

**Kartierung des Zellschicksals von C-X-C-Motiv
Chemokin-Rezeptor 4-exprimierenden dopaminergen
Vorläuferzellen im ventralen Mittelhirn**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Franca Laura Fries

aus Nürnberg

2023

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: Prof. Dr. Sandra Blaess
2. Gutachterin: Prof. Dr. Susanne Schoch-McGovern

Tag der Mündlichen Prüfung: 14.09.2023

Aus dem Institut für Rekonstruktive Neurobiologie
Direktor: Prof. Dr. Oliver Brüstle

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1.	Einleitung	11
1.1	Ziel der Arbeit.....	11
1.2	Diversität der mDAN im adulten Gehirn	11
1.2.1	Organisation und Funktionen von mDAN.....	13
1.2.2	Relevanz der Diversität der mDAN beim Morbus Parkinson.....	16
1.3	Entwicklung der mDAN	18
1.3.1	Induktion des Mittelhirns	20
1.3.1.1	Entwicklung der rostro-kaudalen Achse.....	20
1.3.1.2	Entwicklung der dorso-ventralen Achse.....	22
1.3.1.3	mDA Vorläuferdomäne.....	23
1.3.1.4	Neurogenese und Differenzierung	23
1.3.1.5	Migration	24
1.4	Modelle zur Entstehung der Diversität der mDAN (Räumliches und zeitliches Schema).....	25
1.4.1	Modell A: Räumlich	25
1.4.2	Modell B: Zeitlich.....	27
1.4.3	Methoden zur Erforschung der Abstammung von Neuronen	30
1.5	CXCR4.....	36
1.5.1	Chemokine und ihre Rezeptoren	36
1.5.2	Physiologische Funktionen des CXCR4/CXCL12 Signalwegs in der Entwicklung	37
1.5.3	Pathologische Funktionen des Komplexes CXCR4/CXCL12 im Gehirn	38

1.5.4	Expression von CXCR4 und CXCL12 im embryonalen Mesencephalon	38
1.6	Fragestellungen der Arbeit.....	38
2.	Material und Methoden	40
2.1	Geräte und Software	40
2.2	Material	42
2.3	Mäuse	48
2.3.1	Mauszucht und -haltung.....	48
2.3.2	Mausgenetik.....	49
2.3.3	Verabreichung von Tamoxifen	52
2.4	Molekularbiologie	53
2.4.1	Genotypisierung der Mäuse	53
2.5	Histologie	58
2.5.1	Gewebepräparation und Fixierung.....	58
2.5.2	Einbetten des Gewebes	58
2.5.3	Erstellen von Kryoschnitten.....	58
2.6	Markerproteine von mDAN.....	59
2.6.1	Immunhistochemische Färbungen	59
2.7	Mikroskopie und Analyse der gefärbten Gewebeschnitte	61
2.7.1	Mikroskopie der gefärbten Schnitte.....	61
2.7.2	Analyse der aufgenommenen Bilder der induzierbaren genetischen Strategie zur Kartierung des Zellschicksals.....	62
2.8	Statistische Auswertung.....	64
2.8.1	KoLokAn in SNpc und VTA	64
2.8.2	Verteilung des KoLokAn entlang der rostro-kaudalen Achse zu verschiedenen Induktionszeitpunkten	66

3.	Ergebnisse	68
3.1	Charakterisierung der <i>Cxcr4</i> ^{CreER} -Mauslinie.....	68
3.1.1	Markierung von nicht-DA Zellen, insb. Vorläuferzellen in der Ventrikularzone und in der Mittellinie	69
3.1.2	Beitrag der <i>Cxcr4</i> -Linie zu DAN und anderen Bereichen des Mittelhirns nach Induktion der Markierung zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten	75
3.1.2.1	Beitrag der <i>Cxcr4</i> -abstammenden Zellen zu den Kerngebiete SNpc, VTA, CLN und RRF.....	75
3.1.2.2	Beitrag der <i>Cxcr4</i> -Linie zu vier Bereichen entlang der rostro-kaudalen Achse des Mittelhirns.....	81
3.2	Analyse des Beitrages <i>Cxcr4</i> -abstammender Zellen zu mDAN nach Induktion zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten – quantitative Analyse.....	87
3.2.1	Kolokalisierung in den Kerngebieten SNpc und VTA über verschiedene Induktionszeitpunkte hinweg	88
3.2.2	Vergleich des KoLokAn der rostro-kaudalen a bis c Bereiche	91
3.2.3	Detaillierte Analyse der Unterschiede des KoLokAn nach Induktionszeitpunkt in verschiedenen rostro-kaudalen Bereichen der SNpc und des VTA	94
3.3	Intersektionelle Kartierung des Beitrags der <i>Cxcr4</i> -Linie zu mDAN	96
4.	Diskussion	103
4.1	Induzierbare Strategie zur Kartierung des Zellschicksals der <i>Cxcr4</i> -Linie markiert auch Vorläuferzellen in der Ventrikularzone.....	104
4.2	Kartierung des Zellschicksals der <i>Cxcr4</i> -Linie deutet auf eine zunehmenden Kompetenzrestriktion der DA Vorläuferzellen im Verlauf der embryonalen Entwicklung hin	105
4.3	Einordnung in bisherige Studienergebnisse.....	107
4.4	Methodische Limitationen dieser Studie	110
4.4.1	Anzahl untersuchter Embryonen/Tiere pro Induktionszeitpunkt.....	110

4.4.2	Induzierbare genetische Methode zur Kartierung des Zellschicksals.....	111
4.4.3	Bildbearbeitung- und Auswertung.....	113
4.5	Ausblick.....	114
4.5.1	Kausalität.....	116
4.5.2	Translation der Erkenntnisse auf humane Zellentwicklung und Therapiestrategien.....	117
5.	Zusammenfassung	119
6.	Abbildungsverzeichnis	120
7.	Tabellenverzeichnis	123
8.	Literaturverzeichnis	124
9.	Danksagung	140

Abkürzungsverzeichnis

A8	mDAN im RRF
A9	mDAN in der SNpc
A10	mDAN im VTA
ACC	Anterior cingulärer Kortex
ALDH1A1	Aldehyd Dehydrogenase 1a1
ANOVA	Varianzanalyse (ANalysis Of VAriance)
ARX	Aristaless related homeobox
BMP	Bone Morphogenetic Proteine
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
CALB1	Calbindin 1
CCR7	CXC Motif Chemokin Rezeptor 7
CLN	Kaudaler Nucleus linearis (engl. Caudal linear nucleus)
Cre	Cre DNA-Rekombinase
CreER	Fusionsprotein aus Cre und modifiziertem Estrogenrezeptor
CXCL12	Chemokin C-X-C Motif Chemokine Ligand 12 <i>Alternative Abkürzung:</i> SDF1 alpha oder beta (Stromal Cell-Derived Factor 1)
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptors 4 (Protein)
<i>Cxcr4</i>	CXC-Motiv-Chemokinrezeptors 4 (mRNA oder Gen) <i>Analog für anderen Faktoren</i>
DA	Dopamin/-erg/-e
DAN	Dopaminerge Neurone
DAT	Dopamintransporter
DLS	Dorsolaterales Striatum
DML	Dorsomediales Striatum
DMRTA2	Doublesex and mab-3 related transcription factor like Family A2 (Alternative Abkürzung in der Literatur: DMRT5)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribunukleinsäure

E10	Embryonaler Entwicklungstag 10, analog für weitere Entwicklungstage
EGFP	Grün fluoreszierende Protein (engl. enhanced green fluorescent protein)
EN1 und 2	Engrailed 1 und 2
ER	Estrogenrezeptor
ERK-2	Extrazellulär Signal-Regulierte Kinase 2
FGF8	Morphogene Fibroblast Growth Factor 8
FOXA1 und 2	Forkheadbox A1 und 2
G1	Gen 1, analog Gen 2 usw.
GABA	Gamma Amino Buttersäure
GAT1 und 4	GABA Transporter 1 und 4
GBX2	Gastrulation Brain Homeobox 2
GLI1	Glioma-Associated Oncogene Homolog 1
GP	Globus pallidus
HIV	Humananes Immundefizienz-Virus
HSP90	Hitzeschockprotein 90
HTR3+	Serotonin Rezeptor 3a positiv
IL	Infralimbischer Kortex
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle (engl. „internal ribosomal entry site“)
KCNJ6	G-Protein-aktivierter einwärtsgerichteter Kaliumkanal 2
KoLokAn	Kolokalisierungsanteil
kSt	kaudaler Anteil des Striatums
LMX1A und B	LIM Homeobox Transkriptionsfaktor 1 Alpha und Beta
M	Mutant
mDAN	Dopaminerge Neurone des Mittelhirns
MGE-Vorläufer	Vorläufer der medialen Ganglieneminenz
NAc	Nucleus accumbens
NC	Nucleus caudatus
NDS	Normales Esels-Serum, von engl. „normal donkey serum“
NEZ	Neuroepitheliale Zellen

NKX2-1	NK2 Homeobox 1
NR4A2	Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 2 (Alternative Abkürzung in der Literatur: NURR1)
OTX2	Orthodenticle Homeobox 2
P0	postnataler Tag 0, analog für weitere Entwicklungsstadien
PAX2 und 5	Paired Box 2 und 5
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PBSF	Pre-B-Cell-Growth-Stimulating Factor
PBT	Polybutylenterephthalat
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PFC	Präfrontaler Kortex
PITX3	Paired Like Homeodomain 3
PK-B	Proteinkinase B
PN	Projektionsneuronen
PrL	Prälimbischer Kortex
PV+	Parvalbumin positiv
RGB Modus	RedGreenBlue Modus
RGZ	Radiale Gliazellen
RRF	Retro-Rubrale Regionen
RT	Raumtemperatur
SHH	Sonig Hedgehog
SN	Substantia nigra
SNpc	Substantia nigra pars compacta
SNr	Substantia nigra reticularis
SOX6	SRY-Box Transkriptions Faktor 6
SST+	Somatostatin positiv
tdT	tdTomato
TEA Puffer	Tris Acetat EDTA Puffer
TH	Tyrosin Hydroxylase
TH+	Thyrosin Hydroxylase positiv/e
TM	Tamoxifen

TO	Tuberculum Olfactorium
TRE	Tetracycline Responsive Element
tTA	Tetracyclin-Controlled Transactivator
VGLUT2	Vesikulärer Glutamat-Transporter 2
vIPAG	Ventro-laterales periaquäduktales Grau
VMAT	Vesikulärer Monoamin-Transporter
VMAT2	Vesikulärer Monoamin-Transporter 2
VTA	Ventrales tegmentales Areal
VZ	Ventrikularzone
W	Wildtyp
WNT1	Wingless-Type Mouse-Mamma-Tumor-Virus Integration Site Family 1
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Ziel der Arbeit

Verluste dopaminergener Neurone des Mittelhirns (mDAN) sind mit schweren motorischen Defiziten, wie etwa beim Morbus Parkinson, vergesellschaftet. Neuropsychiatrische Krankheiten wie Depressionen, Schizophrenie und Drogenabusus werden mit einer veränderten Dopamintransmission in Verbindung gebracht (Grace 2016; Sonnenschein et al. 2020; Surmeier et al. 2017; Volkow und Morales 2015). Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre zeigen, dass die mDAN eine große Diversität aufweisen. Die detaillierte Kenntnis der Diversität der mDAN und deren Entstehung ist essentiell, um physiologische Mechanismen und Pathomechanismen von Erkrankungen des dopaminergen (DA) Systems besser zu verstehen und so Diagnostik und zielgerichtete Therapien der Erkrankungen zu konzipieren (Poulin et al. 2020). mDAN werden in der Maus zwischen dem embryonalen Entwicklungstag 10 (E10) und E14 in der Ventrikularzone des ventralen Mittelhirns generiert. Die Diversität der mDAN, sowie die Entstehung von Subtypen könnte, zumindest teilweise, durch ein sich allmählich veränderndes Entwicklungspotential der DA-Vorläufer-Zellen des Mittelhirns während dieser Zeitspanne, bedingt sein. Um diese Hypothese zu untersuchen, sollen neu geborene mDAN zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen E10 und E14 permanent markiert werden, um anschließend zu verfolgen, ob ein bestimmter Entstehungszeitpunkt mit einem bestimmten Subtyp von mDAN korreliert. Das Expressionsmuster des C-X-C-Motiv-Chemokinrezeptors 4 (CXCR4) im embryonalen Mittelhirn (Bodea et al. 2014; Yang et al. 2013) lässt vermuten, dass seine Expression einen guten Marker für neu geborene mDAN darstellen könnte. Im Mausmodell nutzen wir eine Strategie zur Kartierung des Zellschicksals, welche auf einem induzierbaren Cre-LoxP-System beruht. Mit diesem experimentellen Ansatz lassen sich Zellen und ihre Nachkommen dauerhaft markieren, die zu einem bestimmten embryonalen Zeitpunkt das Gen *Cxcr4* exprimieren (Werner et al. 2020).

1.2 Diversität der mDAN im adulten Gehirn

Die Diversität von mDAN im zentralen Nervensystem (ZNS) lässt sich anhand einer Vielzahl von Merkmalen beschreiben (**Abb. 1**). Klassischerweise werden die mDAN nach anatomischen Gesichtspunkten eingeteilt, daher soll diese Einteilung im Folgenden den roten Faden der Erläuterungen darstellen.

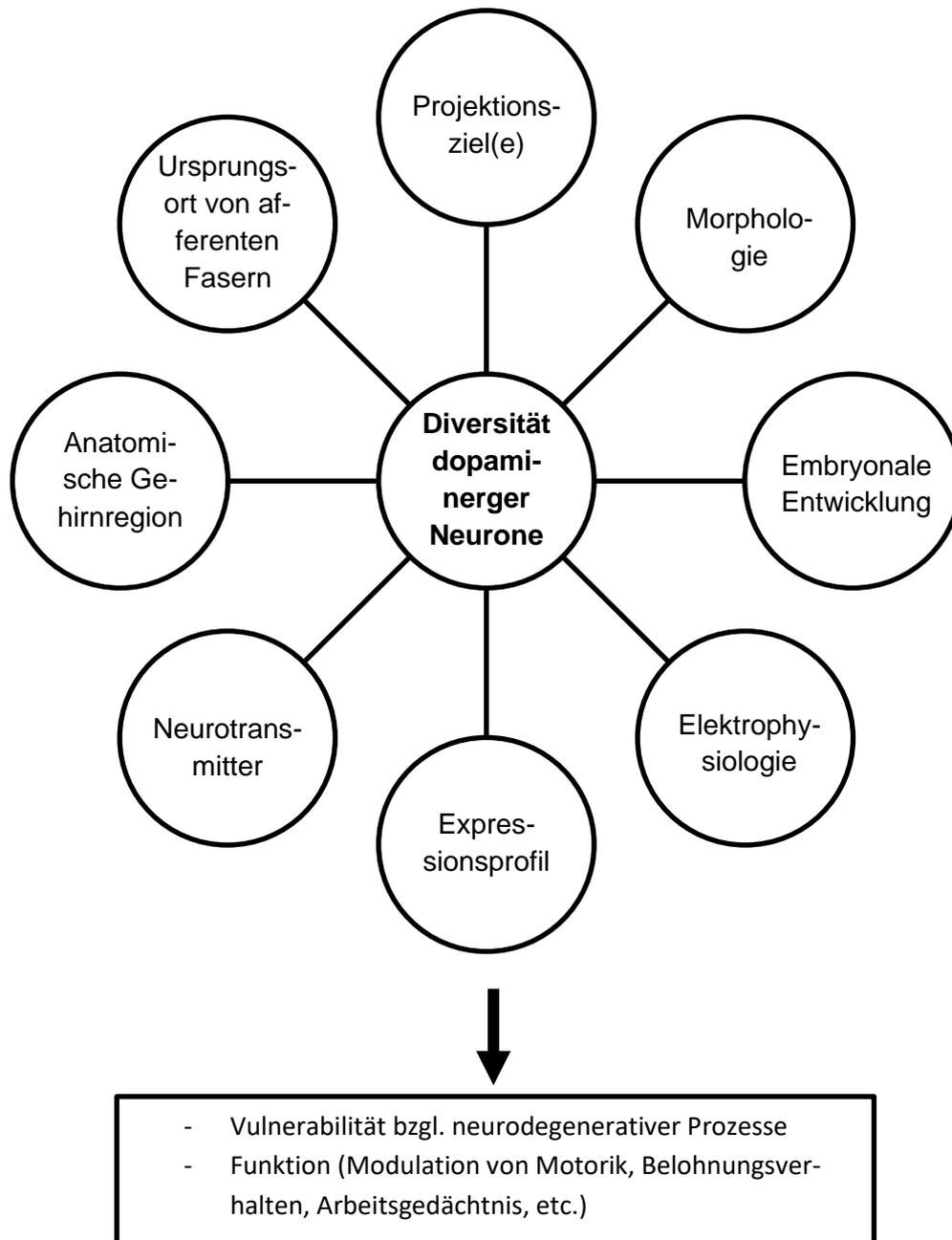


Abb. 1: Verschiedene Diversitätsmerkmale der mDAN

1.2.1 Organisation und Funktionen von mDAN

Dopaminerge Neurone (DAN) sind im zentralen Nervensystem in neun Zellgruppen (A8 - A17) organisiert. Sie befinden sich im Mittelhirn, Hypothalamus, Bulbus olfactorius und in der Retina (Björklund und Dunnett 2007; Dahlstoem und Fuxe 1964), wovon mDAN einen Anteil von etwa 75% an der Gesamtzahl ausmachen (Blaess und Ang 2015). mDAN lassen sich in die drei anatomischen Zellgruppen A8, A9 und A10 unterteilen (Björklund und Dunnett 2007; Dahlstoem und Fuxe 1964) (Vgl. **Abb.2**).

Diese Zellgruppen lassen sich größtenteils äquivalent zu den anatomischen Termini Substantia Nigra Pars Compacta (SNpc, A9), Area ventralis tegmentalis (VTA, A10) und Retro-Rubrale Region (RRF, nach dem englischen „Retro Rubral Field“, A8) nutzen, wobei die anatomischen Termini ebenfalls die im entsprechenden Areal liegenden nicht DA Zellen einschließen (Shepard 1988; Yetnikoff et al. 2014). In SNpc, VTA und RRF kommen neben mDAN auch glutamaterge Neurone vor, sowie Neurone die den inhibitorischen Transmitter Gamma Amino Buttersäure (GABAerge Neurone) ausschütten (Morales und Margolis 2017; Poulin et al. 2020) (Morales und Margolis 2017; Poulin et al. 2020). Außerdem kommen Neurone vor, welche mehrere verschiedene Transmitter freisetzen können. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass GABA von nigrostriatalen Axonen über den Vesikulären Monamintransporter 2 (VMAT2), welcher für die Ausschüttung von Dopamin bekannt ist, freigesetzt wird (Tritsch et al. 2012), wobei GABA sowohl durch die murinen GABA Transporter Subtypen 1 und 4 (GAT 1 und GAT 4) aufgenommen wird (Tritsch et al. 2014), als auch durch die Aldehyd Dehydrogenase 1a1 (ALDH1A1) hergestellt wird (Kim et al. 2015). Im mesokortikalen Signalweg wird Glutamat von einigen mDAN ausgeschüttet, die den vesikulären Glutamat-Transporter 2 (VGLUT2) exprimieren. Die neuronalen Zellkörper befinden sich hauptsächlich im medialen VTA (Hnasko et al. 2010; Stuber et al. 2010; Tecuapetla et al. 2010). Etwa 20-40 % der Zellen des VTA sind GABAerg (Carr und Sesack 2000; Nair-Roberts et al. 2008), der Anteil glutamaterger Neurone am VTA wird mit 2-3 % angegeben (Morales und Margolis 2017; Nair-Roberts et al. 2008; Yamaguchi et al. 2015).

A9 Zellgruppe

Die Zellgruppe A9 befindet sich im Bereich der SNpc, die im rostralen Mesencephalon und teilweise im kaudalen Dienzephalon zu finden ist. Die SNpc setzt sich beim Menschen

und einigen höher entwickelten Säugetierarten wie einigen Affenarten, Schafen und Pferden makroskopisch durch ihre dunkle Farbe, resultierend aus ihrem hohen Melanin-Gehalt, ab (Zecca et al. 2001). Ihre Axone projizieren hauptsächlich zum dorsalen Striatum (Bentivoglio et al. 1979; Poulin et al. 2018). Neben der SNpc befinden sich einige mDAN auch in der SN pars reticulata (SNr) und der SN lateralis (Björklund und Dunnett 2007; Ma 1989).

In Bezug auf motorische Funktionen sind mDAN der SNpc funktionell in die Regulation der Willkürmotorik eingebunden (Roeper 2013; Sulzer und Surmeier 2013). Durch ihre Dopaminrezeptor 1 (D1) - vermittelten exzitatorischen Impulse an das dorsale Striatum haben sie über die Basalganglienschleife einen disinhibitorischen Effekt auf den motorischen Kortex (Jankovic 2008).

In Bezug auf ihre neuropsychologische Rolle erforschten Lerner et al. 2015 die Einflüsse der SNpc auf das Belohnungssystem. Sie beschrieben zwei Subpopulationen von mDAN in der SNpc, eine medial gelegene Zellgruppe, welche Efferenzen zum dorso-medialen Striatum (DML) bildet und eine lateral gelegene Zellgruppe, welche Efferenzen zum dorso-lateralen Striatum (DLS) sendet. Diese Zellgruppen unterscheiden sich substantiell bezüglich ihrer Afferenzen und elektrophysiologischen Merkmale und reagieren mit konträren elektrophysiologischen Mustern auf aversive Stimuli. Zusammengefasst weisen die Ergebnisse darauf hin, dass weiter medial gelegene Neurone der SNpc Informationen über die Valenz des Stimulus weitergeben, während weiter lateral gelegene Neurone der SNpc Informationen über die Differenz zwischen erwarteter Belohnung und eingetretener Belohnung geben (Lerner et al. 2015).

A10 Zellgruppe

A10 mDAN befinden sich im VTA. Sie bilden zwei Hauptprojektionswege, das mesolimbische und das mesokortikale System. Im mesolimbischen System enden ihre Axone in limbischen Strukturen wie dem ventralen Striatum, Nucleus Accumbens (NAc) und Tuberculum Olfactorium (TO), im mesokortikalen System im anterioren cingulären Cortex (ACC), prälimbischen Cortex (PrL), Teilen der Amygdala, sowie infralimbischen Kortex (IL). Tendentiell senden mDAN in der lateralen VTA eher Efferenzen ins ventro-laterale Striatum (lateraler Anteil des Nucleus accumbens, und lateraler Anteil des TO) (Ikemoto 2007), während posteriomediale Neurone der VTA eher Efferenzen zum ventro-medialen

Striatum und zum medialen Anteil des TO, sowie zur basolateralen Amygdala und zum Präfrontalen Kortex (PFC) senden (Ikemoto 2007; Lammel et al. 2008). Im mesokortikalen System wird eine Innervation des gesamten Neokortex beim Primaten im Gegensatz zur relativ spezifischen Innervation des PFC in Nagetieren beobachtet (Björklund und Dunnett 2007).

A10 mDAN sind an der Regulation von Belohnungs- und Motivationsverhalten beteiligt (Koob und Volkow 2010). Überraschenderweise wurde gezeigt, dass sowohl aversive, wie auch angenehme Stimuli zu einer Erregung der mDAN im VTA führen können (Abercrombie et al. 1989; Bassareo et al. 2002; Lammel et al. 2014). Unklar ist, ob entsprechend der Valenz des Stimulus verschiedene Subpopulationen von mDAN erregt werden. Eine Studie an Ratten zeigte etwa, dass mDAN des dorsalen VTA eher durch unangenehme Stromstöße inhibiert wurden, während mDAN des ventralen VTA eher durch diese erregt wurden (Bassareo et al. 2002). Dies legt nahe, dass verschiedene Zellpopulationen die Valenz von Stimuli durch verschiedene elektrophysiologische Muster codieren. Darüber hinaus weisen einige Studien daraufhin, dass die genaue Rolle der mDAN des VTA in der Vorhersage einer Belohnung liegt, das heißt im Vergleich von erwarteter mit der real eingetretenen Belohnung (Cohen et al. 2012; D'Ardenne et al. 2008; Schultz 1997; Schultz 2007; Schultz 2010). Zusammenfassend ist umstritten, ob die Rolle der mDAN des VTA in der Verschlüsselung der Valenz eines Stimulus liegt oder in der Kodierung der Erwartung einer entsprechenden Belohnung (positiver und negativer Belohnungsvorhersagefehler) (Schultz 2010; Schultz 2017).

A8 Zellgruppe

A8 mDAN sind im RRF zu finden, wobei ihre Projektionen und Funktionen weniger genau bekannt sind. Es wird vermutet, dass sie an mesostriatalen, mesolimbischen und mesokortikalen Projektionswegen beteiligt sind (Bentivoglio und Morelli 2005; Björklund und Dunnett 2007; Blaess und Ang 2015).

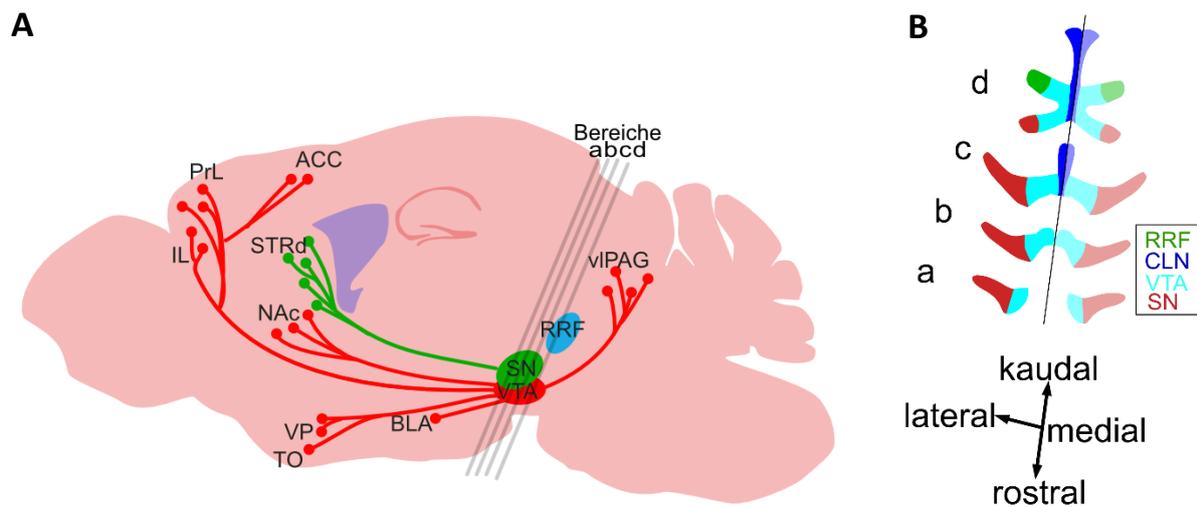


Abb. 2: Schematische Darstellung des adulten Gehirns der Maus. Longitudinalschnitt mit Projektionszielen der anatomischen Kerngebiete der mDAN (A). Koronarschnitte im Bereich des Mittelhirns (B). Ventrales Tegmentales Areal (VTA), Substantia nigra pars compacta (SNpc), Retro-Rubrale Region (RRF), Anteriorer Cingulärer Cortex (ACC), Prälimbischer Cortex (PrL), Infralimbischer Kortex (IL), Nucleus Accumbens (NAc), ventrales Pallidum (VP), Basolaterale Amygdala (BLA), Olfaktorisches Tuberkulum (TO), Ventrolaterales periaquäduktales Grau (vIPAG). Cave: A: Gibt eine verzerrte Darstellung in Bezug auf die Frontalebene wieder. B: Für die spätere Analyse der koronaren Hirnschnitte definierte Bereiche des Mittelhirns von kaudal nach rostral

1.2.2 Relevanz der Diversität der mDAN beim Morbus Parkinson

Bei Erkrankungen, die mit Veränderungen im DA System vergesellschaftet sind, ist ein Verständnis der Krankheitsmechanismen nur unter Berücksichtigung der Diversität der mDAN möglich, wobei hier beispielhaft ihre Rolle in Bezug auf den Morbus Parkinson dargelegt wird. Die Prävalenz des Morbus Parkinson liegt in Europa bei etwa 108 bis 257/100 000 Einwohner*innen und wächst mit dem Lebensalter (Campenhausen et al. 2005). Prognosen weiter steigenden Lebensalters in Industrieländern gehen daher von steigenden Erkrankungszahlen aus. Nach Hochrechnungen von Dorsey et al. (Dorsey et al. 2007) könnte sich bis 2030 die Zahl der Erkrankten verdoppeln (Deutsche Gesellschaft für Neurologie e.V. 2016). Damit kommt der Erkrankung eine entscheidende Rolle in der medizinischen Versorgung zu. 1817 wurden die Leitsymptome des Parkinson-Syndroms Bradykinese, Ruhetremor, Rigor und posturale Instabilität erstmals vom gleichnamigen Arzt beschrieben (Parkinson 1817). Brissaud wies 1899 auf eine Reduktion der SNpc bei

betroffenen Patient*innen hin (Przedborski 2017). Aufgrund von mikroskopisch gestützter Auszählung von mDAN post mortem bei Patient*innen mit Morbus Parkinson und gesunden Kontrollen, sowie Regressionsanalysen auf Basis dieser Zählungen, wird vermutet, dass sich ab einem Verlust von ca. 30 % der mDAN die Willkürmotorik klinisch gestört zeigt (Burke und O'Malley 2013; Hornykiewicz 1998). Dies liegt an einer Störung der Basalganglienschleife, welche als zentraler neurologischer Schaltkreislauf die Willkürmotorik ermöglicht. Durch den Untergang der mDAN kommt es zu einer verminderten Inhibition des Striatums und somit über Zwischenschritte in der Basalganglienschleife zu einer verminderten Disinhibition des motorischen Kortex. Die pathophysiologischen Vorgänge, welche beim sporadischen Parkinsonsyndrom zum Zellverlust führen, sind bis heute nicht vollständig verstanden. Es wurde gezeigt, dass mDAN der VTA später untergehen als Areale in der SNpc und dass ventrale Teile der SNpc früher betroffen sind (Halliday et al. 1996; Kamath et al. 2022; Surmeier et al. 2017). Damier und Kollegen schlugen 1998 nach Obduktion von fünf Gehirnen von Patient*innen mit M. Parkinson eine Progressionsrichtung der Erkrankung von kaudal nach rostral, von lateral nach medial und von ventral nach dorsal in der SNpc vor (Damier et al. 1999).

