


Abb. 46: Analyse der Differenzierung BrdU⁺-Zellen der Periglomerularzellschicht des OB in Flt-1TK^{-/-} und wt-Mäusen.

Flt-1TK^{-/-} und wt Tiere wurden an fünf aufeinander folgenden Tagen mit BrdU injiziert und an Tag 30 analysiert. a) Konfokale Analyse von Dreifachimmunfluoreszenzfärbungen mit anti-BrdU, NeuN und anti-TH zeigte eine signifikante Zunahme NeuN⁺-Zellen in der PGL der Flt-1TK^{-/-} gegenüber dem wt. Zusätzlich war in den Flt-1TK^{-/-} die Zahl der TH⁺/BrdU⁺-Zellen der PGL signifikant höher als im wt. *p=0,02; **p=0,047; ***p=0,014. b) Die prozentuale Verteilung der TH⁺/BrdU⁺-Zellen war hochsignifikant erhöht, der Anteil nur NeuN-positiver (TH-negativer) BrdU⁺-Zellen dafür signifikant reduziert. Der Anteil aller neuronalen BrdU⁺-Zellen blieb gleich, genauso der Anteil BrdU-markierter Zellen die keinen neuronalen Marker exprimierten. NeuN: p=0,02; TH: p= 0,001. n: Flt-1 TK^{-/-}=5; wt=4.

Gleichzeitig war die Zahl der TH+/BrdU+-Zellen der PGL in den Flt-1TK^{-/-} signifikant höher als im wt. Diese Differenzen schlugen sich auch in der prozentualen Verteilung nieder. Der Anteil der TH+/BrdU+-Zellen war hochsignifikant erhöht (um 110% im Mittel), der Anteil NeuN-positiver (TH-negativer) BrdU+-Zellen dafür signifikant reduziert und betrug nur noch 81,41% des wt-Werts. Der Anteil aller neuronalen BrdU+-Zellen war in beiden Genotypen vergleichbar, ebenso der Anteil BrdU-markierter Zellen, die keinen neuronalen Marker exprimierten (Abb. 46 b). Die Unterbrechung des VEGFR-1-Signalwegs steigert somit die neuronale Differenzierung und fördert die Ausbildung von Interneuronen eines dopaminergen Subtyps.

4.3.7 Analyse des Volumens der einzelnen Schichten des adulten olfaktorischen Bulbus

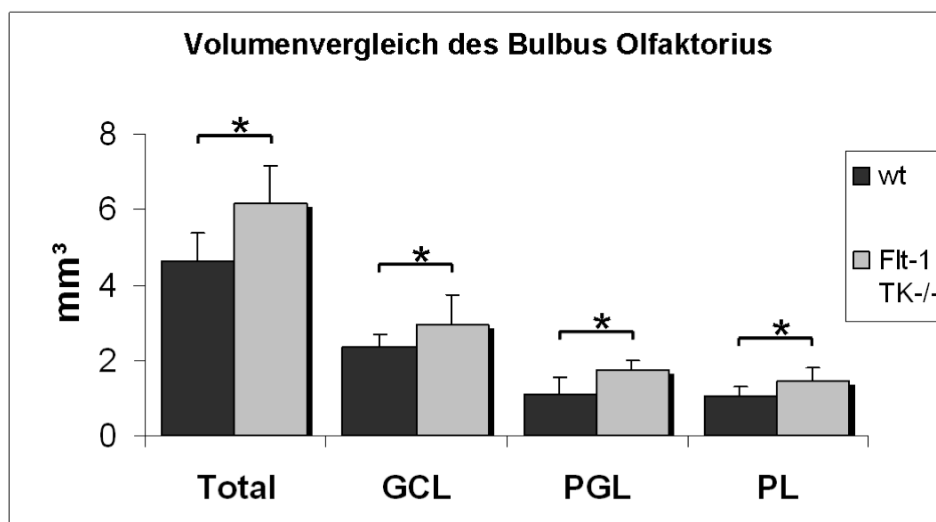


Abb. 47: Volumetrische Analyse des OB von Flt-1 TK und wt-Tieren.

In Flt-1TK^{-/-}-Tieren war eine hochsignifikante Volumenzunahme gegenüber wt-Tieren zu beobachten. Jede der einzelnen Schichten war in Flt-1TK^{-/-} größer als im Kontrolltier, besonders die PGL. Total:p=0,0008; GCL: p=0,045; PGL: p=0,0003; PL: p=0,018. n=12.

In den vorangegangenen Experimenten und Analysen wurde in den Flt-1TK^{-/-} eine im Vergleich zum wt verstärkte Wanderung BrdU-positiver Zellen in die äußeren Schichten des OB beobachtet, was mit längerer Versuchsdauer und einer steigenden Anzahl BrdU-markierter, neuronaler Zellen einherging. Aufgrund dessen wurde überprüft, ob die gesteigerte Neurogenese in einer Volumenzunahme des OB resultiert. Tatsächlich waren die OB der Flt-1TK^{-/-} im Mittelwert hochsignifikant vergrößert (auf 136,29 % des

wt-Werts). Auch jede einzelne Schicht hatte im Vergleich mit dem wt ein größeres Volumen. Die größte Differenz war in der PGL zu sehen. Sie betrug in den Flt-1TK^{-/-} im Mittel 157,02 % der PGL des wt. (Abb. 47). Die Deletion der Intrazellulärdomäne des VEGFR-1 resultiert in einer Volumenzunahme des OB.

4.3.8 Proliferationskinetische Untersuchungen im adulten Hippokampus

Neben der SVZ ist der Hippokampus die zweite Hauptregion mit neurogener Aktivität im adulten Gehirn unter physiologischen Bedingungen. Neue Neurone entstehen dort vor allem in der SGL im DG.^{5,58,59,93-97} Um die Rolle des VEGFR-1 in der adulten hippocampalen Neurogenese zu untersuchen, wurde Flt-1TK^{-/-} und wt-Mäusen an fünf

aufeinander folgenden Tagen intraperitoneal BrdU-administriert und die Tiere,
 a) an Tag 0 genau 3 h nach der letzten Injektion zum Vergleich der Proliferationsrate,
 b) an Tag 30 zur Analyse der differenzierten Zellen
 perfundiert. (Abb. 48)

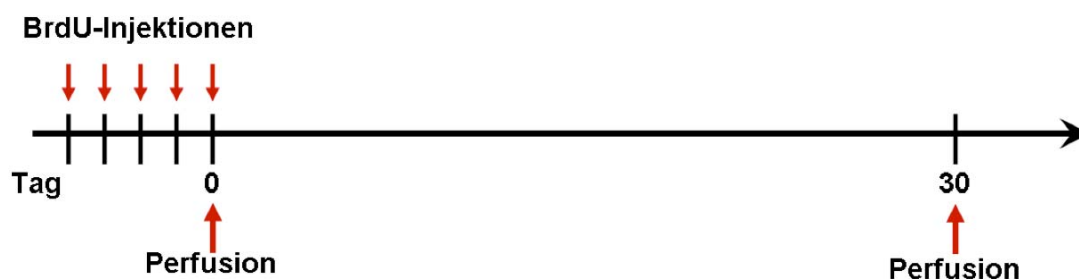


Abb. 48: Versuchsplan zur Analyse der adulten Neurogenese im Hippokampus.

Mäuse beider Genotypen (wt und Flt-1TK^{-/-}) wurden an fünf aufeinander folgenden Tagen mit BrdU injiziert und an Tag 30 nach der letzten BrdU-Gabe perfundiert. Es wurden Serienschnitte angefertigt und BrdU immunhistochemisch detektiert. Danach wurde der Hippokampus stereologisch ausgewertet.

Die stereologische Analyse immunhistochemisch gefärbter Serienschnitte zeigte zu keinem der beiden Zeitpunkte Unterschiede in Zellzahl oder Zelldichte BrdU-markierter Zellen in allen Regionen des Hippokampus: der SGL des DG, in der die meisten neuronalen Vorläufer des Hippokampus entstehen, der Molekularzellschicht und dem Hilus (Abb. 49 und 50).

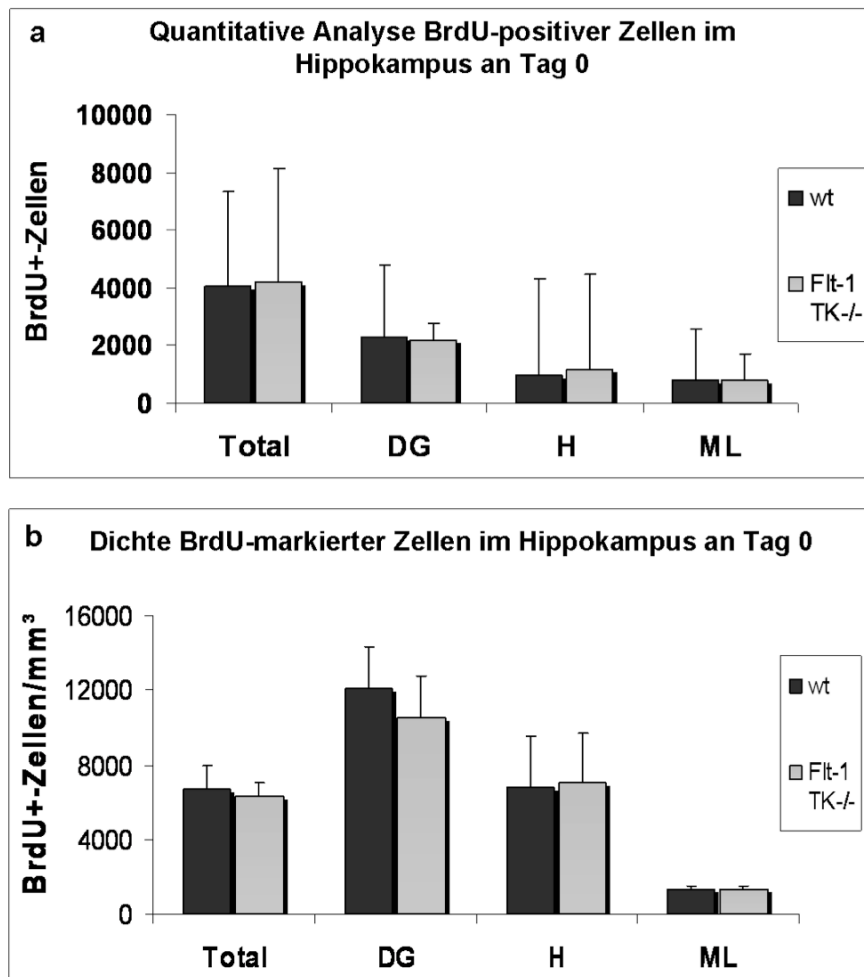


Abb. 49: Quantitative Analyse BrdU-markierter Zellen im Hippokampus am Tag 0.

Flt-1TK^{-/-} und wt Tiere wurden an fünf aufeinander folgenden Tagen mit BrdU injiziert und an Tag 0 analysiert. Es konnte weder eine Differenz in der Anzahl BrdU-markierter Zellen noch in der Zelldichte dieser gemessen werden. n: Flt-1TK^{-/-}=5 wt=7.

Die volumetrische Analyse des Hippokampus zeigte eine geringe, aber signifikante Größenzunahme der GCL des DG und der ML in den Flt-1TK^{-/-} im Vergleich zu wt-Tieren (Abb. 51).

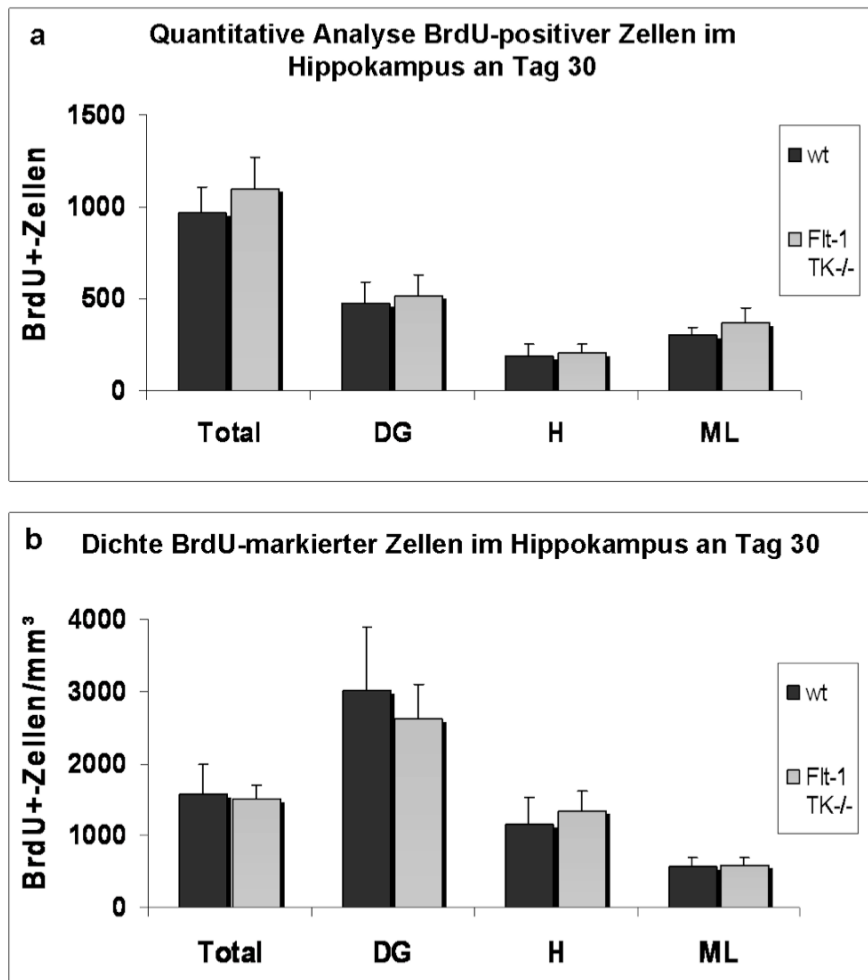


Abb. 50: Quantitative Analyse BrdU-markierter Zellen im Hippokampus am Tag 30 nach BrdU-Gabe. Flt-1TK^{-/-} und wt Tiere wurden an fünf aufeinander folgenden Tagen mit BrdU injiziert und an Tag 30 analysiert. Die Anzahl und Zelldichte BrdU-markierter Zellen war in allen Schichten vergleichbar. n = 7

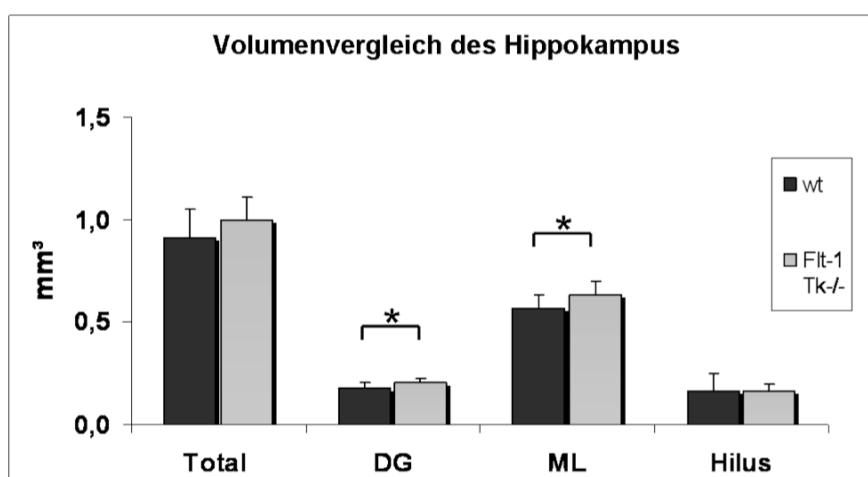


Abb. 51: Volumetrische Analyse des Hippokampus von Flt-1TK^{-/-} und wt-Tieren. In Flt-1TK^{-/-}-Tieren war eine geringe, aber signifikante Volumenzunahme der GCL des DG und der ML gegenüber wt-Tieren zu beobachten. Jedoch waren die Gesamtvolumina nicht signifikant unterschiedlich. *p=0,02. n: Flt-1TK^{-/-}=12, wt=14.

4.3.9 Zusammenfassung der *in vivo*-Analysen:

		wt	Flt-1TK-/-	P-Wert
1x BrdU-Injekt. Perfusion nach 3h	SVZ	5733	7139	0,02
	RMS	3801	3818	n.s.
5x BrdU-Injekt. Perfusion nach 3h	SVZ	12031	14046	n.s.
	RMS	11379	8481	n.s.
	OB	36120	47780	n.s.
	OB-GL	33297	42974	n.s.
	OB-PGL	1651	2760	n.s.
	OB-PL	1172	2047	0,041
	CC	26814	21040	n.s.
	HC	4050	4183	n.s.
5x BrdU-Injekt. Perfusion nach 6 Tagen	SVZ	8971	8724	n.s.
	RMS	6358	3308	0,00027
	OB	63868	71150	n.s.
	OB-GL	58664	64290	n.s.
	OB-PGL	3236	3729	n.s.
	OB-PL	1967	3132	0,0047
	CC	5616	3689	0,034
5x BrdU-Injekt. Perfusion nach 30 Tagen	SVZ	151	248	n.s.
	OB	54222	61455	n.s.
	OB-GL	49392	51403	n.s.
	OB-PGL	3470	6970	0,017
	OB-PL	1360	3082	0,00017
	HC	964	1100	n.s.

Abb. 52: Übersicht der quantitativen Analysen BrdU-markierter Zellen in Flt-1TK-/- und wt-Mäusen in den unterschiedlichen Versuchsgruppen in verschiedenen Hirnregionen.

Daten wurden durch stereologische Auszählungen BrdU-positiver Zellen ermittelt und sind als Gesamtwerte der Zellen pro Struktur angegeben. Die Zahlen stellen die Mittelwerte der Versuchsgruppen dar. P-Werte wurden mit Hilfe des Studentischen T-Tests berechnet. n.s.: nicht signifikant.

Die Ergebnisse der proliferationskinetischen Untersuchungen sind in Abb. 52 tabellarisch dargestellt. Die Analysen ergaben folgende Ergebnisse:

- In den Flt-1TK-/- ist die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen in der SVZ erhöht.
- Die Zellzahl BrdU-markierter Zellen im RMS der Flt-1TK-/- war 6 Tage nach BrdU-Injektion um 47,97% reduziert, ohne dass es zu einer Akkumulation in der SVZ kam. Es waren die neuronalen Vorläuferzellen die signifikant reduziert waren.
- Aus dem RMS wandern in den Flt-1TK-/- weniger BrdU+-Zellen ins CC ab als im wt.