Einen weiteren Ansatz bezüglich der betroffenen mDAN Subgruppen beim Morbus Parkinson liefert die tiefe Hirnstimulation im Nucleus subthalamicus, eine symptomatische Therapieform bei Patient*innen mit M. Parkinson, welche sich u.a. bei motorischen Symptomen (Ruhetremor, Bradykinese und Rigor) als erfolgreich erwies. Eine Stimulation der lateralen Anteile der SNpc erwies sich als wirksamer als eine Stimulation der medialen Anteile der SNpc. Besonders die oben bereits erwähnten lateralen Zellen der SNpc erhalten Impulse aus dem Nucleus subthalamicus und senden Axone zum dorsalen Striatum, weshalb ex juvantibus eine starke Beteiligung dieser Region in der Pathophysiologie der motorischen Symptome beim sporadischen Parkinsonsyndrom postuliert wird (Menegas et al. 2015), was mit den oben beschriebenen Autopsiebefunden vereinbar ist, sowie mit den oben beschriebenen Konnektom-Analysen.

Die große Variabilität der Verlaufsformen des Morbus Parkinson wirft außerdem die Frage auf, ob bei verschiedenen Symptomausprägungen ggf. verschiedene Subtypen der mDAN vermehrt untergehen und wenn dies der Fall sein sollte, wodurch sich bei dem

entsprechenden Patient*innenkollektiv diese Vulnerabilität der mDAN unterscheidet. Bekannt ist bereits eine Assoziation klinischer Symptomausprägungen mit genetischen Varianten in Risikogenen (Brockmann und Lohmann 2017).

Aus welchem Grund bei der Erkrankung v.a. mDAN untergehen und wieso einzelne mDAN früher untergehen als andere, ist Gegenstand der aktuellen Forschung (Kamath et al. 2022). Ein besseres Verständnis der Entwicklungsprozesse, die zu verschiedenen mDAN-Subtypen führen, könnte außerdem zur Erzeugung von krankheitsrelevanten mDAN in vitro beitragen, was nicht nur für die Zellersatztherapie, sondern auch für zukünftige Krankheits-Modelle und medikamentöse Therapieansätze vielversprechend ist (Arenas et al. 2015).

1.3 Entwicklung der mDAN

Die Entwicklung der mDAN wurde vielseitig an der Maus als Modellorganismus der Säugtierentwicklung erforscht (Poulin et al. 2020). Dies liegt zum einen in der Ähnlichkeit der Organisation von humanem und Maus-mDA System begründet. Zum anderen eignet sich die Maus als Modellorganismus für genetische Untersuchungsmethoden, wie die gezielte Inaktivierung („Knock-Out“) bestimmter Gene und den Einbau des Cre/loxP-Systems ins Erbgut zur konditionalen Gen-Aktivierung und Genetischen Strategien zur Kartierung des Zellschicksals (engl. „Fate-Mapping“) (Vgl. Abschnitt 2.3.2.), wodurch genetische Schlüsselfaktoren in der Embryonalentwicklung identifiziert werden können (Blaess und Ang 2015). Wenn nicht anders beschrieben, wird im Folgenden über die murine Entwicklung berichtet.

Initialer Schritt der Entwicklung der mDAN ist die Induktion des Mittelhirns und insbesondere des ventralen Mittelhirns, wo die Vorläuferregion der späteren mDAN entsteht. Die Zellen in dieser Region durchlaufen die Schritte der Proliferation, Neurogenese und Differenzierung. Während der Differenzierung erwerben sie einen dopaminergen Phänotyp, migrieren an ihre endgültige Position und bilden Verbindungen zu ihren Zielen in oben beschriebenen Hirnregionen aus.

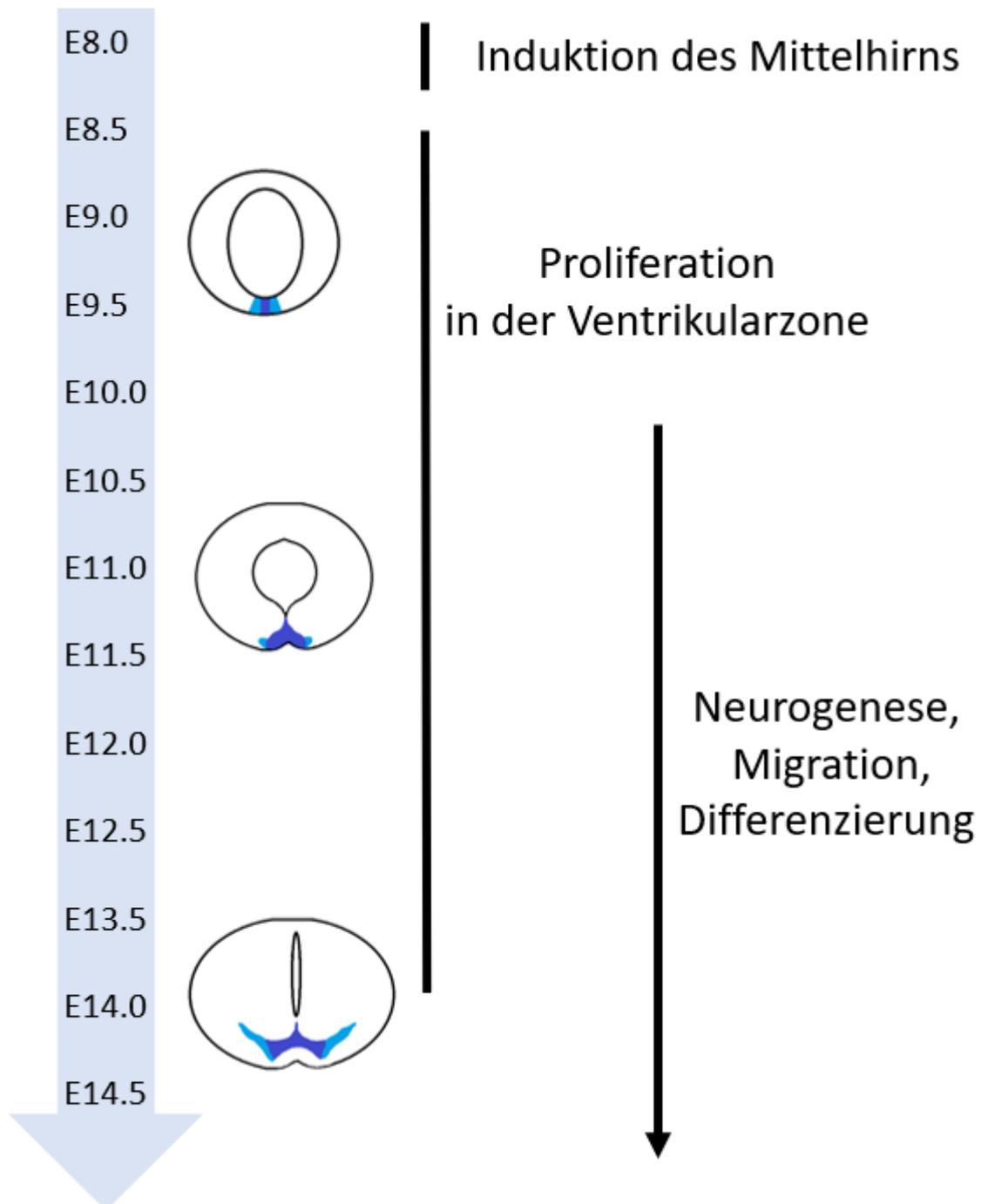


Abb. 3: Überblick über die embryonale Entwicklung der mDAN

1.3.1 Induktion des Mittelhirns

Im Rahmen der Embryonalentwicklung entsteht während der Gastrulation eine äußere Zellschicht des Embryoblasten, das Ektoderm, welches in ein neurales und epidermales Ektoderm unterteilt wird. Das neurale Ektoderm ist der Ursprung des zentralen Nervensystems (ZNS) und bildet durch die longitudinale Faltung der daraus entstehenden Neuralplatte im weiteren Entwicklungsverlauf das Neuralrohr, welches zuerst lediglich eine rohrförmige Struktur darstellt. Aus dem Hohlraum im Zentrum des Neuralrohrs entsteht im Verlauf der Embryonalentwicklung die Gesamtheit des Ventrikelsystems, um welches herum das ZNS Gestalt annimmt.

1.3.1.1 Entwicklung der rostro-kaudalen Achse

Entlang der rostro-kaudalen Achse des Neuralrohrs kommt es durch verschiedene Musterbildungsprozesse zur Gliederung, die durch die Bildung von Ausstülpungen, sog. Neuromeren auch makroskopisch sichtbar wird (Tian et al. 2022). Da sich hier erstmals das spätere Mesencephalon makroskopisch absetzt, lässt sich dies als erster Schritt der Entstehung der mDA bezeichnen. Die Neuromere, aus denen das spätere Mesencephalon und rostrale Rhombencephalon hervorgehen, werden als Mesencephalon und Rhombomer 1 bezeichnet (Palmgren, 1921; Ramon y Cajal, 1995). Diese sind durch eine dorsale morphologische Einschnürung getrennt, die Isthmus genannt wird (Altman und Bayer, 1997; Palmgren, 1921). Ventral ist die Abgrenzung weniger deutlich ersichtlich, hier kann lediglich ein kleiner Knoten (Engl. Notch) identifiziert werden. Durch Genexpressionanalyse, sowie Experimente in denen Funktionsverluste und Funktionsgewinne von möglichen beteiligten Faktoren generiert wurden (Engl. „Knock-Out“, „Gain-of-Funtion“), konnten genetische Einflussfaktoren auf die Entwicklung der mDA Vorläuferzellen identifiziert werden. Hierbei spielen Transkriptionsfaktoren eine zentrale Rolle. Sie sind Transkriptions-regulierende Proteine, deren Funktion in der Bindung an bestimmte Regionen der DNA besteht, wodurch die Initiierung der Transkription der entsprechend regulierten Gene, je nach Transkriptionsfaktor oder Bindungsdomäne, positiv oder negativ beeinflusst wird. Orthodenticle Homeobox 2 (OTX2) und Gastrulation Brain Homeobox 2 (GBX2) gehören zur Familie der Homeobox Transkriptionsfaktoren. Sie sind zum Zeitpunkt E8.5 in zwei, in der rostro-kaudalen Achse direkt aneinander angrenzenden Gebieten, exprimiert. Ihre Besonderheit besteht darin, dass sie relativ früh in der Entwicklung

nachweisbar sind und eine Grenze in der rostro-kaudalen Achse markieren. Es wurde gezeigt, dass die Inaktivierung eines der beiden Gene zur Vergrößerung des Expressionsgebietes des jeweils anderen führt, woraus geschlossen wurde, dass sie ihre Expression gegenseitig unterdrücken. Dies zeigt außerdem, dass sie essenziell für die korrekte Abgrenzung von Mittelhirn und Rhombencephalon sind. Bemerkenswert ist weiterhin, dass ihre Expression durch keine bekannte Induktionskaskade ausgelöst wird und sie somit eine relativ unabhängige Rolle einnehmen (Hidalgo-Sánchez et al. 2000; Hidalgo-Sánchez et al. 2005).

Weitere Transkriptionsfaktoren, die wenig später als die oben genannten exprimiert werden sind Paired Box 2 und 5 (PAX2 und 5), Engrailed1 und 2 (EN1 und 2) und LIM Homeobox Transkriptionsfaktors 1 Beta (LMX1B) (Zervas et al. 2005). Sie sind deutlich stärker in Signalkaskaden untereinander eingebunden als die oben genannten OTX2 und GBX2. Für eine detaillierte Übersicht der Transkriptionsfaktoren, welche die Entwicklung von Mesencephalon und rostralen Rhombencephalon in ihrer rostro-kaudalen Achse beeinflussen, sowie durchgeführten Studien zu Funktionsverlusten und Funktionsgewinnen, siehe (Zervas et al. 2005).

Essenziell für die korrekte Entwicklung des Mittelhirns und seine Abgrenzung in der rostro-kaudalen Achse von Rhombencephalon und Prosencephalon sind außerdem die Morphogene Fibroblast Growth Factor 8 (FGF8) und Wingless-Type Mouse-Mamma-Tumor-Virus Integration Site Family 1 (WNT1). In *Wnt1*-Funktionsverlust-Mäusen fehlt das Mittelhirn vollständig. Es wird vermutet, dass WNT1 an der Aufrechterhaltung der OTX2/GBX2-Grenze beteiligt ist. Dies wurde aufgrund von Analysen des Swaying-Phänotyps bei einer charakteristischen Punktmutation im *Wnt1*-Gen geschlossen, welche ein vorzeitiges Stop-Codon und somit eine fehlerhafte Expression von WNT1 zur Folge hat. Bei diesen Tieren wurden ektope Cluster von *Wnt1*- und *Otx2*-exprimierenden Zellen im Rhombencephalon gefunden (Bodea und Blaess 2015). Weiterhin wird sein Einfluss auf die Expression von Engrailed 1 (En1) vermutet, da sich die Inaktivierung von *Wnt1* partiell aufheben lässt, indem EN1 vom *Wnt1* Locus exprimiert wird (Bodea und Blaess 2015). FGF8 wird von der sog. Randleiste sezerniert. Für die Bildung der Mesencephalon/Rhombencephalon-Region spielt FGF8 eine dosisabhängige Rolle (Bodea und Blaess 2015).

1.3.1.2 Entwicklung der dorso-ventralen Achse

Entlang der dorso-ventralen Achse kommt es ebenfalls zu einer Gliederung des Neuralrohrs. Die entstehenden Regionen werden als Bodenplatte, Grundplatte, Flügelplatte und Dachplatte bezeichnet. Das Morphogen Sonic Hedgehog (SHH) ist bereits früh in der Chorda dorsalis exprimiert, was wiederum die Expression von SHH in der ventralen Mittellinie, der sog. Bodenplatte, induziert. In Embryonen mit Funktionsverlust-Mutationen im SHH Signalweg kommt es nicht zur Spezifizierung von ventralen Zelltypen, was die zentrale Rolle von SHH für die Etablierung des ventralen ZNS zeigt. Im Mesencephalon führt SHH zur Expression des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors Glioma-Associated Oncogene Homolog 1 (GLI1) und der Transkriptionsfaktoren Forkheadbox A1 und 2 (FOXA1 und 2) in der Bodenplatte (Corrales et al. 2006; Mavromatakis et al. 2011). FOXA1/2 wiederum sind essenziell, damit SHH in der Bodenplatte exprimiert wird (Mavromatakis et al. 2011). Im dorsalen Anteil des Neuralrohres werden verschiedene Signalmoleküle der Familie Bone Morphogenetic Proteine (BMP) und WNT exprimiert. Funktionsverlust dieser Faktoren führen häufig zu einem Fehler beim Verschluss des Neuralrohres und so zum frühzeitigen Abbruch der Embryonalentwicklung.

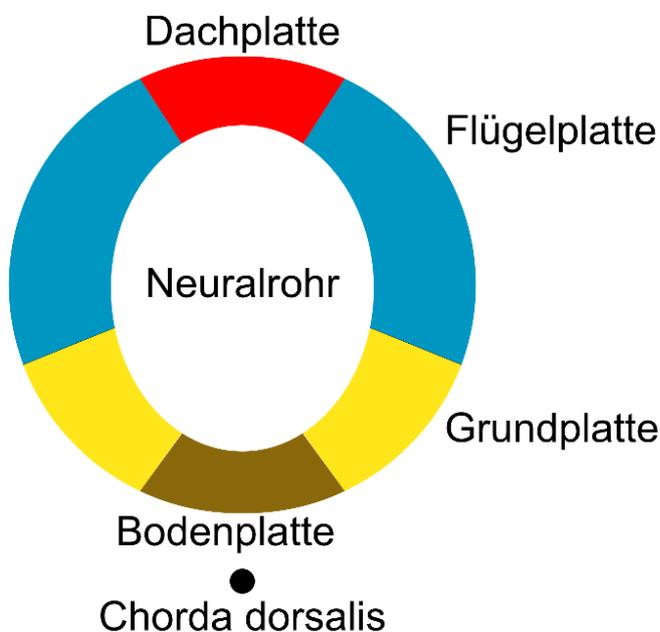


Abb. 4: Gliederung der dorso-ventralen Achse im embryonalen Mittelhirn

1.3.1.3 mDA Vorläuferdomäne

In enger Nachbarschaft zum hohlen Inneren des Neuralrohres in der sogenannten Ventrikularzone befindet sich eine dicht gepackte Zellschicht, die sog. Progenitorregion, in der sich Vorläuferzellen durch Mitose teilen. Dadurch entstehen entweder erneut Vorläuferzellen oder Neuroblasten. Ab dem Zeitpunkt E8.5 lässt sich eine Untergruppe von Vorläuferzellen in der Ventrikularzone des ventralen Mittelhirns identifizieren. Andersson et al. wiesen erstmals nach, dass LIM Homeobox Transkriptionsfaktor 1 Alpha (LMX1A) der Schlüsselfaktor für die Identität der mDAN-Vorläufer im Hühnchen ist (Andersson et al. 2006). Auf der Grundlage dieser und einer Reihe von Folgestudien wird allgemein angenommen, dass die Expression von LMX1A die mDAN-Vorläuferdomäne im ventralen Mittelhirn von Maus und Hühnchen begrenzt (Ono et al. 2007). Neben LMX1A werden mehrere andere Transkriptionsfaktoren in der gesamten Population der mDAN-Vorläuferzellen exprimiert: LMX1B, FOXA1/2, Aristaless related homeobox (ARX) und Doublesex and mab-3 related transcription factor like Family A2 (DMRTA2 auch bekannt als DMRT5). Die Expression dieser Faktoren ist nicht auf die LMX1A-positive Vorläuferdomäne beschränkt, da sie sich weiter entlang der medio-lateralen oder rostro-kaudalen Achse des Neuralrohres erstreckt (Bodea et al. 2014; Deng et al. 2011; Ferri et al. 2007; Gennet et al. 2011; Omodei et al. 2008; Yan et al. 2011).

1.3.1.4 Neurogenese und Differenzierung

Zum Zeitpunkt E10.5 können unterhalb der mDA Vorläuferdomäne erstmals Tyrosin Hydroxylase (TH) positive (TH+) Zellen im ventralen Mittelhirn nachgewiesen werden (Wallén et al. 1999). TH katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der DA-Synthese und ist ein Marker für differenzierte mDAN. Ein weiterer Differenzierungsmarker für mDAN ist Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 2 (NR4A2, ehemals NURR1 genannt), welcher ebenfalls ab E10.5 im ventralen Mittelhirn detektiert werden kann und während des gesamten Differenzierungsprozesses in mDAN exprimiert bleibt (Perlmann und Wallén-Mackenzie 2004). Sich differenzierende mDAN beginnen an ihren späteren Bestimmungsort zu migrieren (Hanaway et al. 1971) und gleichzeitig Zellfortsätze auszubilden (Bodea et al. 2014; Yang et al. 2013). Dendriten, Synapsen und ein individuelles Expressionsprofil werden im Folgenden etabliert (Bodea und Blaess 2015; Deschamps et al. 2009; Lin et al. 2005; Marillat et al. 2002; Panman et al. 2014; Yue et al. 1999).

1.3.1.5 Migration

Während der Differenzierung migrieren die Neurone weg von der Ventrikularzone hin zur Mantelzone des ventralen Mittelhirns, wo sie die oben beschriebenen anatomischen Regionen SNpc, VTA, und RRF bilden. Die Zellen im ventralen Mittelhirn sind in Zellhaufen, sog. Kerngebieten organisiert. Im ventralen Mittelhirn konnten zwei Migrationsrouten gezeigt werden - radiale und tangentielle Migration.

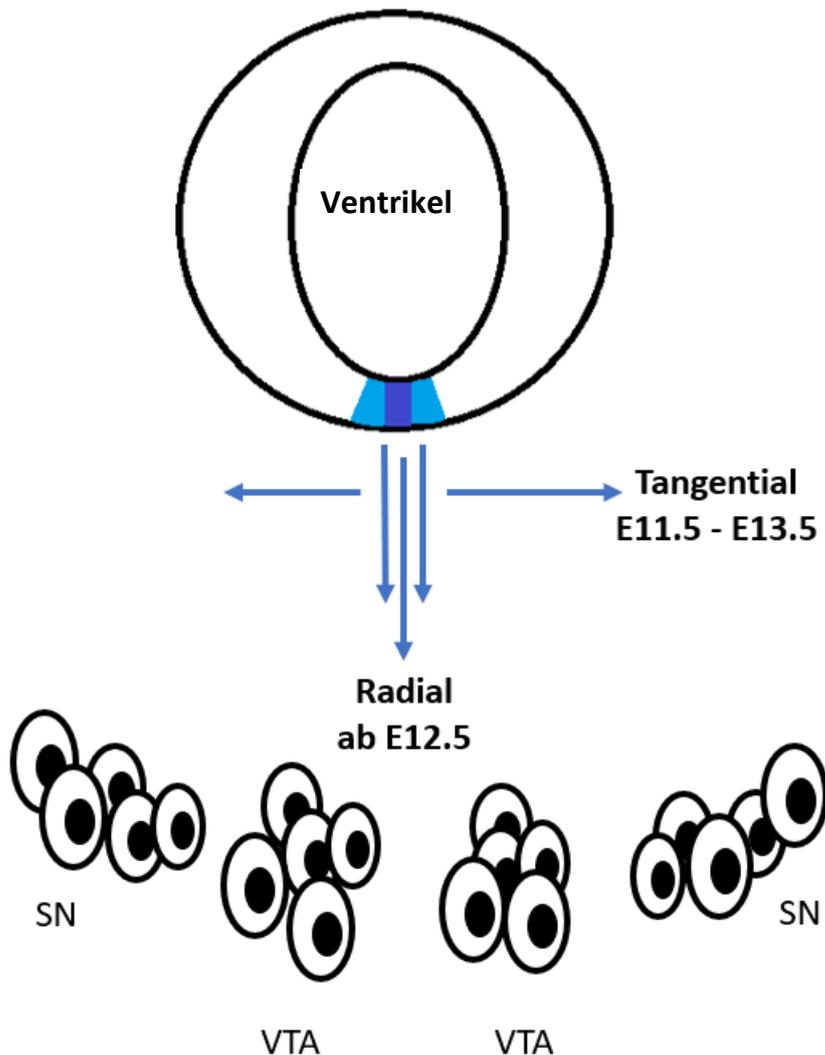


Abb. 5: Schematische Darstellung der Migrationsrouten von mDAN während der Embryonalentwicklung. Koronare Schnittebene. Modifiziert nach (Vaswani et al. 2019)

Man geht davon aus, dass radiale Migration im Mesencephalon entlang von radialen Gliofortsätzen stattfindet. Diese Glioprozesse exprimieren u.a. das Matrix-Protein Tenascin (Kawano et al. 1995). Weiterhin ist bekannt, dass die radiale Migration vom Chemokin C-

X-C Motif Chemokine Ligand 12 (CXCL12) und einem seiner Rezeptoren, C-X-C Motif Chemokine Receptor 4 (CXCR4), moduliert wird. In diesem Zusammenhang wurde in organotypischen Schnittkulturen gezeigt, dass CXCL12 in der Lage ist eine Bewegung von mDAN und ihren Axonen zu sich hin zu induzieren (Bodea et al. 2014; Yang et al. 2013). Tangentiale Migration wird unter anderem durch das extrazelluläre Matrixprotein Reelin vermittelt (Bodea et al. 2014; Vaswani et al. 2019).

1.4 Modelle zur Entstehung der Diversität der mDAN (Räumliches und zeitliches Schema)
Die Diversität der mDAN besteht, wie oben beschrieben, auf verschiedenen Ebenen. Im Folgenden sollen zwei denkbare Modelle bezüglich der embryonalen Entwicklung und Etablierung der Diversität der mDAN erläutert werden. Im ersten Modell differenzieren sich mDAN je nach Lage der Vorläuferzellen in verschiedene Subgruppen (Modell A: räumlich). Im zweiten Modell entstehen mDAN Vorläufer oder differenzieren sich mDAN zu verschiedenen Zeitpunkten (Modell B: zeitlich). Möglich wäre ebenfalls eine Kombination der Modelle. Für die kortikale Entwicklung wurde bereits gezeigt, dass beide Prozesse eine Rolle in der Generierung verschiedener Subtypen spielen, weshalb diese im Folgenden zur Veranschaulichung der beiden Modelle dient.

1.4.1 Modell A: Räumlich

Kortikale Interneuronen lassen sich aufgrund ihrer transkriptionellen Ähnlichkeiten und der Expression selektiver Marker in mehrere Hauptklassen einteilen: Parvalbumin positive (PV+), Somatostatin positive (SST+) und Serotonin Rezeptor 3a positive (HTR3+) Zellen, sowie eine kleine Gruppe kortikaler Interneurone, die sowohl PV+ als auch SST+ sind. Diese Hauptklassen werden wiederum in Untergruppen eingeteilt.

Bestimmend für das spätere Zellschicksal ist bei kortikalen Interneuronen zum Einen die Lage der Vorläuferzellen in drei verschiedenen Vorläuferregionen im Subpallium: dem medialen und kaudalen Ganglienhügel, sowie der präoptischen Region (Präoptisches Areal, präoptischer Hypothalamus, Septum) (Lim et al. 2018). Der mediale Ganglienhügel und das angrenzende präoptische Areal erzeugen einen Großteil aller Interneuronen der SST+ und PV+ Hauptklassen, wohingegen der kaudale Ganglienhügel der Ursprung vieler HTR3+ Interneuronen ist (Lim et al. 2018). Während der Embryonalperiode zeichnen sich die Vorläuferdomänen durch individuelle Transkriptionsprofile aus. So ist etwa NK2

Homeobox 1 (NKX2-1) im medialen Ganglienhügel und präoptischen Areal exprimiert, jedoch nicht im präoptischen Hypothalamus oder kaudalen Ganglienhügel (Lim et al. 2018).

Für die mDA Vorläufer ist bekannt, dass einige Gene zu verschiedenen Anteilen in lateralen und medialen Teilen der Entstehungszone der mDAN exprimiert werden. Etwa sind WNT1 und ALDH1A1 und OTX2 spezifisch in lateralen Regionen exprimiert (Brown et al. 2011; Panman et al. 2014), während Corin und SOX6 vermehrt in medialen Regionen exprimiert werden (Ono et al. 2007; Panman et al. 2014). In rostro-kaudaler Richtung zeigt sich ein Expressionsgradient von WNT1 und EN1 mit Zunahme der Expression beider Faktoren in Richtung Rhombencephalon (Lahti et al. 2012). Somit zeigen sich für verschiedene Subregionen der Progenitorregion spezifische molekulare Expressionsprofile. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass die mediale und laterale Progenitorregionen, in verschiedenem Ausmaß zu späteren mDAN der SNpc und des VTA beitragen: Blaess et al. zeigten 2011 mittels genetischer Zellschicksalskartierungsmethoden (s. Abschnitt 2.3.2), dass sich mDA Vorläufer, welche zwischen E8.5 und E9.0 SHH exprimieren, v.a. in der medialen Bodenplatte befinden und sich zu einem größeren Anteil zu mDAN der SNpc als des VTA entwickeln und dass sich Vorläufer, die zum Zeitpunkt E11.5 SHH exprimieren, v.a. in der lateralen Bodenplatte befinden und sich zu einem größeren Anteil in mDAN des medialen VTA entwickeln (Blaess et al. 2011).

Panman et al. beschrieben 2014, dass sich die medial lokalisierten SOX6 positiven Vorläufer zu mDAN der SNpc entwickeln, während sich die lateral gelegenen OTX positiven Vorläufer zu mDAN des VTA entwickeln. Die Schlussfolgerung erfolgte aufgrund von in situ Hybridisation zu verschiedenen embryologischen Zeitpunkten. Eine Abstammungsanalyse wurde durch Pereira Luppi et al. 2021 ergänzt, die die initiale Annahme spezifizierte, indem sie zeigte, dass dorsale SNpc überwiegend von SOX6 negativen Vorläuferzellen aus der lateralen Bodenplatte abstammen. Weiter kaudal entstehen aus diesen lateral in der Bodenplatte gelegenen Vorläufern mDAN im ventro-medialen VTA, die sich durch die Expression von OTX2 auszeichnen. Im Gegensatz dazu bilden SOX6 positive Vorläufer aus der medialen Bodenplatte vermehrt mDAN in der ventralen SNpc (Pereira Luppi et al. 2021).

Diese Studien zeigen, dass sich die Lage und späteres molekulares Profil der mDAN im adulten Gehirn anhand der Lage ihrer Vorläuferzellen in der Vorläuferregion der mDAN zumindest teilweise vorhersagen lässt, jedoch reichen zwei Vorläufer-Domänen, eine mediale und eine laterale, nicht aus, um die funktionelle oder molekulare Vielfalt der mDA-Subtypen im erwachsenen Gehirn zu erklären (Poulin et al., 2020; Roeper, 2013).

1.4.2 Modell B: Zeitlich

Bei kortikalen Interneuronen korreliert weiterhin der Entstehungszeitpunkt zum Teil mit der Vielfalt dieser Neurone. Etwa erzeugt der Vorläuferpool im medialen Ganglienhügel sowohl Projektionsneurone für den Globus Pallidus (GP), als auch verschiedene Typen von kortikalen Interneuronen, welche sich durch die Expression von SST und PV auszeichnen (Lim et al. 2018). Vorläufer der medialen Ganglieneninenz (MGE-Vorläufer) erzeugen in der ersten Hälfte der neurogenen Periode die meisten SST+-Interneurone, während PV+-Interneurone während der gesamten Neurogenese mit einer nahezu konstanten Rate produziert werden (Inan et al. 2012; Miyoshi et al. 2007). Somit ergibt sich neben der oben bereits erwähnten Charakterisierung des Zellschicksals durch Lokalisation der Vorläuferzellen eine Spezifizierung des Zellschicksals durch ihren Entstehungszeitpunkt.

Bei kortikalen Projektionsneuronen (PN) spielt ebenfalls der Zeitraum der Entwicklung eine Rolle. Hier wurde das Prinzip einer zunehmenden Kompetenzrestriktion der Vorläuferzellen gezeigt (Llorca und Marín 2021). Der Vorläuferpool späterer Projektionsneurone befindet sich im Pallidum in direkter Nachbarschaft zum Ventrikel-Lumen. Die sich dort teilenden Vorläuferzellen werden als neuroepitheliale Zellen (NEZ) bezeichnet. Durch Zellteilung entstehen radiale Gliazellen (RGZ), die sich durch eine bipolare Morphologie charakterisieren. Ein apikaler Fortsatz steht mit dem Ventrikel in Kontakt und ein basaler Fortsatz mit der entgegengesetzten Zelloberfläche. Von NEZs unterscheiden sie sich durch die Expression charakteristischer Transkriptionsfaktoren. Auch die RGZ teilen sich noch mehrfach. Sie nutzen die Fortsätze der sie umgebenden RGZ als Leitstruktur, um zur Oberfläche zu wandern. Dieses Migrationsverhalten führt zum Entstehen eines Innen-Außen-Musters der kortikalen Laminierung, das ungefähr mit dem neuronalen Geburtsdatum korreliert: früh geborene PN enden in tiefen Schichten des Neokortex, während

spät geborene PNs zunehmend oberflächlichere Schichten besetzen. Zum Ende des beschriebenen Prozesses hin entwickeln sich einige RGZ zu Gliazellen, teilen sich erneut und bilden schlussendlich Astrozyten (Llorca und Marín 2021).

McConnell und Kaznowski zeigten bereits 1991 durch Transplantationsstudien, dass das Zellschicksal von Neuronen verschiedenen zyklischen Veränderungen unterliegt, etwa zyklischen Veränderungen in ihrer Fähigkeit, auf Umweltfaktoren zu reagieren.

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Markierung mit [3H]Thymidin wurden embryonale Vorläuferzellen der kortikalen Neurone in ältere Wirtsgehirne transplantiert. Es wurde gezeigt, dass das laminare Schicksal der transplantierten Neuronen mit der Position ihrer Vorläuferzellen im Zellzyklus zum Zeitpunkt der Transplantation korreliert. Tochterzellen von Zellen, die in der S-Phase transplantiert wurden, wandern in die Schicht 2/3, ebenso wie die Wirtsneurone. Vorläuferzellen, die zu einem späteren Zeitpunkt im Zellzyklus transplantiert werden, produzieren dagegen Tochterzellen, die sich auf ihr normales Schicksal in den tiefen Schichten festlegen (McConnell und Kaznowski 1991).

Eine Reihe weiterer Studien nutzte die Markierung von Zellen und ihren Tochterzellen durch einen retroviralen Vektor, der für das bakterielle Enzym Beta-Galaktosidase kodiert. Dieser Vektor wurde zur Markierung von Vorläuferzellen in der Großhirnrinde von Rattenembryonen während der Phase der Neurogenese verwendet. Wenn sich diese Embryonen bis zum Erwachsenenalter entwickeln, können die Klone von Zellen, die aus den markierten Vorläuferzellen hervorgegangen sind, immunhistochemisch identifiziert werden (Frantz und McConnell 1996; Price und Thurlow 1988; Rakic 1988). Es wurde gezeigt, dass sich aus früher in der Embryonalperiode markierten Zellen eine größere Anzahl verschiedener Zelltypen entwickeln können. Im Gegensatz dazu kennzeichnen retrovirale Infektionen, die spät in der Neurogenese durchgeführt werden, eine eingeschränktere Gruppe von Nachkommen, da Neuronen, die zu diesem Zeitpunkt geboren werden, ausschließlich in die zuletzt erzeugten Schichten 3 und 2 wanderten. Dies lässt auf eine Multipotenz der frühen Zellklone schließen, welche im Laufe der Embryogenese zunehmend eingeschränkt wird (Frantz und McConnell 1996).

2000 veröffentlichten Desai und McConnell eine Arbeit, in der ebenfalls eine zunehmende Schicksalsrestriktion der kortikalen Neurone gezeigt wird: Vorläufer von Neuronen der vierten Schicht wurden im ersten Schritt in Gehirne transplantiert, welche bereits in der Embryogenese fortgeschritten waren und in denen die Schichten zwei und drei gebildet

wurden. Die transplantierten Neuronen nahmen das Schicksal der neuen Umgebung (Schicht 2 und 3) an, was zeigt, dass die Vorläufer der Schicht vier multipotent sind. Vorläufer des mittleren Stadiums der Entwicklung wurden anschließend in eine jüngere Umgebung transplantiert, in der sich die Neuronen der Schicht sechs bildeten. Die transplantierten Neuronen umgingen die Schicht sechs und siedelten sich in embryologisch älteren Schichten ab, was darauf hinweist, dass die embryologisch älteren Vorläuferzellen der Schicht vier ein eingeschränktes Schicksalspotenzial haben und nicht in der Lage sind, auf Umweltreize zu reagieren, die die Produktion der Schicht sechs auslösen (Desai und McConnell 2000).

Im Mittelhirn nutzten erste Untersuchungen durch Bayer et al. bezüglich des Zeitpunkts der Entstehung der mDA Vorläuferzellen die Injektion von [3H]Thymidin als Marker zur Bestimmung des Zeitpunktes, zu dem die Zelle gebildet wird und darauffolgend Antikörperfärbung gegen TH zur Identifizierung der mDAN. Hierfür wurde zu einem definierten embryonalen Zeitpunkt der radioaktive Marker [3H]Thymidin (Bayer et al. 1995) oder später häufiger Bromdesoxyuridin (BrdU) injiziert. [3H]Thymidin oder BrdU wird anschließend in Zellen, die sich kurz nach der Injektion in der Zellteilung befinden in die DNA eingebaut und markieren so Zellen, die sich anschließend differenzieren, dauerhaft. Zu einem späteren Zeitpunkt kann das Schicksal der markierten Zellen analysiert werden (Llorens-Martín und Trejo 2011). Mithilfe von [3H]Thymidin-Injektionen wurde festgestellt, dass der Höhepunkt der Entstehung der mDAN der SNpc und des dorso-lateralen VTA etwa zum Zeitpunkt E11.5 vor dem des ventromedialen VTA bei E12.5, liegt. Außerdem zeigte sich, dass rostrale mDAN generell früher geboren werden als kaudale (Bayer et al. 1995; Bodea und Blaess 2015; Bye et al. 2012).

Mit der BrdU-Methode zeigte sich eine Abnahme markierter Zellen im Mittelhirn zwischen den Injektionszeitpunkten E10.5 und E12.5 und eine Verschiebung markierter mDAN von lateral nach medial mit späteren Injektionszeitpunkten. Zum Zeitpunkt E10.5 werden sowohl mDAN der SNpc, als auch Zellen des VTA zu gleichen Anteilen markiert. mDAN, welche zum Zeitpunkt E11.5 markiert werden, beinhalten verhältnismäßig mehr Zellen des VTA als der SNpc. Für mDAN, welche zum Zeitpunkt E12.5 geboren werden, wird die latero-mediale Verschiebung noch deutlicher und die wenigen Zellen, die in der SNpc

markiert sind, befinden sich in medialen Anteilen der SNpc. Dies wurde, neben der anatomischen Zuordnung auch durch Antikörperfärbungen gegen KCNJ6 und CALB1 bestätigt, wobei KCNJ6 vorwiegend mDAN der SNpc markiert und CALB1 vorwiegend mDAN des VTA (Bodea 2015). Zusammenfassend weisen die erwähnten Vorstudien darauf hin, dass spätere anatomische Lokalisation und der Zeitpunkt der Entstehung zumindest teilweise übereinstimmen (Bodea und Blaess 2015).

Das Modell einer zunehmenden Kompetenzrestriktion wäre ebenfalls für die Entstehung der Vielfalt der mDAN plausibel, da die mDA-Neurogenese über mehrere Tage hinweg stattfindet (E10.0-E14.5 bei der Maus) und Studien zur Geburtsdatierung darauf hindeuten, dass sich die mDAN in SNpc und im VTA im Hinblick auf den Zeitpunkt der maximalen Neurogenese unterscheiden.

1.4.3 Methoden zur Erforschung der Abstammung von Neuronen

Bestimmte embryonale Zellen zu markieren und diese und - im Falle von markierten Vorläuferzellen - deren Tochterzellen zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung zu untersuchen, ist essenziell, um Abstammungslinien nachweisen zu können. Dies erreicht die induzierbare genetische Strategie zur Kartierung des Zellschicksals, bei welcher Zellen, die ein bestimmtes Gen (Gen 1) exprimieren, markiert werden. Die Markierung wird an alle Tochterzellen weitergegeben (Danielian et al. 1998; Kimmel et al. 2000; Legué und Joyner 2010; Zervas et al. 2005; Zervas et al. 2004). Hierfür werden zwei Allele benötigt. In Allel 1 wird unter Kontrolle des Promotors 1 des Gens 1 eine Cre DNA-Rekombinase (Cre) abgelesen. In Allel 2, wird unter einem zweiten ubiquitär exprimierten Genlokus die cDNA für ein Reporterprotein, etwa ein Fluoreszenzprotein, nach einem von zwei loxP-Sequenzen (Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase) flankierten (=floxed) Stop-Codon eingebracht (sog. Reporterallel). Bei Vorliegen von Cre Rekombinase schneidet diese das Stopcodon vor dem Gen, welches für das Reporterprotein codiert, heraus. Das Gen wird abgelesen und das Reporterprotein wird in der Zelle permanent exprimiert (auch dann noch, wenn Cre unter Kontrolle des Promotors 1 nicht mehr exprimiert wird). So werden alle Zellen, die das Gen 1 exprimieren und alle ihre Nachkommen dauerhaft markiert.

In einer Erweiterung der oben beschriebenen Methode, der sog. *induzierbaren* genetischen Strategie zur Kartierung des Zellschicksals kann spezifiziert werden, in welchem

Zeitraum ein Ablesen des Gens 1 zur Aktivierung von Cre führt und somit zur permanenten Markierung der Cre-exprimierenden Zellen. Hierbei wird eine durch Tamoxifen (TM) induzierbare Cre DNA-Rekombinase (CreER) unter Kontrolle des Promotors 1 des Gens 1 abgelesen. Die Rekombinase ist nur bei Vorliegen von TM aktiv. Dies wird durch eine Fusion von Cre mit der modifizierten Ligandenbindungsdomäne von Estrogenrezeptoren erreicht, welcher mit dem Hitzeschockprotein 90 (HSP90) interagiert und sich im Zytoplasma befindet. An die modifizierte Ligandenbindungsdomäne bindet kein körpereigenes Estrogen, sondern lediglich synthetisches Tamoxifen (Metzger et al. 1995). TM ist plazentagängig und überwindet die Blut-Hirnschranke. Die Verabreichung von TM unterbricht die Interaktion von HSP90 mit CreER und induziert die Translokation von Cre in den Zellkern, seinen Wirkort, wo sich die DNA befindet (Blaess et al. 2011; Metzger und Chambon 2001; Metzger et al. 1995). Hier kann, wie oben beschrieben, nun die Rekombination erfolgen. Nach Administration des Induktors TM, stellt sich die Aktivierung von Cre nach etwa 6 h ein und hält für etwa 24 bis 48 h an. Die Expression des Reporters wurde als abhängig von der Tamoxifendosis beschrieben, weshalb auf eine einheitliche Dosierung geachtet werden sollte (Joyner und Zervas 2006), wobei wir stets potentiell von einer partiellen Rekombination (Mosaik-Markierung) ausgehen (Vgl. **Abb. 6**).

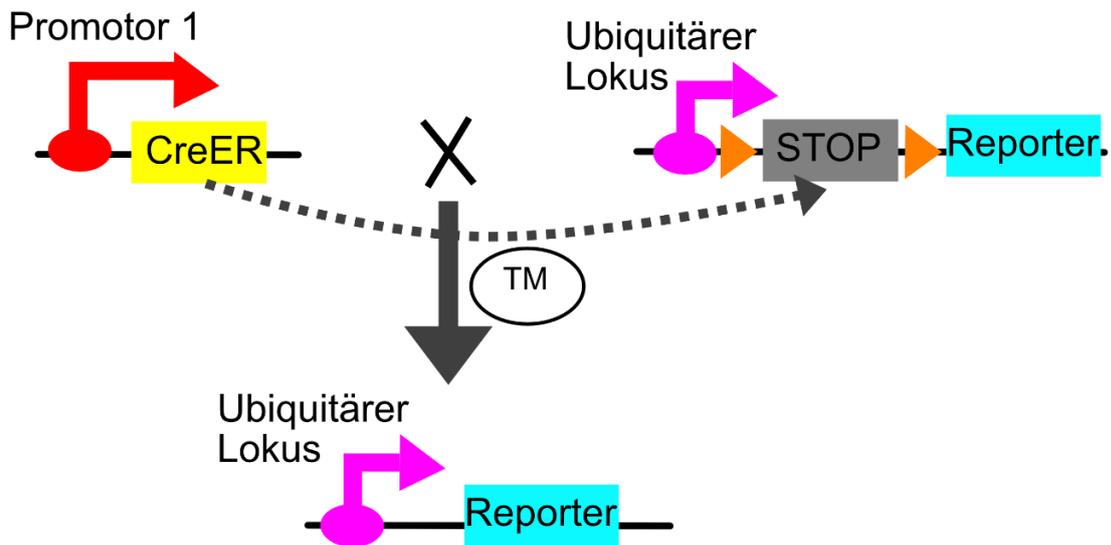


Abb. 6: Schema der induzierbaren genetischen Strategie zur Kartierung des Zellschicksals (engl.: Genetic Inducible Fate Mapping) auf genetischer Ebene. Unter dem Promotor von Gen 1 wird eine an einen Estrogenrezeptor (ER) gekoppelte Cre Rekombinase (CreER) abgelesen. Nach Bindung von Tamoxifen (TM) an CreER kann diese in den Zellkern gelangen und die Rekombination der loxP Seiten vermitteln. Dadurch wird das von den loxP Seiten (▶) flankierte Stopcodon herausgeschnitten und das Reporterprotein (z.B. ein Fluoreszenzprotein) kann exprimiert werden (Jensen und Dymecki 2014)

Weiterhin kann die Markierung auf Zellen spezifiziert werden, welche zwei definierte Gene G1 und G2 exprimieren. Dies wird als *intersektionelle* genetische Strategie zur Kartierung des Zellschicksals bezeichnet und ermöglicht eine feinere Eingrenzung der zu untersuchenden Zellen. Hierfür sind drei Allele notwendig. Auch diese Methode kann mit Cre oder induzierbar mit CreER genutzt werden. Im Folgenden wird auf die induzierbare Methode genauer eingegangen, da diese in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde.

In Allel 1, wird unter Kontrolle des Promotors 1 von Gen 1 CreER abgelesen, was wie oben beschrieben nach Aktivierung durch Tamoxifen im Zellkern an der DNA wirksam werden kann. Unter Kontrolle des Promotors 2 von Gen 2 wird das Gen des Tetracycline Transaktivator (tTA) abgelesen. Die Bindung von tTA an ein entsprechendes „Tetracycline Response Element“ (TRE) führt zur Aktivierung des TRE kontrollierten Gens. In einem für die intersektionelle induzierbare genetische Strategie zur Kartierung des Zellschicksals konzipierten Reporterallel (Allel 3) folgt hinter TRE ein von loxP-Seiten flankiertes Stopcodon, sodass das Reporter-gen nur exprimiert werden kann, wenn eine Aktivierung von

CreER über Expression des Gens 1 stattgefunden hat und zum Untersuchungszeitpunkt Gen 2 und damit tTA eprimiert wurde (Jensen und Dymecki 2014; Joyner und Zervas 2006) (Vgl. **Abb. 7**).

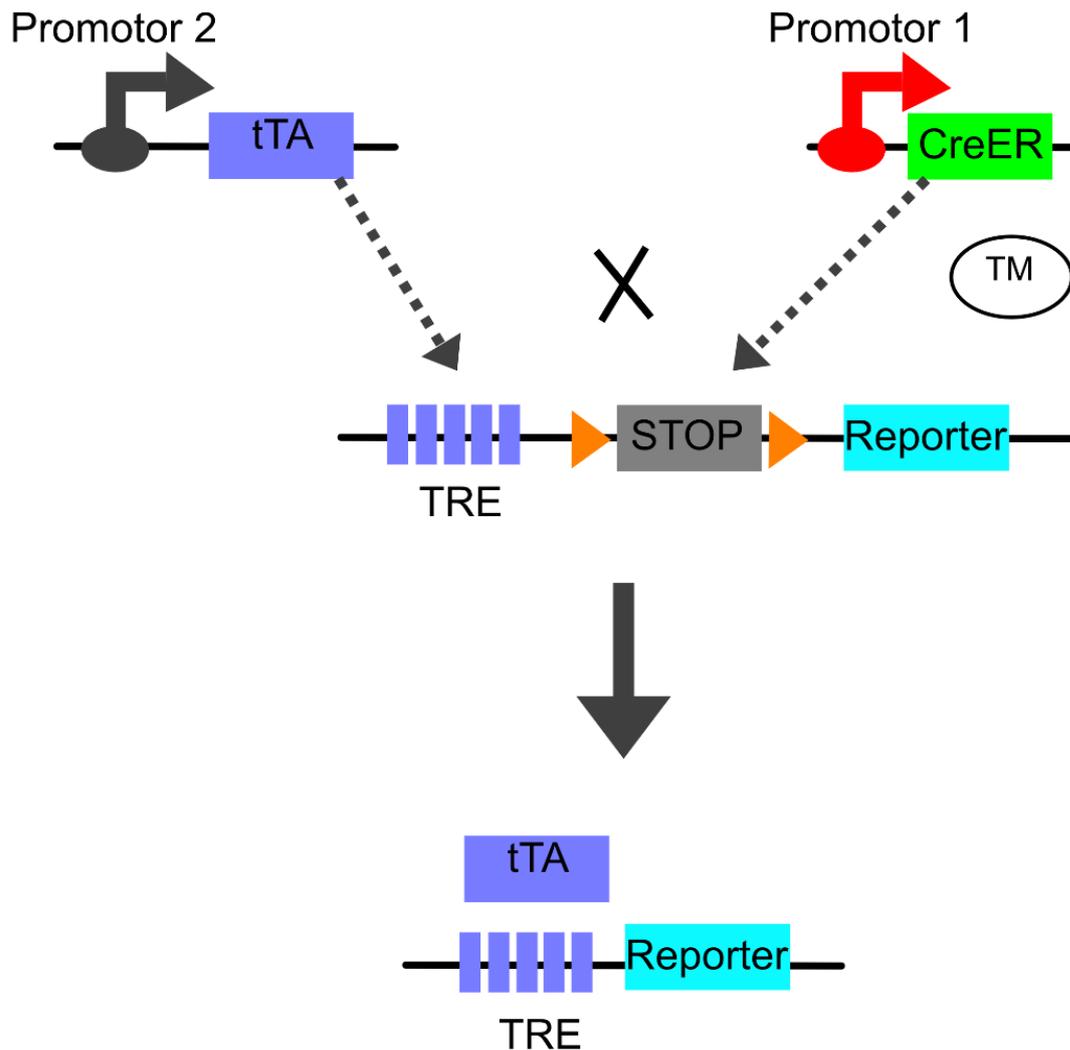


Abb. 7: Induzierbare intersektionelle genetischen Strategie zur Kartierung des Zellschicksals auf genetischer Ebene. Nur bei Expression von Gen 1 und damit CreER Rekombinase, sowie deren Aktivierung durch Tamoxifen (TM) und Expression von Gen 2 und damit tTA kann das Reporterprotein exprimiert werden (Jensen und Dymecki 2014)

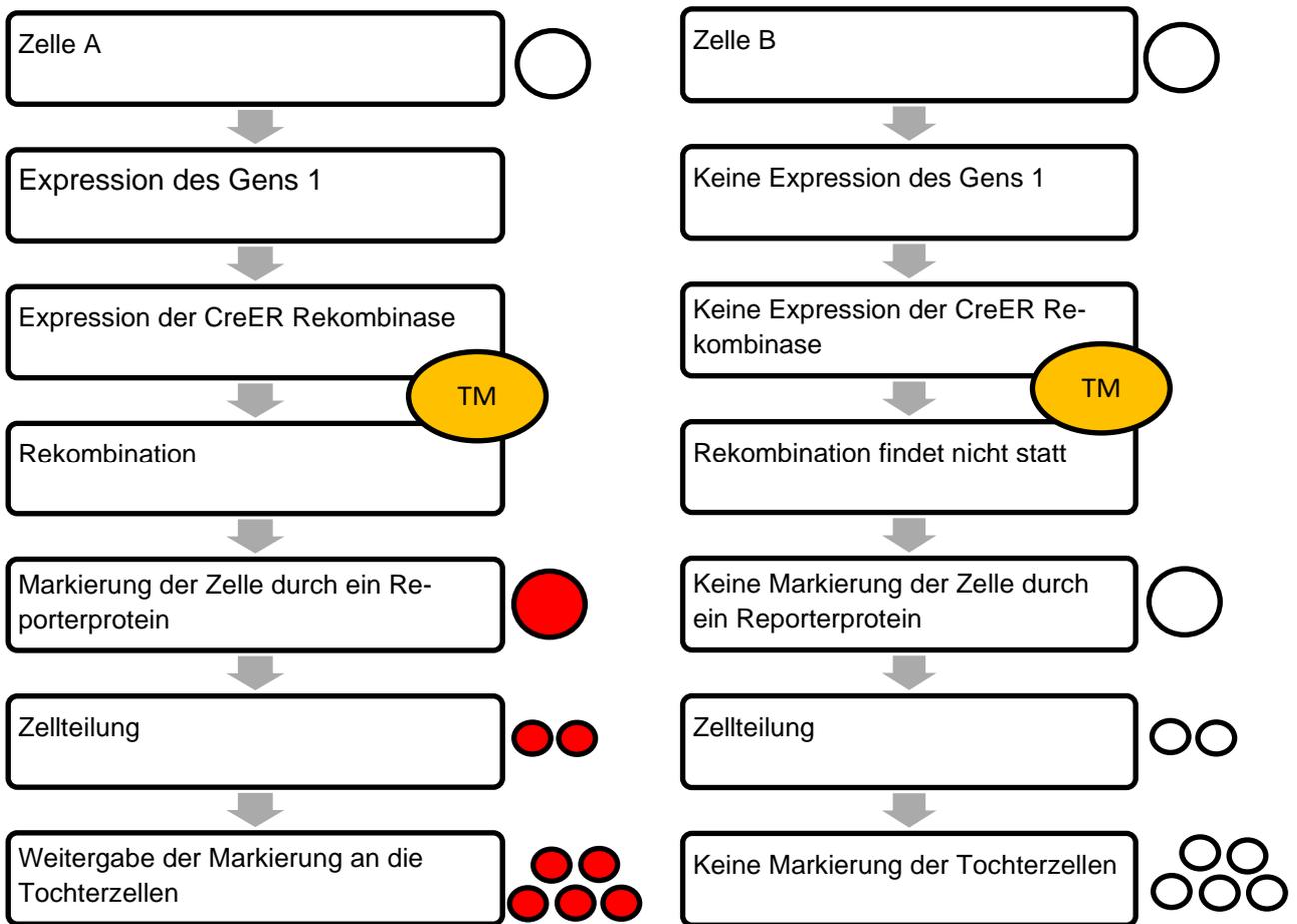


Abb. 8: Schema der induzierbaren genetischen Strategie zur Kartierung des Zellschicksals spezifisch dargestellt für die Markierung von Vorläuferzellen. In Zelle A wird das Gen 1 exprimiert. Die Gabe von Tamoxifen (TM) führt zur Expression des Reporterproteins. In Zelle B wird das Gen 1 nicht abgelesen, wodurch das Fluoreszenzprotein nicht exprimiert werden kann

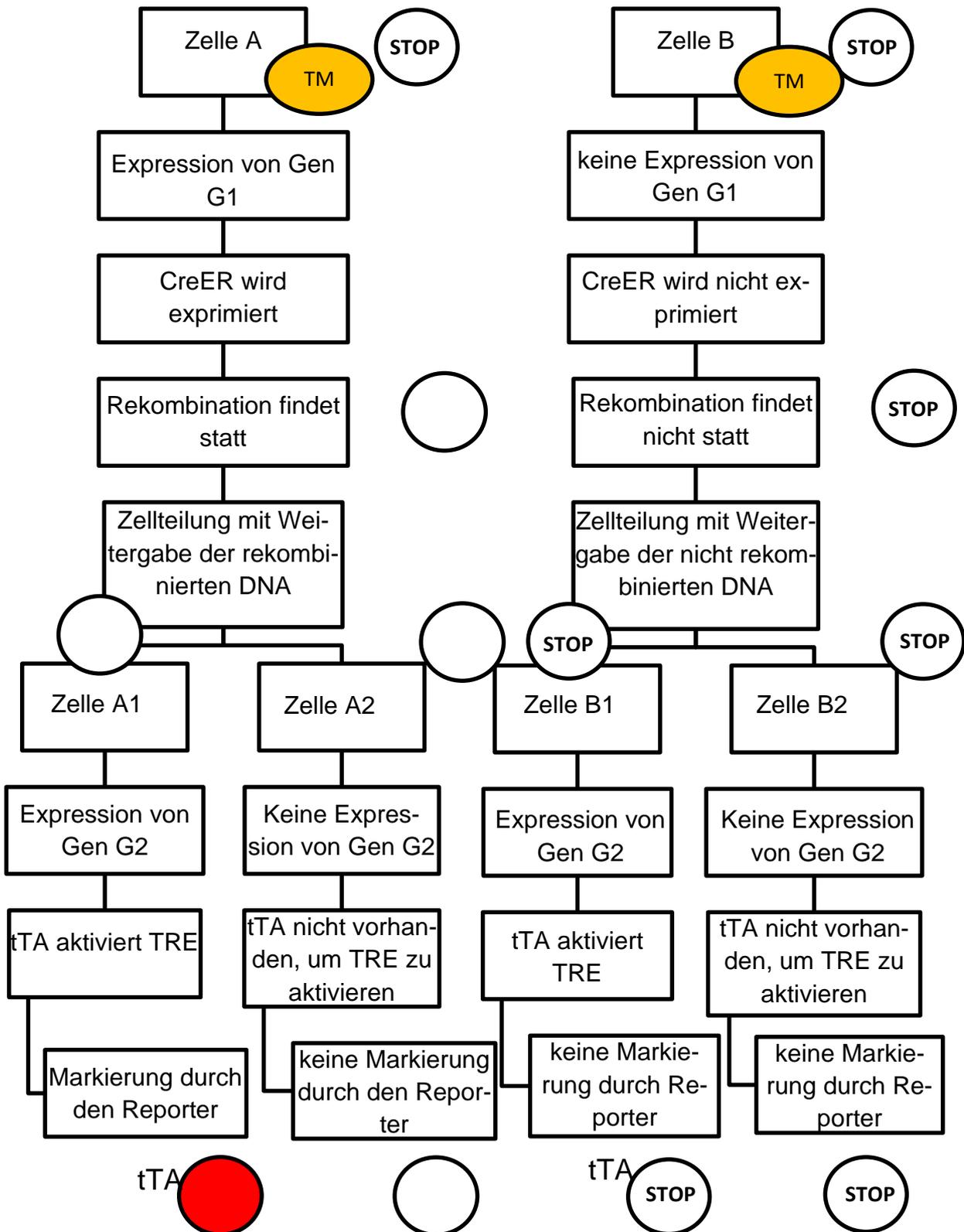


Abb. 9: Induzierbare intersektionelle genetischen Strategie zur Kartierung des Zellschicksals spezifisch dargestellt für die Markierung von Vorläuferzellen. Nur wenn die beiden Gene G1 und G2 exprimiert werden, induziert die Gabe von Tamoxifen (TM) die Expression des Reporterproteins

1.5 CXCR4

CXCR4 ist ein Chemokin-Rezeptor, der während der Entwicklung des ventralen Mittelhirns zwischen E11.5 und E16.5 exprimiert ist und u.a. wie oben beschrieben die Zellmigration der mDAN beeinflusst (Vaswani und Blaess 2016). Wie in der Einleitung erwähnt, werden mit dem gewählten methodischen Ansatz Zellen markiert, welche *Cxcr4* mRNA zu einem definierten embryologischen Zeitpunkt exprimieren. Daher wird im Folgenden auf bisherige Erkenntnisse bezüglich des Proteins mit Fokus auf seine Rolle im ZNS und dessen Entwicklung eingegangen.