- Im OB angekommen migrieren die Zellen in die einzelnen Schichten, wobei in den Flt-1TK^{-/-} mit längerer Versuchsdauer zunehmend mehr BrdU⁺-Zellen in der PL und der PGL detektierbar waren als im wt.
- In der PGL war 30 Tage nach BrdU-Gabe in den Flt-1TK^{-/-} im Vergleich zum wt eine erhöhte neuronale Differenzierung zu beobachten.

4.3.10 Vergleich der Migrationseigenschaften in Flt-1TK und wt-Mäusen *in vitro* (SVZ- Explantatkulturen)

Die in den vorangegangenen Kapiteln dargestellten Ergebnisse, vor allem die Reduktion der BrdU-positiven Zellen im RMS und die langsam zunehmende Verschiebung BrdU-markierter Zellen in die äußeren Schichten des OB, lassen auf ein unterschiedliches Migrationsverhalten schließen. Zur Untersuchung der Migration neuraler Vorläuferzellen aus der SVZ wurden Gewebestücke der SVZ von Flt-1TK^{-/-} und wt-Mäusen in Matrigel, einem dreidimensionalen Extrazellulärmatrix-Gel, kultiviert. Zhang *et al.* (2003)²⁶⁶ haben bereits gezeigt, dass VEGF-A chemoattraktiv auf neurale Vorläuferzellen wirkt und dass dieser Effekt abhängig von der Anwesenheit von FGF-2 ist. Vorversuche ergaben, eine verstärkte Migration von Zellen aus den SVZ-Explantaten unter Zugabe von VEGF-A ins Medium. Daher wurde beim Hauptversuch FGF-2 (10ng/μl) und VEGF-A (40ng/μl) dem Medium aller Explantate zugesetzt. Nach einer Woche zeigten sich erste Migrationsketten aus der SVZ. Die Explantate wurden an Tag 7, Tag 9 und Tag 13 fotografiert und die maximalen Migrationsdistanzen zum Rand des Explantats gemessen. Pro Explantat wurden drei Stellen gemessen und die Werte gemittelt. Wie in Abb. 53 b dargestellt, hatten Zellen aus Explantaten der Flt-1TK^{-/-} zu jedem gemessenen Zeitpunkt bereits eine größere Distanz im Matrigel zurückgelegt als Zellen aus wt-Explantaten. Die Wanderungsgeschwindigkeit nahm mit längerer Versuchsdauer stark zu und war in den transgenen Tieren mehr als doppelt so hoch als in wt-Tieren. Die aus den Explantaten migrierenden Zellen exprimierten Marker neuronaler Vorläufer wie DCX und Tuj-I oder den glialen Marker GFAP (Abb. 53 a).

Die Inhibierung der Signaltransduktion des VEGFR-1 bewirkt somit eine Erhöhung der Migrationsgeschwindigkeit neuraler Vorläuferzellen *in vitro*.

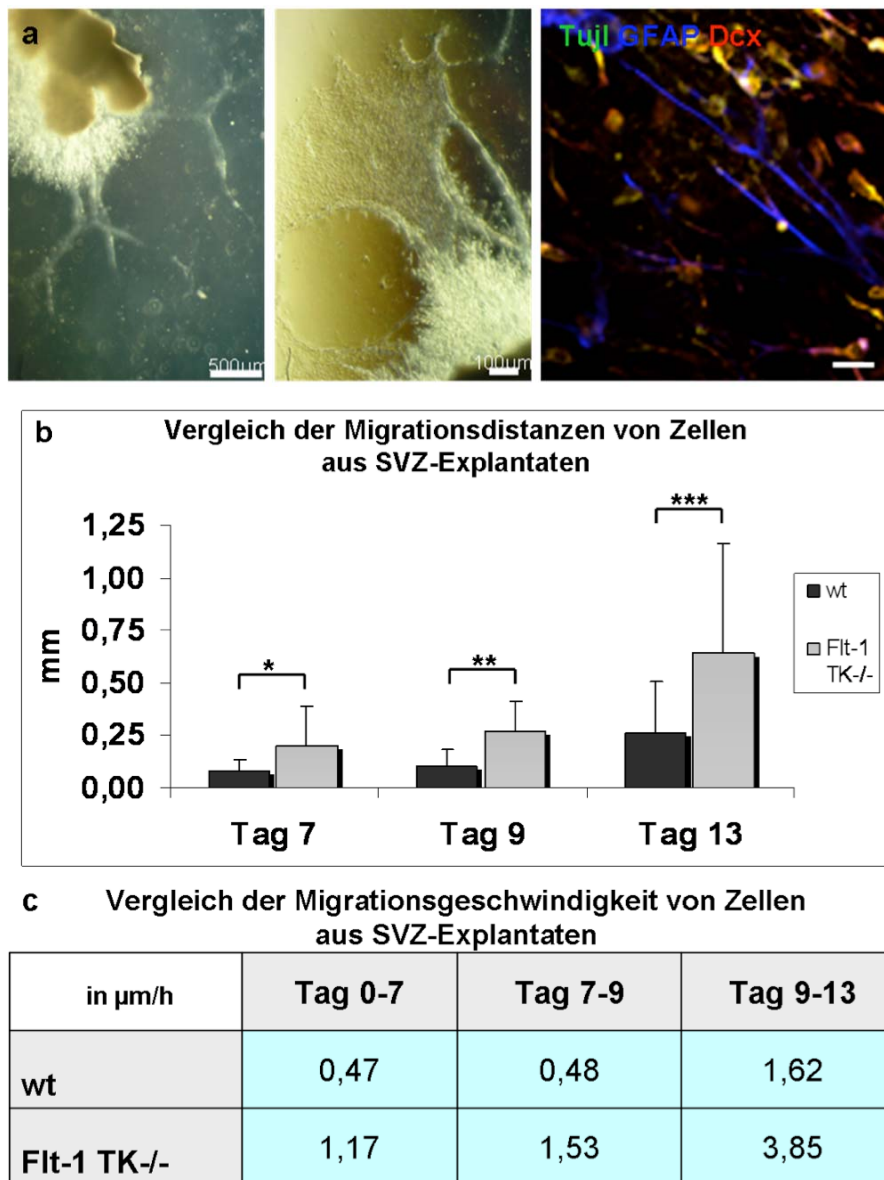


Abb. 53: *In vitro*-Analyse der Migration von Zellen aus SVZ-Explantaten in Matrigel

Die SVZ wurde aus 4 Flt-1 TK-/- und 4 wt-Mäusen isoliert und Gewebestücke in Matrigel eingebettet und in Migrationsmedium mit FGF-2 (20ng/ml) und VEGF-A (40ng/ml) kultiviert. a) Zellen migrieren aus den SVZ-Explantaten ins Matrigel. Sie exprimieren Tuji1 und DCX und GFAP. Messbalken= 10µm. b) Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Migrationsdistanzen verglichen. Zellen aus Explantaten der Flt-1TK-/- waren zu allen Zeitpunkten eine größere Distanz migriert als Zellen aus wt-Explantaten. c) Die Migrationsgeschwindigkeit war in Flt-1TK-/- im Vergleich zum wt stark erhöht. n: Flt-1 TK-/- = 22; wt=15.

4.3.11 Quantitative Analyse des Proteins VEGF-A im Gehirn

Es ist bekannt, dass VEGF-A neurale Vorläuferzellen des adulten Gehirns *in vitro* und *in vivo* beeinflusst.^{83,84,266,280,288,291} Zur Prüfung, ob eine differente VEGF-A-Konzentration für die beobachteten Effekte ursächlich sein könnte, erfolgte eine quantitative Bestimmung von VEGF-A in Lysaten aus Hirngewebe verschiedener Hirnregionen mittels ELISA. Das Expressionsniveau von VEGF-A war in Flt-1TK^{-/-} gegenüber wt-Mäuse stets erhöht (Abb. 54). Signifikante Unterschiede wurden in den Lysaten ganzer Hemisphären und des Striatum/Hippokampus und Cortex detektiert. Aufgrund der geringen Gesamtproteinmenge wurden die SVZ und OB von jeweils drei Tieren zusammen lysiert (Pool).

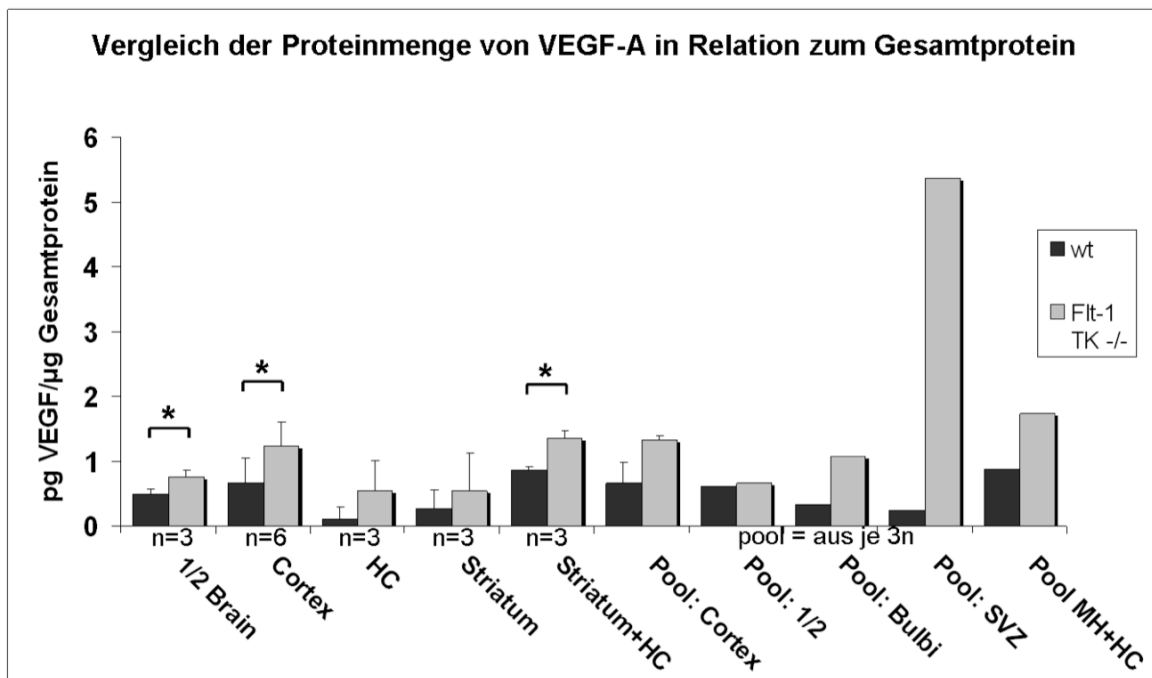


Abb. 54: Quantitative Analyse des VEGF-A Proteins aus Gewebslysaten verschiedener Hirnregionen (ELISA)

Aus den einzelnen Hirnregionen wurden Gewebslysate hergestellt und in diesen die Proteinmenge von VEGF-A mit einem ELISA gemessen. In Lysaten aus allen Hirnregionen war konstant mehr VEGF-A pro µg Gesamtprotein in den Flt-1TK^{-/-} messbar als in wt-Tieren. In einzelnen Bereichen die mit * gekennzeichnet sind erreichten die Differenzen statistische Signifikanz. Pool beschreibt eine Kombination von Lysaten aus 3 Tieren eines Genotyps. 1/2Hirn *p=0,02; Cortex *p=0,026; Striatum+HC *p=0,0075.

4.3.12 Induktion des Phänotyps der *Flt-1Tk*^{-/-} im Wildtyp

Die erhöhte Konzentration von VEGF-A im Hirn der *Flt-1Tk*^{-/-}, im Vergleich zu wt-Mäusen, führte zu der Hypothese, dass VEGF-A für den beobachteten Phänotyp, also die veränderte Wanderung BrdU-markierter Zellen im RMS, die Ursache ist. Demnach müsste eine Administration von VEGF-A in das Gehirn des wt den in den VEGFR-1-Tk-defizienten Mäusen beobachteten Phänotyp auslösen.

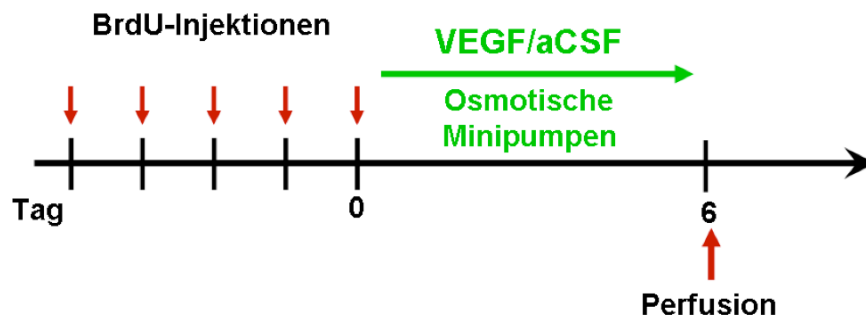


Abb. 55: Versuchsplan zur Analyse der adulten Neurogenese im Hippokampus.

Mäuse beider Genotypen wurden an fünf aufeinander folgenden Tagen mit BrdU injiziert. An Tag 0 wurden allen Mäusen Pumpen mit aCSF (Kontrollsg.) oder VEGF-A stereotaktisch in die LV implantiert. Nach einer 6-tägigen Infusionszeit wurden die SVZ, der RMS und der OB ausgewertet.

Um diese Frage zu beantworten wurde *Flt-1Tk*^{-/-} und wt-Mäusen VEGF-A intrazerebroventrikular (i.c.v.) VEGF-A appliziert. Dazu wurden osmotische Minipumpen stereotaktisch in die LV implantiert, welche Kontrolllösung (artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit; aCSF) oder VEGF-A (2 ng/µl in aCSF) mit einer Durchflussrate von 0,5 µl/h (= 12 µl pro Tag) in das Ventrikelsystem des Gehirns abgaben. Es wurde bereits gezeigt, dass VEGF-A *in vivo* die Proliferationsrate in der SVZ erhöht.⁸³ Damit die Proliferation in der SVZ in diesem Versuch nicht beeinträchtigt wird und die Migrationsphase der BrdU-markierten Zellen separat analysierbar war, erfolgte die Implantation der Mikropumpen erst am Tag 0, also nach der letzten BrdU-Injektion (siehe Abb. 55). Nach 6 Tagen wurden die Tiere perfundiert, Serienschnitte angefertigt und BrdU immunhistochemisch detektiert.

In der SVZ konnte (wie zuvor an Tag 6, s. Kap. 4.3.5.1) kein Unterschied in der Anzahl BrdU-markierter Zellen zwischen den einzelnen Versuchsgruppen beobachtet werden. Auch nach Infusion von VEGF-A war die Zahl BrdU-positiver Zellen in beiden Genotypen nicht erhöht. In Tieren die mit Kontrolllösung behandelt wurden, war - wie zuvor an Tag 6 (s. Kap. 4.3.5.1) - im RMS der *Flt-1TK*^{-/-} eine hochsignifikante Reduktion BrdU-positiver

Zellen im Vergleich zum wt sichtbar (Abb. 57 a). Auch war der RMS der Flt-1TK-/- signifikant schmaler (Abb. 57 c) als der des wt.

Tatsächlich führte i.c.v. Administration von VEGF-A in der Migrationsphase in wt-Tieren zu einer vergleichbaren, hochsignifikanten Reduktion BrdU-markierter Zellen und des Volumen des RMS wie in den Flt-1TK-/- (Abb. 57 a). Die Gabe von VEGF-A in den transgenen Mäusen führte zu keiner Differenz im Vergleich zu den transgenen Mäusen, denen mit Kontrolllösung verabreicht wurde (Abb. 57 a und c).

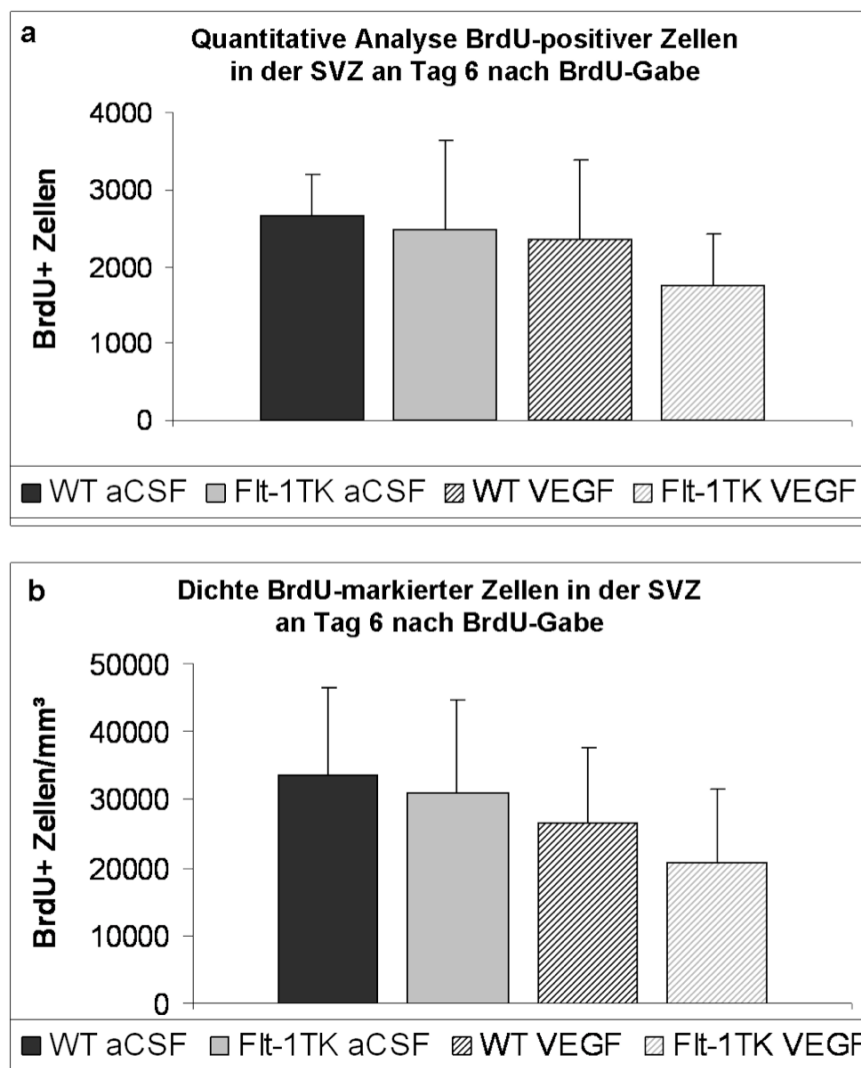


Abb. 56: Quantitative Analyse der SVZ am Tag 6 nach BrdU-Injektion und Implantation osmotischer Minipumpen.

Flt-1TK-/- und wt Tiere wurden an fünf aufeinander folgenden Tagen mit BrdU injiziert und an Tag 0 Pumpen mit VEGF oder aCSF i.c.v. implantiert. Die Mäuse wurden an Tag 6 analysiert. Flt-1TK-/- und wt-Mäuse zeigten keine Unterschiede in der Anzahl und Dichte BrdU+-Zellen in der SVZ. Auch VEGF-Gabe zeigte keine Differenz. n: Flt-1TK; (aCSF)-/-=3, Flt1TK-/(VEGF)=5; wt (aCSF)=6; wt (VEGF)=7.

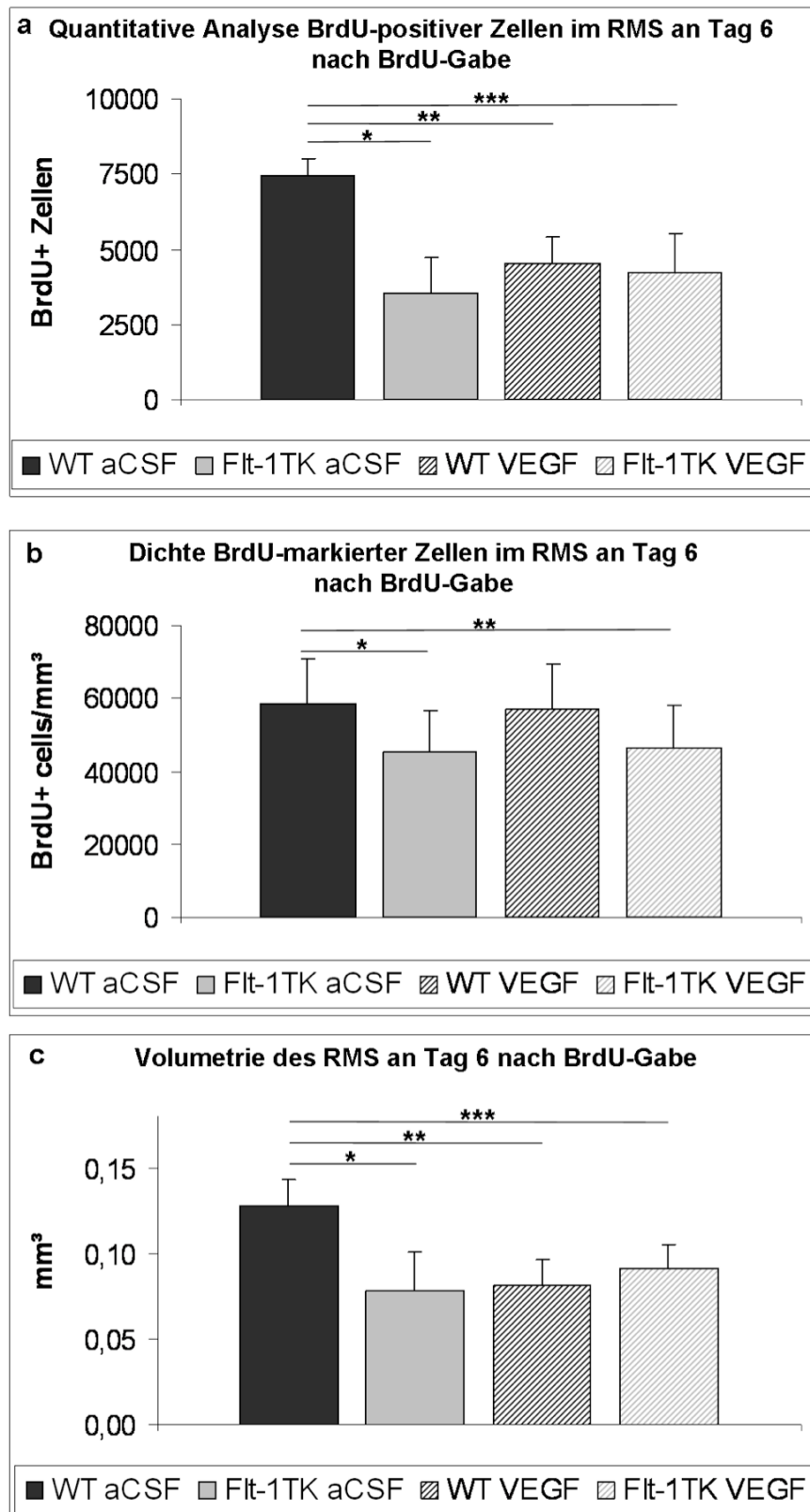


Abb. 57: Analyse des RMS am Tag 6 nach BrdU-Injektion und Implantation osmotischer Minipumpen.

a) Flt-1TK^{-/-} zeigten keine signifikante Reduktion in der Anzahl BrdU⁺-Zellen im RMS. VEGF-A-Infusion (icv) reduzierte die BrdU-markierte Zellen auf wt-Niveau. * $p=0,0009$; ** $p=0,0001$; *** $p=0,0008$. b) Die Dichte BrdU⁺-Zellen war in Flt-1TK^{-/-}-Mäusen signifikant reduziert. * $p=0,035$; ** $p=0,047$. c) Volumina des RMS war in Flt-1TK^{-/-} signifikant kleiner als in wt-Tieren. VEGF-A-Infusion im wt verkleinerte das RMS-Volumen auf wt-Niveau. * $p=0,05$; ** $p=0,004$; *** $p=0,048$; n: Flt-1TK (aCSF)^{-/-}=3, Flt1TK^{-/-}(VEGF)=5; wt (aCSF)=6; wt (VEGF)=7.

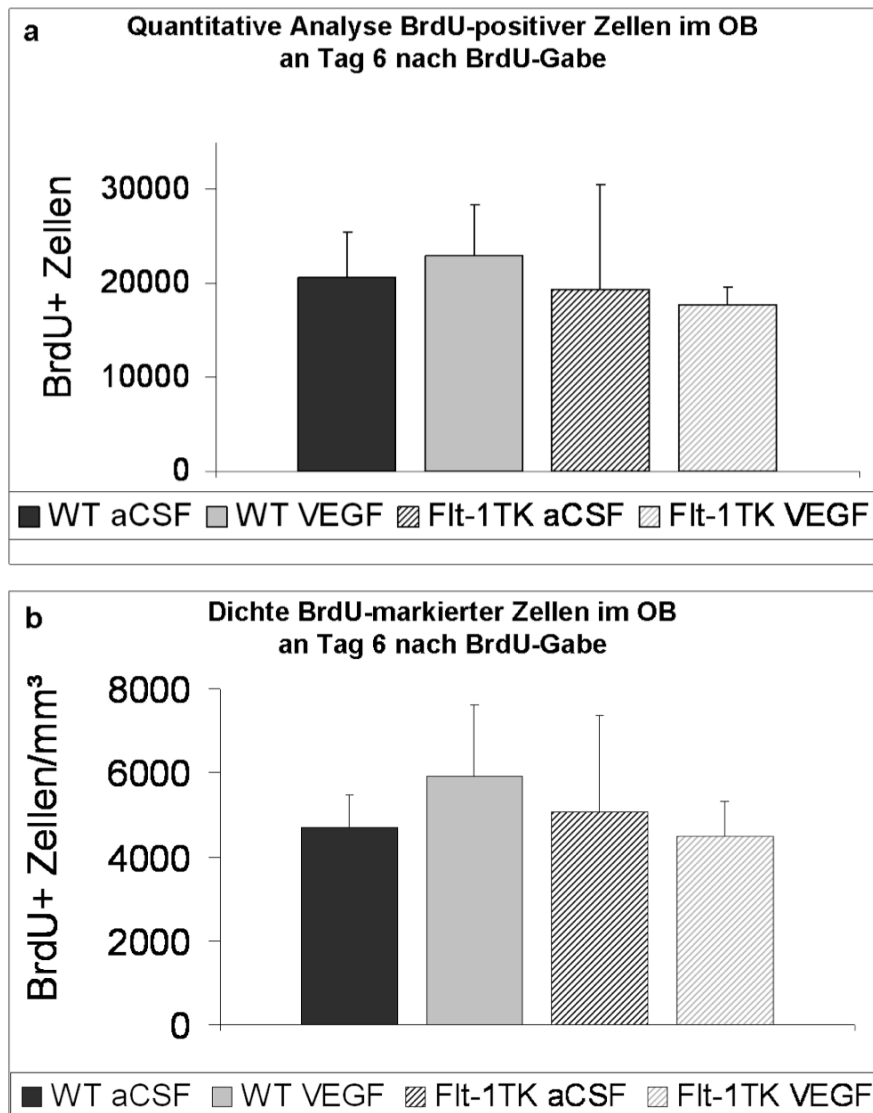


Abb. 58: Quantitative Analyse des OB am Tag 6 nach BrdU-Injektion und Implantation osmotischer Minipumpen.

Flt-1TK^{-/-} und wt Tiere wurden an fünf aufeinander folgenden Tagen mit BrdU injiziert und an Tag 0 Pumpen mit VEGF oder aCSF i.c.v. implantiert. Die Mäuse wurden an Tag 6 analysiert. Flt-1TK^{-/-} und wt-Mäuse zeigten keine Unterschiede in der Anzahl und Dichte BrdU+-Zellen im OB. Auch VEGF-Gabe zeigte keine Differenz. n: Flt-1TK^{-/-} (aCSF) =3, Flt1TK^{-/-}(VEGF)=5; wt (aCSF)=6; wt (VEGF)=7.

Quantitative, stereologische Analyse des OB ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 58).

Infusion (i.c.v.) von VEGF-A in die LV von wt-Tieren während der Migrationsphase induziert somit im wt 6 Tage nach BrdU-Injektionen den im RMS der Flt-1TK^{-/-}-Mäuse beobachteten Phänotyp.

4.3.13 Vergleich der Vaskularisierung von *Flt-1Tk^{-/-}* und *wt*-Mäusen

Eine Erhöhung der Proteinmenge von VEGF-A in *Flt-1Tk^{-/-}* könnte zu einer verstärkten Vaskularisierung führen, welche indirekt zu den beschriebenen Effekten beitragen könnte. Zum Vergleich der Vaskularisierung des Gehirns in *Flt-1Tk^{-/-}* und *wt*-Mäusen Gefäße durch Immunfluoreszenzfärbung mit dem vaskulären Marker anti-PECAM-1 an Seriengefrierschnitten visualisiert und Gefäßanzahl und Gefäßoberfläche bestimmt. Die Auswertungen erfolgten an jeweils 6 Schnitten pro Tier und Region, die jeweils einen Abstand von 300 µm voneinander hatten. In den analysierten Hirnregionen waren keine Unterschiede in der Anzahl der Gefäße, der Gefäßoberfläche und der mittleren Gefäßgröße zwischen beiden Tiergruppen messbar (Abb. 59, nächste Seite). Unterschiede in der Vaskularisierung sind somit nicht ursächlich für die in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Effekte der Inhibierung des VEGFR-1-Signalwegs. Differenzen zwischen *Flt-1TK^{-/-}* und *wt* in der Perfusionsrate und Permeabilität von Gefäßen sind in anschließenden Versuchen zu überprüfen.

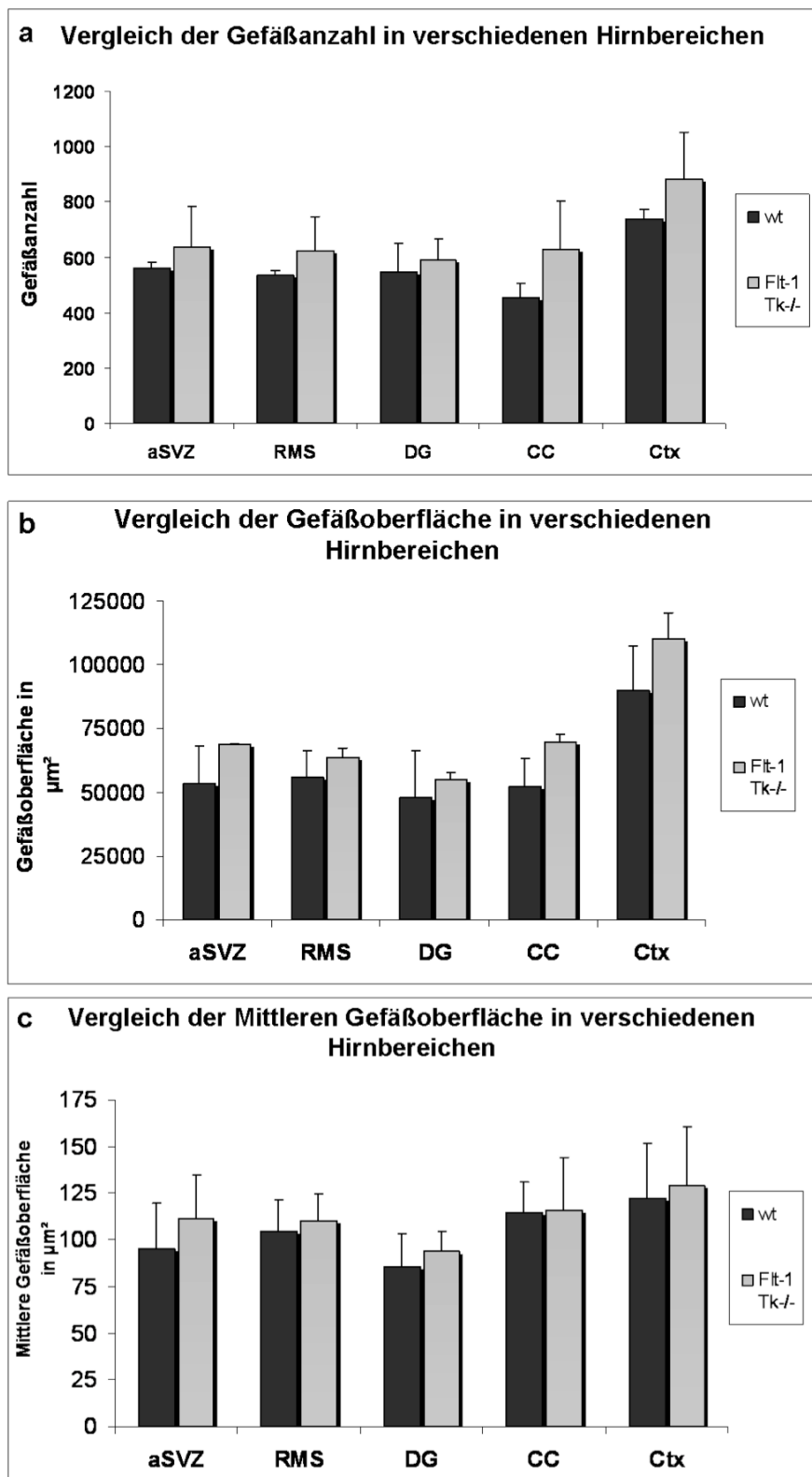


Abb. 59: Analyse der Vaskularisierung von Flt-1Tk und wt-Mäusen in verschiedenen Hirnregionen.

Analysen von Immunfluoreszenzfärbungen mit dem endotheliale Marker PECAM-1 zeigten eine vergleichbare Vaskularisierung in Flt-1Tk-/- und wt. Es waren keine Unterschiede in Gefäßanzahl, Gefäßfläche und mittlere Gefäßgröße messbar. n=3

5 Diskussion

Adulte Neurogenese ist unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich auf die SVZ der LV des Telenzephalons und dem Hippokampus beschränkt.^{5,58,59,93-97} Neurogenese basiert auf einem sequenziellen, mehrschrittigen Prozess, der durch ein komplexes Zusammenspiel autokriner und parakriner Faktoren von Zellen der Mikroumgebung, die die neurogene Nische ausbilden, kontrolliert wird.^{36,139,140,172-175} Auch für einige angiogene Faktoren wurde eine zusätzliche Wirkung auf neurale Zellen beschrieben.^{34,36} VEGF-A, ursprünglich als endothelzell-spezifischer Wachstumsfaktor bekannt,^{194,202-205} wird im adulten ZNS von Gliazellen, Neuronen und dem Plexus choroideus sekretiert und steigert die Neurogenese *in vitro* und *in vivo*.^{83,84,266,280,288,291} Als Hauptrezeptor in der Vermittlung neurogener Signale von VEGF-A wird der VEGFR-2 angesehen.^{252,253} Auch VEGF-B, das selektiv an VEGFR-1 und Nrp-1 bindet, hat einen Effekt auf die Neurogenese im adulten Gehirn.^{200,230,290} Für den VEGFR-1 sind bisher jedoch keine Funktionen in adulter Neurogenese bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es das Expressionsmuster des VEGFR-1 im adulten Gehirn und dessen potentielle Rolle in der Regulation adulter Neurogenese zu untersuchen.

5.1 Differenzielle Expression des VEGFR-1 im adulten ZNS

In dieser Arbeit konnte in mehrfach reproduzierten Versuchen, sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene, erstmals eine Expression des VEGFR-1 unter physiologischen Bedingungen in den Regionen adulter olfaktorischer und hippokampaler Neurogenese detailliert beschrieben werden. VEGFR-1 war in der SVZ, dem RMS, dem OB, dem Hippokampus und dem Corpus callosum nachweisbar. Das dabei beobachtete differentielle Expressionsmuster lässt auf unterschiedliche Funktionen schließen.

Ausschließlich in der Ependyma war die VEGFR-1-Expression punktförmig. VEGFR-1 ist dort nicht membranständig, sondern intrazellulär vermutlich nahe bzw. um den Nukleus zu finden. Eine intrazelluläre Expression von VEGFR-1 wurde bereits für humane Brustkrebszellen beschrieben. In diesen ist VEGFR-1 in der den Nukleus umgebenden, lamininhaltigen Hülle lokalisiert und fördert das Überleben der kanzerogenen Zellen in

Antwort auf die Gabe von VEGF-A, was für einen intrazellulären autokrinen Protektionseffekt spricht.³¹³ Ob die intrazelluläre Lokalisation des VEGFR-1 in der Ependyma der LV des adulten Maushirns ähnlich ist, könnte mit Doppelmarkierungen von VEGFR-1 und Laminin sowie durch Auftrennung und Analyse zytoplasmatischer und nukleärer Zellfraktionen von Ependymzellen überprüft werden. Das Fehlen einer signifikant erhöhten Apoptoserate in den Flt-1Tk^{-/-} Mäusen, bei denen die Signaltransduktion des VEGFR-1 inhibiert ist, spricht gegen einen ähnlichen Protektionseffekt.