1.5.1 Chemokine und ihre Rezeptoren

Chemokine bilden eine Unterform der Zytokine. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie bei anderen Zellen eine gerichtete Zellbewegung induzieren können (Hughes und Nibbs 2018). CXCR4 etwa lockt Lymphozyten in entzündetes Gewebe. Zytokine wurden ehemals nur im Immunsystem vermutet und daher diesbezüglich ausgiebig erforscht. Erst ab 1988 wurde ihre Beteiligung an embryonalen Entwicklungsprozessen entdeckt (Nagasawa 2015; Namen et al. 1988). Weiterhin wurde gezeigt, dass Chemokine von allen wichtigen Zelltypen des ZNS synthetisiert werden können, etwa von Neuronen, Glia, und Mikroglia (Tran und Miller 2003).

Chemokine werden in vier große Gruppen eingeteilt. Diese Einteilung basiert auf der Lokalisation und Organisation der Cysteinreste an der Aminogruppe, welche ein oder zwei Disulfid-Brücken bilden können. Die meisten Chemokin-Rezeptoren erkennen mehrere Chemokine und die meisten Chemokine werden durch mehrere Chemokinrezeptoren erkannt.

CXCR4/CXCL12

Die Chemokine, welche als Liganden an CXCR4 binden, gehören zur CXC-Gruppe, welche auch als Alpha-Subfamilie bezeichnet wird. Sie zeichnet sich durch eine einzelne Aminogruppe zwischen zwei Cysteingruppen aus. Der Stromal Cell-Derived Factor 1 (SDF1) ist ein Vertreter der Chemokine der Alphagruppe. Es existieren zwei bekannte Isoformen, SDF-1 α und SDF-1 β (Tashiro et al. 1993), welche durch Splicing entstehen. Der im Mittelhirn vorherrschende Ligand ist SDF-1 α . Er ist auch unter dem Namen C-X-

C-Motiv-Chemokin 12 (CXCL12) oder PBSF (Pre-B-Cell-Growth-Stimulating Factor) (Nagasawa, T, 2015, Janowski, 2009) bekannt. In dieser Arbeit wird, aufgrund besserer Übersicht, stets die Bezeichnung CXCL12 genutzt.

Wie alle bekannten Zytokin-Rezeptoren vermittelt auch CXCR4 G-Protein gekoppelt Signale an das Zellinnere. Die weitere Signaltransduktion in der Zelle erfolgt über die Aktivierung der Proteinkinase B (PK-B) und der Extrazellulären Signal-regulierten Kinase 2 (ERK-2) (Tilton et al. 2000). Neben der Bindung an CXCR4, bindet CXCL12 auch an C-X-C Motif Chemokin Rezeptor 7 (CXCR7).

1.5.2 Physiologische Funktionen des CXCR4/CXCL12 Signalwegs in der Entwicklung

CXCL12 war das erste Zytokin, dessen Rolle in Entwicklungsprozessen untersucht wurde und das erste Chemokin, das in Neuronen entdeckt wurde (Lavi et al. 1997). Heute ist es für seine Beteiligung an der Hämatopoese, Kardiogenese, Ausbildung von Gefäßen und Neurogenese, sowie am Erhalt von Stammzellen bekannt (Nagasawa 2015). Die zentrale Rolle von CXCR4 in der Entwicklung zeigt sich daran, dass Mäuse mit Funktionsverlust-Mutationen in *Cxcr4* perinatal sterben. Untersucht man das Gehirn dieser Mäuse, zeigen sich u.a. Defekte in der Proliferation und Migration der Körnerzellschicht des Cerebellums (Ma; Zou 1998) und des Gyrus dentatus (Lu et al. 2002). Auch das Auswachsen der Axone von Körnerzellen im Cerebellum (Arkawa et al 2003) und die Entwicklung kortikaler Interneurone (Stumm et al. 2003) weisen Defekte auf. *Cxcr4*-Knockout-Mäuse zeigen außerdem Defekte beim Auswachsen von Axonen im Rückenmark und eine geringere Anzahl retinaler Neurone im Vergleich zu gesunden Tieren (Chalasani et al. 2003). Weiterhin wurden leicht veränderte Muster in der Verteilung der mDAN nachgewiesen. Diese Ergebnisse ließen bereits vermuten, dass CXCR4/CXCL12 einer von mehreren Signalwegen ist, welche an der radialen Migration von mDAN beteiligt sind (Bodea et al. 2014, Yang et al. 2013, Vgl. Abschnitt 1.3.1.5).

1.5.3 Pathologische Funktionen des Komplexes CXCR4/CXCL12 im Gehirn

Auch in verschiedenen Krankheitsgenesen spielt CXCR4 eine entscheidende Rolle. Beispielsweise zu nennen, ist seine Rolle als Korezeptor bei der Aufnahme des Humanan Immundefizienz-Virus (HIV) in die Wirtszelle (Feng et al. 1996). Somit ist die Suppression des Rezeptors im Rahmen der Erkrankung ein Ziel aktueller Forschung (Zhang et al. 2016). In Astrozytomen wurde eine erhöhte Konzentration von CXCR4 und seinem Liganden CXCL12 nachgewiesen. Weiterhin wurde die Beteiligung des Komplexes an Proliferation und Migration des Glioms gezeigt (Bajetto et al. 2006; Gascon et al. 2020; Yi et al. 2019).

1.5.4 Expression von CXCR4 und CXCL12 im embryonalen Mesencephalon

Im ventralen Mittelhirn wird *Cxcl12* in den Meningen exprimiert, welche der Mantelzellschicht anliegen (Yang et al. 2013).

Das CXCR4 Protein wird zwischen den Zeitpunkten E11.5 und E16.5 in der medialen Population der TH+ Neurone (mDAN) exprimiert, die direkt unter der Vorläuferdomäne liegen und welche wahrscheinlich der radial migrierenden Population entsprechen, die frisch differenziert ist. In mDAN, welche in ihrer Differenzierung und Migration schon weiter vorangeschritten sind, ist CXCR4 kaum exprimiert. Zu den Zeitpunkten TM E10.5 und E18.5 wurde keine Expression von CXCR4 im Mittelhirn gefunden (Bodea et al. 2014).

Der zweite Rezeptor für CXCL12, CXCR7 ist hingegen nur in der Ventrikularzone des ventralen Mittelhirns exprimiert (Bodea et al. 2014).

1.6 Fragestellungen der Arbeit

Die mDAN sind eine inhomogene Gruppe von Neuronen, in denen sich die einzelnen Zellen durch verschiedene Merkmale, wie etwa ihre Funktion, anatomische Lokalisation, Konnektom, Expressionsprofil, elektrophysiologische Merkmale und andere unterscheiden. Eine wichtige Frage in der Erforschung der mDAN ist, wie sich ihre Vielfalt während der Entwicklung etabliert. Hierfür gibt es zwei Modelle, die möglicherweise auch zusammenwirken könnten. Im ersten Modell entwickeln sich Vorläuferzellen der mDAN je nach Lage in der Vorläuferregion in verschiedene adulte Subgruppen (Modell A: räumlich). Im zweiten Modell entstehen Untergruppen der mDAN zu unterschiedlichen Zeitpunkten

während der Embryonalentwicklung (Modell B: zeitlich). Zusätzlich könnte die Diversität, insbesondere das Genexpressionsprofil und die Physiologie durch spätere Einflüsse beeinflusst werden (etwa durch Interaktionen mit neuronalen Zellen über Zelladhäsionsmoleküle oder sezernierte Faktoren oder durch synaptische Kontakte).

Die oben beschriebende Expression von CXCR4 zwischen E11.5 bis E16.5, welche aufgrund ihrer Lokalisation darauf hinweist, dass *Cxcr4* in neugeborenen mDAN während der Embryonalperiode exprimiert wird, scheint sich zu eignen, um mDAN zu markieren, die in bestimmten Zeiträumen geboren werden und so Modell B zu testen. Der Vorteil dieser neuen Methode gegenüber früheren Studien zur Bestimmung des Zeitpunktes, zu dem die Zelle gebildet wird (engl. „Birthdating“-Studien) mit [3H]Thymidin und BrdU ist die dauerhafte und langfristige Markierung der Zellen auch in adulten Tieren. Weiterhin kann aufgrund der Expression von fluoreszenten Reporterproteinen im gesamten Neuron nicht nur die Lage der markierten Zellen analysiert werden, sondern auch direkt weitere Eigenschaften, wie etwa deren axonale Projektionen oder Morphologie, untersucht werden.

Die zu prüfenden Hypothesen der vorliegenden Arbeit sind, dass (1) die Expression von *Cxcr4* als Marker zur Zeitpunktbestimmung der Geburt einer Zelle für mDAN genutzt werden kann, und (2) dass sich bei Induktion der Rekombination zu verschiedenen embryonalen Zeitpunkten eine räumliche Häufung der zu einem bestimmten Zeitpunkt markierten Zellen im histologischen Schnitt in verschiedenen anatomischen Kerngebieten ergibt, was dafür sprechen würde, dass bestimmte mDAN Subgruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Embryonalentwicklung entstehen.

Methodisch nutzten wir eine induzierbare genetische Strategie zur Kartierung des Zellschicksals (Madisen et al., 2010; Werner et al., 2020) und in einem zweiten Schritt eine induzierbare intersektionelle genetische Strategie zur Kartierung des Zellschicksals, um zu verschiedenen embryonalen Zeitpunkten (TM E11.5 bis 17.5) *Cxcr4*-abstammende Zellen mit einem Reporterprotein zu markieren. Die Verteilung der markierten Zellen wurde pränatal (E18.5) oder neonatal (postnataler Tag (P0)) mittels immunhistochemischen Färbungen gegen das Reporterprotein zur Verstärkung der Markierung *Cxcr4*-abstammender Zellen und gegen TH zur Markierung von mDAN untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Software

Tab. 1: Technische Ausstattung

Anwendung	Modell/ Katalog Nr.	Hersteller	Verwaltungssitz
Autoklav	DX-150 benchtop	Systemec	Wettenberg, DE
Fluoreszenzlampe	Illuminator HXP120C	Carl Zeiss	Jena, DE
Gelkammern	Model 41-1525 Model 40-1515	Peqlab	Erlangen, DE
Kühl- und Gefrierschränke 4°C, -20°C, -80°C	G 2013 Comfort HERAFreeze	Liebherr Kendro	Lindau Hanau, DE
Magnetrührstäbchen	AGE 1200 rpm	VELP Scientifica	Usmate, IT
Mikroskop	AxioObserver Z1 SIP66732	Carl Zeiss	Jena, DE
Mikroskop Farbkamera	AxioCam MRc	Carl Zeiss	Jena, DE
Mikroskop Kamera	AxioCam MRm	Carl Zeiss	Jena, DE
Mikrowelle	MW7809	Severin	Sundern, DE
Mikro-Zentrifuge	Pico17	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, DE
Mini-Zentrifuge	3722L	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, DE
Objektiv, 10-fache Vergrößerung (ApoTome)	EC PlnN 10x/0.3 DIC I 1.11µm	Carl Zeiss	Jena, DE
Objektiv, 20-fache Vergrößerung (ApoTome)	EC PlnN 20x/0.5 DIC II 0.67 µm	Carl Zeiss	Jena, DE
Objektiv, 40-fache Vergrößerung (ApoTome)	Pln Apo 40x/1.3 Oil DIC III 0.26 µm	Carl Zeiss	Jena, DE
pH Meter	FE20 FiveEasy	Mettler Toledo	Giessen, DE
Pipetten (10, 20, 200,1000µL)	FA10002M FA10003M FA10005M FA10006M	Gilson	Middleton, USA
Pipettierhelfer Accu-jet pro	26300	Brand	Wertheim, DE
Schüttler	4440148	VWR	Darmstadt, DE
Spannungsgeber Elektrophorese	EV231	Peqlab	Erlangen, DE
Thermoblock (zur Lyse)	230-1.00AT	Peqlab	Erlangen, DE

Anwendung	Modell/ Katalog Nr.	Hersteller	Verwaltungssitz
Thermozykler	DNA engine PTC-200	BioRAD	München, DE
Vortex Mixer	Vortex mixer Rx3	VELP Scientifica	Usmate, IT
VortexMixer	Vortex genius	IKoLokAn	Staufen, DE
Waage	AC211S	Sartorius	Göttingen, DE
Waage	ATL-822-1	Sartorius	Göttingen, DE
Wasserbad	10679808	GFL	Burgwedel, DE
Wasserbad	WB Typ1012/1013	GFL	Burgwedel, DE
Zentrifuge	Pico 17	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, DE
Zentrifuge	Labofuge 400R 75008-162	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, DE

Tab.2: Software

Anwendung	Software	Hersteller	Verwaltungssitz
Gel Dokumentation	Quantity One	Bio-Rad	München, DE
Erstellen einer Bild-datei	Axiovision 4.8	Carl Zeiss	Jena, DE
Erstellen einer Bild-datei	Leica Application Suite 3.3.0	Leica	Wetzlar, DE
Erstellen einer Bild-datei	Olympus Fluoview ver.3.1	Olympus	Hamburg, DE
Bildbearbeitung	ImageJ 1.46k	Wayne Rasband, National Institutes of Health	Bethesda, USA
Bildbearbeitung	ImageJ 1.47n (Fiji)	Wayne Rasband, National Institutes of Health	Bethesda, USA
Bildbearbeitung	Imarisx64 7.6.1	Bitplane	Zürich, CH
Verarbeitung der Bilddaten	Microsoft Excel 2019 Version 1808	Microsoft Corporation	Washington, USA
Auswertung der Bilddaten und Statistik	RStudio Version 2009-2020 Version 1.2.5042	RStudio, Inc.	Bosten, USA
Auswertung der Bilddaten und Statistik	GraphPad PRISM Version 7.0	GraphPad Software, Inc	San Diego, California

2.2 Material

Tab. 3: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Modell/ Katalog Nr.	Hersteller	Verwaltungssitz
Deckgläser	LAME110071	Labomedic	Bonn, DE
Einbettenschälchen	Histosette	VWR	Darmstadt, DE
Einmalhandschuhe	PFC 4303971	Ansell	München, DE
Einweg-Ausgießform	Peel-A-Way	Polysciences Inc.	Eppenheim, DE
Eppendorf Röhrchen 1.5mL	72690	Sarstedt	Nümbrecht, DE
Graefe Pinzette (0.8mm)	11050-10	Fine Science Tools	Heidelberg, DE
Iris Schere (11 cm)	14060-11	Fine Science Tools	Heidelberg, DE
Iris Schere (9 cm)	14060-09	Fine Science Tools	Heidelberg, DE
Klingen	Apollo	Apollo Herkenrath GmbH & Co KG	Solingen, DE
Kryostat Klingen	819	Leica	Wetzlar, DE
Objektträgerkasten	HS15994E	Carl Roth	Karlsruhe, DE
Parafilm	PM-996	Bemis	Köln, DE
Pasteur Plastik Pipetten 1mL	2655181	VWR	Darmstadt, DE
PCR Stripes	732-0551	VWR	Darmstadt, DE
PCR Stripes einzelne Tubes	732-0545	VWR	Darmstadt, DE
Perforierter Löffel	Moria MC17BIS 10370 -18	Fine Science Tools	Heidelberg, DE
Petri Schalen 100x15mm	351029	BD Biosciences	Heidelberg, DE
Petri Schalen 35x10mm	351008	BD Biosciences	Heidelberg, DE
Pipetten-Filterspitzen	ART 100/200/1000 barrier tips	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, DE
Polypropylen konische Tubes 1.5mL	352096	BD Biosciences	Heidelberg, DE
Polypropylen konische Tubes 50mL	352070	BD Biosciences	Heidelberg, DE
Rasierklingen	121-6	Plano GmbH	Wetzlar, DE
Rein Rotmarder Pinsel 770	149-2120	VWR	Darmstadt, DE
Schlundsonden zur Tierfütterung	18061-20	Fine Science Tools	Heidelberg, DE

Verbrauchsmaterial	Modell/ Katalog Nr.	Hersteller	Verwaltungssitz
Serologische Pipetten	4487 (5mL) 4488 (10mL) 4489 (25mL)	Corning Life Sciences	Kaiserslautern, DE
Skalpellschneide Chirurgische Klinge no.10	0201000010	Feather Safety Razor co.LTD	Köln, DE
Spritze – 1mL	300013	BD Biosciences	Heidelberg, DE
Sterilisations-Klebeband	SteriClin sticky tape	VP group	Feuchtwangen, DE

Tab. 4: Weiteres Präparierbesteck

Material	Modell/ Katalog Nr.	Hersteller	Verwaltungssitz
Gerade Präparierschere	91401-12	Fine Science Tools	Heidelberg, DE
Noyes Federschere (14 mm)	15012-12	Fine Science Tools	Heidelberg, DE
Pinzette Dumont (#5)	11252 – 30	Fine Science Tools	Heidelberg, DE

Tab 5: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	Katalog Nr.	Hersteller	Verwaltungssitz
Agarose	16500-500	Life Technologies	Darmstadt, DE
Ampuwa	40676.00.00	Ampuwa, Fresenius	Bad Homburg, DE
Aqua-PolyMount	18606	Polysciences Inc.	Eppenheim, DE
Ascorbinsäure	A4403	Sigma-Aldrich	Steinheim, DE
Benzylalkohol	402834	Sigma-Aldrich	Steinheim, DE
Benzylbenzolat	B6630	Sigma-Aldrich	Steinheim, DE
Bisbenzimidazol H33258	B2883	Sigma-Aldrich	Steinheim, DE
Bromphenolblau	A1120.005	AppliChem	Darmstadt, DE
Chlorophorm	22711.26	VWR	Darmstadt, DE
DMEM (Glukose)	41966-029	Life Technologies	Darmstadt, DE
DMSO (Dimethylsulfoxid)	D8418	Sigma-Aldrich	Steinheim, DE
DNA Leiter (1kb)	10787-018	Life Technologies	Darmstadt, DE
DNase I	LS002138	Cell Systems	Kirkland, USA

Chemikalien	Katalog Nr.	Hersteller	Verwaltungssitz
dNTPs (100mM)	28-4065-52	GE Healthcare	Dornstadt, DE
EDTA	E6511	Sigma-Aldrich	Steinheim, DE
Essigsäureanhydrid	1.00639.1000	VWR	Darmstadt, DE
Ethanol	20821.32	VWR	Darmstadt, DE
Ethidiumbromid	2218.2	Carl Roth	Karlsruhe, DE
Formamide	155-15026	Life Technologies	Darmstadt, DE
Glucose	G7528-250g	Sigma-Aldrich	Deisenhofen, DE
Hoechst-Lösung	62249	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, DE
Immersol	TM518F	Carl Zeiss	Jena, DE
Isopropanol	P/7500/15	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, DE
Maisöl	C8267	Sigma-Aldrich	Steinheim, DE
MgCl	25108.26	VWR	Darmstadt, DE
Na ₂ HPO ₄	28028.3	VWR	Darmstadt, DE
NaCl	27808.3	VWR	Darmstadt, DE
NaCl	S2002	Sigma-Aldrich	Deisenhofen, DE
NaH ₂ PO ₄	28013.26	VWR	Darmstadt, DE
NaHCO ₃	27775.29	VWR	Darmstadt, DE
NaOH	31627.29	VWR	Darmstadt, DE
Nomales Eselsserum	017-000-121	Jackson ImmunoResearch	Suffolk, UK
Paraformaldehyd	335.2	Carl Roth	Karlsruhe, DE
Progesteron	P-3972	Sigma-Aldrich	Steinheim, DE
Saccharose	27480.36	Sigma-Aldrich	Deisenhofen, DE
Tamoxifen	T5648	Sigma-Aldrich	Deisenhofen, DE
Taq DNA Polymerase recombinant	10342-020	Life Technologies	Darmstadt, DE
ThermoClean	25220100	Bioanalytic	Freiburg, DE
Tissue Tek O.C.T.	4583	Sakura	Alphen aan den Rijn, NL
Triethanolamin	28746290	VWR	Darmstadt, DE
Tris-HCl	108219.1	Merck Millipore	Darmstadt, DE
TritonX100	1.08603.1000	Merck Millipore	Darmstadt, DE
Tween20	28829.18	VWR	Darmstadt, DE
UltraPure LMP Agarose	15517-022	Life Technologies	Darmstadt, DE
Xylen	CN80.2	Carl Roth	Karlsruhe, DE
Ziegenserum	G9023519	Sigma-Aldrich	Steinheim, DE

Tab. 6: Antikörper (AK)

Fluorophor/ Antigen	Wirt- spezies	Zielspezies (nur für se- kundäre AK)	Firma	Produktcode
TH	Kaninchen		Merck, Darmstadt, DE	AB152
TH	Maus		Merck, Darmstadt, DE	MAB318
DsRed	Maus		Clontech	632392
GFP	Kaninchen		Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA	AB_2536526
GFP	Ratte		Nacalai Tesque, Inc	04404-84
GFP	Ziege		Abcam	AB5449
RFP	Kaninchen		Rockland-inc, Hamburg, DE	600-401-379
Alexa 350	Esel	Ziege	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA	A21081
Alexa 350	Esel	Kaninchen	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA	A10039
Alexa 350	Esel	Maus	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA	A10035
Alexa 488	Esel	Kaninchen	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA	A21206
Alexa 488	Esel	Maus	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA	A21202
Alexa 488	Esel	Ratte	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA	A21208
Alexa 546	Esel	Kaninchen	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA	A10040
Alexa 647	Esel	Maus	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA	A31571
Alexa 647	Esel	Kaninchen	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA	A31573
Alexa 647	Esel	Ratte	Life Technologies Research	AB150155
Biotin	Esel	Kaninchen	Jackson Immuno Research	AB_2340593
Biotin	Esel	Ratte	Jackson Immuno Research	712-066-150
Cy3	Esel	Maus	Jackson Immuno Research	715-165-151

Tab. 7: Streptavidin-Konjugat

Präparat	Hergestellt durch	Katalog Nr.
Cy3-konjugiertes Streptavidin	Jackson Immuno Research	016-160-084

Tab. 8: Enzyme

Enzym	Hergestellt durch	Katalog Nr.
Deoxyribonuklease (DNAse)	Promega Corp, Mannheim, DE	M610A
Proteinase K	Roche, Penzberg, DE	03115879001
Ribonuklease (RNAse A)	Life Technologies, Darmstadt, DE	PureLink 12091-021
Taq DNA Polymerase Recombinant (500U)	Roche, Penzberg, DE	10342-020

Tab. 9: PCR-Primer zur Genotypisierung der Mäuse

Primer	Sequenz 5'- 3'
Cre	F: TAA AGA TAT ctc acg tac tga cgg tg R: TCT CTG ACC AGA GTC ATC CTT AGC
CreER	F: AGT GAA ACC TCT GAG GCG TTT GGT M R: TCT GAA CCC GTC CCA CTC AAC TTA WT R: TAG AGC CTG TTT TGC ACG TTC ACC
Cxcr4CreERJena	X4_Cre_U: AGT GAA ACC TCT GAG GCG TTT GGT X4_Cre_L1: TAG AGC CTG TTT TGC ACG TTC ACC X4_Cre_L2: TCT GAA CCC GTC CCA CTC AAC TTA
CreER900	F1: CGA CCA GGT TCG TTC ACT CA R1: ACA GTA GCT TCA CTG GGT GC
R26	RR1: AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT RR2: GCG AAG AGT TTG TCC TCA ACC RR3: GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG
Ai9	Ai9 WT F: AAG GGA GCT GCA GTG GAG TA Ai9 WT R: CCG AAA ATC TGT GGG AAG TC Ai9 MT F: CTG TTC CTG TAC GGC ATG G Ai9 MT R: GGC ATT AAA GCA GCG TAT CC
Ai82	Ai82 MT F: ACG AGA TCA GCA GCC TCT GT Ai82 MT R: CTG ACC TTG CCG TTT AC Ai82 WT F: TTC CCC AAC GGT CAC TTA CT Ai82 WT R: CAC ACC TTT AAT CCC GAT GC
Pitx3-IRES	Pitx3-F: GAC TGG CTT GCC CTC GTC CCA Pitx3-R: GTG CAC CGA GGC CCC AGA TCA

Tab. 10: Puffer und Lösungen

Puffer /Lösung	Inhalt
Lösungen zur Genotypisierung	
Lyse Puffer	333 µL 1.5 M Tris, pH 8.8 (50 mM), 20 µL 0.5 M EDTA (1 mM), 500 µL 10% Tween, 9.1 mL dH ₂ O
Lösungen zur Immunofluoreszenz-Färbung	
1 x TAE	50 x TAE verdünnt 1:50 mit H ₂ O, gelagert bei RT
10x Ladepuffer	50% Glycerol, 0.4%; Bromphenol Blau 0.4%; Xylen Cyanol, vermischt und bei 4°C gelagert
50 x Tris-Acetat-Puffer (TAE)	242g Tris-Base, 100mL 0.5M EDTA (pH 8.0), 57.1mL Acetat-Essig in 1L H ₂ O, gelagert bei RT
Blockierer	10% NDS in PBT
Fixierungslösung (4% PFA)	10 mL 20% PFA in 50mL PBS
Lösungen für die Gelelektrophorese	
PBS (5x)	40 g NaCl (137 mM) 1 g KCl (2,7 mM) 7.1 g Na ₂ HPO ₄ (10 mM) 1.36 g KH ₂ P ₄ (2 mM) in 1 L dH ₂ O
PBS-Säure (0.1%)	0.1% Natrium-Säure in PBS
PBT (0.1%)	10 mL 10% Triton-X (0.1 %), 990 mL PBS (1x)
PBT (0.2%)	20 mL 10% Triton-X (0.2 %), 980 mL PBS (1x)
PFA (20%, Paraformaldehyde)	500 g PFA 2.0 L ddH ₂ O 8.0 mL NaOH, durch 0.4 µm-Filter gefiltert und gelagert bei -20°C
Waschlösung	0.1% Triton-100x in PBT

2.3 Mäuse

Tab. 11: Liste der Mauslinien

Abkürzung	Allel-Symbol oder Name	Allel-Typ	Zur Verfügung gestellt durch/ erworben von	Referenz
CD1	Wildtyp	Wildtyp	Charles River Laboratories	Referenznummer 022
<i>R26^{EYFP}</i>	<i>Gt(ROSA)26Sor^{tm1Sor}</i>	Targeted (Reporter)	Frank Costantini lab, Columbia University	(Srinivas et al., 2001)
<i>R26^{Ai9}</i>	<i>Gt(ROSA)26Sor^{tm9(CAG-tdTomato)Hze}</i>	Targeted (Reporter)	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA	Referenznummer: 007909; (Madisen et al. 2010)
<i>Cxcr4^{CreER}</i>	<i>Cxcr4^{CreER(T2)-IRES-eGFP}</i>	Targeted (Knock-in)	Ralf Stumm lab, Jena University	(Werner et al. 2020)
<i>Pitx3^{tTA}</i>	<i>Pitx3^{IRES2-tTA}</i>	Targeted (Knock-in)	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA	Referenznummer: 021962; (Lin et al. 2012; The Jackson Laboratory 2022)
<i>Ai82^{TRE}</i>	<i>Ai82D^{TITL-GFP/+}</i>	Targeted (Reporter)	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA	Referenznummer: 023532 (Madison et al. 2015)
<i>En1^{Cre}</i>	<i>En1^{Cre}</i>	Targeted (Knock-in)	Prof. Alexandra Joyner, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York	(Kimmel et al. 2000)

2.3.1 Mäuszucht und -haltung

Alle transgenen Mauslinien wurden auf einem CD1-Auszuchtmaus-Hintergrund gezüchtet. Um das Risiko von Gendrifts zu vermindern, wurden die transgenen Mäuse in jeder zweiten Generation mit CD 1 Mäusen verkreuzt. Die Mäuse wurden in einer kontrollierten

Umgebung bei 12 h Licht-Dunkelheitszyklus gehalten. Futter und Wasser wurden ad libitum zur Verfügung gestellt. Alle Versuche wurden unter strikter Einhaltung der Tierschutzbestimmungen der Bundesregierung, der Gesetzgebung der Europäischen Union und der Bestimmungen der Universität Bonn durchgeführt. Das Tierversuchsprotokoll wurde vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt (Genehmigungsnummer: 84-02.04.2016.A238).

2.3.2 Mausgenetik

Für die Genetische Strategie zur Kartierung des Zellschicksals nutzen wir eine aus dem Labor Ralf Stumm (Universität Jena) stammende Mauslinie, in welche eine CreER-Kassette gefolgt von einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) und einem GFP-Protein in den *Cxcr4*-Lokus eingefügt wurde. Die zweite Mauslinie enthielt das Reporter-gen *tdTomato* (*tdT*), welches nur bei aktivem Cre-Protein abgelesen wird (Vgl. Abschnitt 1.4.3). *R26* ist ein Locus, von dem Genprodukte ubiquitär exprimiert werden. Die *R26^{Ai9/Ai9}* Reporter Mäuse wurden generiert, indem eine loxP-flankierte STOP-Sequenz, gefolgt von einem *tdT* Protein-Gen in den *Gt(ROSA)26Sor* Locus eingebracht wurde (Madisen et al. 2010). Das *tdT* Protein wird daher nur exprimiert, wenn das STOP-Kodon durch eine Cre-Rekombinase herausgeschnitten wird. Wir verkreuzten die oben genannten Mauslinien und erhielten so Mäuse, in deren Erbgut beide beschriebenen Allele nachweisbar waren (Vgl. **Abb.10**). Die in der Analyse für *tdT* positiven Zellen werden im Folgenden als „*Cxcr4*-Linie“ bzw. „*Cxr4*-abstammende Zellen“ bezeichnet.