Das Expressionsmuster des VEGFR-1 im adulten Maushirn war außerhalb der Ependyma überwiegend filamentös und kolokalisierte in der SVZ, dem RMS, dem OB, dem Hippokampus und dem Corpus callosum mit dem glialen Marker GFAP. Eine Artefaktbildung ist dabei weitgehend ausgeschlossen, da alle Primär- und Sekundärantikörper vorab durch IgG- und Negativ-Kontrollen auf ihre Spezifität geprüft wurden. Weiter erfolgte die Analyse von Koloalationen zweier Proteine mittels konfokaler Mikroskopie, wobei durch sequentielle Aufnahmen der einzelnen Fluoreszenzkanäle und kleinstmögliche „Pinhole“-Einstellungen falsch-positive Überlagerungen weitgehend auszuschließen sind. Zusätzlich bestätigten Aufnahmen im Spektralmodus, die Überlagerung der einzelnen Färbesignale von markiertem VEGFR-1 und GFAP in den fädigen Strukturen. Eine dreidimensionale Betrachtung der Zellen verdeutlichte, dass sich die Expression des VEGFR-1-Proteins vor allem im Bereich des Zellsoma und der großen Fortsätze der GFAP-positiven Zellen konzentriert. *In situ*-Hybridisierungen mit nachfolgender immunhistochemischer Markierung des Proteins GFAP bestätigten die Expression des VEGFR-1 in GFAP-positiven Zellen der SVZ und des RMS auf RNA-Ebene.

Gliazellen, vor allem Astrozyten, der adulten SVZ und des RMS beeinflussen aktiv die einzelnen Prozesse der neuronalen Zellentwicklung. Glial sezernierte Faktoren wirken u. a. auf die Erhaltung des Stammzellstatus, die Aktivierung und Selbsterneuerung der neuronalen Stammzellen, die neuronale Determinierung und Differenzierung.¹⁷² In der adulten SVZ und im Hippokampus fungieren spezielle GFAP-positive Zellen als neurale Stammzellen, aus denen überwiegend Neuroblasten hervorgehen.^{116,166,314} In der SVZ sind die mitotischen neurogenen GFAP-positiven Zellen meist uni- oder bipolar, während nicht-neurogene, ausdifferenzierte Astrozyten multiple Fortsätze aufweisen.¹¹⁹ In weit lateraler Ebene der murinen SVZ waren einige GFAP-/VEGFR-1-koexprimierende Einzelzellen ohne oder mit nur einem sichtbaren Fortsatz nahe am Ventrikelrand, in der Sub-Ependyma zu finden. Eine nähere immunhistochemische Charakterisierung dieser

Zellen war nicht möglich. Aufgrund spezieller Fixierungsanforderungen des anti-VEGFR-1-Antikörpers ist die Expression des VEGFR-1 nicht zusammen mit BrdU-Inkorporation visualisierbar.

Ein Marker für neurale Stammzellen des adulten ZNS ist Nestin.^{51,75,302} Die VEGFR-1-positiven Zellen in RMS und SVZ waren mit Nestin-positiven Zellen eng benachbart. Eine Koexpression mit Nestin in der SVZ und im RMS war nicht eindeutig festzustellen. Diese Ergebnisse sprechen trotz der morphologischen Ähnlichkeit gegen eine Stammzellidentität der beobachteten VEGFR-1/GFAP-koexprimierenden Einzelzellen in der Sub-Ependyma.

Dass VEGFR-1 nicht in proliferierenden Zellen exprimiert wird, demonstrierten Doppelmarkierungen des VEGFR-1 und PCNA, einem Protein das in G1-Phase und S-Phase des Zellzyklus exprimiert wird und somit mitotische Zellen markiert.³⁰³

Im Gegensatz zum hier aufgedeckten Expressionsmuster des VEGFR-1 in Regionen adulter Neurogenese des murinen Gehirns, ist VEGFR-1 im Primatenhirn in proliferierenden und in Nestin-positiven Zellen der SVZ exprimiert.³¹⁵ VEGFR-2 ist im Affenhirn ausschließlich in der Gefäßwand - vor allem in Endothelzellen - detektierbar,³¹⁵ während im adulten Nagerhirn Ependymzellen und neuronale Zellen den VEGFR-2 exprimieren.^{83,289} Die Expressionsdaten der Spezies stehen nicht im Widerspruch, da die Biologie neuraler Vorläuferzellen im adulten Primatenhirn von der im Nager differiert.^{150,151,315,316} Die differentielle Expression von VEGFR-1 und VEGFR-2 könnte zu diesen Unterschieden beitragen.

Die Neuroblasten werden auf ihrer Wanderung im RMS einem glialen Tunnel umgeben, der aus einem Netzwerk aus Fortsätzen spezialisierter Astrozyten und Extrazellulärmatrix (EZM) besteht.^{139,140} Die spezialisierten Astrozyten modulieren über bidirektionale Signalwege mit den wandernden Neuroblasten deren Proliferation und Migration.^{91,139,142-144} Die Koexpression des VEGFR-1 und GFAP entlang des gesamten RMS weist darauf hin, dass VEGFR-1 in den Astrozyten des glialen Tunnels exprimiert wird. Auch hier zeigt die Analyse im ZNS des Rhesusaffen andere Ergebnisse. VEGFR-1 wird dort nicht im RMS exprimiert.³¹⁵ Die Migrationszeiten und -distanzen von Neuroblasten sind im Primatenhirn gegenüber denen des Nagers stark erhöht.¹⁵⁰ Chemoattraktive Faktoren müssen im Primatenhirn über weitaus größere Distanzen wirken als im Nagerhirn, was unterschiedliche Signale zur Regulation der Migration in den verschiedenen Spezies wahrscheinlich macht.

Im Hippokampus sind es ebenfalls GFAP-positive Zellen die den VEGFR-1 exprimieren. Adulte hippokampale Stammzellen sind GFAP-positiv und auf die Subgranulärzone des

DG beschränkt.¹⁶⁶ Nach Mitose migrieren die Neuroblasten eine kurze Distanz entlang radialglia-ähnlicher Zellen und neuronalen Fortsätzen durch die Granulärzellschicht.^{58,167,168} In der Granulärzellschicht war der VEGFR-1 nicht nachweisbar. Die beobachteten doppelt markierten Zellen (GFAP+/VEGFR-1+) durchspannten die Granulärzellschicht oder waren im Hilus oder der Molekularzellschicht lokalisiert. Dies spricht erneut gegen eine Expression des VEGFR-1 in Stammzellen des adulten ZNS und lässt daher parakrine Effekte auf Neurogenese vermuten. Die VEGFR-1/GFAP-positiven Zellen, die die Granulärzellschicht durchspannen, könnten den radialglia-ähnlichen Zellen entsprechen, die Richtungsweiser für die migrierenden Neuroblasten sind.^{58,167,168} Das wäre ähnlich zur beobachteten Expression des VEGFR-1 in Astrozyten des glialen Tunnels. In beiden Fällen beeinflussen die spezialisierten Astrozyten die Migration der Neuroblasten.

Im adulten Maushirn exprimieren neuronale Zellen nicht den VEGFR-1. Übereinstimmend zeigten Yang *et al.* (2003)²⁸⁹ eine Expression des VEGFR-1 in adulten Ratten nur noch in sehr wenigen (Postnataltag 30) bis keinen (Postnataltag 90) Neuronen. Sie beschreiben die VEGFR-1-Expression in den ersten beiden Lebenswochen stark regionalisiert und zeigen eine neuronale Expression in Cortex, Hippokampus und Striatum, die bis zu adulten Stadien stark abnimmt. Eine Änderung des zellspezifischen Expressionsmusters in der frühen postnatalen Entwicklung ist auch für VEGF-A bekannt.²⁷⁶

Die endotheliale Expression der VEGF-Rezeptoren ist abhängig vom angiogenen Status. Nach Abschluss der Entwicklung findet Angiogenese nur noch in wenigen physiologischen Prozessen statt und die endotheliale VEGFR-Expression ist stark reduziert.^{275,317} Dementsprechend war VEGFR-1 im Gehirn adulter Mäuse nur noch vereinzelt in endothelialen Zellen nachweisbar.

Die VEGFR-1+/GFAP+-Zellen waren häufig gefäßassoziiert. Vaskuläre Strukturen, Gliazellen und die EZM sind Hauptkomponenten neuraler Stammzellnischen, welche die Eigenschaften von Stammzellen beeinflussen.^{36,139,140,172-175} Im ZNS formen gliale Zellen, vor allem Astrozyten, mit dem Gefäßsystem ein glia-vaskuläres Netzwerk, das neben struktureller Funktion auch intrazelluläre Kommunikationswege und neuronale Plastizität beeinflusst.^{172,176} Der auf GFAP-positiven Zellen exprimierte VEGFR-1 könnte daher regulativer Bestandteil neurogener Nischen sein.

5.1.1 Erhöhte VEGF-A Konzentration in Flt-1TK-/-

In den Flt-1TK-/- Mäusen wurde eine signifikant erhöhte VEGF-A Konzentration im Hirn, vor allem im OB, im Cortex und Hippokampus und im Mittelhirn nachgewiesen. Diese erhöhte VEGF-A-Konzentration könnte den meisten der beobachteten Effekten zugrunde liegen. Im adulten Nagerhirn wird VEGF-A in vielen neuronalen Zellen des gesamten Hirns und im Plexus choroideus gebildet.^{83,275} Astrozyten der SVZ und des RMS zeigen eine spezifisch erhöhte Expression gegenüber GFAP-positiver Zellen anderer Hirnareale,²⁶⁷ was eigene Immunfluoreszenzfärbungen bestätigten. Der Plexus choroideus sekretiert VEGF-A in den Liquor,⁸³ von wo es weit ins Hirngewebe diffundieren und nicht nur in Ventrikelnähe wirken kann.³¹⁸ Es wäre interessant zu prüfen, ob die im Vergleich zum Wildtyp (wt) erhöhte Menge VEGF-As in den Flt-1TK-/- direkt durch erhöhte astrozytäre Sekretion ins Gewebe entsteht oder ob die VEGF-A-Konzentration im Liquor erhöht ist. Die Zusammensetzung des Liquors wird wahrscheinlich durch astrozytäre Sekretion erheblich mitbestimmt.¹⁷⁸ Immunhistochemisch war dies nicht aufzuklären. Das regional- und zelltypspezifische Expressionsmuster von VEGFR-1 und VEGF-A war in beiden Genotypen vergleichbar. In beiden Genotypen exprimierten vor allem der Plexus choroideus und GFAP-positive Zellen der SVZ und des RMS den Wachstumsfaktor VEGF-A. Eine erhöhte Anzahl VEGF-A-positiver Astrozyten bzw. eine Expression von VEGF-A in anderen Zelltypen war in nichtquantitativen Analysen der Immunfluoreszenzfärbungen in den Flt-1TK-/- nicht zu beobachten. Eindeutig müsste dies aber durch quantitative, stereologische Analysen von VEGF-A-Markierungen geklärt werden. Zusammengefasst deuten die Ergebnisse auf eine gesteigerte Expressionsstärke als Ursache für die beobachtete erhöhte VEGF-A Konzentration im Hirn der Flt-1TK-/- hin.

Die Deletion der Intrazellulärdomäne kann entweder intrazellulär und damit über einen autokrinen Mechanismus die Expression von VEGF-A steigern oder parakrin die VEGF-A-Synthese in anderen Zelltypen beeinflussen. Bei einer autokrinen Wirkung des glial exprimierten VEGFR-1 auf die VEGF-A-Expression wäre es nicht verwunderlich, dass keine massiven entwicklungsbiologischen Effekte vorliegen. VEGF-A wird spät-embryonal und in neugeborenen Mäusen hauptsächlich neuronal und erst in späteren postnatalen Stadien (Postnataltag 24) zunehmend glial exprimiert.²⁷⁶ Die Reduktion der VEGF-A-Konzentration im Hirn der Flt-1TK-/- (im Vergleich zum wt) wäre somit erst nach der dritten Lebenswoche zu erwarten, einem Zeitpunkt zu dem das ZNS und das

Gefäßsystem schon ausgebildet sind. Zur weiteren Aufklärung sind Proteinmessungen in Hirnen jüngerer Mäuse nötig.

Die Initiation der Signaltransduktion von Rezeptortyrosinkinasen - so auch des VEGFR-1 - erfolgt durch Phosphorylierung der Tyrosine. Ligandenbindung induziert die Rezeptordimerisierung und damit die gegenseitige Transphosphorylierung der nun benachbarten Tyrosinkinasedomänen (intramolekularer „cross-talk“).³¹⁹ VEGFR-1 kann Homodimere, aber auch Heterodimere mit VEGFR-2, ausbilden. Zur Signalweiterleitung der VEGFR-1/VEGFR-2-Heterodimere ist die Tyrosinkinasedomäne des VEGFR-1 essentiell.²⁴⁷ In den Flt-1TK^{-/-} ist, aufgrund der deletierten intrazellulären Domäne, somit auch die VEGFR-2/VEGFR-1-Signaltransduktion gestört, was eine weitere potentielle Ursache für eine erhöhte VEGF-A Produktion wäre. Allerdings ist eine Koexpression beider Rezeptoren Voraussetzung für die Heterodimerisierung. Im adulten Hirn ist dies alleinig in der Ependyma oder den wenigen VEGFR-1 und VEGFR-2 exprimierenden Endothelzellen möglich, da VEGFR-2 adult hauptsächlich neuronal und nicht glial exprimiert wird.^{83,289}

VEGF-A wurde mittels ELISA in Lysaten aus Hirngewebe quantitativ bestimmt. Bei dieser Methode wird nicht zwischen freiem, interzellulärem und an Rezeptoren gebundenem VEGF-A unterschieden. Inaktivierung von Rezeptortyrosinkinasen erfolgt entweder über Phosphatasen oder über die Degradierung des Rezeptors mitsamt dem gebundenen Liganden durch Endozytose. Für einige Rezeptortyrosinkinasen wurde gezeigt, dass deren Endozytose abhängig vom Vorhandensein der Intrazellulärdomäne ist.³¹⁹⁻³²¹ Ein ähnlicher Mechanismus wäre beim VEGFR-1 denkbar. Das Fehlen der Tyrosinkinasedomäne in den Flt-1TK^{-/-} könnte die Endozytose und somit die Degradierung des VEGFR-1 verhindern. Daraus würde eine Absättigung des trunkierten, membrangebundenen VEGFR-1 mit VEGF-A resultieren. Diese hätte wiederum eine Anhäufung von VEGF-A im interzellulären Raum zur Folge, was die erhöhte VEGF-A-Konzentration in den Flt-1TK^{-/-} gegenüber dem wt erklären würde.

In Flt-1TK^{-/-} ist die Bildung der löslichen Rezeptorform (sVEGFR-1) nicht beeinflusst,²⁷⁴ so dass eine in Relation zum wt geringere VEGF-A-Bindung an sVEGFR-1 und damit erhöhte Bioverfügbarkeit ausgeschlossen ist.

5.2 Funktionelle Untersuchungen zur Rolle des VEGFR-1 in der Regulation adulter Neurogenese

Die Expression des VEGFR-1 in GFAP-positiven, aber nicht proliferativen Zellen, in den neurogenen Regionen des adulten Maus-ZNS zusammen mit den erhöhten VEGF-A-Konzentrationen in den Flt-1TK^{-/-} sprechen für eine regulative Funktion des VEGFR-1 auf adulte Neurogenese. Die Interpretation der Ergebnisse der funktionellen Analysen ist in Abb. 60 zusammengefasst dargestellt. Der genetische Hintergrund der Flt-1TK^{-/-} wurde vorab durch chromosomale Analyse bestimmt und daran angleichend Mäuse der Rasse C57Bl/6 als Kontrolltiere ausgewählt. Eine Variation des genetischen Hintergrunds kann somit als Ursache der beobachteten Effekte ausgeschlossen werden. Außerdem waren Versuchstiere beider Gruppen stets im gleichen Alter und wurden in Käfigen gleicher Größe und Ausstattung und möglichst in Gruppen gehalten, so dass altersabhängige oder umweltbedingte Effekte^{5,59,306-308,322} hier nicht zum Tragen kommen.

5.2.1 Einfluss des VEGFR-1 auf die Proliferation von neuraler Zellen im adulten ZNS

In der SVZ entstandene Neuroblasten proliferieren auch während ihrer Migration im RMS,¹²³ was den Ausschlag dazu gab einen möglichen Effekt durch Inhibierung der VEGFR-1-Signaltransduktion auf die Proliferation neuraler Vorläuferzellen in beiden Regionen zu untersuchen. Einmalige Administration von BrdU erlaubte es selektiv eine begrenzte Zellpopulation zu betrachten. Die frühe Analyse 3 h nach Injektion schließt zusätzliche Migrationseffekte aus. Die Flt-1Tk^{-/-} zeigten eine im Vergleich zum wt gesteigerte Proliferation in der SVZ, nicht jedoch im RMS. Erhöht waren überwiegend die proliferierenden neuronalen Vorläuferzellen, was die Zunahme BrdU-markierter DCX-positiver Zellen in der SVZ der transgenen Tiere aufgezeigte. BrdU-markierte Zellen, die nicht DCX oder GFAP exprimierten, waren gleichzeitig signifikant erniedrigt. Dies können Oligodendrozyten, Endothelzellen oder Vorläuferzellen sein, welche noch nicht in die neuronale Linie eingetreten bzw. zu Neuroblasten differenziert sind.

Die gesteigerte Proliferation neuronaler Vorläuferzellen (DCX+) in den Flt-1TK^{-/-} könnte auf die erhöhte Konzentration von VEGF-A zurückzuführen sein, die selektiv auf Neuroblasten zu wirken scheint. VEGF-A steigert *in vivo* und *in vitro* die Proliferation

neuraler Vorläuferzellen.^{83,84} *In vitro* wird der proliferative Effekt VEGF-A durch Inhibierung des VEGFR-2 unterbunden.⁸³ Wenn VEGF-A für den proliferationssteigernden Effekt in den Flt-1TK-/- ursächlich ist, wäre eine auch hier eine Vermittlung des Signals über den VEGFR-2, der in der Ependyma der LV exprimiert wird,⁸³ wahrscheinlich. Dies wäre durch intrazerebroventrikuläre Gabe eines VEGFR-2 Inhibitors in den Flt-1TK-/- zu untersuchen.