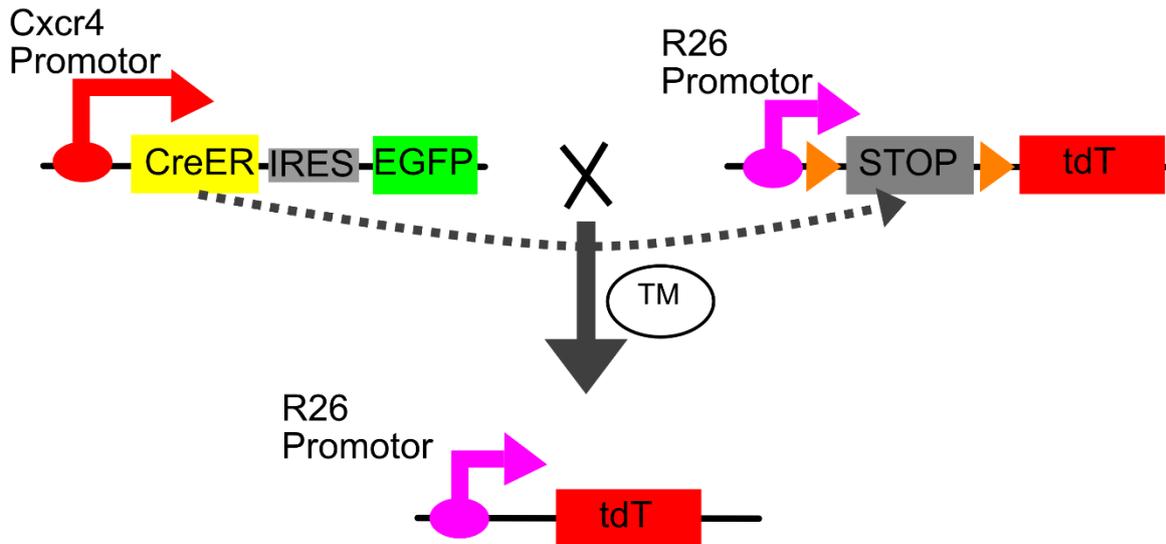


Abb. 10: Mauslinien und Kreuzungen für die induzierbare genetische Strategie zur Kartierung des Zellschicksals und deren Funktionsweise. Unter dem Promotor von *Cxcr4* wird eine an einen Estrogenrezeptor (ER) gekoppelte Cre Rekombinase abgelesen. Nach Bindung von Tamoxifen (TM) an CreER, kann diese in den Zellkern gelangen und die Rekombination der loxP Seiten vermitteln. Dadurch wird das von den loxP Seiten (▶) flankierte Stopcodon herausgeschnitten und das Reporterprotein tdT kann exprimiert werden. Unter dem *Cxcr4* Promotor wird außerdem das Gen für das grün fluoreszierende Protein (EGFP) abgelesen. Von CreER ist es getrennt durch eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) (Werner et al. 2020)

Bei der induzierbaren *intersektionellen* genetischen Strategie zur Kartierung des Zellschicksals kann die Markierung auf Zellen spezifiziert werden, welche zu einem bestimmten embryonalen Zeitpunkt zwei definierte Gene exprimieren. Wir nutzten sie, um die Markierung der Zellen im Mittelhirn auf DA Zellen zu beschränken. Hierfür sind drei Allele notwendig (Vgl. Abschnitt 1.4.3).

In Allel 1, wird unter Kontrolle des Promotors von *Cxcr4* *CreER* abgelesen, wobei CRE wie oben beschrieben erst nach Aktivierung durch TM im Zellkern an der DNA wirksam werden kann. Unter Kontrolle des Promotors des Gens *Paired Like Homeodomain 3* (*Pitx3*) wird das Gen des Tetracycline Transaktivator (tTA) abgelesen (Lin et al. 2012). Die Bindung von tTA an ein entsprechendes „Tetracycline Response Element“ (TRE) führt zur Aktivierung des von TRE kontrollierten Gens. In einem für diese intersektionelle genetische Kartierung konzipierten Reporterallel, wir nutzten EGFP, folgt hinter TRE ein von loxP-Seiten flankiertes Stopcodon, sodass das Reportergen EGFP nur exprimiert werden kann, wenn zum Untersuchungszeitpunkt eine Aktivierung von CreER über Tamoxifen

stattgefunden hat und tTA epimiert wurde (Jensen und Dymecki 2014; Joyner und Zervas 2006; Madisen et al. 2015).

Grundsätzlich wird angenommen, dass *Pitx3* in der Maus in allen differenzierten mDAN exprimiert wird (Bodea et al. 2014; Korotkova et al. 2005), sodass wir schlussfolgerten, dass eine Expression unseres Reportergens EGFP die Expression von *Cxcr4* zum Untersuchungszeitpunkt, sowie die mDAN Zellidentität anzeigt.

In der von uns genutzten Mauslinie *Cxcr4^{CreER}* wird EGFP ebenfalls unter dem *Cxcr4*-Promotor exprimiert. Da wir Gehirne zum Zeitpunkt E18.5 oder P0 untersuchten, ergab sich hierdurch für unsere Analyse keine Überschneidung des Reporterproteins, da *Cxcr4* in Neuronen, Glia und Mikroglia des adulten Mesencephalons nicht exprimiert ist (Saunders et al. 2018).

Die Allele *Cxcr4^{CreER/+}*, *R26^{Ai9/Ai9}*, *Pitx3^{tTA/+}*, *Ai82^{TRE/+}* und *En1^{Cre/+}* (Vgl. Abschnitt 3.3, in weiteren Experimenten der Arbeitsgruppe verwendet) wurden durch PCR-basierte Genotypisierung identifiziert, indem spezifische Oligonukleotide genutzt wurden (s. Abschnitt 2.4.1).

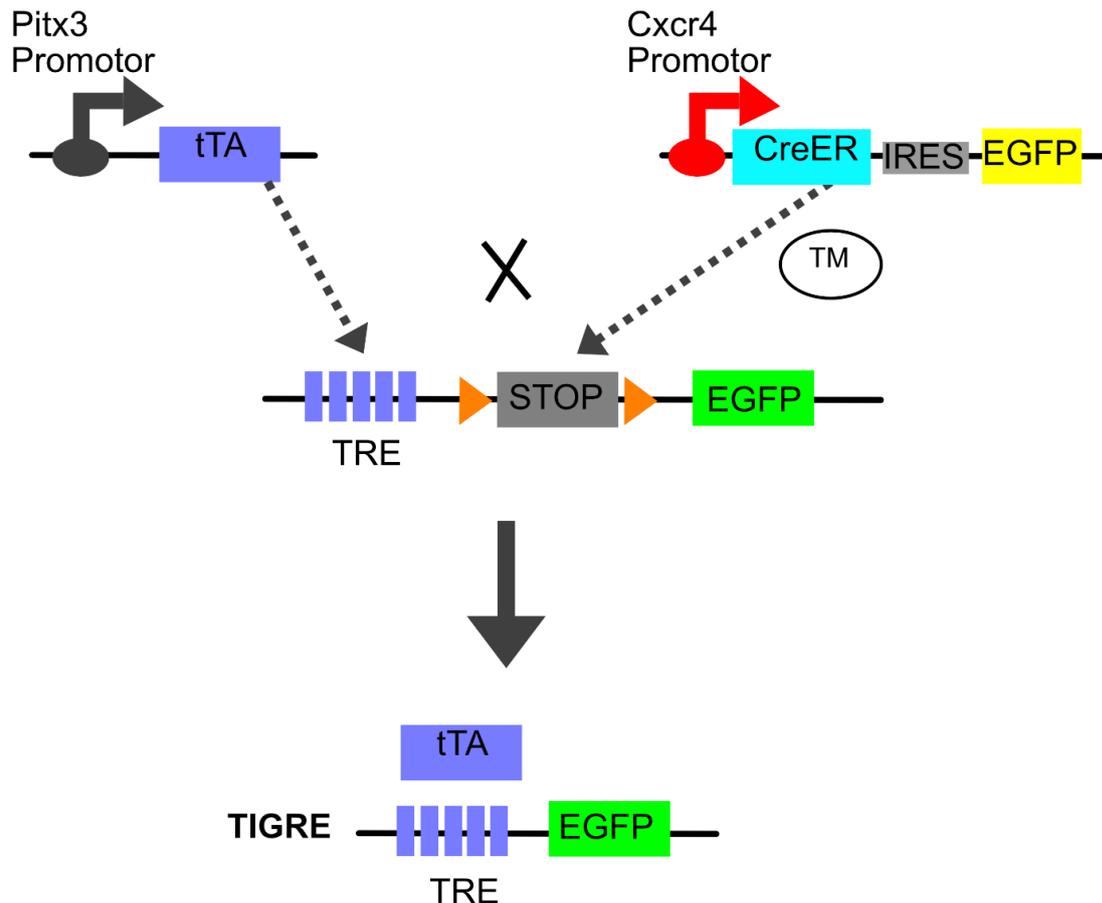


Abb.: 11: Mauslinien und Kreuzungen für die induzierbare intersektionelle genetische Strategie zur Kartierung des Zellschicksals. Unter dem *Cxcr4*-Promotor wird eine an einen Estrogenrezeptor (ER) gekoppelte Cre Rekombinase (CreER) abgelesen. Nach Bindung von Tamoxifen (TM) an CreER kann diese in den Zellkern gelangen und die Rekombination der loxP Seiten (▶) vermitteln. Dadurch wird das von den loxP Seiten flankierte Stopcodon herausgeschnitten. Der Promotor (Tetracycline Response Element, TRE) im TIGRE-Lokus ist nur unter Vorhandensein des Tetracycline-Controlled Transactivator (tTA) aktiv, welches unter Kontrolle des *Pitx3*-Promotors abgelesen wird. Das Reporterprotein EGFP kann exprimiert werden

2.3.3 Verabreichung von Tamoxifen

Zur Induktion der Rekombination mit Cre wurde TM an spezifischen Gestationstagen verabreicht. TM wurde hierfür in einer Konzentration von 20 mg/ml in Mais-Öl gelöst. Um das Risiko von Fehlgeburten zu vermindern wurden der TM Lösung 5 mg/ml Progesteron hinzugefügt (Joyner und Zervas 2006). Den schwangeren Weibchen wurden 3 bis 4 mg Tamoxifen einmalig mit Schlundsonden oral um 12 Uhr mittags an den Gestationstagen

E11.5, E12.5, E13.5, E14.5 oder E15.5 verabreicht (Vgl. **Abb. 16**). Tag E0.5 wurde als Mittag des Tages festgelegt, an dem ein Vaginalpfropf gefunden wurde.

2.4 Molekularbiologie

2.4.1 Genotypisierung der Mäuse

Lyse der Gewebeproben

Zur Genotypisierung der genetisch modifizierten Tiere eines Wurfes wurde eine kleine Gewebeprobe des Ohres (Ohrstanze) oder der Schwanzspitze erworben. Es wurde ein Gewebeverdau in 100 µl Lysepuffer mit 1 µl Proteinase K bei 60°C über mindestens 4 h durchgeführt. Im Folgenden wurde die Proteinkinase K bei 95°C für 10 min inaktiviert. 1 µl der entstandenen klaren Lösung wurde oberflächlich entnommen. Der Überstand (im Folgenden als „Probe“ bezeichnet) enthält DNA und wurde zur Vervielfältigung der DNA während der PCR genutzt.

PCR-Protokolle

Für alle PCRs wurde ein standardisierter Reaktionsmix verwendet. Je nach Anzahl der Primer variiert die Menge an Wasser (H₂O), sodass stets eine Lösung mit einem Gesamtvolumen von 20 µl entsteht (bzgl. Primer-Sequenzen s. Abschnitt 2.2, **Tab. 9**).

Tab. 12: Reaktionsmix

Menge	Reaktions-Komponente
1.00 µL	Probe
2.00 µL	PCR rxn Puffer (1x)
0.16 µL	dNTPs (25 nM)
1.00 µL	Primer 1
1.00 µL	Primer 2
1.00 µL	Ggf. Primer 3
1.00 µL	Ggf. Primer 4
0.60 µL	MgCl ₂ (1.5 mM)
0.2 µL	Taq Polymerase (1 U)
Verdünnung mit dH ₂ O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl	

Es wurden die folgenden PCR-Protokolle durchgeführt:

Tab. 13: PCR-Protokolle

Rosa26 YFP		
Primer: R26-RR1 (5 μ M), R26-RR2 (5 μ M), R26-RR3 (5 μ M)		
Thermozykler-Programm		
Schritte	Temp. °C	Dauer min.
1) Denaturieren	94	2:00
2) Denaturieren	94	1:00
3) Primer-Hybridisierung	61	1:00
4) Elongation	72	10:00
5) Letzte Elongation	72	10:00
6) Inkubation	8	∞
Wiederholung der Schritte 2 – 4 30 Mal		
Gelelektrophorese – 1.5% Agarose, Wildtyp: 650 bp, Mutant: 340 bp		

Cre		
Primer: creF (5 μ M), creR (5 μ M)		
Thermozykler-Programm		
Schritte	Temp. °C	Dauer min.
1) Denaturieren	95	2:00
2) Denaturieren	95	0:40
3) Primer-Hybridisierung	59	1:00
4) Elongation	72	0:50
5) Incubation	8	∞
Wiederholung der Schritte 2 – 4 für 30 Zyklen		
Gelelektrophorese – 1.5% Agarose, Mutant: 300 bp		

CreER		
Primer: ERT1 (5 μ M), ERT1 (5 μ M)		
Thermozykler-Programm		
Schritte	Temp. °C	Dauer min.
1) Denaturieren	94	2:00
2) Denaturieren	94	1:00
3) Primer-Hybridisierung	61	1:00
4) Elongation	72	1:00
5) letzte Elongation	72	10:00
6) Inkubation	8	∞
Wiederholung der Schritte 2 – 4 für 30 Zyklen		
Gelelektrophorese – 1.5% Agarose, Mutant: 400 bp		

Cxcr4CreERJena		
Primer: X4_Cre_L1 (5 μ M), X4_Cre_L2 (5 μ M), X4_Cre_U (5 μ M)		
Thermozykler-Programm		
Schritte	Temp. °C	Dauer min.
1) Denaturieren	95	2:00
2) Denaturieren	95	0:15
3) Primer-Hybridisierung	60	0:15
4) Elongation	72	1:30
5) Letzte Elongation	72	3:00
6) Inkubation	8	∞
Wiederholung der Schritte 2 – 4 für 33 Zyklen		
Gelelektrophorese – 1.5% Agarose, Wildtyp: 299 bp, Mutant: 467 bp		

CreER900		
Primer: F1 (5 μ M), R1 (5 μ M)		
Thermozykler-Programm		
Schritte	Temp. °C	Dauer min.
1) Denaturieren	94	2:00
2) Denaturieren	94	0:30
3) Primer-Hybridisierung	57	0:30
4) Elongation	72	1:30
5) Letzte Elongation	72	10
6) Inkubation	15	∞
Wiederholung der Schritte 2 – 4 für 34 Zyklen		
Gelelektrophorese – 1.5% Agarose, Mutant: 900 bp		

Ai9		
Primer: Ai9 WT F (5 μ M), Ai9 WT R (5 μ M), Ai9 MT F (5 μ M), Ai9 MT R (5 μ M)		
Thermozykler-Programm		
Schritte	Temp. °C	Dauer min.
1) Denaturieren	94	2:00
2) Denaturieren	94	1:00
3) Primer-Hybridisierung	61	1:00
4) Elongation	72	10:00
5) Letzte Elongation	72	10:00
6) Inkubation	8	∞
Wiederholung der Schritte 2 – 4 für 30 Zyklen		
Gelelektrophorese – 1.5% Agarose, Wildtyp: 297 bp, Mutant: 196 bp		

Ai82		
Primer: Ai82 MT F (5 μ M), Ai82 MT R (5 μ M), Ai82 WT F (5 μ M), Ai82 WT R (5 μ M)		
Thermozykler-Programm		
Schritte	Temp. °C	Dauer min.
1) Denaturieren	94	2:00
2) Denaturieren	94	0:20
3) Primer-Hybridisierung	50	0:15
4) Elongation	68	0:10
5) Denaturieren	94	0:15
6) Primer-Hybridisierung	60	0:15
7) Elongation	72	0:10
8) letzte Elongation	72	2:00
Wiederholung der Schritte 2 – 4 für 10 Zyklen Wiederholung der Schritte 5 - 7 für 28 Zyklen		
Gelelektrophorese – 1.5% Agarose, Wildtyp: 356 bp, Mutant: 239 bp		

PITX3-IRES		
Primer: Pitx3-F (5 μ M), Pitx3-R (5 μ M)		
Thermozykler- Programm		
Schritte	Temp. °C	Dauer min.
1) Denaturieren	94	2:00
2) Denaturieren	94	0:45
3) Primer-Hybridisierung	67	0:30
4) Elongation	72	0:45
5) Letzte Elongation	72	10:00
6) Inkubation	4	∞
Wiederholung der Schritte 2 – 4 für 29 Zyklen		
Gelelektrophorese – 1.5% Agarose, Mutant: 500 bp		

DNA Elektrophorese

Das Agarosegel wurde hergestellt, indem TEA Puffer mit 1.5 % Agarose erhitzt und anschließend bei Raumtemperatur bis zu einer Temperatur von etwa 40°C abgekühlt wurde. Ethidiumbromid (10 g/mL) wurde hinzugefügt und die Lösung in eine Gelkammer gegeben. Der PCR-Mix wurde nach Zugabe von Ladebuffer (6X) auf das Gel geladen. Daraufhin wurde über 40 min eine Spannung von 120 V angelegt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit einer UV-Lampe im Gel Doc Transluminator beleuchtet und ein Foto aufgenommen.

Genotypisierung

Durch die Bestimmung des Genotyps konnten wir zeigen, dass ein Teil der embryonalen Tiere aus den Verkreuzungen für die beiden benötigten Gene positiv war, welche in etwa dem nach der Mendelschen Lehre erwarteten Prozentsatz von 50 % je Gen entsprechen.

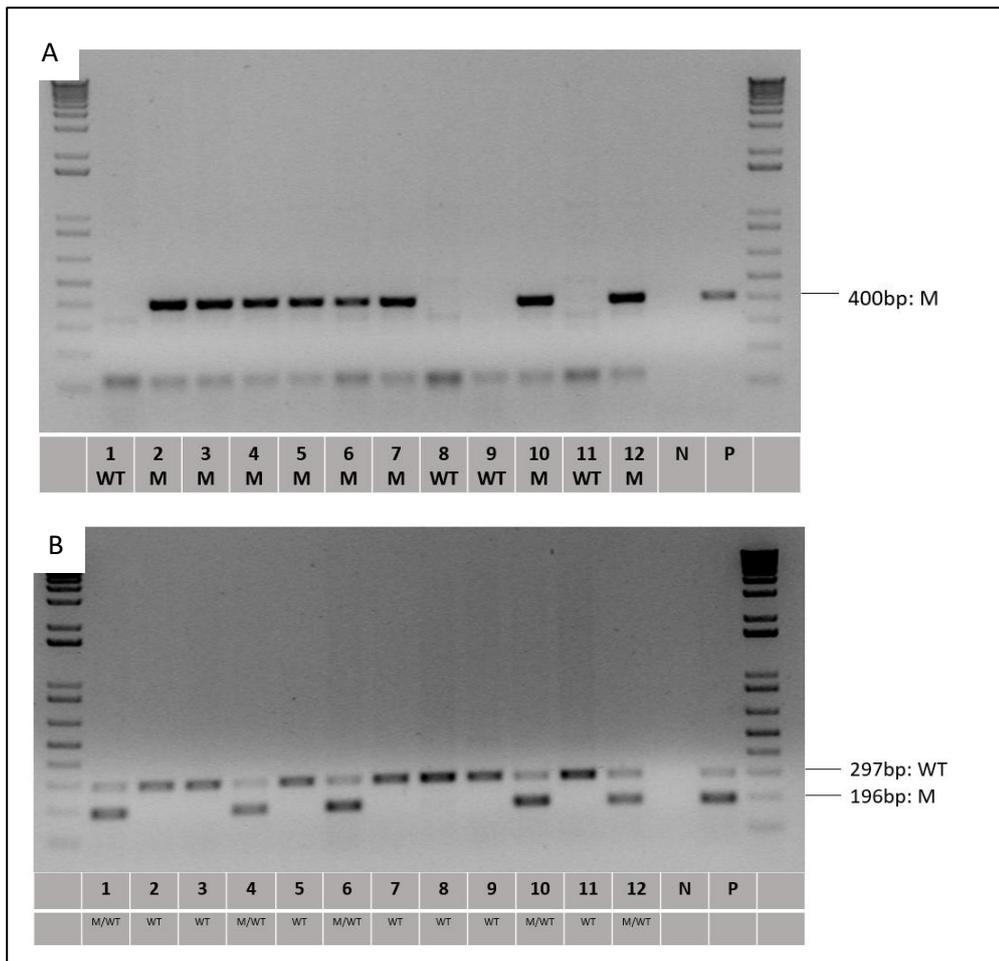


Abb. 12: Beispieldarstellung der Genotypisierung eines Wurfs. Wurf L4279, Verkreuzung eines Männchens mit dem Genotyp *Cxcr4^{CreER/+}* mit einem Weibchen des Genotyps *R26^{Ai9/+}*. A: PCR für das *Cxcr4^{CreER}* Allel, B: PCR für das *R26^{Ai9}* Allel. M: Mutant, WT: Wildtyp

2.5 Histologie

2.5.1 Gewebepräparation und Fixierung

Schwangere weibliche Mäuse wurden durch zervikale Dislokation am Tag E18.5 getötet. Alle anschließenden Arbeitsschritte wurden zur Anästhesie der Embryonen und Konservierung des Gewebes auf Eis durchgeführt. Zuerst wurden die Embryos zügig aus dem Uterus entnommen und in eiskaltes PBS gelegt. Um die Gehirne zu entnehmen, wurden die Köpfe der Embryos mit einer Schere abgetrennt. Die Köpfe wurden mit Hilfe einer Pinzette fixiert und mit einer weiteren Pinzette wurden vorsichtig Haut und Schädel entfernt. Von diesem Gewebe wurde eine Probe zur Genotypisierung analog zur Gewebeprobe bei postnatalen Tieren genutzt. Daraufhin wurde das Gehirn aus dem Schädel gehoben und in eisgekühltes PBS gelegt. Die Gehirne wurden anschließend in 4 % PFA über Nacht fixiert (Zervas et al. 2005).

Bei einzelnen Würfen wurde aus arbeitszeitlichen Gründen der Tag P0 abgewartet und die Neugeborenen analog zu den Embryonen getötet und das Gewebe prozessiert.

2.5.2 Einbetten des Gewebes

Zur Kryo-Einbettung wurde das Gewebe in 15 % Saccharose bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert, bis es im Gefäß auf den Boden sank (etwa 6 h oder über Nacht), sodass von einer Sättigung des Gewebes mit Saccharose ausgegangen werden konnte. Daraufhin wurde die Prozedur mit 30 % Saccharose wiederholt. War das Gewebe erneut auf den Boden gesunken, wurde es dreimal für je 5 min in PBS gewaschen und in OCT TissueTek eingebettet, das Gewebe-TissueTek-Konvolut auf Trockeneis gefroren und bei -80°C gelagert.

2.5.3 Erstellen von Kryoschnitten

Vor dem Schneiden wurde der Kryostat auf eine Messer- und Objekttemperatur von -19 bis -21°C eingestellt. Nach Erreichen der gewünschten Temperatur, wurde ein eingebettetes Gehirn aus dem -80°C Gefrierschrank entnommen und die OCT TissueTek-Überstände grob getrimmt. Mit OCT-TissueTek wurde das Gehirn daraufhin auf die Platte des Kryostats fixiert und etwa 10 min gewartet bis sich die Temperatur des Gehirn-OCT-Tissu-

Tek-Blocks bei -20°C befand. 14 µm dicke Schnitte wurden auf Superfrost Ultra Plus Adhesion-Objektträgern in Serien von 10 Objektträgern gesammelt. Anschließend wurden sie 2 h lang bei Raumtemperatur getrocknet und bei -20°C aufbewahrt.

2.6 Markerproteine von mDAN

Die DA Identität der genetisch markierten Zellen wird mit einer Immunofärbung für den DA Marker Tyrosinehydroxylase (TH) validiert. Diese Analyse soll zeigen, ob die Gabe von TM zu unterschiedlichen Zeitpunkten tatsächlich unterschiedliche Subpopulationen der DAN markiert. Daher wird im Folgenden die Wahl des Markerproteins erklärt.

Wenn an der Synapse ein erhöhter Bedarf an Dopamin entsteht, wird das Enzym TH aktiviert. TH katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Dopaminsynthese, wobei an das C3-Atom der Aminosäure Tyrosin eine Hydroxyl-Gruppe angefügt wird. Es entsteht der Botenstoff Dopamin. Dieser wird anschließend durch den Vesikulären Monoamin-Transporter (VMAT) aus dem Zytoplasma in ein intrazelluläres Vesikel transportiert. Der Einstrom von Calcium führt anschließend zur Entleerung des Vesikels in den synaptischen Spalt. Ein Teil des ausgeschütteten DA wird anschließend, unter anderem durch den Dopamintransporter (DAT) aus dem synaptischen Spalt wieder aufgenommen (Daubner et al. 2011).

Zur histologischen Identifizierung von DAN stellen Antikörperfärbungen gegen das Enzym TH den Goldstandard dar (White und Thomas 2012). DA ist ein Zwischenprodukt der Katecholaminsynthese von (Nor-)Adrenalin und somit findet sich das Enzym TH in allen Katecholamin-produzierenden Zellen. Dopamin ist das einzige im Mittelhirn vorkommende Katecholamin und somit hier ein spezifischer Marker. Andere Marker für dopaminerge Neurone sind VMAT2 und DAT.

2.6.1 Immunhistochemische Färbungen

Immunhistochemische Färbungen werden üblicherweise durchgeführt, um Antigene in Zellen und Gewebe zu markieren. Antikörper, welche mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert wurden, binden an spezifische Antigene.

Die bei -20°C gefrorenen Gewebeschnitte wurden bei Raumtemperatur (RT) für 2 h aufgetaut und dreimal in PBS gespült. Daraufhin wurden sie 5 min lang in 4 % PFA fixiert und erneut je einmal in PBS und anschließend in PBT (0,1%) bei RT gespült. In einer

feuchten Kammer wurden die Objektträger daraufhin mit Blockierer (10 % NDS/PBT) bei RT für 2 h inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Antikörper in 3 %-iger NDS/PBT Lösung verdünnt. Der Blockierer wurde von den Objektträgern entfernt und in der feuchten Kammer je 300 µl der verdünnten ersten Antikörperlösung auf einen Objektträger gegeben. Die Schnitte wurden in einer ersten Lösung mit Antikörpern über Nacht bei 4°C oder bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert.

Die folgenden Antikörper und Verdünnungen wurden genutzt:

- Genetische Strategie zur Kartierung des Zellschicksals:
Primäre Antikörper: Kaninchen anti-RFP 1:5000 bzw. Maus anti-TH Maus 1:400
- Intersektionelle genetische Strategie zur Kartierung des Zellschicksals:
- Primäre Antikörper: Ratte anti-GFP 1:2000 bzw. Kaninchen anti-TH 1:500.

Als nächstes wurde die erste Antikörperlösung entfernt. Die Schnitte wurden drei Mal mit PBT gewaschen, dann die zweite Antikörper-Lösung analog zur ersten hergestellt und auf den Objektträgern verteilt. Die folgenden Antikörper und Verdünnungen wurden genutzt:

- Genetische Strategie zur Kartierung des Zellschicksals:
Biotinylierter Esel anti-Kaninchen 1:200 gefolgt von Cy3-Streptavidin-Konjugat 1:1000 und Alexa 488 konjugierter Esel anti-Maus 1:400
- Intersektionelle genetische Strategie zur Kartierung des Zellschicksals:
Sekundäre Antikörper: Alexa 488 konjugierter Esel anti-Ratte 1:400 bzw. Alexa 546 konjugierter Esel anti- Kaninchen 1:500
- Zum Markieren der Nuklei wurde Hoechst Lösung (1:10.000) zum zweiten Antikörper-Gemisch hinzugefügt.

Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei RT wurden die Objektträger erneut drei Mal fünf Minuten lang mit PBT gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation mit Cy3-Streptavidin-Lösung in PBS und anschließend erneutes Waschen über drei Mal fünf Minuten mit PBT. Nachdem die Schnitte zwei Minuten lang an der Luft getrocknet waren, wurde abschließend ein Deckglas aufgebracht, welches mit Aqua Polymout fixiert wurde. In einer dunklen Kammer wurden die Objektträger einige Stunden bei RT getrocknet und anschließend bei 4°C gelagert. Alle Waschschrte wurden in Coplin Gläsern durchgeführt.

Um die Darstellung zu optimieren, testeten wir verschiedene Antikörper-Kombinationen und Antikörper-Konzentrationen (Vgl. Tab. 6, s.o.). Die klarste Darstellung der durch die genetische Strategie zur Kartierung des Zellschicksals markierten Zellen wurde durch

eine durch Biotin verstärkte Antikörperfärbung erzielt, während die mDAN mit einem Maus-monoklonalen Antikörper gegen TH, angefärbt wurden.

2.7 Mikroskopie und Analyse der gefärbten Gewebeschnitte

2.7.1 Mikroskopie der gefärbten Schnitte

Immunhistochemisch gefärbte Schnitte wurden unter einem Zeiss AxioObserver Z1 invertierten Fluoreszenzmikroskop mit einem 20x Objektiv betrachtet. Um Bilder größerer Areale aufzunehmen, wurde das AxioVision Mosaik Modul benutzt. Einzelne eigenständig aufgenommene Bilder konnten so automatisch zusammengefügt werden, wodurch eine Bilddatei eines größeren Areals entstand.

Cy3 bzw. Alexa546 ergibt ein Fluoreszenzsignal im orangen Bereich (Anregungsspitze bei 553 bzw. 556; Emissionsspitze bei 568 nm bzw. 573 nm), Alexa 488 im grünen Bereich (Anregungs- bzw. Emissionsspitze bei 490 nm bzw. 525 nm). Immunfluoreszenzfärbung mit Cy3/Alexa 546 werden in den Abbildungen dieser Arbeit als rotes Fluoreszenzsignal, Immunfluoreszenzfärbung mit ALEXA 488 als grünes Fluoreszenzsignal dargestellt.

Weiterhin wurde die Darstellung der Bilder mit verschiedenen Aufnahmetechniken getestet. Es wurden Z-Stapel-Aufnahmen und Aufnahmen einzelner Ebenen angefertigt. Aus den Z-Stapel-Aufnahmen wurde mithilfe der Software Axiovision 4.8, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, die maximale Intensitäts-Projektions-Darstellung erstellt. Mit derselben Software wurde weiterhin aus dem Satz verschiedener Bilder in der Z-Ebene das jeweils schärfste Bild für die verschiedenen Kanäle ausgewählt und daraufhin die Kanäle wieder kombiniert. Zusammenfassend zeigte sich keine hinreichend verbesserte Darstellung durch die Aufnahme der Z-Stapel-Bilder. Die zufriedenstellendste Darstellung wurde erreicht, wenn der Fokus auf die Zellen mit Markierung durch das Reporterprotein gesetzt wurde, die Einzelbilder in einer einzelnen Ebene mit einem 20X Objektiv aufgenommen und durch die MosaiX-Funktion der oben genannten Software zu einem kompletten Bild zusammengefügt wurden.

2.7.2 Analyse der aufgenommenen Bilder der induzierbaren genetischen Strategie zur Kartierung des Zellschicksals

Die Analyse wurde, wenn nicht anders gekennzeichnet, für je mindestens drei Embryonen für jeden TM-Induktions-Zeitpunkt durchgeführt (Vgl. **Abb. 16**). Pro Maus und pro Bereich A bis D wurden zwischen ein und drei Kryoschnitte untersucht. Die Anzahl untersuchter Schnitte orientierte sich an dem zur Verfügung stehenden Material.

Die aufgenommenen Bilder wurden im Bildbearbeitungsprogramm Fiji (ImageJ) prozessiert und analysiert.

Anpassung von Helligkeit und Kontrast

Im ersten Schritt wurden die Farbkanäle getrennt und daraufhin Helligkeit und Kontrast angepasst. Anschließend wurde Hintergrundsignal reduziert, indem zuerst die mittlere Intensität des Bildes in beiden Kanälen getrennt gemessen und anschließend dieser Wert (TH+Zellen) bzw. der doppelte Wert (tdT+Zellen) mithilfe des Fiji-Math-Tools abgezogen wurde. Danach wurden die Farbkanäle wieder zu einem Bild (Composite) zusammengefügt und in den RGB (RotGrünBlau, engl. „RedGreenBlue“) Modus umgewandelt.

Ermittlung der Kolokalisation von TH und *Cxcr4*-abstammenden Zellen

Zur vergleichenden Analyse wurden die Schnittbilder vier Bereichen (a bis d) von rostral nach kaudal zugeordnet (**Abb. 13**) (Vgl. (Bodea et al. 2014), auf denen je die Kernregionen VTA, SNpc und RRF freihand mithilfe des Lasso-Tools in Fiji markiert wurden. Mit dem Fiji-Plugin „Colocalization Threshold“ wurden Pixel erkannt, in denen das Signal für das Reporterprotein und für TH vorhanden war (ImageJ 2021).

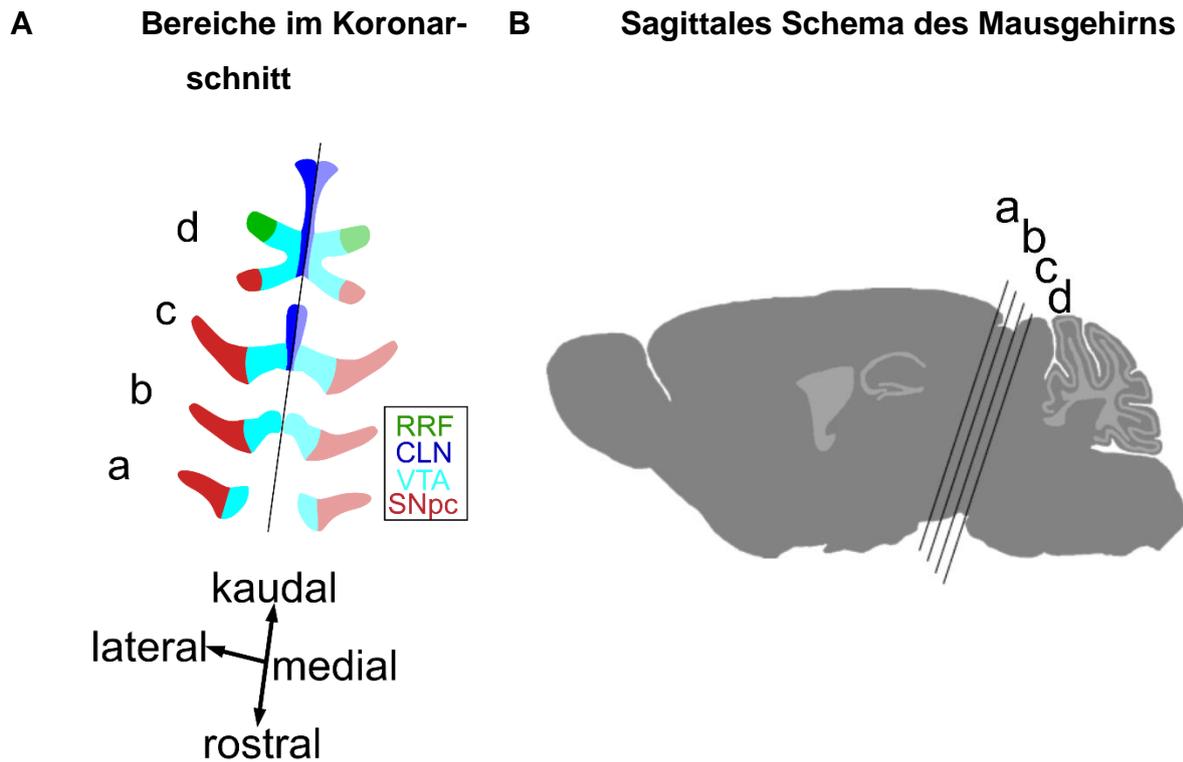


Abb. 13: Schematische Darstellungen der vier Bereiche entlang der rostro-kaudalen Achse der Mittelhirnregion. Die Einteilung der Hirnschnitte erfolgt anhand der Morphologie der TH+ mDAN Kerngebiete im Koronarschnitt. (A) Darstellung der Kerngebiete VTA, SNpc, CLN (kaudaler Nucleus linearis) und RRF im Koronarschnitt (Vgl. Abb.2). (B) Lage der Koronarschnitte in Bezug auf das murine Gehirn

Anteil der der Cxcr4-abstammenden Zellen an der Gesamtfläche

Anschließend wurde im Programm Fiji berechnet, welchen Anteil die Pixel, welche Signal für TH und das Reporterprotein tdT aufwiesen, an der Gesamtzahl an Pixeln der jeweiligen Kernregion (SNpc, VTA oder RRF) in Prozent ausmachen. Dieser Anteil wird im Folgenden als Kolokalisierungsanteil (KoLokAn) bezeichnet.

Es wurde ein Makro erstellt, um die oben beschriebenen Schritte nach dem Öffnen der Bilddateien und Markierung der Kernregionen zu automatisieren (s. Anlage 1).

Den Induktionszeitpunkt TM E11.5 schlossen wir aus den Analysen aus, da v.a. in der Mittellinie eine derart starke ubiquitäre Markierung mit dem Reporterprotein erfolgt war (Vgl. **Abb. 20**) dass die Berechnung des KoLokAn keine realistische Einschätzung bzgl. der tdT+ mDAN, d.h. den *Cxcr4*-abstammenden mDAN geben würde, sondern Überlagerungen mit anderen angeschnittenen und angefärbten Strukturen angeben würde.

2.8 Statistische Auswertung

Die Rohdaten des Programms Fiji wurden mithilfe von Microsoft Excel angezeigt und dort auf Plausibilität überprüft. Aufnahmen, bei denen extrem hohe oder extrem niedrige KoLokAn bestimmt wurden, wurden nochmal gesichtet und experimentelle Ausreißer ausgeschlossen, falls in der Immunfluoreszenzfärbung Artefakte zu erkennen waren. Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm R Studio durchgeführt. Es wurde mithilfe der Pakete „tidyverse“ (Wickham et al. 2019), „ggplot2“ (Wickham 2016) und „ggpubr“ (The Comprehensive R Archive Network 2022) gearbeitet.

In einem ersten Schritt wurde den ventro-kaudalen Regionen von einzelnen Kerngebieten für jedes Tier ein entsprechender KoLokAn zugeordnet. Für manche Bereiche a bis d (Vgl. **Abb. 13**) wurde mehr als ein Schnitt pro Tier gefärbt und dokumentiert. In diesen Fällen wurden Bilder aller Schnitte (n=1 bis 3), die einem Bereich zugeordnet werden konnten, ausgewertet.

2.8.1 KoLokAn in SNpc und VTA

Um die KoLokAn für die gesamte SNpc bzw. das gesamte VTA abzuschätzen, wurden Mittelwerte für die a-c-Bereiche der SNpc bzw. VTA pro Induktionszeitpunkt und Tier ermittelt. Der d-Bereich d wurde aus dieser Analyse ausgeschlossen, da im d-Bereich nur ein kleiner Anteil der mDAN der SNpc liegt und kein Teil des VTA.

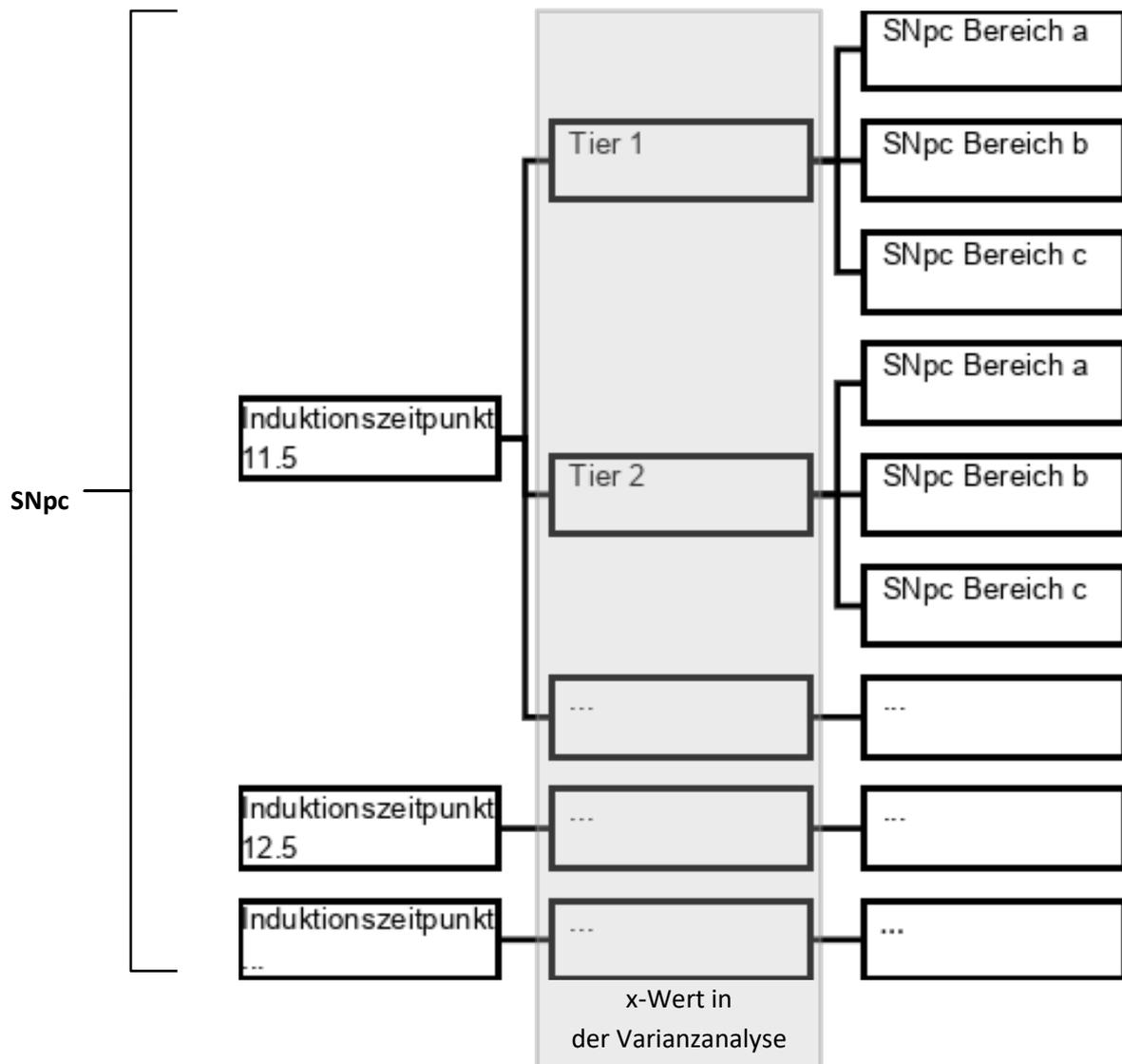


Abb. 14: Vergleich der Induktionszeitpunkte pro Kerngebiet für SNpc und VTA am Bsp. der SNpc. Hierzu wurde zuerst aus den a- bis c-Bereichen ein Tier-spezifischer und anschließend aus dem Ergebnis ein Induktionszeitpunkt-spezifischer Mittelwert gebildet

Um zu ermitteln, ob sich der KoLokAn zu den verschiedenen Induktionszeitpunkten unterscheidet, wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (engl. One-Way-ANOVA) durchgeführt (für SNpc oder VTA). Mit der einfaktorischen Varianzanalyse wird allgemein ermittelt, ob es einen relevanten Unterschied zwischen den Ausprägungen einer kontinuierlichen Variablen Y (hier: KoLokAn) in Bezug auf eine kategoriale Variable X (hier: verschiedene Induktionszeitpunkte) gibt. Wenn sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zeigte (Signifikanzniveau $p < 5\%$), schlossen wir einen Post-Hoc-Test für

linearen Trend an, der aufzeigt, zwischen welchen Gruppen (definiert durch das X, in unserem Fall die Induktionszeitpunkte) ein relevanter Unterschied besteht. Anschließend wurde mithilfe des Programms GraphPad Prism ein Test für linearen Trend durchgeführt. In diesem Test wird die X-Variable, im Gegensatz zur einfaktoriellen Varianzanalyse, nominal behandelt und überprüft ob die Mittelwerte der Y-Variablen (in unserem Fall KoLokAn in der SNpc oder VTA) systematisch mit steigendem Wert von X steigen oder fallen (GraphPad Software, LLC 2022).

2.8.2 Verteilung des KoLokAn entlang der rostro-kaudalen Achse zu verschiedenen Induktionszeitpunkten

Anschließend sollten Unterschiede in der Verteilung des KoLokAn entlang der rostro-kaudalen Achse zu verschiedenen Induktionszeitpunkten überprüft werden. Hierfür wurden für die Kerngebiete SNpc und VTA die a bis c Bereiche berücksichtigt (Vgl. **Abb. 13**). Durch eine einfaktorielle Varianzanalyse wurden Unterschiede der Verteilung des KoLokAn zwischen den Bereichen ermittelt und mit einem Tukey-Post-Hoc Test spezifiziert, zwischen welchen Bereichen Unterschiede bestehen. Zusätzlich wurden die Mittelwerte des KoLokAn der Kerngebiete pro Bereich (SNpc plus VTA) errechnet und diese zwischen den verschiedenen Induktionszeitpunkten verglichen, indem eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt wurde.

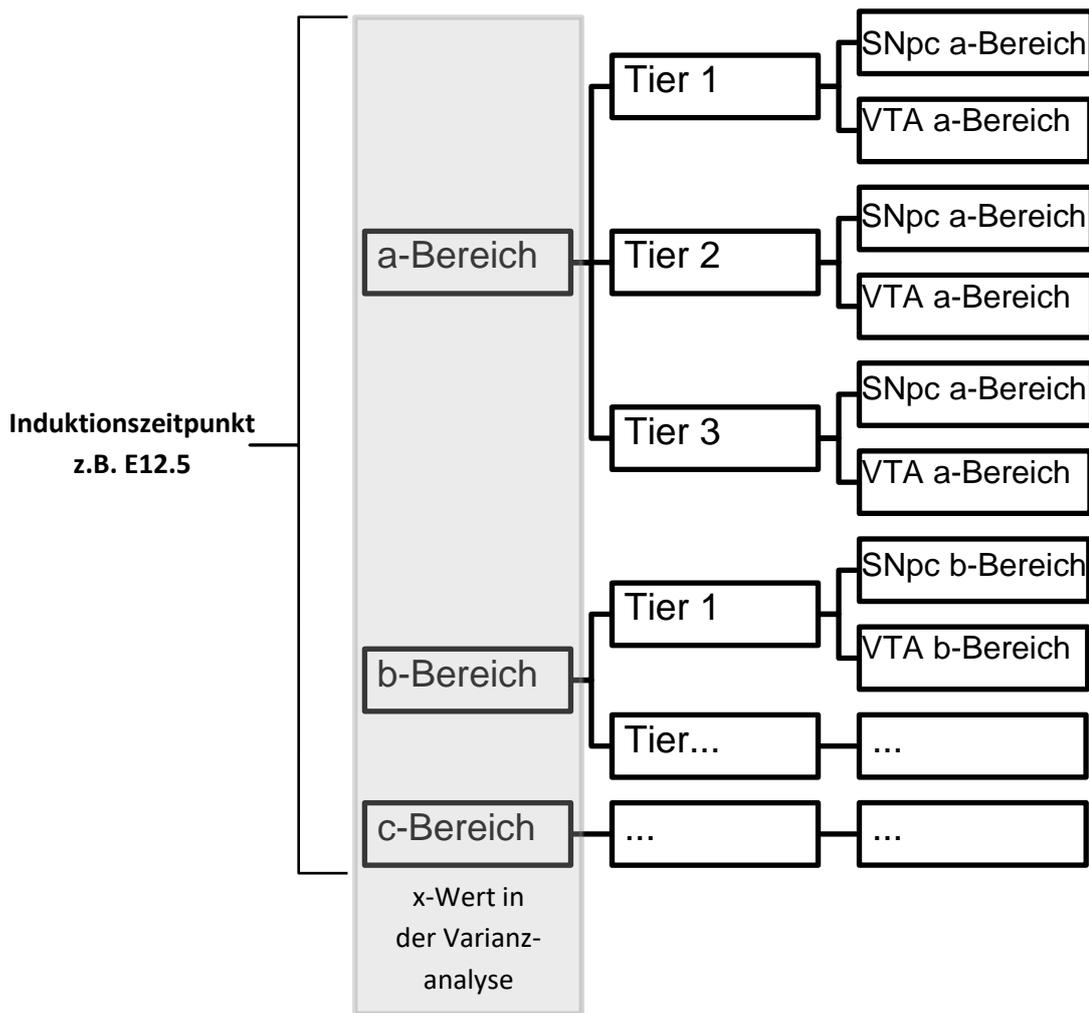


Abb. 15: Vergleich der rostro-kaudalen Bereiche. Ein Tier-spezifischer Mittelwert der KoLokAn von SNpc und VTA eines Bereichs (a, b oder c) wurde gebildet. Die Tier-spezifischen Mittelwerte wurden anschließend zu einem Bereichs-spezifischen Mittelwert pro Induktionszeitpunkt zusammengefasst

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der *Cxcr4*^{CreER}-Mauslinie

In der vorliegenden Arbeit soll zunächst das Rekombinationsmuster, der *Cxcr4*^{CreER}-Linie im ventralen Mittelhirn charakterisiert werden. Mithilfe der induzierbaren genetischen Strategie zur Kartierung des Zellschicksals (**Vgl. Abb. 6-9**) wurden *Cxcr4*-exprimierende Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten dauerhaft markiert und anschließend in prä- oder neonatalen Gehirnen untersucht, zu welchen Zellen des ventralen Mittelhirns sie sich entwickelt hatten (**Vgl. Abb. 16**). Durch Tamoxifengabe wurde eine Rekombination des Reporterallels mithilfe des CreER/LoxP-Systems nur in Zellen ausgelöst, die zum Gabezeitpunkt von TM und kurz danach *Cxcr4* exprimierten. Diese Zellen werden im Folgenden als „*Cxcr4*-Linie“ bzw. „*Cxcr4*-abstammende“ Zellen bezeichnet.

Wie bereits beschrieben ist CXCR4 in der Embryonalperiode zwischen E11.5 und E16.5 in neu geborenen mDAN exprimiert, (Bodea et al. 2014) (**Vgl. Abschnitt 1.5.4**). Angepasst an den Wirkzeitraum von TM wählten wir als letzten Induktionszeitpunkt daher E15.5. Um die Verteilung der *Cxcr4*-Linie und ihren Beitrag zu den mDAN in prä- oder neonatalen Gehirnen zu untersuchen, wurde eine Antikörperfärbung gegen den mDAN Marker TH durchgeführt. mDAN werden in Abbildungen grundsätzlich in grün dargestellt, um das grüne Fluoreszenzsignal durch Alexa 488 in der Antikörperfärbung gegen TH anzuzeigen. Es wurde weiterhin eine Antikörperfärbung gegen das Fluoreszenzprotein tdT durchgeführt, um das Signal des Reporterproteins zu verstärken. Die *Cxcr4*-Linie wird in den Abbildungen grundsätzlich in rot dargestellt, um das rote Fluoreszenzsignal der Cy3-Färbung gegen tdT zu repräsentieren (**Vgl. Abschnitt 2.6.1, 2.7**).

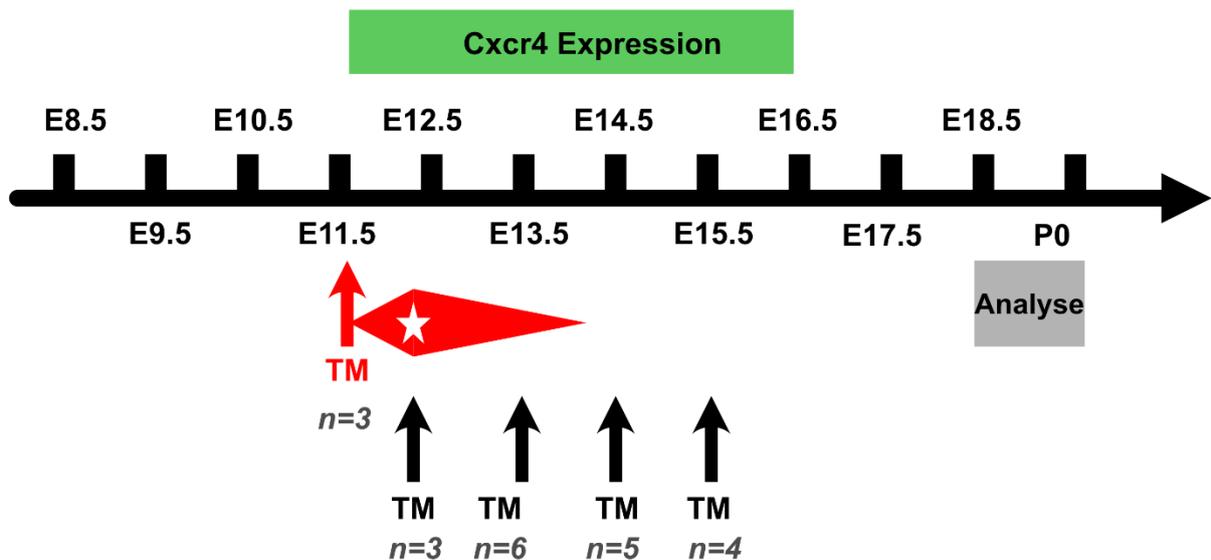


Abb. 16: Zeitraum der *Cxcr4*-Expression im Mittelhirn. Beispielhafte Beschreibung des Wirkverhaltens von Tamoxifen (TM) bei Verabreichung zum Zeitpunkt TM E11.5 mit Wirkmaximum nach ca. 6 h (Joyner, Zervas, 2006). Verabreichungszeitpunkte von TM und Analysezeitpunkte E18.5 oder P0 unter Angabe der Anzahl (n) analysierter Tiere. Genotypen der analysierten Mäuse: *Cxcr4*^{CreER/+}, *R26*^{Ai9/Ai9} oder *Cxcr4*^{CreER/+}, *R26*^{Ai9/+}

3.1.1 Markierung von nicht-DA Zellen, insb. Vorläuferzellen in der Ventrikularzone und in der Mittellinie

Aufgrund der Expression des CXCR4 Proteins in der Embryonalperiode im Bereich neu geborener mDAN (Blaess et al. 2011), erwarteten wir mit der gewählten induzierbaren genetischen Strategie zur Kartierung des Zellschicksals (**Abb. 16**, Vgl. Abschnitte 1.4.1 und 2.3.2) eine Markierung zur Bestimmung des Zeitpunktes, zu dem die mDAN gebildet werden. Überraschenderweise zeigte eine Analyse der Mittelhirnschnitte zum Zeitpunkt E18.5 bzw. P0 eine deutliche Markierung der gesamten Ventrikularzone zu allen untersuchten Induktionszeitpunkten mit dem Reporterprotein tdT (**Abb. 17**). Die markierten Zellen waren außerdem nicht auf die ventrale Ventrikularzone beschränkt, aus der mDAN hervorgehen, sondern waren über die gesamte dorsoventrale Ausdehnung der Ventrikularzone verteilt (**Abb. 17**, nicht gezeigtes Material, (Petese et al. 2022)). Dieses Ergebnis zeigt, dass *Cxcr4* und damit *CreER* zu den gewählten Induktionszeitpunkten breit in mesencephalen Vorläuferzellen exprimiert sein muss. Das widerspricht den Beobachtungen, dass die Expression des CXCR4 Proteins erst in neu geborenen mDAN hochreguliert

wird (Blaess et al. 2011) und deutet darauf hin, dass zumindest das *Cxcr4* mRNA-Transkript in den Mittelhirnvorläuferzellen zu den untersuchten Induktionszeitpunkten breit exprimiert wird. Wir sichteten daher erneut publizierte Expressionsdaten für das CXCR4 Protein und *Cxcr4* mRNA (**Vgl. Abb. 19**). Tatsächlich scheint das *Cxcr4*-Transkript in ventralen Vorläuferzellen von E10.5 bis mindestens E13.5 schwach, aber breit exprimiert zu sein (Yang et al. 2013), während das Protein in Vorläuferzellen nicht detektierbar ist. In neu geborenen mDAN bleibt es noch eine Weile länger als das *Cxcr4*-Transkript nachweisbar (Bodea et al. 2014) (**Vgl. Abb. 19**). Embryonalstadien nach E13.5 und dorsale Bereiche des Mesencephalons wurden in der Yang et al. Studie allerdings nicht untersucht.

Passend zur Transkription von *Cxcr4* in Vorläuferzellen in der Ventrikularzone, konnten wir neben der ausgedehnten Markierung durch tdT in der Ventrikularzone zeigen, dass Abkömmlinge der *Cxcr4*-Linie außerhalb der Ventrikularzone nicht auf TH-positive Zellen, d.h. mDAN beschränkt sind, sondern, zu allen Induktionszeitpunkten TH-positive, wie auch TH-negative Zellen hervorbrachten (**Abb. 21 bis 23**, nicht gezeigtes Material). Zu allen untersuchten Induktionszeitpunkten brachten die *Cxcr4*-exprimierenden Zellen außerdem Zellen mit der Morphologie radialer Glia hervor, d.h. länglichen schweifartigen Zellfortsätzen, v.a. in der Mittellinie (**Abb. 18**), die sehr wahrscheinlich von Vorläuferzellen in der Ventrikularzone ausgehen.