Weiter wäre eine indirekte Wirkung von VEGF-A über Glia- oder Endothelzellen auf die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen denkbar. Effekte auf neurale Vorläufer durch hypoxie-induzierte Astrozyten wurden in Ko-Kulturversuchen beschrieben.³²³ Endothelzellen stimulieren in Ko-Kultur die Ausbildung zahlreicher Zellkontakte zwischen neuroepithelialen Zellen und gleichzeitig die Aktivierung von den Faktoren Notch und Hes-1, die im Selbsterneuerungs- und Überlebensprogramm von Stammzellen eine zentrale Rolle spielen.¹⁸⁹⁻¹⁹¹ VEGF-A aus epithelialen Zellen des Plexus choroideus induziert u. a. die Fenestrierung von Endothelzellen *in vitro*,³²⁴ was eine verstärkte Ausschüttung von Faktoren, die auf Proliferation einen Einfluss bewirken kann.

Die Deletion der Signaltransduktion des glial exprimierten VEGFR-1 in und nahe der SVZ könnte neben VEGF-A auch die Ausschüttung und die Produktion anderer glial gebildeter Wachstumsfaktoren beeinflussen. Mitogene, wie FGF regulieren Proliferation, Selbsterneuerung und den Stammzellstatus neuronaler Vorläuferzellen⁷⁸⁻⁸⁰ und werden zumindest teilweise von Astrozyten synthetisiert und sekretiert.³²⁵ FGF-2 ist essentiell für die Expressionssteigerung des VEGFR-2 in neuronalen Vorläuferzellen, was *in vitro* Voraussetzung für den Effekt von VEGF-A auf deren Proliferation ist.⁸² Cystatin C, ein Ko-Faktor, der vermutlich mit FGF-2 die Proliferation neuronaler Stammzellen steigert, wird ebenfalls von Astrozyten exprimiert.³²⁶ Weiter führt die astrogliale Signalkaskade der Wnt-Proteine zu einer gesteigerten Neurogenese,³²⁷ während Signale der BMP-Familie die Entstehung von Gliazellen fördert. Ependymzellen, ein spezialisierter Typ Gliazellen, sekretieren den Faktor Noggin der wiederum durch Antagonisierung von BMPs und dadurch Inhibierung von Gliogenese eine Steigerung der Neurogenese bewirkt.^{64,328} Es gibt daher einige mögliche indirekte Wirkungsmechanismen für VEGF-A auf die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen und zahlreiche potentiell zusätzlich involvierte Faktoren.

In anderen Studien hatte VEGF-A einen mitogenen Effekt auf GFAP-positive Astrozyten, die VEGF-A und den VEGFR-1 exprimierten.²⁸⁴⁻²⁸⁷ Vermehrt GFAP-positive BrdU-markierte Zellen waren in den Flt-1TK-/- nicht zu beobachten. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass VEGFR-1 diesen Effekt vermittelt und dieser in den VEGFR-1/GFAP-

doppelmarkierten Zellen durch Fehlen der Intrazellulärdomäne des VEGFR-1 inhibiert ist. Außerdem wirkt VEGF-A dosisabhängig und nur Administration sehr hoher VEGF-A-Konzentrationen führt zu einer gleichzeitigen Steigerung von BrdU-positiven Neuronen, Astrozyten und Endothelzellen.⁸⁴ Die Erhöhung der VEGF-A-Konzentration in Flt-1TK-/- gegenüber dem wt ist aber im Vergleich dazu eher gering, was den ausbleibenden mitogenen Effekt auf Gliazellen erklären könnte.

Für VEGF-B, das alleinig an VEGFR-1 und Nrp-1 bindet, wurde ein proliferationssteigernder Effekt auf neurale Vorläuferzellen der SVZ und des Hippokampus beschrieben.²⁹⁰ Übereinstimmend resultiert die Deletion von VEGF-B (VEGF-B-/-) in reduzierter neurogener Aktivität im adulten Maus-ZNS, welche durch Infusion von VEGF-B wieder auf das physiologische Maß angehoben werden konnte.²⁹⁰ Neuropiline haben nur eine kurze intrazelluläre Domäne, die nicht ausreichend für eine alleinige, unabhängige Signaltransduktion ist. Ihre Signaltransduktion verläuft durch Komplexbildung mit anderen Rezeptoren.¹⁹⁹ Eine Komplexbildung von Nrp-1 und VEGFR-1 wurde beschrieben.^{260,261} Somit müsste ein Effekt von VEGF-B auf die Neurogenese durch die Inhibition der Signalweiterleitung des VEGFR-1 unterbunden werden. In den Flt-1TK-/- wäre dann eine niedrigere Proliferationsrate neuraler Zellen, ähnlich der VEGF-B-/- Maus, zu erwarten. Da aber VEGF-B die Proliferation *in vivo* in viel geringerem Maße erhöht als VEGF-A,²⁹⁰ wird dieser Effekt potentiell durch die Effekte der erhöhte Konzentration von VEGF-A in den Flt-1TK-/- überlagert.

5.2.2 Erhöhte VEGF-A Mengen in Flt-1Tk-/- fördern die Migration neuraler Zellen im RMS

Die vorliegende Arbeit demonstriert erstmalig einen Effekt von VEGF-A auf migrierende Neuroblasten *in vivo* unter physiologischen Bedingungen. Flt-Tk-/- Mäuse, die höhere VEGF-A Konzentrationen im Gehirn aufweisen, zeigten im Vergleich zum wt eine um fast die Hälfte (47,97%) reduzierte Anzahl BrdU-positiver Zellen im RMS 6 Tage nach der letzten BrdU-Injektion. Im RMS der Flt-1TK-/- waren es die BrdU-positive DCX-exprimierende Zellen, also die neuronal determinierten Vorläuferzellen, die gegenüber den Kontrolltieren reduziert waren. Beide Genotypen wiesen vergleichbare Apoptoseraten im RMS und der SVZ auf. Gleichzeitig war die Proliferation in der SVZ der Flt-1TK-/- im Vergleich zum wt erhöht, im RMS hingegen unbeeinträchtigt. Zusammen ließ dies eine Änderung des Migrationsverhaltens vermuten.

Eine verlangsamte Migration oder ein verzögertes Eintreten in den RMS würde eine Akkumulation der BrdU-markierten Zellen in der SVZ bewirken, was in den Flt-1TK^{-/-} nicht zu beobachten war. Kultivierung von SVZ-Explantaten in Matrigel zeigte damit übereinstimmend eine stark erhöhte Migrationsgeschwindigkeit von Zellen aus Explantaten der transgenen Tiere ins umgebende Gel. Die migrierenden Zellen waren GFAP- oder in der großen Überzahl Tuj1- und DCX-positiv, also hauptsächlich neuronale Vorläuferzellen. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass die BrdU-positiven Zellen, sobald sie in den RMS eingetreten sind, in den Flt-1TK^{-/-} schneller zum OB migrieren als im wt und daher in den transgenen Tieren weniger BrdU⁺-Zellen gleichzeitig im RMS vorhanden sind. Diese Annahme wird durch die mit steigender Versuchsdauer zunehmende Differenz in der Zahl BrdU-positiver Zellen des RMS zwischen beiden Genotypen gestützt. Der RMS der Flt-1TK^{-/-} war zudem schmaler als im wt, was aus einem verstärkt zielgerichtetem Migrationsverhalten, also einer geringeren Abwanderung der Neuroblasten resultieren kann.

Konform damit ist die beobachtete signifikante Reduktion der in das Corpus callosum abgewanderten BrdU-positiven Zellen in Flt-1TK^{-/-} an Tag 6 nach BrdU-Injektion. Neuronale Vorläuferzellen wandern aus dem RMS ins Corpus callosum, wo sie zu Oligodendrozyten differenzieren oder weiter in den zerebralen Cortex migrieren. Vorläuferzellen der SVZ tragen somit zur Produktion von Oligodendrozyten im adulten ZNS bei.^{299,300} Nach experimenteller Demyelierung steigt die Anzahl neu gebildeter Oligodendrozyten aus der SVZ.³²⁹ Von Interesse wäre es zu erforschen, ob durch die verminderte Einwanderung ins Corpus callosum in den Flt-1TK^{-/-} dort weniger Oligodendrozyten zu finden sind als im wt und ob dies die Myelinisierung beeinflusst.

Die Reduktion der BrdU-positiven Zellen im RMS der Flt-1TK^{-/-} gegenüber dem wt ist Folge der gemessenen, höheren VEGF-A-Konzentration im Hirn dieser Mäuse. Dies wurde eindeutig dadurch gezeigt, dass allein intrazerebroventrikuläre Infusion von VEGF-A, während der 6-tägigen Migrationszeit den beobachteten Phänotyp im wt auslöste. In Kontrolltieren wurde nach Administration von VEGF-A eine vergleichbare Verminderung BrdU-positiver Zellen im RMS und Reduktion des RMS Volumens beobachtet wie in den Flt-1TK^{-/-} Mäusen.

In Ko-Kultur steigert eine hypoxie-induzierte, erhöhte astrozytäre Sekretion von VEGF-A die Migration neuronaler Vorläuferzellen.³²³ *In vivo* wurde eine Rolle für VEGF-A in der Migration von Neuroblasten bisher nur unter pathophysiologischen Bedingungen beschrieben. Transgene Mäusen, die VEGF-A neuronal überexprimieren, weisen nach zerebraler Ischämie eine gesteigerte Rekrutierung neu gebildeter Neurone ins

geschädigte Gebiet auf.²⁶⁵ Die Migrationsgeschwindigkeit wurde dabei allerdings nicht untersucht.

In vitro vermittelt VEGFR-2 den direkten chemoattraktiven Effekt von VEGF-A auf neurale Vorläuferzellen, der abhängig von der Präsenz von FGF-2 ist.²⁶⁶ Auch IQGAP1, ein Zellgerüstprotein, ist in die Vermittlung der migrationssteigernden Wirkung von VEGF-A auf Neuroblasten *in vitro* involviert.²⁶⁷ Der Effekt von VEGF-A geht mit der Formierung eines Komplexes zwischen IQGAP1, Lis1 und Cdc42 und Rac1, GTPasen der Rho-Familie, einher.²⁶⁷ Auch für die VEGF-A-induzierte Migration von Endothelzellen sind Rho und Rho-kinase essentiell.³³⁰ Rho reguliert u. a. Tyrosinphosphorylierung des VEGFR-2.³³¹

Möglich ist überdies eine indirekte Wirkung von VEGF-A auf die wandernden Neuroblasten über Endothelzellen und/oder die Modulation der neurovaskulären Nische. Im adulten Kanarienvogel löst VEGF-A angiogene Prozesse aus, die die Mikrokapillaren, aber nicht größere Gefäße, beeinflussen. Die aktivierten Gefäße produzierten verstärkt BDNF, was *in vitro* die Migration von Neuroblasten aus Explantaten der SVZ erhöhte.¹⁸⁶ Auch in Mäusen wurde die Expression von BDNF und des Rezeptors TrkB in der SVZ, RMS und im OB beschrieben und *in vitro* einen migrationssteigernden Effekt von BDNF auf Neuroblasten aus der SVZ gezeigt.³³² Dies ist einer der potentiellen Mechanismen über den VEGF-A durch Modulation der neurovaskulären Nische auf die Migration der Neuroblasten einwirken kann. *Flt-1TK*^{-/-} Mäuse zeigten allerdings - im Vergleich zum *wt* - keine gesteigerte Vaskularisierung oder erhöhte Proliferation von Zellen, welche nicht DCX oder GFAP exprimieren und somit Endothelzellen sein können. Geplante Studien mit dynamischer T1-gewichteter Magnetresonanztomographie sollen eine mögliche Steigerung des Blutflusses oder der Permeabilität der Gefäße in den transgenen Tieren prüfen.

In den Kulturversuchen wurde VEGF-A zu allen Explantaten zugegeben. Eine Differenz in der Proteinmenge von VEGF-A sollte hier nicht zum Tragen kommen. Dies weist auf einen zusätzlichen Effekt unabhängig von der unterschiedlichen VEGF-A Konzentration *in vitro* hin, der *in vivo* entweder nicht gegeben oder durch andere Effekte überdeckt ist. VEGFR-1 könnte z. B. beruhend auf der Synthese und Sekretion spezieller EZM-Proteine, ähnlich wie bei die Mobilität steigernden Wirkung auf Endothelzellen,²⁷⁴ die Neuroblastenmigration beeinflussen. Denkbar wäre auch, dass die migrierenden Zellen der Explantate bereits vor Kultivierung, also bereits in früher Zellentwicklung, durch die unterschiedlichen VEGF-A Mengen *in vivo* auf einen bestimmten Weg festgelegt sind.

5.2.3 VEGF-A induzierte Veränderung der Migration im RMS resultiert in einer Volumenzunahme des OB

Eine verstärkte Migration zum OB lässt eine höhere Anzahl BrdU-positiver Zellen dort erwarten. Die deutliche Zunahme des Volumens des OB weist auf eine erhöhte Zellzahl hin. Die Periglomerulärzellschicht (PGL) der Flt-1TK^{-/-} war um 57%, die Plexiformschicht (PL) um 37% größer als im Kontrolltier. Eine Erhöhung der Gesamtzahl BrdU-markierter Zellen im OB war jedoch nicht messbar. Dieses Ausbleiben scheint aus der Addition der statistischen Varianzen zu resultieren. Bei einer gleichen Anzahl der BrdU-markierten Zellen der GCL und einer Erhöhung der BrdU-positiven Zellen in der PL an Tag 0 und Tag 6 und später auch PGL wäre jeweils eine erhöhte Gesamtzellzahl zu erwarten.

Im Einklang mit der Größendifferenz der PGL und PL des OB ist das Migrationsverhalten im OB der Flt-1TK^{-/-} anders als in Kontrolltieren. Inhibierung der Signaltransduktion des VEGFR-1 führte zu einer verstärkten Migration BrdU-positiver Zellen aus der GCL durch die PL in die PGL, die zu den verschiedenen Zeitpunkten nach 0, 6, und 30 Tagen nach BrdU-Injektion verfolgt wurde. Ob die Migrationsänderung im OB wie im RMS abhängig von VEGF-A ist, müsste mit Infusion von VEGF-A in die LV oder direkt in den OB und eine Analyse der BrdU-positiven Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht werden. Zellen aus der SVZ migrieren innerhalb des OB nicht in Ketten wie im RMS, sondern einzellig radial nach außen.^{94,153,154} Dabei folgen sie Blutgefäßen des OB.¹⁸⁸ Auch eine Modulation der neurovaskulären Nische könnte das geänderte Migrationsverhalten bewirkt haben.

5.2.4 Einfluss des VEGFR-1 auf die neuronale Differenzierung im adulten Bulbus olfaktorius

Ein Einfluss der VEGF/VEGFR-Familie auf die Größe des OB und die Genese olfaktorischer, dopaminergischer Zellen wird hier zum ersten Mal beschrieben. Im OB der Flt-1TK^{-/-} waren 30 Tage nach BrdU-Injektion mehr BrdU-positive Zellen in die PGL und die PL eingewandert und zu Neuronen differenziert als im wt. Subtypisierungen zeigen zudem eine erhöhte Differenzierung in dopaminerge Interneurone in der PGL der Flt-1TK^{-/-}. Es wurde gezeigt, dass eine Administration von VEGF-A *in vivo* in einer größeren Anzahl neuer Neurone im OB resultiert.⁸³ Da die Effekte in dieser Studie mit der Erhöhung der Proliferation in der SVZ einhergehen, ist nicht klar, ob VEGF-A die

vermehrte Entstehung neuronaler Vorläufer fördert oder (auch) direkt auf den terminalen Differenzierungsprozess einwirkt.

Diese Frage stellt sich ebenso bei der vorliegenden Arbeit. *In vitro* fördert VEGF-A nur in hohen Konzentrationen die neuronale Differenzierung.²⁸¹ Hier wurde in der SVZ der transgenen Tiere eine höhere Anzahl BrdU-positiver DCX-exprimierender Zellen detektiert als im wt. Dies spricht dafür, dass die erhöhte Neuronenzahl im OB der Flt-1TK-/- eine Folge erhöhter Proliferation neuronaler Vorläufer in der SVZ oder/und geringerer Abwanderung aus dem RMS ins Corpus callosum ist. Es erklärt allerdings nicht, warum nur die PGL und nicht die GCL im OB der Flt-1TK-/- mehr Neurone enthält als die des wt. Ein zusätzlicher parakriner Effekt der Inhibierung des VEGFR-1 Signalwegs auf den Determinierungs-/Differenzierungsprozess der Neuroblasten im RMS - eventuell über VEGF-A - ist wahrscheinlich. Analysen des Differenzierungspotentials von Neuroblasten, die an unterschiedlichen Stationen entlang der SVZ-RMS-OB-Achse entnommen wurden, zeigen eine zunehmende Differenzierung entlang ihres Weges zum OB.^{161,165} Dabei entscheidet sich das Zellschicksal der dopaminergen Neurone der PGL viel weiter rostral als das der Neurone der GCL.^{161,165} Ob der VEGFR-1 speziell die dopaminerge Differenzierung im OB beeinflusst oder ob in Flt-1TK-/- auch Unterschiede in der Zahl dopaminergener Neurone der Substantia nigra zu finden sind und ob dies abhängig von erhöhten VEGF-A ist, könnte Gegenstand zukünftiger Forschungsprojekte sein.

5.2.5 Die Inhibition der Signaltransduktion des VEGFR-1 zeigt keinen Effekt auf adulte hippocampale Neurogenese

Die Inhibierung der Signaltransduktion zeigte in den untersuchten Parametern keinen Effekt auf hippocampale adulte Neurogenese. Hier wurde bei Analyse 30 Tage nach BrdU-Injektion weder eine Differenz in der Proliferation noch im Überleben oder der endgültigen Lokalisierung BrdU-positiver Zellen zwischen wt und Flt-1TK-/- erhalten. Im Hippokampus exprimierten weitaus weniger Zellen den VEGFR-1 als in der SVZ, was geringere Effekte erwarten lässt.

Die erhöhte VEGF-A Konzentration könnte auch im Hippokampus neurogene Prozesse beeinflussen. Es ist bekannt, dass VEGF-A die mit Lernen und Gedächtnisleistungen verbundene, hippocampale Neurogenese steigert.²⁸⁸ Dies scheint über VEGFR-2 mediiert zu sein und unabhängig von der gleichzeitig beobachteten gesteigerten Angiogenese. Entsprechend führt neurale Expression von dominant-negativem

VEGFR-2 im Hippokampus zu einer starken Reduktion proliferierender Zellen und verminderter Lernfähigkeit.²⁸⁸ Die Flt-1TK^{-/-} zeigten keine Erhöhung der Gefäßanzahl oder -größe im Hippokampus. Im Hinblick auf Lernstörungen wäre es von großem Interesse in den Flt-1TK^{-/-} einen - potentiell VEGF-A vermittelten - Effekt auf die neuronale Differenzierung und die Differenzierung der verschiedenen Subtypen hippocampaler Neurone zu untersuchen.

Hippokampale Neurogenese verläuft, im Gegensatz zur olfaktorischen Neurogenese, lokal sehr beschränkt. Im Hippokampus findet die Proliferation der Vorläuferzellen, deren Migration und Differenzierung in Neurone innerhalb eines Radius von ca. 100 µm statt,¹⁶⁶ so dass eine Veränderung der Migrationsgeschwindigkeit mit den hier verwendeten Methoden nicht detektierbar wäre.

5.2.6 Zusammenfassung der Interpretation der Ergebnisse:

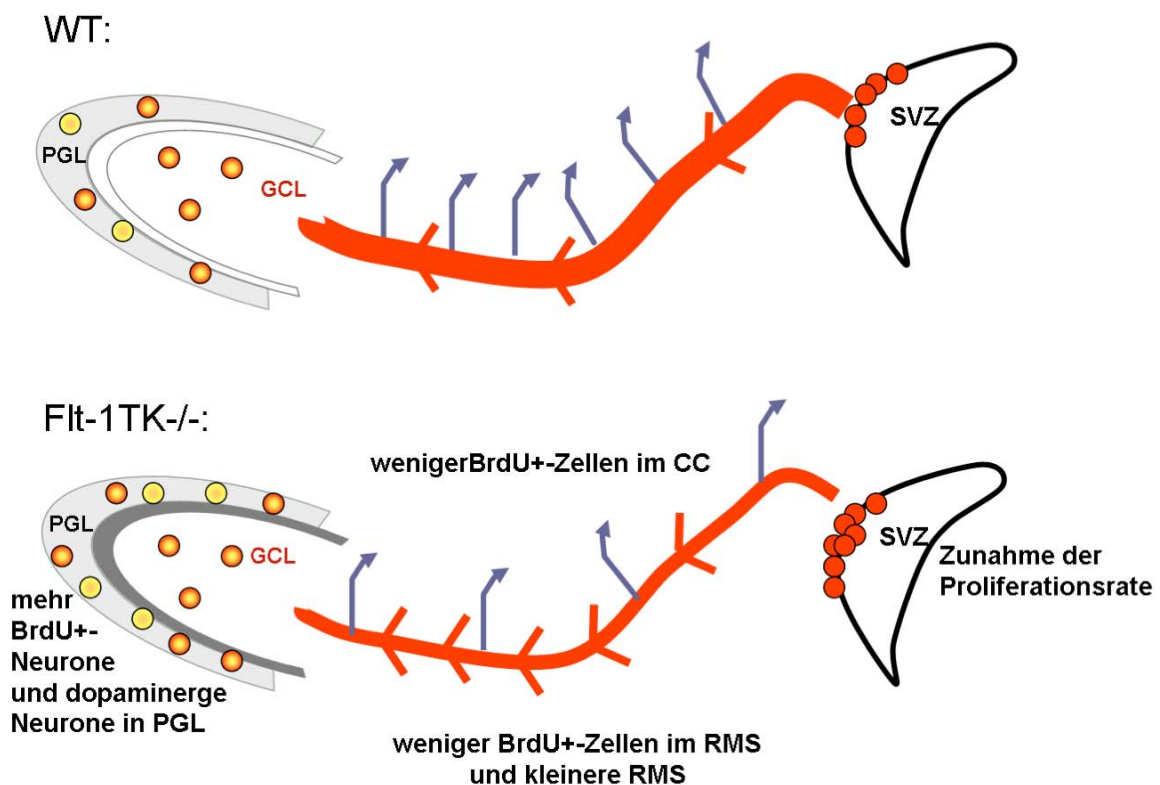


Abb. 60: Schematische Darstellung der Effekte der genetischen Inhibierung der Signaltransduktion des VEGFR-1 in Flt-1TK^{-/-} im Vergleich zum wt-Mäusen.

In Flt-1TK^{-/-}-Mäusen ist die Proliferation neuraler Vorläuferzellen in der SVZ erhöht. Neuroblasten wandern in einem schmaleren RMS und höherer Migrationsgeschwindigkeit zum OB. Weniger Zellen verlassen den OB und wandern ins Corpus callosum ein. Im OB angekommen migrieren die neu entstandenen Zellen verstärkt durch die Plexiformschicht in die Periglomerulärzellschicht, wo sie vermehrt zu Neuronen (orange-gelb) und insbesondere dopaminergen Neuronen (gelb) differenzieren. Der OB ist dadurch gegenüber dem wt vergrößert. CC: Corpus callosum; GCL: Granulärzellschicht; PGL: Periglomerulärzellschicht; PL: Plexiformschicht; RMS: Rostralmigratorischer Strom; SVZ: Subventrikularzone.

Die Ergebnisse der Analysen zur Funktion des VEGFR-1 in der Regulation adulter Neurogenese sind in Abb. 60 zusammengefasst dargestellt. In den Flt-1TK^{-/-} Mäusen ist die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen in der SVZ gegenüber dem wt erhöht. Die in Kulturversuchen beobachtete stark erhöhte Migrationsgeschwindigkeit von Neuroblasten der Flt-1TK^{-/-} stützt die Hypothese, dass die neuronalen Vorläuferzellen schneller zum OB migrieren. Auf dem Weg wandern weniger Zellen ins Corpus callosum ab. Im OB angekommen migrieren die Zellen in die einzelnen Schichten des OB, wobei in den Flt-1TK^{-/-} vermehrt Zellen in der PL und der PGL zu finden sind. Dort differenzieren signifikant mehr Neurone als im wt. Subtypisierungen zeigen zudem eine erhöhte Differenzierung in dopaminerge Interneurone in der PGL der Flt-1TK^{-/-}.

VEGFR-1 ist somit ein regulatorischer Faktor für die adulte olfaktorische Neurogenese und spielt eine potentielle Rolle in der Differenzierung dopaminerge Interneurone.

6 Zusammenfassung

Neurale Stammzellen sind im adulten Säugerhirn in der Subventrikulären Zone (SVZ) der Lateralventrikel und dem Hippokampus lokalisiert. In der SVZ entstandene neurale Zellen migrieren entlang eines von Astrozyten umgebenen Pfades, dem Rostralmigratorischen Strom (RMS), zum Olfaktorischen Bulbus (OB), wo sie zu olfaktorischen Interneuronen differenzieren. Vaskuläre Wachstumsfaktoren, wie VEGF-A beeinflussen die adulte Neurogenese. Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmalig detailliert die spezifische Expression des VEGF-Rezeptor-1 (VEGFR-1) in den Regionen olfaktorischer und hippokampaler Neurogenese des adulten ZNS. Die Ergebnisse zeigen, dass VEGFR-1 im adulten Hirn hauptsächlich in GFAP-positiven Zellen in der SVZ, dem RMS, dem OB, dem Corpus callosum und dem Hippokampus exprimiert ist. *In vivo*-Analysen transgener Mäuse (Flt-1TK^{-/-}), denen die Signaltransduktionsdomäne des VEGFR-1 fehlt, demonstrieren hier erstmals eine Rolle des VEGFR-1 in adulter Neurogenese. Flt-1TK^{-/-} weisen eine erhöhte Proliferation neuronaler Vorläuferzellen der SVZ auf. Im RMS ist jedoch 6 Tage nach BrdU-Administration die Anzahl markierter Zellen im Vergleich zum Wildtyp (wt) um 47,97% reduziert, ohne dass es zu einer Akkumulation in der SVZ kommt. Zusammen mit der in Kulturversuchen stark erhöhten Migrationsgeschwindigkeit von Neuroblasten der Flt-1TK^{-/-} und einer verminderten Abwanderung von Zellen aus dem RMS ins Corpus callosum der Flt-1TK^{-/-}, weist dies auf eine gesteigerte Migration zum OB hin. Tatsächlich war der OB der Flt-1TK^{-/-}, vor allem die Plexiform- und Periglomerulärzellschicht (PGL), signifikant vergrößert. Im OB der transgenen Tiere migrieren zudem signifikant mehr BrdU-markierte Zellen in die PGL. Dort differenzieren signifikant mehr Neurone als im wt. Subtypisierungen zeigen, zudem eine erhöhte Differenzierung in dopaminerge Interneurone in der PGL der Flt-1TK^{-/-}. Im Gehirn Flt-1TK^{-/-} war die Konzentration von VEGF-A erhöht. Intrazerebroventrikuläre Infusion von VEGF-A in wt-Tiere erbrachte den eindeutigen Nachweis, dass die Erhöhung der VEGF-A-Konzentration im Gehirn der Flt-1TK^{-/-} ursächlich für die in diesen Tieren beobachtete Reduktion der BrdU-positiven Zellen im RMS ist. Dies ist gleichzeitig der erste Nachweis einer Wirkung von VEGF-A auf Neuroblasten im RMS *in vivo* unter physiologischen Bedingungen. Die erhöhte VEGF-A-Konzentration könnte auch den anderen hier dargelegten Effekten zugrunde liegen. VEGFR-1 ist somit ein regulatorischer Faktor für die adulte olfaktorische Neurogenese und spielt eine potentielle Rolle in der Differenzierung dopaminerger Interneurone.

7 Literaturverzeichnis

1. Weissman, I.L., Anderson, D.J. & Gage, F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 387-403 (2001).
2. Ramon y Cajal, S. *Degeneration and Regeneration of the Nervous System.*, (1913).
3. Ramon y Cajal, S. *Degeneration and Regeneration of the Nervous System.* New York: Hafner (1928).
4. Altman, J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* **137**, 433-57 (1969).
5. Altman, J. & Das, G.D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* **124**, 319-35 (1965).
6. Hockfield, S. & McKay, R.D. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci* **5**, 3310-28 (1985).
7. Kaplan, M.S. & Hinds, J.W. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* **197**, 1092-4 (1977).
8. Reynolds, B.A. & Weiss, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* **255**, 1707-10 (1992).
9. Kilpatrick, T.J. & Bartlett, P.F. Cloning and growth of multipotential neural precursors: requirements for proliferation and differentiation. *Neuron* **10**, 255-65 (1993).
10. Goldman, S.A. & Nottebohm, F. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 2390-4 (1983).
11. Lindvall, O. & Bjorklund, A. Cell replacement therapy: helping the brain to repair itself. *NeuroRx* **1**, 379-81 (2004).
12. Lindvall, O., Kokaia, Z. & Martinez-Serrano, A. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat Med* **10 Suppl**, S42-50 (2004).
13. Gu, W., Brannstrom, T. & Wester, P. Cortical neurogenesis in adult rats after reversible photothrombotic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* **20**, 1166-73 (2000).
14. Liu, J., Solway, K., Messing, R.O. & Sharp, F.R. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci* **18**, 7768-78 (1998).
15. Leker, R.R. et al. Long-lasting regeneration after ischemia in the cerebral cortex. *Stroke* **38**, 153-61 (2007).
16. Parent, J.M., Vexler, Z.S., Gong, C., Derugin, N. & Ferriero, D.M. Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann Neurol* **52**, 802-13 (2002).
17. Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z. & Lindvall, O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* **8**, 963-70 (2002).
18. Nakatomi, H. et al. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* **110**, 429-41 (2002).
19. Scharfman, H.E., Goodman, J.H. & Sollas, A.L. Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. *J Neurosci* **20**, 6144-58 (2000).
20. Jin, K. et al. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 343-7 (2004).
21. Curtis, M.A., Eriksson, P.S. & Faull, R.L. Progenitor cells and adult neurogenesis in neurodegenerative diseases and injuries of the basal ganglia. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **34**, 528-32 (2007).

22. Zhao, M. et al. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7925-30 (2003).
23. Curtis, M.A. et al. Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9023-7 (2003).
24. Chi, L. et al. Motor neuron degeneration promotes neural progenitor cell proliferation, migration, and neurogenesis in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis mice. *Stem Cells* **24**, 34-43 (2006).
25. Calza, L. et al. Neural stem cells and cholinergic neurons: regulation by immunolesion and treatment with mitogens, retinoic acid, and nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7325-30 (2003).
26. Jagasia, R., Song, H., Gage, F.H. & Lie, D.C. New regulators in adult neurogenesis and their potential role for repair. *Trends Mol Med* **12**, 400-5 (2006).
27. Singh, S.K. et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**, 396-401 (2004).
28. Vescovi, A.L., Galli, R. & Reynolds, B.A. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer* **6**, 425-36 (2006).
29. Holland, E.C. et al. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat Genet* **25**, 55-7 (2000).
30. Hemmati, H.D. et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15178-83 (2003).
31. Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F. & Weissman, I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105-11 (2001).
32. Storkebaum, E. & Carmeliet, P. VEGF: a critical player in neurodegeneration. *J Clin Invest* **113**, 14-8 (2004).
33. Storkebaum, E., Lambrechts, D. & Carmeliet, P. VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *Bioessays* **26**, 943-54 (2004).
34. Raab, S. & Plate, K.H. Different networks, common growth factors: shared growth factors and receptors of the vascular and the nervous system. *Acta Neuropathol (Berl)* (2007).
35. Carmeliet, P. Blood vessels and nerves: common signals, pathways and diseases. *Nat Rev Genet* **4**, 710-20 (2003).
36. Ward, N.L. & Lamanna, J.C. The neurovascular unit and its growth factors: coordinated response in the vascular and nervous systems. *Neurol Res* **26**, 870-83 (2004).
37. Buee, L., Hof, P.R. & Delacourte, A. Brain microvascular changes in Alzheimer's disease and other dementias. *Ann N Y Acad Sci* **826**, 7-24 (1997).
38. Machein, M.R. & Plate, K.H. Role of VEGF in developmental angiogenesis and in tumor angiogenesis in the brain. *Cancer Treat Res* **117**, 191-218 (2004).
39. Carmeliet, P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* **9**, 653-60 (2003).
40. Weinstein, B.M. Vessels and nerves: marching to the same tune. *Cell* **120**, 299-302 (2005).
41. Tesar, P.J. et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* **448**, 196-9 (2007).
42. Gardner, R.L. Origin and differentiation of extraembryonic tissues in the mouse. *Int Rev Exp Pathol* **24**, 63-133 (1983).
43. Evans, M.J. & Kaufman, M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-6 (1981).
44. Temple, S. & Alvarez-Buylla, A. Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Curr Opin Neurobiol* **9**, 135-41 (1999).
45. Potten, C.S. & Loeffler, M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* **110**, 1001-20 (1990).
46. Udolph, G., Prokop, A., Bossing, T. & Technau, G.M. A common precursor for glia and neurons in the embryonic CNS of *Drosophila* gives rise to segment-specific lineage variants. *Development* **118**, 765-75 (1993).

47. Qian, X., Goderie, S.K., Shen, Q., Stern, J.H. & Temple, S. Intrinsic programs of patterned cell lineages in isolated vertebrate CNS ventricular zone cells. *Development* **125**, 3143-52 (1998).
48. McKay, R. Stem cells in the central nervous system. *Science* **276**, 66-71 (1997).
49. van der Kooy, D. & Weiss, S. Why stem cells? *Science* **287**, 1439-41 (2000).
50. Frederiksen, K. & McKay, R.D. Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J Neurosci* **8**, 1144-51 (1988).
51. Lendahl, U. & McKay, R.D. The use of cell lines in neurobiology. *Trends Neurosci* **13**, 132-7 (1990).
52. Vicario-Abejon, C., Cunningham, M.G. & McKay, R.D. Cerebellar precursors transplanted to the neonatal dentate gyrus express features characteristic of hippocampal neurons. *J Neurosci* **15**, 6351-63 (1995).
53. Brustle, O. et al. In vitro-generated neural precursors participate in mammalian brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14809-14 (1997).
54. Renfranz, P.J., Cunningham, M.G. & McKay, R.D. Region-specific differentiation of the hippocampal stem cell line HiB5 upon implantation into the developing mammalian brain. *Cell* **66**, 713-29 (1991).
55. Cattaneo, E. & McKay, R. Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature* **347**, 762-5 (1990).
56. Davis, A.A. & Temple, S. A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. *Nature* **372**, 263-6 (1994).
57. Temple, S. Division and differentiation of isolated CNS blast cells in microculture. *Nature* **340**, 471-3 (1989).
58. Cameron, H.A., Woolley, C.S., McEwen, B.S. & Gould, E. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* **56**, 337-44 (1993).
59. Kuhn, H.G., Dickinson-Anson, H. & Gage, F.H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* **16**, 2027-33 (1996).
60. van Praag, H. et al. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* **415**, 1030-4 (2002).
61. Markakis, E.A. & Gage, F.H. Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J Comp Neurol* **406**, 449-60 (1999).
62. Jessberger, S. & Kempermann, G. Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *Eur J Neurosci* **18**, 2707-12 (2003).
63. Alvarez-Buylla, A. & Lim, D.A. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* **41**, 683-6 (2004).
64. Sturrock, R.R. & Smart, I.H. A morphological study of the mouse subependymal layer from embryonic life to old age. *J Anat* **130**, 391-415 (1980).
65. Anderson, S.A., Eisenstat, D.D., Shi, L. & Rubenstein, J.L. Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. *Science* **278**, 474-6 (1997).
66. de Carlos, J.A., Lopez-Mascaraque, L. & Valverde, F. Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J Neurosci* **16**, 6146-56 (1996).
67. Kriegstein, A.R. & Gotz, M. Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia* **43**, 37-43 (2003).
68. Cameron, R.S. & Rakic, P. Glial cell lineage in the cerebral cortex: a review and synthesis. *Glia* **4**, 124-37 (1991).
69. Noctor, S.C. et al. Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J Neurosci* **22**, 3161-73 (2002).
70. Malatesta, P., Hartfuss, E. & Gotz, M. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* **127**, 5253-63 (2000).
71. Temple, S. The development of neural stem cells. *Nature* **414**, 112-7 (2001).