Wir verwarfen daher unsere ursprüngliche Hypothese, dass sich die *Cxcr4*^{CreER}-Linie einsetzen lässt, um spezifisch neu geborene mDAN zu markieren, im Sinne eines Markers zur Bestimmung des Zeitpunktes, zu dem die Zelle gebildet wird. Das Vorhandensein von *Cxcr4* sowohl in proliferierenden Vorläufern als auch die vorübergehende Expression von *Cxcr4* in frisch differenzierten mDAN ermöglicht aber zu untersuchen, ob sich über die Entwicklung hinweg die Kompetenz der markierten Vorläufer ändert. Erwarten würde man, dass zu frühen Markierungszeitpunkten alle mDAN markiert sind, während mit späteren Markierungszeitpunkten ein zunehmend kleinerer Anteil an mDAN markiert werden sollte (Vgl. Abschnitt 1.4.2). Zeigt dieser kleinere Anteil an markierten mDAN bestimmte Merkmale (z.B. anatomische Lokalisierung) würde das dafür sprechen, dass die Vorläuferzellen zu späteren Entwicklungszeitpunkten eine eingeschränkte Kompetenz haben, sich also nur noch zu mDAN mit diesen bestimmten Merkmalen entwickeln können.

mDA Vorläuferzellen könnten ihre Kompetenz im Laufe der Zeit ändern und zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten unterschiedliche mDA-Subtypen, im Sinne einer progredienten Kompetenzrestriktion, hervorbringen. Hierfür sprechen auch eingangs erwähnte Studien zur Bestimmung des Zeitpunktes, zu dem mDAN gebildet werden, die darauf hinweisen, dass sich mDAN in der SNpc und im VTA hinsichtlich des Zeitpunkts der maximalen Neurogenese unterscheiden (Bayer et al. 1995; Bye et al. 2012) (Vgl. Abschnitt 1.4.2). Das Vorhandensein des *Cxcr4*-Transkripts in Vorläufern und frisch differenzierten mDAN über den für die Neurogenese relevanten Zeitraum von E11.5 bis E16.5 ermöglicht mithilfe der genetischen Strategie zur Kartierung des Zellschicksals, Zellen zu bestimmten embryonalen Zeitpunkten zu markieren und im Anschluss deren Eigenschaften, wie etwa die anatomische Lokalisation, zu analysieren.

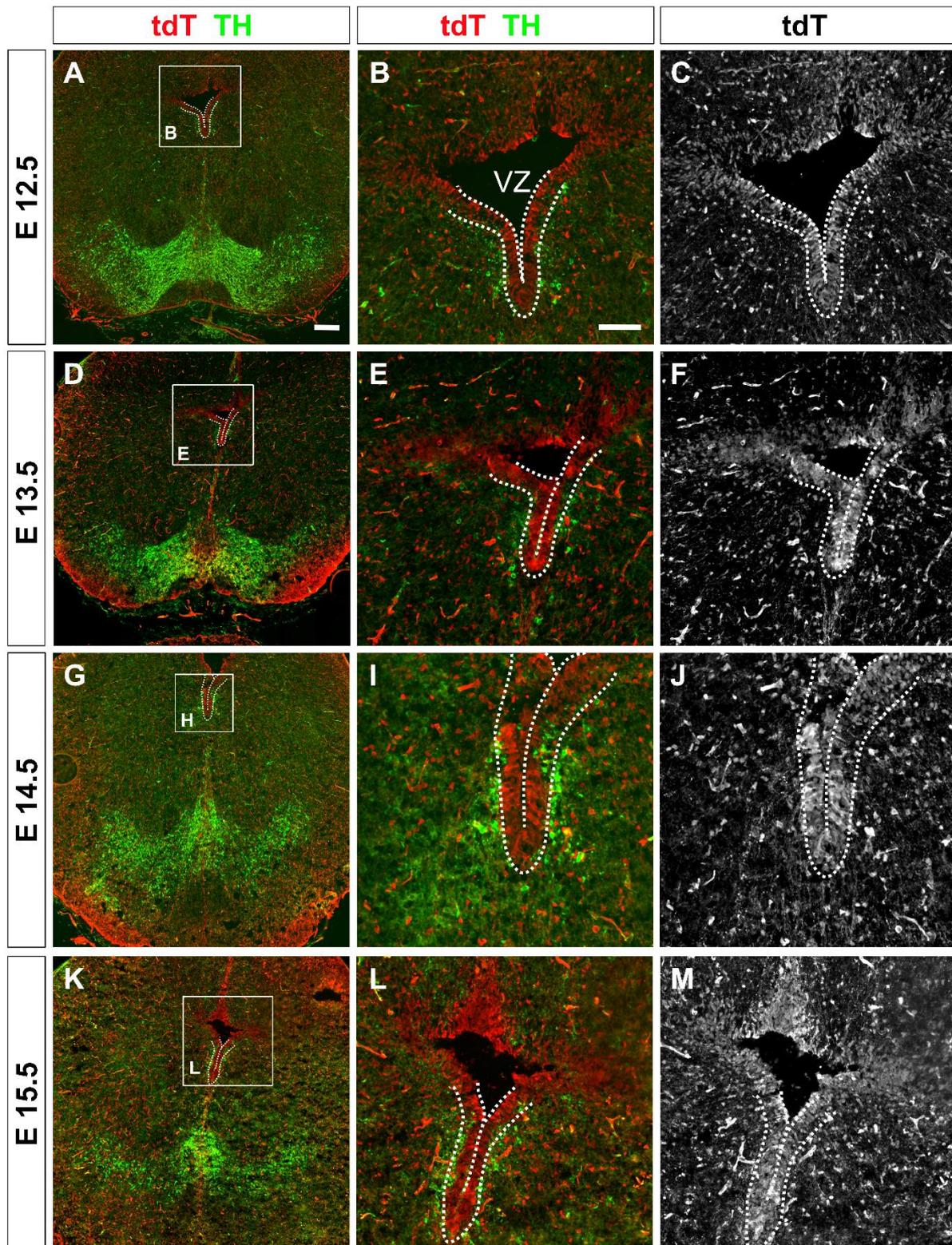


Abb. 17: Koronarschnitte des ventralen Mittelhirns mit den Induktionszeitpunkten TM 12.5 bis TM15.5 und Detailansichten der Ventrikularzone (VZ).
(Fortsetzung der Legende auf der nächsten Seite)

Hirnschnitt auf Höhe des ventralen Mittelhirns einer Maus mit dem Genotyp *Cxcr4^{CreER/+} R26^{Ai9/+}*, Analysezeitpunkt E18.5 oder P0. (A,D,G,I) Übersichtsdarstellungen aus dem Mittelhirn, Detailausschnitte als Quadrate markiert, (B, E, H, K). Detailabbildung der VZ (markiert durch eine gestrichelte Linie), Antikörperfärbung auf das Fluoreszenzprotein tdT (rot), mDAN, Antikörperfärbung auf TH (grün); (C, F, I, L) *Cxcr4*-Linie in der VZ. Maßstabsleisten: A,D,G,K: 100 μm ; B, C, E, F, I, J, L, M: 50 μm . Es handelt sich um Beispielbilder. Analysiert wurden für die Zeitpunkte TM E12.5 n=3, TM E13.5 n=6, TM E14.5 n=5, TM E15.5 n=4 Mäuse mit dem angegebenen Genotyp. Nach (Petese et al. 2022)

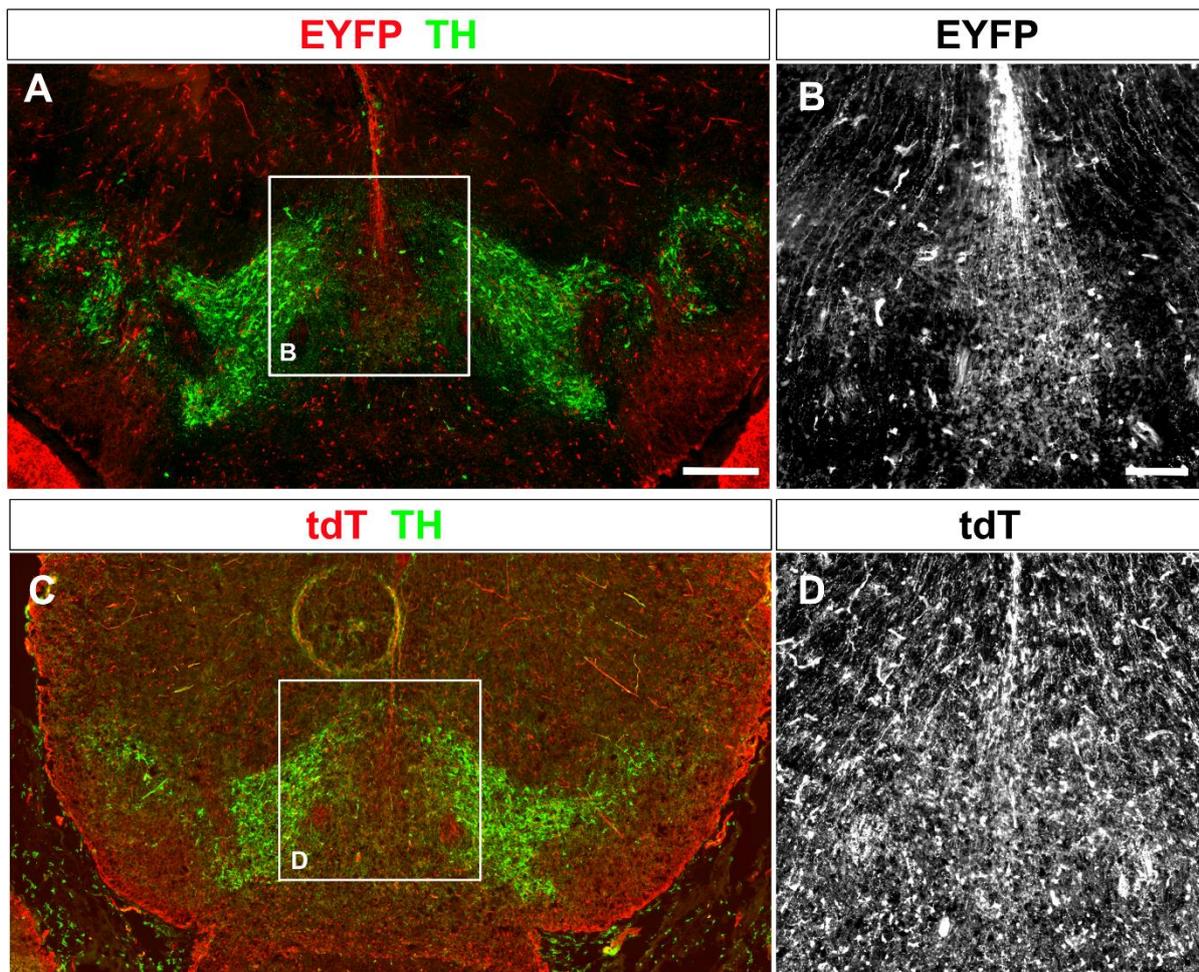


Abb. 18: Übersichtsdarstellung des ventralen Mittelhirns mit dem Induktionszeitpunkt TM E14.5 und Detailansichten der Mittellinie. Hirnschnitte auf Höhe des ventralen Mittelhirns, Analysezeitpunkt E18.5 oder P0 (A, B) Genotyp *Cxcr4^{CreER/+} R26^{EYFP/+}*, *Cxcr4*-abstammende Zellen (Antikörperfärbung für das Fluoreszenzprotein EYFP, rot), mDAN (Antikörperfärbung für TH, grün); (C,D) Genotyp, *Cxcr4*-abstammende Zellen (Antikörperfärbung auf das Fluoreszenzprotein tdT, rot), mDAN (Antikörperfärbung auf TH, grün), Maßstabsleisten: A,C: 100 μm ; B,D: 50 μm . Es handelt sich um Beispielbilder. Analysiert wurden für den Zeitpunkt TM E14.5 n= 1 Maus mit dem Genotyp *Cxcr4^{CreER/+} R26^{EYFP/+}* und n=3 Mäuse mit dem Genotyp *Cxcr4^{CreER/+} R26^{Ai9/+}*

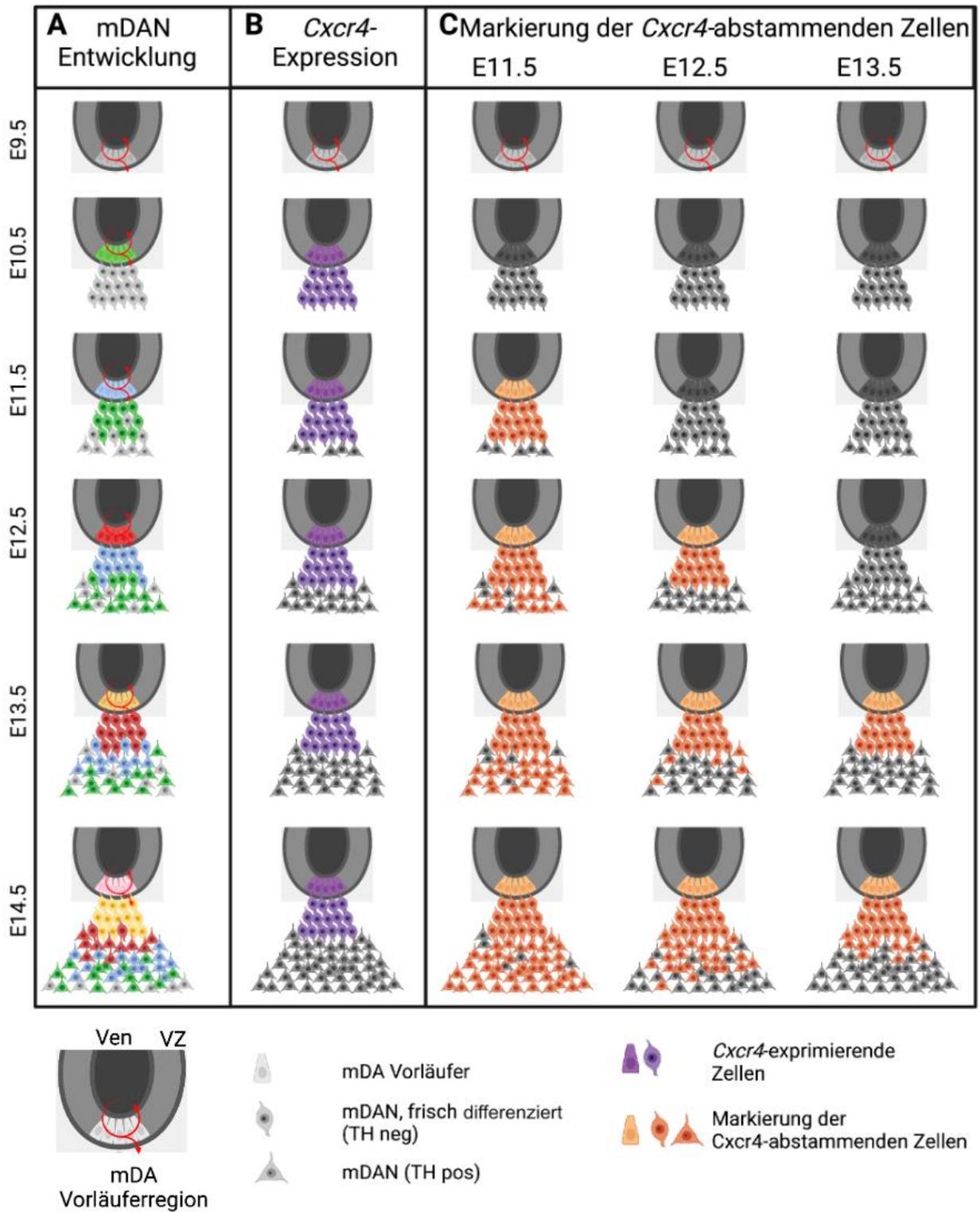


Abb. 19: Bildung von mDAN und *Cxcr4*-Linie im ventralen Mittelhirn.
(Fortsetzung der Legende auf der nächsten Seite)

(A) Die mDA-Vorläuferzone befindet sich an der ventralen Mittellinie des Mittelhirns und erzeugt zwischen E10.5 und E14.5 mDAN. Aus den Vorläuferzellen entstehen differenzierte, aber noch nicht TH-exprimierende Neurone, die zu mDAN reifen. Die Neurogenese erstreckt sich über mehrere Tage, die verschiedenen Geburtsdaten der Zellen werden durch verschiedene Farben angezeigt (Bodea et al. 2014; Yang et al. 2013). (B) *Cxcr4* wird in mDA-Vorläuferzellen (und anderen Vorläuferzellen in der ventrikulären Zone (VZ), und in frisch differenzierten mDAN exprimiert, ist in mDAN aber weitgehend herunterreguliert (C) Durch die genetische Strategie zur Kartierung des Zellschicksals von *Cxcr4*-exprimierenden Vorläufern und differenzierten Neuronen zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten kann das Potenzial der markierten Zellen zu bestimmten Entwicklungszeitpunkten aufgezeigt werden. Ven: Ventrikel. Abbildung mit Biorender generiert. Nach (Petese et al. 2022)

3.1.2 Beitrag der *Cxcr4*-Linie zu DAN und anderen Bereichen des Mittelhirns nach Induktion der Markierung zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten

3.1.2.1 Beitrag der *Cxcr4*-abstammenden Zellen zu den Kerngebiete SNpc, VTA, CLN und RRF

In der qualitativen Betrachtung war ein ausgedehnter Beitrag der *Cxcr4*-Linie (tdT-exprimierende Zellen) zum gesamten ventralen Mittelhirn zu frühen Induktionszeitpunkten (TM E11.5, E12.5) und eine zunehmende Einschränkung des Beitrags mit zunehmendem Induktionszeitpunkt offensichtlich (**Abb. 20**). Zum Induktionszeitpunkt TM E11.5 trugen tdT-exprimierende Zellen nicht nur in großem Umfang zu mDAN bei, sondern auch zu SNr, zu den mesencephalen Raphekernen (Nucleus linearis inferior, superior) und RRF, welche nur sporadisch mDAN enthalten (Björklund und Dunnett 2007; Blaess und Ang 2015) und zum Nucleus ruber, welcher keine mDAN enthält (**Abb. 20** und nicht gezeigtes Material). Zum Zeitpunkt TM E12.5 zeigte sich ein unverändert starkes Signal für tdT in der Fluoreszenzmikroskopie in allen Regionen bis auf ein leichtes Abfallen des Signals in lateralen Bereichen der SNpc (**Abb. 20, 21**). Zum Zeitpunkt TM E13.5 zeigte sich ein deutlich abfallendes Signal für tdT in allen Regionen bis auf das ventrale VTA (**Abb. 20, 22**). Zum Zeitpunkt TM E14.5 beschränkte sich das Signal für tdT ebenfalls auf das ventrale VTA, (**Abb. 20, Abb. 23**). Zum Zeitpunkt TM E15.5 war bereits kaum mehr Signal zu sehen, was sich zum Zeitpunkt TM E17.5 weiter verdeutlichte (**Abb. 20**). Weitere Detailabbildungen s. **Abb. 24-27**.

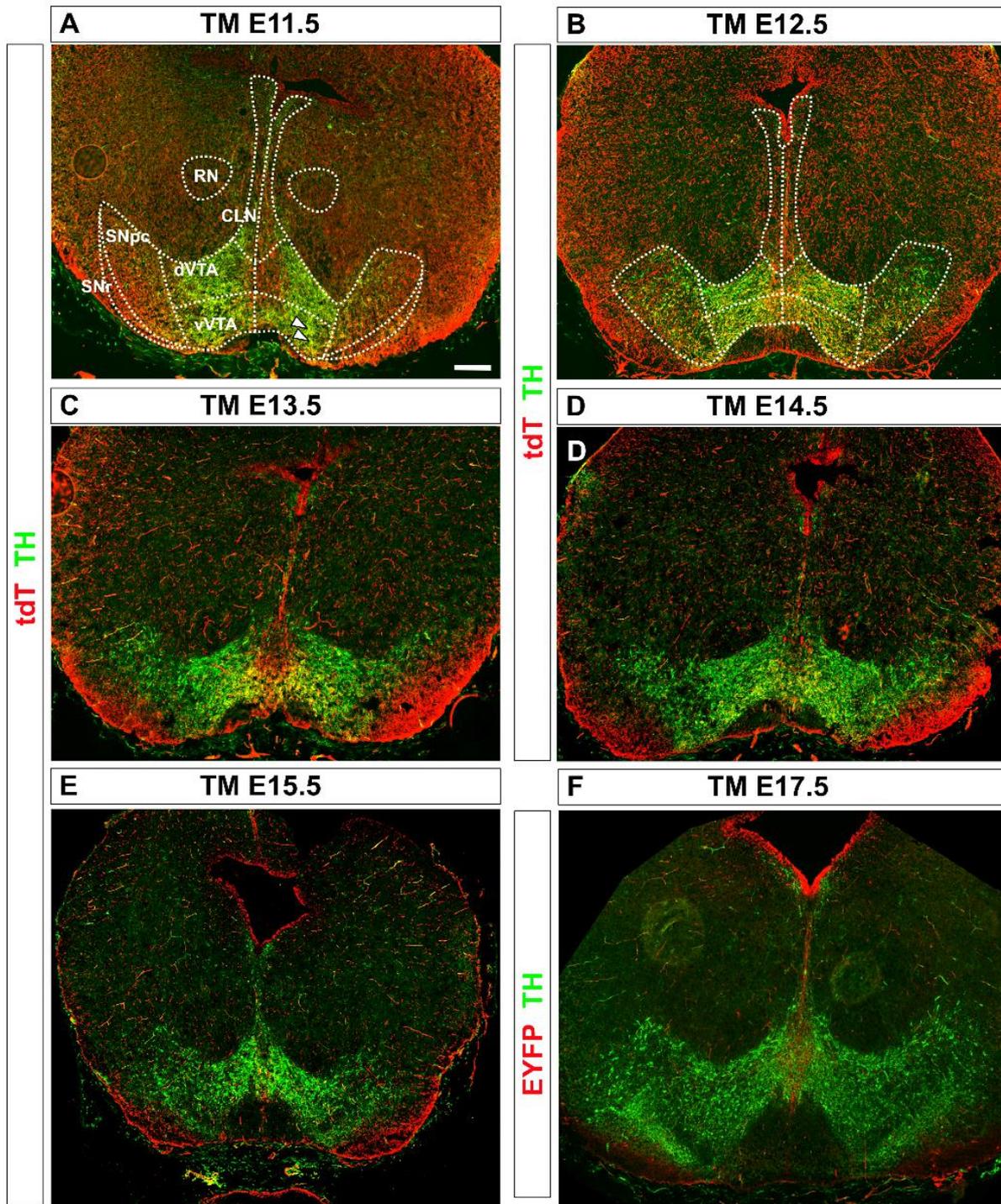


Abb. 20: Übersichten des ventralen Mittelhirns zu verschiedenen Induktionszeitpunkten.
(Fortsetzung der Legende auf der nächsten Seite)

Koronare Schnittebene auf Höhe des c-Bereichs. Analysezeitpunkt E18.5 oder P0. **A-E:** Immunfluoreszenz-Färbung gegen TH (Alexa 488, grün), um mDA Zellen zu markieren. Immunfluoreszenz-Färbung gegen tdT (rot, Cy3) zeigt die *Cxcr4*-Linie, Genotyp der Tiere: A bis E: *Cxcr4^{CreER/+}*, *R26^{Ai9/+}*. In A exemplarisch *Cxcr4* abstammende (tdT+) mDAN (TH+) mit Dreiecken markiert. **F:** Immunfluoreszenz Färbung gegen TH (grün, Alexa 488), um mDA Zellen zu markieren. Immunfluoreszenz-Färbung gegen tdT (rot, Cy3) entspricht den *Cxcr4*-abstammenden Zellen, Genotyp der Tiere: *Cxcr4^{CreER/+}*, *R26^{EYFP/+}*. A: TM E11.5; B: TM E12.5; C: TM E13.5; D: TM E14.5; E: TM E15.5; F: TM E17.5. Maßstabsleiste 100 µm. Analysiert wurden für die Zeitpunkte TM E11.5 n=3, 12.5 n=3, TM E13.5 n=6, TM E14.5 n=5, TM E15.5 n=4 und TM E17.5 n= 2 Mäuse mit dem angegebenen Genotyp

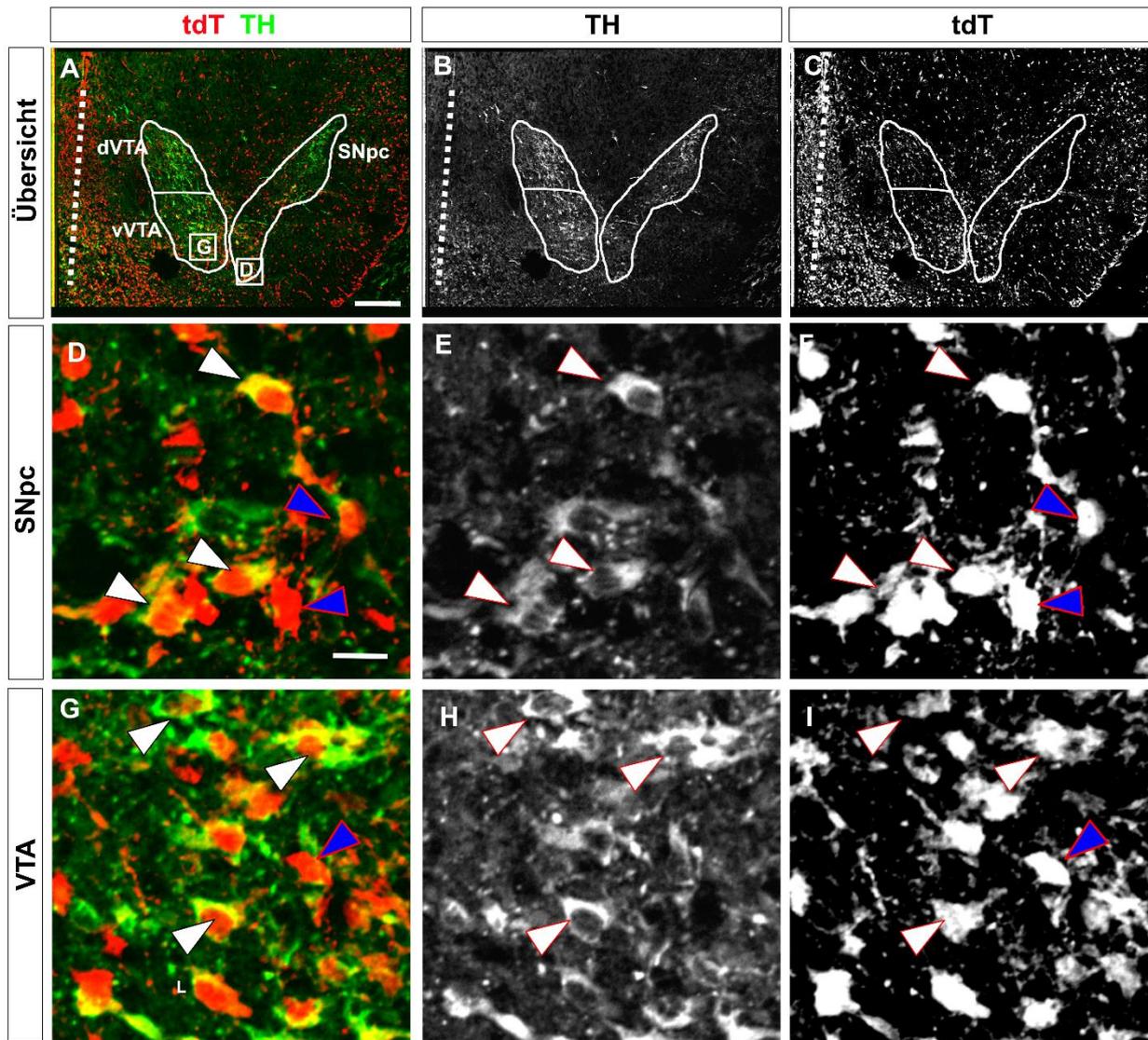


Abb. 21: Detailansicht von VTA und SNpc, *Cxcr4*-Linie zum Induktionszeitpunkt TM E12.5 markiert. Koronarer Schnitt und einseitige Darstellung auf Höhe des ventralen Mittelhirns einer Maus mit dem Genotyp *Cxcr4*^{CreER/+} *R26*^{Ai9/+}, Analysezeitpunkt E18.5 oder P0. B-Bereich. Mittellinie durch eine gestrichelte Linie markiert. Immunfluoreszenz-Färbung gegen TH (Alexa 488, grün) und gegen tdT (rot, Cy3). (A-C) Übersicht des ventralen Mittelhirns. DA Zellgruppen sind weiß umrandet; die in D-I gezeigten Vergrößerungen sind mit Quadraten markiert. Maßstabsleiste A-C: 100 μ m, D-I: 10 μ m. Weiße Dreiecke zeigen exemplarische *Cxcr4*-abstammende (tdT +) mDAN (TH +). Blaue Dreiecke zeigen exemplarisch *Cxcr4*-abstammende (tdT +) nicht DA Zellen (TH neg.). Es handelt sich um Beispielbilder. Analysiert wurden für den Induktionszeitpunkt TM E12.5 n=3 Mäuse mit dem angegebenen Genotyp