72. Johe, K.K., Hazel, T.G., Muller, T., Dugich-Djordjevic, M.M. & McKay, R.D. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev* **10**, 3129-40 (1996).
73. Frederiksen, K., Jat, P.S., Valtz, N., Levy, D. & McKay, R. Immortalization of precursor cells from the mammalian CNS. *Neuron* **1**, 439-48 (1988).
74. McKay, R. Stem cells and the cellular organization of the brain. *J Neurosci Res* **59**, 298-300 (2000).
75. Reynolds, B.A., Tetzlaff, W. & Weiss, S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* **12**, 4565-74 (1992).
76. Reynolds, B.A. & Weiss, S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* **175**, 1-13 (1996).
77. Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* **36**, 1021-34 (2002).
78. Gritti, A. et al. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* **16**, 1091-100 (1996).
79. Vicario-Abejon, C., Johe, K.K., Hazel, T.G., Collazo, D. & McKay, R.D. Functions of basic fibroblast growth factor and neurotrophins in the differentiation of hippocampal neurons. *Neuron* **15**, 105-14 (1995).
80. Maric, D., Fiorio Pla, A., Chang, Y.H. & Barker, J.L. Self-renewing and differentiating properties of cortical neural stem cells are selectively regulated by basic fibroblast growth factor (FGF) signaling via specific FGF receptors. *J Neurosci* **27**, 1836-52 (2007).
81. Panchision, D.M. et al. Sequential actions of BMP receptors control neural precursor cell production and fate. *Genes Dev* **15**, 2094-110 (2001).
82. Xiao, Z. et al. Upregulation of Flk-1 by bFGF via the ERK pathway is essential for VEGF-mediated promotion of neural stem cell proliferation. *Cell Res* **17**, 73-9 (2007).
83. Schanzer, A. et al. Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor. *Brain Pathol* **14**, 237-48 (2004).
84. Jin, K. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11946-50 (2002).
85. Greenwald, I. & Rubin, G.M. Making a difference: the role of cell-cell interactions in establishing separate identities for equivalent cells. *Cell* **68**, 271-81 (1992).
86. Tsai, R.Y. & McKay, R.D. Cell contact regulates fate choice by cortical stem cells. *J Neurosci* **20**, 3725-35 (2000).
87. Chen, H.L. et al. Oxygen tension regulates survival and fate of mouse central nervous system precursors at multiple levels. *Stem Cells* **25**, 2291-301 (2007).
88. Pistollato, F., Chen, H.L., Schwartz, P.H., Basso, G. & Panchision, D.M. Oxygen tension controls the expansion of human CNS precursors and the generation of astrocytes and oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci* **35**, 424-35 (2007).
89. Galea, L.A. Gonadal hormone modulation of neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rodents. *Brain Res Rev* (2007).
90. Spritzer, M.D. & Galea, L.A. Testosterone and dihydrotestosterone, but not estradiol, enhance survival of new hippocampal neurons in adult male rats. *Dev Neurobiol* **67**, 1321-33 (2007).
91. Liu, X., Wang, Q., Haydar, T.F. & Bordey, A. Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci* **8**, 1179-87 (2005).
92. Freundlieb, N. et al. Dopaminergic substantia nigra neurons project topographically organized to the subventricular zone and stimulate precursor cell proliferation in aged primates. *J Neurosci* **26**, 2321-5 (2006).

93. Kaplan, M.S. & Bell, D.H. Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. *J Neurosci* **4**, 1429-41 (1984).
94. Luskin, M.B. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* **11**, 173-89 (1993).
95. Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* **97**, 703-16 (1999).
96. Lois, C. & Alvarez-Buylla, A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2074-7 (1993).
97. Alvarez-Buylla, A. & Nottebohm, F. Migration of young neurons in adult avian brain. *Nature* **335**, 353-4 (1988).
98. Jackson, E.L. et al. PDGFR alpha-positive B cells are neural stem cells in the adult SVZ that form glioma-like growths in response to increased PDGF signaling. *Neuron* **51**, 187-99 (2006).
99. Bull, N.D. & Bartlett, P.F. The adult mouse hippocampal progenitor is neurogenic but not a stem cell. *J Neurosci* **25**, 10815-21 (2005).
100. Lee, A. et al. Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum. *Nat Neurosci* **8**, 723-9 (2005).
101. Merkle, F.T., Mirzadeh, Z. & Alvarez-Buylla, A. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science* **317**, 381-4 (2007).
102. Menn, B. et al. Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci* **26**, 7907-18 (2006).
103. Clarke, D.L. Neural stem cells. *Bone Marrow Transplant* **32 Suppl 1**, S13-7 (2003).
104. Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11619-24 (1999).
105. Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J.M. & Tramontin, A.D. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* **2**, 287-93 (2001).
106. Johansson, C.B. et al. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* **96**, 25-34 (1999).
107. Spassky, N. et al. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci* **25**, 10-8 (2005).
108. Carleton, A., Petreanu, L.T., Lansford, R., Alvarez-Buylla, A. & Lledo, P.M. Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci* **6**, 507-18 (2003).
109. Carlen, M. et al. Functional integration of adult-born neurons. *Curr Biol* **12**, 606-8 (2002).
110. Magavi, S.S., Leavitt, B.R. & Macklis, J.D. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* **405**, 951-5 (2000).
111. Kaplan, M.S. Neurogenesis in the 3-month-old rat visual cortex. *J Comp Neurol* **195**, 323-38 (1981).
112. Boulder Committee. Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology. The Boulder Committee. *Anat Rec* **166**, 257-61 (1970).
113. Smart, I.H. A pilot study of cell production by the ganglionic eminences of the developing mouse brain. *J Anat* **121**, 71-84 (1976).
114. Tramontin, A.D., Garcia-Verdugo, J.M., Lim, D.A. & Alvarez-Buylla, A. Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cereb Cortex* **13**, 580-7 (2003).
115. Garcia-Verdugo, J.M., Doetsch, F., Wichterle, H., Lim, D.A. & Alvarez-Buylla, A. Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *J Neurobiol* **36**, 234-48 (1998).
116. Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* **17**, 5046-61 (1997).
117. Doetsch, F. & Alvarez-Buylla, A. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14895-900 (1996).

118. Luskin, M.B., Zigova, T., Soteres, B.J. & Stewart, R.R. Neuronal progenitor cells derived from the anterior subventricular zone of the neonatal rat forebrain continue to proliferate in vitro and express a neuronal phenotype. *Mol Cell Neurosci* **8**, 351-66 (1997).
119. Garcia, A.D., Doan, N.B., Imura, T., Bush, T.G. & Sofroniew, M.V. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* **7**, 1233-41 (2004).
120. Quinones-Hinojosa, A. et al. Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J Comp Neurol* **494**, 415-34 (2006).
121. Lois, C. & Alvarez-Buylla, A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* **264**, 1145-8 (1994).
122. Lois, C., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. Chain migration of neuronal precursors. *Science* **271**, 978-81 (1996).
123. Menezes, J.R., Smith, C.M., Nelson, K.C. & Luskin, M.B. The division of neuronal progenitor cells during migration in the neonatal mammalian forebrain. *Mol Cell Neurosci* **6**, 496-508 (1995).
124. Nadarajah, B. & Parnavelas, J.G. Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* **3**, 423-32 (2002).
125. Wichterle, H., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron* **18**, 779-91 (1997).
126. Luskin, M.B. & Boone, M.S. Rate and pattern of migration of lineally-related olfactory bulb interneurons generated postnatally in the subventricular zone of the rat. *Chem Senses* **19**, 695-714 (1994).
127. Cremer, H. et al. Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* **367**, 455-9 (1994).
128. Tomasiewicz, H. et al. Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system. *Neuron* **11**, 1163-74 (1993).
129. Hu, H., Tomasiewicz, H., Magnuson, T. & Rutishauser, U. The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone. *Neuron* **16**, 735-43 (1996).
130. Chazal, G., Durbec, P., Jankovski, A., Rougon, G. & Cremer, H. Consequences of neural cell adhesion molecule deficiency on cell migration in the rostral migratory stream of the mouse. *J Neurosci* **20**, 1446-57 (2000).
131. Ocbina, P.J., Dizon, M.L., Shin, L. & Szele, F.G. Doublecortin is necessary for the migration of adult subventricular zone cells from neurospheres. *Mol Cell Neurosci* **33**, 126-35 (2006).
132. Tanaka, T. et al. Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration. *J Cell Biol* **165**, 709-21 (2004).
133. Tanaka, T. et al. Cdk5 phosphorylation of doublecortin ser297 regulates its effect on neuronal migration. *Neuron* **41**, 215-27 (2004).
134. Kim, M.H. et al. The DCX-domain tandems of doublecortin and doublecortin-like kinase. *Nat Struct Biol* **10**, 324-33 (2003).
135. Gleeson, J.G., Lin, P.T., Flanagan, L.A. & Walsh, C.A. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* **23**, 257-71 (1999).
136. Couillard-Despres, S. et al. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci* **21**, 1-14 (2005).
137. Ghashghaei, H.T., Lai, C. & Anton, E.S. Neuronal migration in the adult brain: are we there yet? *Nat Rev Neurosci* **8**, 141-51 (2007).
138. Kirschenbaum, B., Doetsch, F., Lois, C. & Alvarez-Buylla, A. Adult subventricular zone neuronal precursors continue to proliferate and migrate in the absence of the olfactory bulb. *J Neurosci* **19**, 2171-80 (1999).

139. Bovetti, S., Bovolín, P., Perroteau, I. & Puche, A.C. Subventricular zone-derived neuroblast migration to the olfactory bulb is modulated by matrix remodelling. *Eur J Neurosci* **25**, 2021-33 (2007).
140. Thomas, L.B., Gates, M.A. & Steindler, D.A. Young neurons from the adult subependymal zone proliferate and migrate along an astrocyte, extracellular matrix-rich pathway. *Glia* **17**, 1-14 (1996).
141. Gritti, A. et al. Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci* **22**, 437-45 (2002).
142. Bolteus, A.J. & Bordey, A. GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. *J Neurosci* **24**, 7623-31 (2004).
143. Liesi, P. Laminin-immunoreactive glia distinguish regenerative adult CNS systems from non-regenerative ones. *Embo J* **4**, 2505-11 (1985).
144. Emsley, J.G. & Hagg, T. alpha6beta1 integrin directs migration of neuronal precursors in adult mouse forebrain. *Exp Neurol* **183**, 273-85 (2003).
145. Lim, D.A. & Alvarez-Buylla, A. Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7526-31 (1999).
146. Bolteus, A.J., Garganta, C. & Bordey, A. Assays for measuring extracellular GABA levels and cell migration rate in acute slices. *Brain Res Brain Res Protoc* **14**, 126-34 (2005).
147. Peretto, P., Giachino, C., Aimar, P., Fasolo, A. & Bonfanti, L. Chain formation and glial tube assembly in the shift from neonatal to adult subventricular zone of the rodent forebrain. *J Comp Neurol* **487**, 407-27 (2005).
148. Peretto, P., Merighi, A., Fasolo, A. & Bonfanti, L. Glial tubes in the rostral migratory stream of the adult rat. *Brain Res Bull* **42**, 9-21 (1997).
149. Peretto, P., Merighi, A., Fasolo, A. & Bonfanti, L. The subependymal layer in rodents: a site of structural plasticity and cell migration in the adult mammalian brain. *Brain Res Bull* **49**, 221-43 (1999).
150. Kornack, D.R. & Rakic, P. The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4752-7 (2001).
151. Sanai, N. et al. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* **427**, 740-4 (2004).
152. Curtis, M.A. et al. Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science* **315**, 1243-9 (2007).
153. Kohwi, M., Osumi, N., Rubenstein, J.L. & Alvarez-Buylla, A. Pax6 is required for making specific subpopulations of granule and periglomerular neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* **25**, 6997-7003 (2005).
154. Hack, I., Bancila, M., Loulier, K., Carroll, P. & Cremer, H. Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis. *Nat Neurosci* **5**, 939-45 (2002).
155. Puopolo, M. & Belluzzi, O. Functional heterogeneity of periglomerular cells in the rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* **10**, 1073-83 (1998).
156. Parrish-Aungst, S., Shipley, M.T., Erdelyi, F., Szabo, G. & Puche, A.C. Quantitative analysis of neuronal diversity in the mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol* **501**, 825-36 (2007).
157. Kosaka, K. & Kosaka, T. synaptic organization of the glomerulus in the main olfactory bulb: compartments of the glomerulus and heterogeneity of the periglomerular cells. *Anat Sci Int* **80**, 80-90 (2005).
158. Petreanu, L. & Alvarez-Buylla, A. Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci* **22**, 6106-13 (2002).
159. Winner, B., Cooper-Kuhn, C.M., Aigner, R., Winkler, J. & Kuhn, H.G. Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* **16**, 1681-9 (2002).
160. Kohwi, M. et al. A subpopulation of olfactory bulb GABAergic interneurons is derived from Emx1- and Dlx5/6-expressing progenitors. *J Neurosci* **27**, 6878-91 (2007).

161. Baker, H. et al. Phenotypic differentiation during migration of dopaminergic progenitor cells to the olfactory bulb. *J Neurosci* **21**, 8505-13 (2001).
162. Corotto, F.S., Henegar, J.R. & Maruniak, J.A. Odor deprivation leads to reduced neurogenesis and reduced neuronal survival in the olfactory bulb of the adult mouse. *Neuroscience* **61**, 739-44 (1994).
163. Bovetti, S., Peretto, P., Fasolo, A. & De Marchis, S. Spatio-temporal specification of olfactory bulb interneurons. *J Mol Histol* (2007).
164. De Marchis, S. et al. GABAergic phenotypic differentiation of a subpopulation of subventricular derived migrating progenitors. *Eur J Neurosci* **20**, 1307-17 (2004).
165. Hack, M.A. et al. Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nat Neurosci* **8**, 865-72 (2005).
166. Seri, B., Garcia-Verdugo, J.M., McEwen, B.S. & Alvarez-Buylla, A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* **21**, 7153-60 (2001).
167. Kuhn, H.G., Winkler, J., Kempermann, G., Thal, L.J. & Gage, F.H. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* **17**, 5820-9 (1997).
168. Kaplan, M.S. Formation and turnover of neurons in young and senescent animals: an electronmicroscopic and morphometric analysis. *Ann N Y Acad Sci* **457**, 173-92 (1985).
169. Fuchs, E. Scratching the surface of skin development. *Nature* **445**, 834-42 (2007).
170. Xie, T. & Li, L. Stem cells and their niche: an inseparable relationship. *Development* **134**, 2001-6 (2007).
171. Scheres, B. Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 345-54 (2007).
172. Ma, D.K., Ming, G.L. & Song, H. Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* **15**, 514-20 (2005).
173. Palmer, T.D., Willhoite, A.R. & Gage, F.H. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* **425**, 479-94 (2000).
174. Chopp, M., Zhang, Z.G. & Jiang, Q. Neurogenesis, angiogenesis, and MRI indices of functional recovery from stroke. *Stroke* **38**, 827-31 (2007).
175. Horner, P.J. & Palmer, T.D. New roles for astrocytes: the nightlife of an 'astrocyte'. La vida local! *Trends Neurosci* **26**, 597-603 (2003).
176. Nedergaard, M., Ransom, B. & Goldman, S.A. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* **26**, 523-30 (2003).
177. Ridet, J.L., Malhotra, S.K., Privat, A. & Gage, F.H. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* **20**, 570-7 (1997).
178. Lafon-Cazal, M. et al. Proteomic analysis of astrocytic secretion in the mouse. Comparison with the cerebrospinal fluid proteome. *J Biol Chem* **278**, 24438-48 (2003).
179. Ghashghaei, H.T. et al. The role of neuregulin-ErbB4 interactions on the proliferation and organization of cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1930-5 (2006).
180. Song, H., Stevens, C.F. & Gage, F.H. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* **417**, 39-44 (2002).
181. Christopherson, K.S. et al. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* **120**, 421-33 (2005).
182. Ullian, E.M., Sapperstein, S.K., Christopherson, K.S. & Barres, B.A. Control of synapse number by glia. *Science* **291**, 657-61 (2001).
183. Mason, H.A., Ito, S. & Corfas, G. Extracellular signals that regulate the tangential migration of olfactory bulb neuronal precursors: inducers, inhibitors, and repellents. *J Neurosci* **21**, 7654-63 (2001).
184. Hama, H., Hara, C., Yamaguchi, K. & Miyawaki, A. PKC signaling mediates global enhancement of excitatory synaptogenesis in neurons triggered by local contact with astrocytes. *Neuron* **41**, 405-15 (2004).

185. Palmer, T.D. Adult neurogenesis and the vascular Nietzsche. *Neuron* **34**, 856-8 (2002).
186. Louissaint, A., Jr., Rao, S., Leventhal, C. & Goldman, S.A. Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. *Neuron* **34**, 945-60 (2002).
187. Corotto, F.S., Henegar, J.A. & Maruniak, J.A. Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain. *Neurosci Lett* **149**, 111-4 (1993).
188. Bovetti, S. et al. Blood vessels form a scaffold for neuroblast migration in the adult olfactory bulb. *J Neurosci* **27**, 5976-80 (2007).
189. Shen, Q. et al. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* **304**, 1338-40 (2004).
190. Androutsellis-Theotokis, A. et al. Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo. *Nature* **442**, 823-6 (2006).
191. Ohtsuka, T., Sakamoto, M., Guillemot, F. & Kageyama, R. Roles of the basic helix-loop-helix genes *Hes1* and *Hes5* in expansion of neural stem cells of the developing brain. *J Biol Chem* **276**, 30467-74 (2001).
192. Shah, N.M., Groves, A.K. & Anderson, D.J. Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members. *Cell* **85**, 331-43 (1996).
193. Mi, H., Haeberle, H. & Barres, B.A. Induction of astrocyte differentiation by endothelial cells. *J Neurosci* **21**, 1538-47 (2001).
194. Risau, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671-4 (1997).
195. Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* **25**, 581-611 (2004).
196. Karkkainen, M.J. et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* **5**, 74-80 (2004).
197. Karpanen, T. et al. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res* **61**, 1786-90 (2001).
198. Eichmann, A., Le Noble, F., Autiero, M. & Carmeliet, P. Guidance of vascular and neural network formation. *Curr Opin Neurobiol* **15**, 108-15 (2005).
199. Takahashi, H. & Shibuya, M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* **109**, 227-41 (2005).
200. Ferrara, N., Gerber, H.P. & LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* **9**, 669-76 (2003).
201. Tammela, T., Enholm, B., Alitalo, K. & Paavonen, K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* **65**, 550-63 (2005).
202. Senger, D.R. et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* **219**, 983-5 (1983).
203. Connolly, D.T. et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* **84**, 1470-8 (1989).
204. Ferrara, N. & Henzel, W.J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **161**, 851-8 (1989).
205. Ferrara, N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**, C1358-66 (2001).
206. Robinson, C.J. & Stringer, S.E. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* **114**, 853-65 (2001).
207. Vincenti, V., Cassano, C., Rocchi, M. & Persico, G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* **93**, 1493-5 (1996).
208. Carmeliet, P. et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**, 435-9 (1996).
209. Raab, S. et al. Impaired brain angiogenesis and neuronal apoptosis induced by conditional homozygous inactivation of vascular endothelial growth factor. *Thromb Haemost* **91**, 595-605 (2004).

210. Alon, T. et al. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* **1**, 1024-8 (1995).
211. Benjamin, L.E. & Keshet, E. Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8761-6 (1997).
212. Gerber, H.P. et al. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* **126**, 1149-59 (1999).
213. Lee, S. et al. Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell* **130**, 691-703 (2007).
214. Gerhardt, H. et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* **161**, 1163-77 (2003).
215. Ruhrberg, C. et al. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev* **16**, 2684-98 (2002).
216. Friedlander, M. et al. Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science* **270**, 1500-2 (1995).
217. Varner, J.A., Brooks, P.C. & Cheresh, D.A. REVIEW: the integrin alpha V beta 3: angiogenesis and apoptosis. *Cell Adhes Commun* **3**, 367-74 (1995).
218. Ferrara, N. et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* **380**, 439-42 (1996).
219. Haigh, J.J. et al. Cortical and retinal defects caused by dosage-dependent reductions in VEGF-A paracrine signaling. *Dev Biol* **262**, 225-41 (2003).
220. Forsythe, J.A. et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* **16**, 4604-13 (1996).
221. Levy, A.P., Levy, N.S., Wegner, S. & Goldberg, M.A. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem* **270**, 13333-40 (1995).
222. Liu, Y., Cox, S.R., Morita, T. & Kourembanas, S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res* **77**, 638-43 (1995).
223. Pugh, C.W. & Ratcliffe, P.J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* **9**, 677-84 (2003).
224. Olofsson, B. et al. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2576-81 (1996).
225. Olofsson, B. et al. Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform. *J Biol Chem* **271**, 19310-7 (1996).
226. Silvestre, J.S. et al. Vascular endothelial growth factor-B promotes in vivo angiogenesis. *Circ Res* **93**, 114-23 (2003).
227. Aase, K. et al. Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice display an atrial conduction defect. *Circulation* **104**, 358-64 (2001).
228. Bellomo, D. et al. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (*Vegfb*) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res* **86**, E29-35 (2000).
229. Mould, A.W. et al. *Vegfb* gene knockout mice display reduced pathology and synovial angiogenesis in both antigen-induced and collagen-induced models of arthritis. *Arthritis Rheum* **48**, 2660-9 (2003).
230. Sun, Y. et al. Increased severity of cerebral ischemic injury in vascular endothelial growth factor-B-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **24**, 1146-52 (2004).
231. Maglione, D., Guerriero, V., Viglietto, G., Delli-Bovi, P. & Persico, M.G. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9267-71 (1991).

232. Cao, Y., Ji, W.R., Qi, P., Rosin, A. & Cao, Y. Placenta growth factor: identification and characterization of a novel isoform generated by RNA alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* **235**, 493-8 (1997).
233. Yang, W., Ahn, H., Hinrichs, M., Torry, R.J. & Torry, D.S. Evidence of a novel isoform of placenta growth factor (PlGF-4) expressed in human trophoblast and endothelial cells. *J Reprod Immunol* **60**, 53-60 (2003).
234. Carmeliet, P. et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* **7**, 575-83 (2001).
235. Odoriso, T. et al. Mice overexpressing placenta growth factor exhibit increased vascularization and vessel permeability. *J Cell Sci* **115**, 2559-67 (2002).
236. Gerber, H.P., Condorelli, F., Park, J. & Ferrara, N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* **272**, 23659-67 (1997).
237. Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M. & Heldin, C.H. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* **269**, 26988-95 (1994).
238. de Vries, C. et al. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* **255**, 989-91 (1992).
239. Fong, G.H., Rossant, J., Gertsenstein, M. & Breitman, M.L. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* **376**, 66-70 (1995).
240. Fong, G.H., Zhang, L., Bryce, D.M. & Peng, J. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development* **126**, 3015-25 (1999).
241. Shibuya, M. & Claesson-Welsh, L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* **312**, 549-60 (2006).
242. Vogel, C. et al. Flt-1, but not Flk-1 mediates hyperpermeability through activation of the PI3-K/Akt pathway. *J Cell Physiol* **212**, 236-43 (2007).
243. Sawano, A., Takahashi, T., Yamaguchi, S. & Shibuya, M. The phosphorylated 1169-tyrosine containing region of flt-1 kinase (VEGFR-1) is a major binding site for PLCgamma. *Biochem Biophys Res Commun* **238**, 487-91 (1997).
244. Hattori, K. et al. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med* **8**, 841-9 (2002).
245. Lyden, D. et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* **7**, 1194-201 (2001).
246. Kearney, J.B. et al. Vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 negatively regulates developmental blood vessel formation by modulating endothelial cell division. *Blood* **99**, 2397-407 (2002).
247. Autiero, M. et al. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* **9**, 936-43 (2003).
248. Rahimi, N., Dayanir, V. & Lashkari, K. Receptor chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) modulates mitogenic activity of VEGFR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem* **275**, 16986-92 (2000).
249. Brockington, A., Lewis, C., Wharton, S. & Shaw, P.J. Vascular endothelial growth factor and the nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol* **30**, 427-46 (2004).
250. Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T. & Shibuya, M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9349-54 (1998).
251. Hiratsuka, S. et al. Membrane fixation of vascular endothelial growth factor receptor 1 ligand-binding domain is important for vasculogenesis and angiogenesis in mice. *Mol Cell Biol* **25**, 346-54 (2005).

252. Kroll, J. & Waltenberger, J. The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* **272**, 32521-7 (1997).
253. Matsumoto, T. & Claesson-Welsh, L. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE* **2001**, RE21 (2001).
254. Ogunshola, O.O. et al. Paracrine and autocrine functions of neuronal vascular endothelial growth factor (VEGF) in the central nervous system. *J Biol Chem* **277**, 11410-5 (2002).
255. Wick, A. et al. Neuroprotection by hypoxic preconditioning requires sequential activation of vascular endothelial growth factor receptor and Akt. *J Neurosci* **22**, 6401-7 (2002).
256. Matsuzaki, H. et al. Vascular endothelial growth factor rescues hippocampal neurons from glutamate-induced toxicity: signal transduction cascades. *Faseb J* **15**, 1218-20 (2001).
257. Neufeld, G. et al. The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* **12**, 13-9 (2002).
258. Soker, S., Miao, H.Q., Nomi, M., Takashima, S. & Klagsbrun, M. VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *J Cell Biochem* **85**, 357-68 (2002).
259. Favier, B. et al. Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration. *Blood* **108**, 1243-50 (2006).
260. Mac Gabhann, F. & Popel, A.S. Interactions of VEGF isoforms with VEGFR-1, VEGFR-2, and neuropilin in vivo: a computational model of human skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**, H459-74 (2007).
261. Fuh, G., Garcia, K.C. & de Vos, A.M. The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1. *J Biol Chem* **275**, 26690-5 (2000).
262. Kitsukawa, T., Shimono, A., Kawakami, A., Kondoh, H. & Fujisawa, H. Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development* **121**, 4309-18 (1995).
263. Kawasaki, T. et al. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* **126**, 4895-902 (1999).
264. Yuan, L. et al. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development* **129**, 4797-806 (2002).
265. Wang, Y. et al. VEGF-overexpressing transgenic mice show enhanced post-ischemic neurogenesis and neuromigration. *J Neurosci Res* **85**, 740-7 (2007).
266. Zhang, H., Vutskits, L., Pepper, M.S. & Kiss, J.Z. VEGF is a chemoattractant for FGF-2-stimulated neural progenitors. *J Cell Biol* **163**, 1375-84 (2003).
267. Balenci, L. et al. IQGAP1 regulates adult neural progenitors in vivo and vascular endothelial growth factor-triggered neural progenitor migration in vitro. *J Neurosci* **27**, 4716-24 (2007).
268. Schwarz, Q. et al. Vascular endothelial growth factor controls neuronal migration and cooperates with Sema3A to pattern distinct compartments of the facial nerve. *Genes Dev* **18**, 2822-34 (2004).
269. Jin, X. et al. Expression and function of vascular endothelial growth factor receptors (Flt-1 and Flk-1) in vascular adventitial fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* **43**, 292-300 (2007).
270. Clauss, M. et al. The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem* **271**, 17629-34 (1996).
271. Shibuya, M. Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1). *Int J Biochem Cell Biol* **33**, 409-20 (2001).
272. Fragoso, R. et al. VEGFR-1 (FLT-1) activation modulates acute lymphoblastic leukemia localization and survival within the bone marrow, determining the onset of extramedullary disease. *Blood* **107**, 1608-16 (2006).

273. Pillozzi, S. et al. VEGFR-1 (FLT-1), beta1 integrin, and hERG K⁺ channel for a macromolecular signaling complex in acute myeloid leukemia: role in cell migration and clinical outcome. *Blood* **110**, 1238-50 (2007).
274. Orecchia, A. et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 is deposited in the extracellular matrix by endothelial cells and is a ligand for the alpha 5 beta 1 integrin. *J Cell Sci* **116**, 3479-89 (2003).
275. Breier, G., Albrecht, U., Sterrer, S. & Risau, W. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* **114**, 521-32 (1992).
276. Ogunshola, O.O. et al. Neuronal VEGF expression correlates with angiogenesis in postnatal developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* **119**, 139-53 (2000).
277. Yang, K. & Cepko, C.L. Flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor (VEGF), is expressed by retinal progenitor cells. *J Neurosci* **16**, 6089-99 (1996).
278. Yourey, P.A., Gohari, S., Su, J.L. & Alderson, R.F. Vascular endothelial cell growth factors promote the in vitro development of rat photoreceptor cells. *J Neurosci* **20**, 6781-8 (2000).
279. Robinson, G.S. et al. Nonvascular role for VEGF: VEGFR-1, 2 activity is critical for neural retinal development. *Faseb J* **15**, 1215-7 (2001).
280. Hashimoto, T., Zhang, X.M., Chen, B.Y. & Yang, X.J. VEGF activates divergent intracellular signaling components to regulate retinal progenitor cell proliferation and neuronal differentiation. *Development* **133**, 2201-10 (2006).
281. Meng, H. et al. Biphasic effects of exogenous VEGF on VEGF expression of adult neural progenitors. *Neurosci Lett* **393**, 97-101 (2006).
282. Maurer, M.H., Tripps, W.K., Feldmann, R.E., Jr. & Kuschinsky, W. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rat neural stem cells. *Neurosci Lett* **344**, 165-8 (2003).
283. Fabel, K. et al. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* **18**, 2803-12 (2003).
284. Rosenstein, J.M., Mani, N., Silverman, W.F. & Krum, J.M. Patterns of brain angiogenesis after vascular endothelial growth factor administration in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7086-91 (1998).
285. Krum, J.M. & Rosenstein, J.M. VEGF mRNA and its receptor flt-1 are expressed in reactive astrocytes following neural grafting and tumor cell implantation in the adult CNS. *Exp Neurol* **154**, 57-65 (1998).
286. Krum, J.M., Mani, N. & Rosenstein, J.M. Angiogenic and astroglial responses to vascular endothelial growth factor administration in adult rat brain. *Neuroscience* **110**, 589-604 (2002).
287. Krum, J.M. & Khaibullina, A. Inhibition of endogenous VEGF impedes revascularization and astroglial proliferation: roles for VEGF in brain repair. *Exp Neurol* **181**, 241-57 (2003).
288. Cao, L. et al. VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nat Genet* **36**, 827-35 (2004).
289. Yang, S.Z., Zhang, L.M., Huang, Y.L. & Sun, F.Y. Distribution of Flk-1 and Flt-1 receptors in neonatal and adult rat brains. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **274**, 851-6 (2003).
290. Sun, Y. et al. Vascular endothelial growth factor-B (VEGFB) stimulates neurogenesis: evidence from knockout mice and growth factor administration. *Dev Biol* **289**, 329-35 (2006).
291. Jin, K. et al. Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum. *Mol Cell Neurosci* **24**, 171-89 (2003).
292. Mullis, K. et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-73 (1986).
293. Williams, R.W. & Rakic, P. Three-dimensional counting: an accurate and direct method to estimate numbers of cells in sectioned material. *J Comp Neurol* **278**, 344-52 (1988).

294. Gundersen, H.J. et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis* **96**, 857-81 (1988).
295. Schaeren-Wiemers, N. & Gerfin-Moser, A. A single protocol to detect transcripts of various types and expression levels in neural tissue and cultured cells: in situ hybridization using digoxigenin-labelled cRNA probes. *Histochemistry* **100**, 431-40 (1993).
296. Breier, G., Clauss, M. & Risau, W. Coordinate expression of vascular endothelial growth factor receptor-1 (flt-1) and its ligand suggests a paracrine regulation of murine vascular development. *Dev Dyn* **204**, 228-39 (1995).
297. Ward, N.L. et al. Cerebral angiogenic factors, angiogenesis, and physiological response to chronic hypoxia differ among four commonly used mouse strains. *J Appl Physiol* **102**, 1927-35 (2007).
298. Kempermann, G., Kuhn, H.G. & Gage, F.H. Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10409-14 (1997).
299. Levison, S.W. & Goldman, J.E. Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. *Neuron* **10**, 201-12 (1993).
300. Marshall, C.A. & Goldman, J.E. Subpallial dlx2-expressing cells give rise to astrocytes and oligodendrocytes in the cerebral cortex and white matter. *J Neurosci* **22**, 9821-30 (2002).
301. Mullen, R.J., Buck, C.R. & Smith, A.M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* **116**, 201-11 (1992).
302. Kronenberg, G. et al. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol* **467**, 455-63 (2003).
303. Hall, P.A. et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* **162**, 285-94 (1990).
304. Adachi, K. et al. {beta}-catenin Signaling Promotes Proliferation of Progenitor Cells in the Adult Mouse Subventricular Zone. *Stem Cells* (2007).
305. Lie, D.C., Song, H., Colamarino, S.A., Ming, G.L. & Gage, F.H. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**, 399-421 (2004).
306. Kempermann, G., Kuhn, H.G. & Gage, F.H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* **386**, 493-5 (1997).
307. van Praag, H., Christie, B.R., Sejnowski, T.J. & Gage, F.H. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13427-31 (1999).
308. van Praag, H., Kempermann, G. & Gage, F.H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* **2**, 266-70 (1999).
309. Gratzner, H.G. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* **218**, 474-5 (1982).
310. Dolbeare, F. Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part I: Historical perspectives, histochemical methods and cell kinetics. *Histochem J* **27**, 339-69 (1995).
311. Cameron, H.A. & McKay, R.D. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* **435**, 406-17 (2001).
312. Kempermann, G. Adult Neurogenesis: Stem Cells and Neuronal Development in the Adult Brain. *Oxford University Press, Inc.* (2006).
313. Lee, T.H. et al. Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. *PLoS Med* **4**, e186 (2007).
314. Ming, G.L. & Song, H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* **28**, 223-50 (2005).

315. Tonchev, A.B., Yamashima, T., Guo, J., Chaldakov, G.N. & Takakura, N. Expression of angiogenic and neurotrophic factors in the progenitor cell niche of adult monkey subventricular zone. *Neuroscience* **144**, 1425-35 (2007).
316. Yamashima, T., Tonchev, A.B. & Yukie, M. Adult hippocampal neurogenesis in rodents and primates: endogenous, enhanced, and engrafted. *Rev Neurosci* **18**, 67-82 (2007).
317. Kremer, C., Breier, G., Risau, W. & Plate, K.H. Up-regulation of flk-1/vascular endothelial growth factor receptor 2 by its ligand in a cerebral slice culture system. *Cancer Res* **57**, 3852-9 (1997).
318. Störkebaum, E. et al. Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. *Nat Neurosci* **8**, 85-92 (2005).
319. Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211-25 (2000).
320. Haglund, K. et al. Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol* **5**, 461-6 (2003).
321. Dikic, I. Mechanisms controlling EGF receptor endocytosis and degradation. *Biochem Soc Trans* **31**, 1178-81 (2003).
322. Cameron, H.A. & McKay, R.D. Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci* **2**, 894-7 (1999).
323. Xu, Q. et al. Hypoxia-induced astrocytes promote the migration of neural progenitor cells via vascular endothelial factor, stem cell factor, stromal-derived factor-1alpha and monocyte chemoattractant protein-1 upregulation in vitro. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **34**, 624-31 (2007).
324. Esser, S. et al. Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol* **140**, 947-59 (1998).
325. Shetty, A.K., Hattiangady, B. & Shetty, G.A. Stem/progenitor cell proliferation factors FGF-2, IGF-1, and VEGF exhibit early decline during the course of aging in the hippocampus: role of astrocytes. *Glia* **51**, 173-86 (2005).
326. Taupin, P. et al. FGF-2-responsive neural stem cell proliferation requires CCg, a novel autocrine/paracrine cofactor. *Neuron* **28**, 385-97 (2000).
327. Lie, D.C. et al. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* **437**, 1370-5 (2005).
328. Lim, D.A. et al. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* **28**, 713-26 (2000).
329. Nait-Oumesmar, B. et al. Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination. *Eur J Neurosci* **11**, 4357-66 (1999).
330. van Nieuw Amerongen, G.P., Koolwijk, P., Versteilen, A. & van Hinsbergh, V.W. Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in VEGF-induced endothelial cell migration and angiogenesis in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 211-7 (2003).
331. Gingras, D., Lamy, S. & Beliveau, R. Tyrosine phosphorylation of the vascular endothelial-growth-factor receptor-2 (VEGFR-2) is modulated by Rho proteins. *Biochem J* **348 Pt 2**, 273-80 (2000).
332. Chiaramello, S. et al. BDNF/ TrkB interaction regulates migration of SVZ precursor cells via PI3-K and MAP-K signalling pathways. *Eur J Neurosci* **26**, 1780-90 (2007).