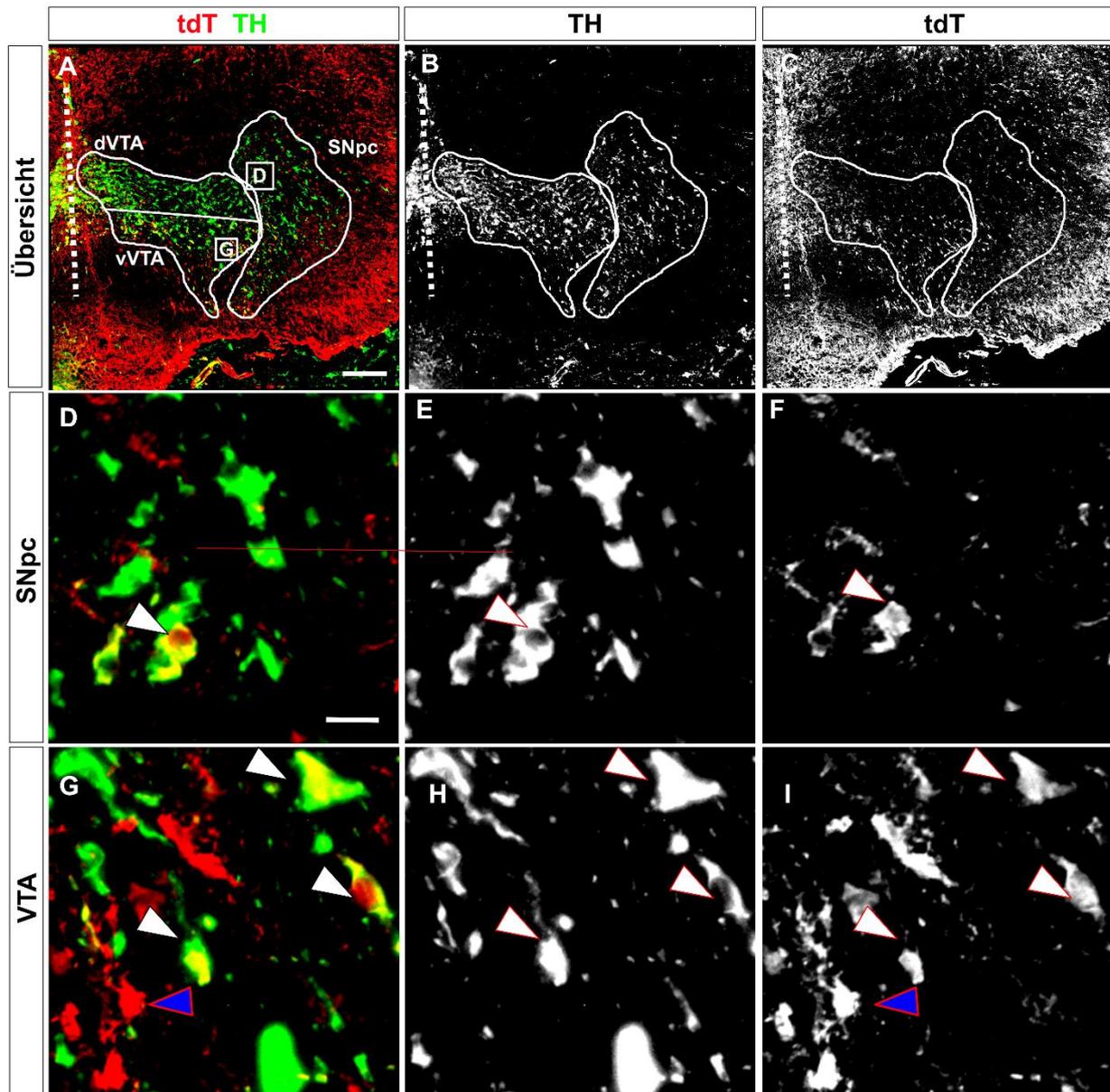


Abb. 22: Detailansicht von VTA und SNpc, *Cxcr4*-Linie zum Induktionszeitpunkt TM E13.5 markiert. Koronarer Schnitt und einseitige Darstellung auf Höhe des ventralen Mittelhirns einer Maus mit dem Genotyp *Cxcr4*^{CreER/+} *R26*^{Ai9/+}, Analysezeitpunkt E18.5 oder P0. B-Bereich. Mittellinie durch eine gestrichelte Linie markiert. (A-C) Übersichtsausschnitt aus dem ventralen Mittelhirn, dopaminerge Zellgruppen weiß umrandet, Ausschnitte aus den Kernregionen für die Abbildungen D bis I als Quadrate markiert, (A,D,G) *Cxcr4*-Linie (Antikörperfärbung auf das Fluoreszenzprotein tdT, rot), mDA Zellen (Antikörperfärbung auf TH, grün); (B,E,H); (C,F,I) *Cxcr4*-Linie. Maßstabsleiste A-C: 100 µm, D-I: 10 µm. Weiße Dreiecke zeigen exemplarische *Cxcr4*-abstammende (tdT +) mDAN (TH +). Blaue Dreiecke zeigen exemplarisch *Cxcr4*-abstammende (tdT +) nicht DA Zellen (TH neg.). Es handelt sich um Beispielbilder. Analysiert wurden für den Zeitpunkt TM E13.5 n=6 Mäuse mit dem angegebenen Genotyp

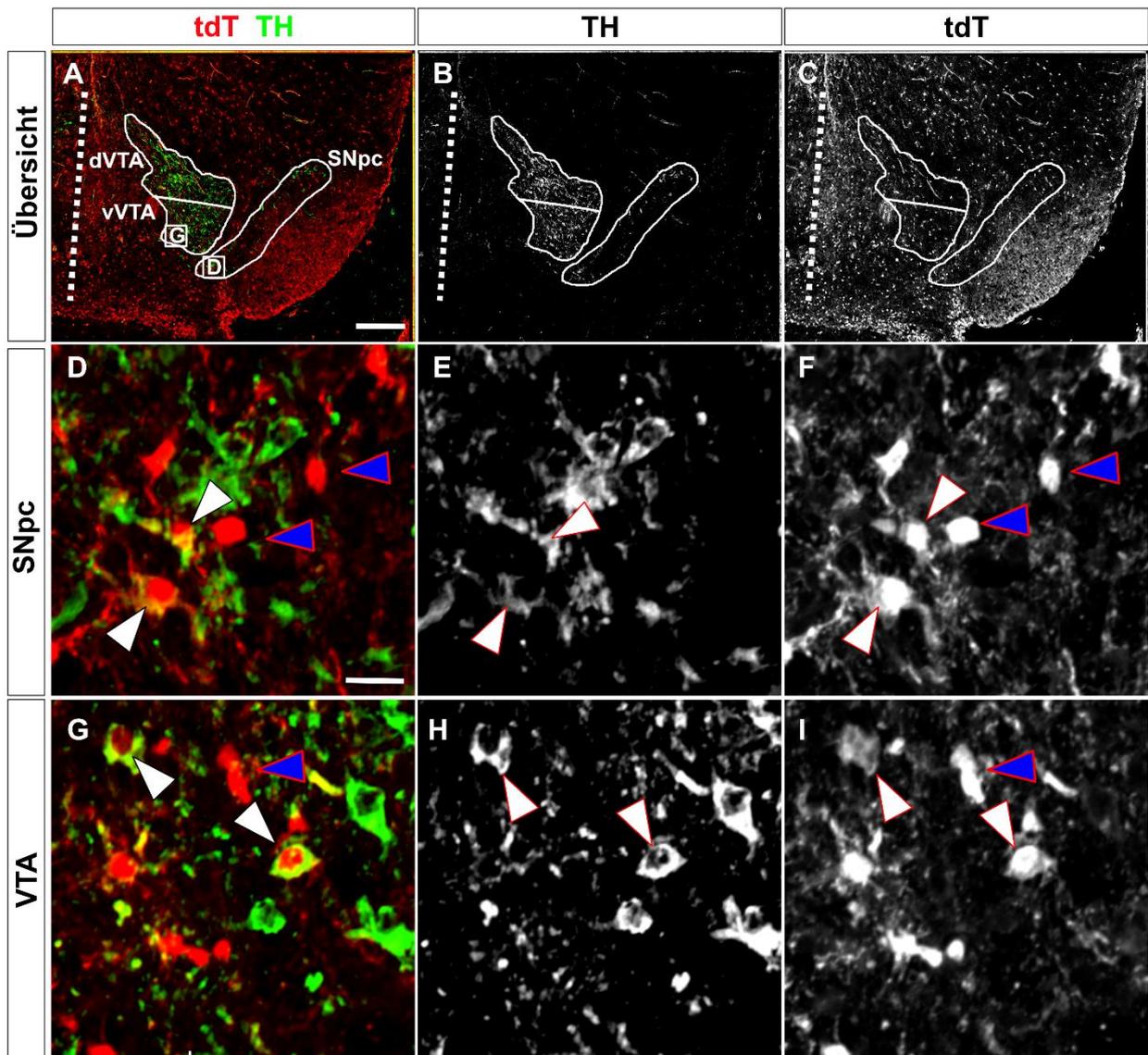


Abb. 23: Detailansicht von VTA und SNpc, *Cxcr4*-Linie zum Induktionszeitpunkt TM E14.5 markiert. Koronarer Schnitt und einseitige Darstellung auf Höhe des ventralen Mittelhirns einer Maus mit dem Genotyp *Cxcr4^{CreER/+} R26^{Ai9/+}*, Analysezeitpunkt E18.5 oder P0. Bereich b. Mittellinie durch eine gestrichelte Linie markiert. (A-C) Übersichtsausschnitt aus dem ventralen Mittelhirn, DA Zellgruppen weiß umrandet, Ausschnitte aus den Kernregionen für die Abbildungen D bis I als Quadrate markiert, (A,D,G) *Cxcr4*-Linie (Antikörperfärbung auf das Fluoreszenzprotein tdT, rot), mDA Zellen (Antikörperfärbung auf TH, grün); (B,E,H); (C,F,I) *Cxcr4*-Linie. Maßstabsleiste A-C: 100 μ m, D-I: 10 μ m. Weiße Dreiecke zeigen exemplarische *Cxcr4*-abstammende (tdT +) mDAN (TH +). Blaue Dreiecke zeigen exemplarisch *Cxcr4*-abstammende (tdT +) nicht DA Zellen (TH neg.). Es handelt sich um Beispielbilder. Analysiert wurden für den Zeitpunkt TM E14.5 n=5 Mäuse mit dem angegebenen Genotyp

3.1.2.2 Beitrag der *Cxcr4*-Linie zu vier Bereichen entlang der rostro-kaudalen Achse des Mittelhirns

Vorstudien wiesen darauf hin, dass rostrale mDAN generell früher geboren werden als kaudale (Bayer et al., 1995, Bodea, Blaess, 2015, Bye et al., 2012) (Vgl. Kapitel 1.4). Deshalb teilten wir die mDAN-Regionen des Mittelhirns entlang der rostro-kaudalen Achse in vier Regionen ein, welche wir mit "a" bis "d" benannten (**Abb. 13**) (Vgl. (Blaess et al. 2011)) und verglichen den Beitrag der *Cxcr4*-Linie in den einzelnen Bereichen zu verschiedenen Induktionszeitpunkten (Vgl. **Abb. 24-27**).

Wir betrachteten den Beitrag der *Cxcr4*-Linie (tdT+, rote) in jedem rostro-kaudalen Bereich im Vergleich der Induktionszeitpunkte. Weiterhin betrachteten wir die Kollokalisierung von rotem (*Cxcr4*-abstammende, tdT+ Zellen) und grünem Signal (TH+, Alexa488+) über Zellkörpern (entsprechende Detailabbildungen, auf denen das überlappende Signal deutlicher erkennbar ist **s. Abb. 21-23**).

Im a-Bereich (**Abb. 24**) zeigt sich visuell ein ausgedehntes Vorkommen der *Cxcr4*-abstammenden Zellen zu den Induktionszeitpunkten TM E12.5 und TM E13.5, sowohl in SNpc als auch VTA (**Abb. 24 A-H**), welches zu den Induktionszeitpunkten TM E14.5 und TM E15.5 deutlich abnimmt. (**Abb. 24 I-P**). Zu allen Zeitpunkten stellen sich im a-Bereich *Cxcr4*-abstammende mDAN (tdT+, TH+) dar. Deren Vorkommen nimmt zwischen TM E12.5 und TM E15.5 deutlich ab, sodass Koexpression zum Zeitpunkt TM E15.5 nur noch vereinzelt vorhanden war.

Im b-Bereich (**Abb. 25**) zeigt sich zu allen Zeitpunkten, insb. aber zu den Zeitpunkten TM E12.5 und TM E13.5 eine im Vergleich zum a-Bereich (**Abb. 24**) ausgedehntere Markierung der *Cxcr4*-abstammenden (tdT+) Zellen, welche idem zum a-Bereich zu den Induktionszeitpunkten E14.5 und E15.5 deutlich abnimmt (**Abb. 25 I-P**). *Cxcr4*-abstammende mDAN (tdT+, TH+) zeigen sich im b-Bereich im Vergleich zum a-Bereich vermehrt und bleiben bis zum Zeitpunkt E15.5 im VTA deutlich sichtbar. In der SNpc zeigen sich zu den Zeitpunkten TM E14.5 und TM E15.5 nur vereinzelt *Cxcr4*-abstammende mDAN.

Im c-Bereich (**Abb. 26**) zeigen sich weiterhin im Vergleich zum a-Bereich deutlich mehr *Cxcr4*-abstammende (tdT+) Zellen zwischen den Induktionszeitpunkten TM E12.5 und TM

E14.5. Zum Zeitpunkt TM E15.5 zeigt sich ein deutlicher Rückgang *Cxcr4*-abstammender Zellen. *Cxcr4*-abstammende mDAN zeigen sich im Vergleich zum a-Bereich vermehrt und bleiben bis zum Zeitpunkt TM E15.5 im VTA deutlich sichtbar. In der SNpc zeigen sich zu den Zeitpunkten TM E14.5 und TM E15.5 idem zum b-Bereich nur vereinzelt *Cxcr4*-abstammende mDAN.

Im d-Bereich (**Abb. 27**) stellten sich insg. weniger *Cxcr4*-abstammende Zellen dar als in den b- und c-Bereichen. Insgesamt scheint daher der Beitrag zu SNpc, CLN und RRF gering, ist aber zu allen Zeitpunkten vorhanden und fällt wie in den a-c-Bereichen vom Induktionszeitpunkt TM E12.5 bis TM E15.5 ab.

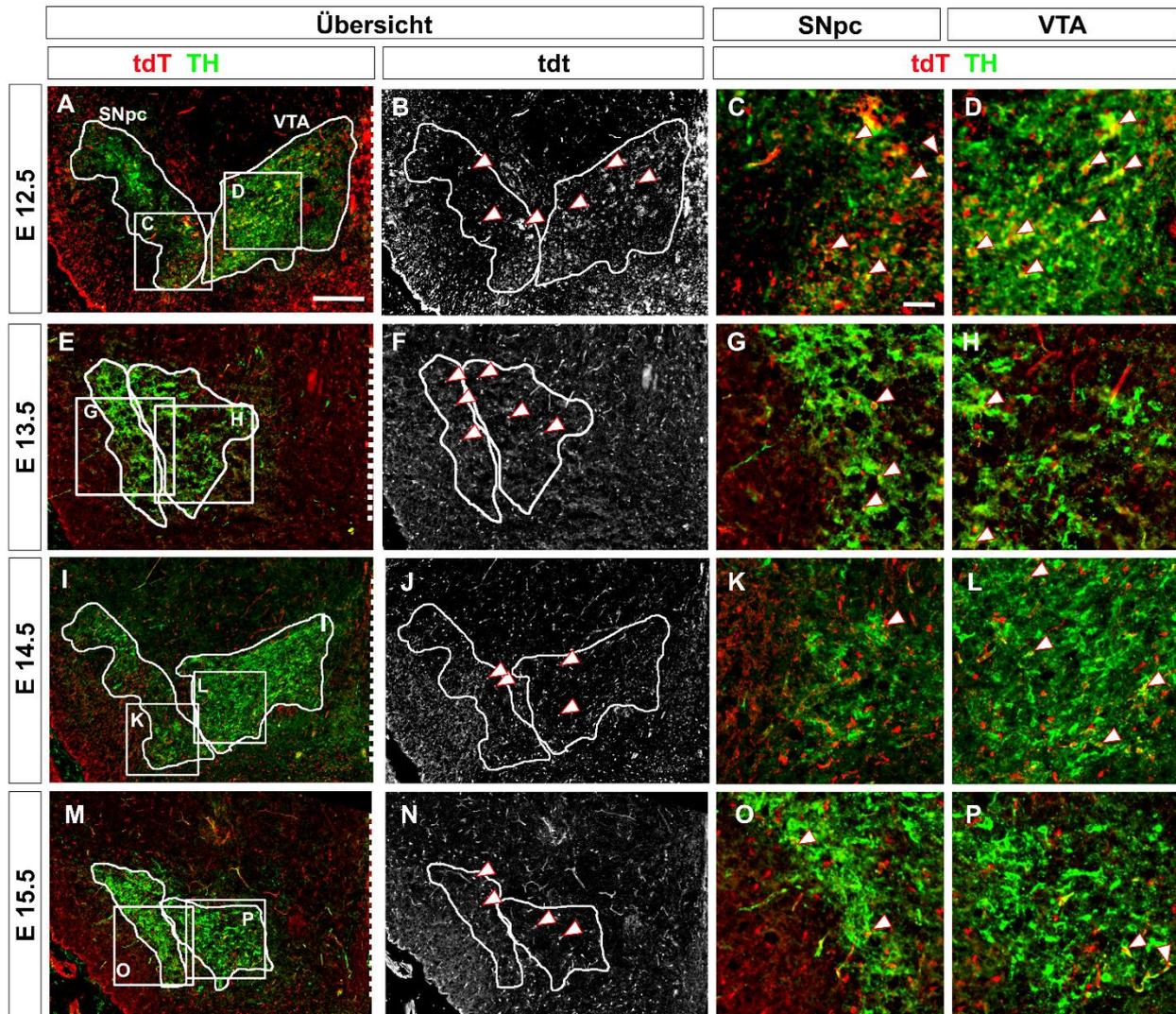


Abb. 24: Koronare Hirnschnitte aus dem ventralen Mittelhirn im a-Bereich, *Cxcr4*-Linie zum Induktionszeitpunkt TM E12.5 bis E15.5 markiert. Analysezeitpunkt E18.5 oder P0. Genotyp *Cxcr4^{CreER/+} R26^{Ai9/+}*, *Cxcr4*-Linie (Antikörperfärbung auf das Fluoreszenzprotein tdT, rot) und mDAN (Antikörperfärbung für TH, grün); A,E,I,M: Übersichtsausschnitt aus dem ventralen Mittelhirn, DA Zellcluster weiß umrandet, vergrößert dargestellte Ausschnitte als Quadrate markiert; Mittellinie als gestrichelte Linie dargestellt; B,F,J,N: *Cxcr4*-abstammende Zellen (Antikörperfärbung auf das Fluoreszenzprotein tdT, weiß), mDAN Gebiete weiß umrandet, *Cxcr4*-Linie exemplarisch durch Dreiecke markiert; C,G,K,O: Ausschnitt aus der SNpc; mDAN der *Cxcr4*-Linie exemplarisch durch Dreiecke markiert; D,H,L,P: Ausschnitte aus dem VTA. mDAN der *Cxcr4*-Linie exemplarisch durch Dreiecke markiert. Es handelt sich um Beispielbilder. Analysiert wurden für die Zeitpunkte TM E11.5 n=3, E12.5 n=3, E13.5 n=6, E14.5 n=5, E15.5 n=4 und E17.5 n=2 Mäuse mit dem angegebenen Genotyp. Maßstabsleiste A,B,E,F,I,J,M,N: 100 μ m, C,D,G,H,K,L,O,P: 50 μ m. Nach (Petese et al. 2022)

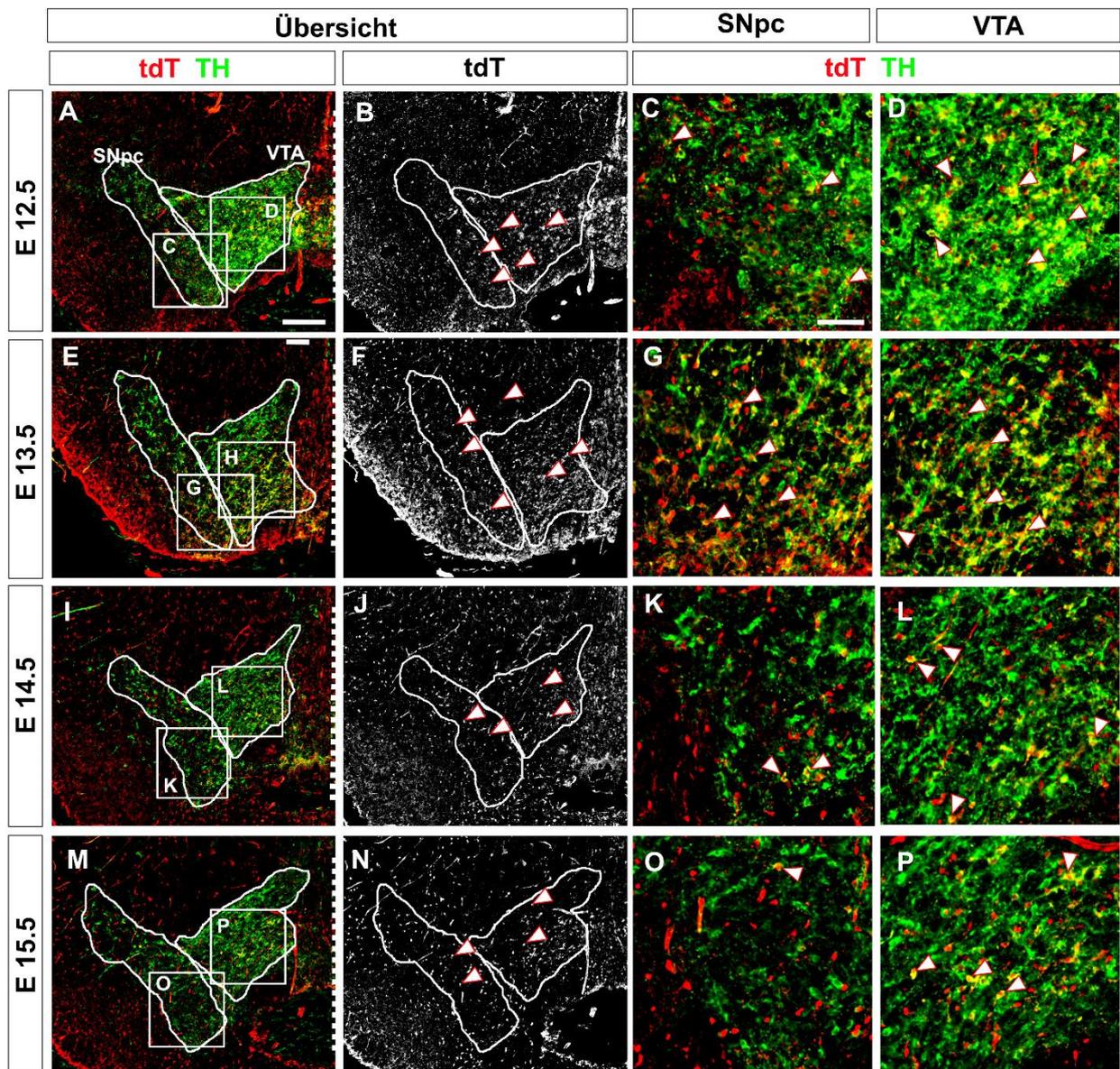


Abb. 25: Koronare Hirnschnitte aus dem ventralen Mittelhirn im b-Bereich, *Cxcr4*-Linie zum Induktionszeitpunkt TM E12.5 bis E15.5 markiert. Analysezeitpunkt E18.5 oder P0. Genotyp *Cxcr4^{CreER/+} R26^{Ai9/+}*, *Cxcr4*-Linie (Antikörperfärbung auf das Fluoreszenzprotein tdT, rot) und mDA Neurone (Antikörperfärbung für TH, grün); A,E,I,M: Übersichtsausschnitt aus dem ventralen Mittelhirn, DA Zellcluster weiß umrandet, vergrößert dargestellte Ausschnitte als Quadrate markiert; Mittellinie als gestrichelte Linie dargestellt; B,F,J,N: *Cxcr4*-abstammende Zellen (Antikörperfärbung auf das Fluoreszenzprotein tdT, weiß), mDA Gebiete weiß umrandet, *Cxcr4*-Linie exemplarisch durch Dreiecke markiert; C,G,K,O: Ausschnitt aus der SNpc; mDAN der *Cxcr4*-Linie exemplarisch durch Dreiecke markiert; D,H,L,P: Ausschnitte aus dem VTA. mDAN der *Cxcr4*-Linie exemplarisch durch Dreiecke markiert; Es handelt sich um Beispielbilder. Analysiert wurden für die Zeitpunkte TM E11.5 n=3, E12.5 n=3, E13.5 n=6, E14.5 n=5, E15.5 n=4 und E17.5 n= 2 Mäuse mit dem angegebenen Genotyp. Maßstabsleiste A,B,E,F,I,J,M,N: 100 μ m, C,D,G,H,K,L,O,P: 50 μ m. Nach (Petese et al. 2022)

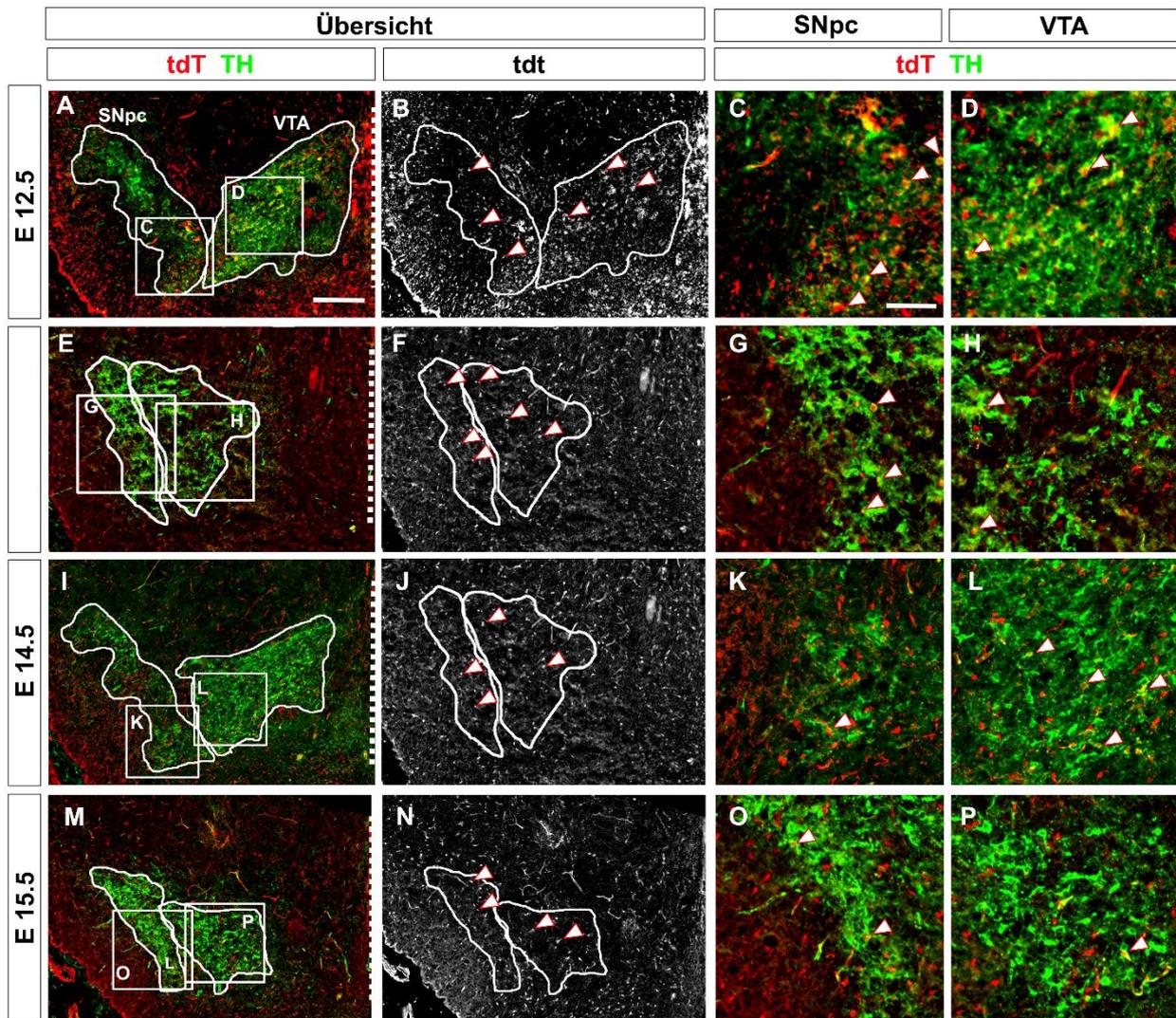


Abb. 26: Koronare Hirnschnitte aus dem ventralen Mittelhirn im c-Bereich, *Cxcr4*-Linie zum Induktionszeitpunkt TM E12.5-E15.5 markiert. Analysezeitpunkt E18.5 oder P0. Genotyp *Cxcr4^{CreER/+} R26^{Ai9/+}*, *Cxcr4*-Linie (Antikörperfärbung auf das Fluoreszenzprotein tdT, rot) und mDAN (Antikörperfärbung für TH, grün); A,E,I,M: Übersichtsausschnitt aus dem ventralen Mittelhirn, DA Zellcluster weiß umrandet, vergrößert dargestellte Ausschnitte als Quadrate markiert; Mittellinie als gestrichelte Linie dargestellt; B,F,J,N: *Cxcr4*-Linie (Antikörperfärbung auf das Fluoreszenzprotein tdT, weiß), mDA Gebiete weiß umrandet, *Cxcr4*-Linie exemplarisch durch Dreiecke markiert; C,G,K,O: Ausschnitt aus der SNpc; mDAN der *Cxcr4*-Linie exemplarisch durch Dreiecke markiert; D,H,L,P: Ausschnitte aus dem VTA. mDAN der *Cxcr4*-Linie exemplarisch durch Dreiecke markiert; Es handelt sich um Beispielbilder. Analysiert wurden für die Zeitpunkte TM E11.5 n=3, E12.5 n=3, E13.5 n=6, E14.5 n=5, E15.5 n=4 und E17.5 n=2 Mäuse mit dem angegebenen Genotyp. Maßstabsleiste A,B,E,F,I,J,M,N: 100 µm, C,D,G,H,K,L,O,P: 50 µm. Nach (Petese et al. 2022)

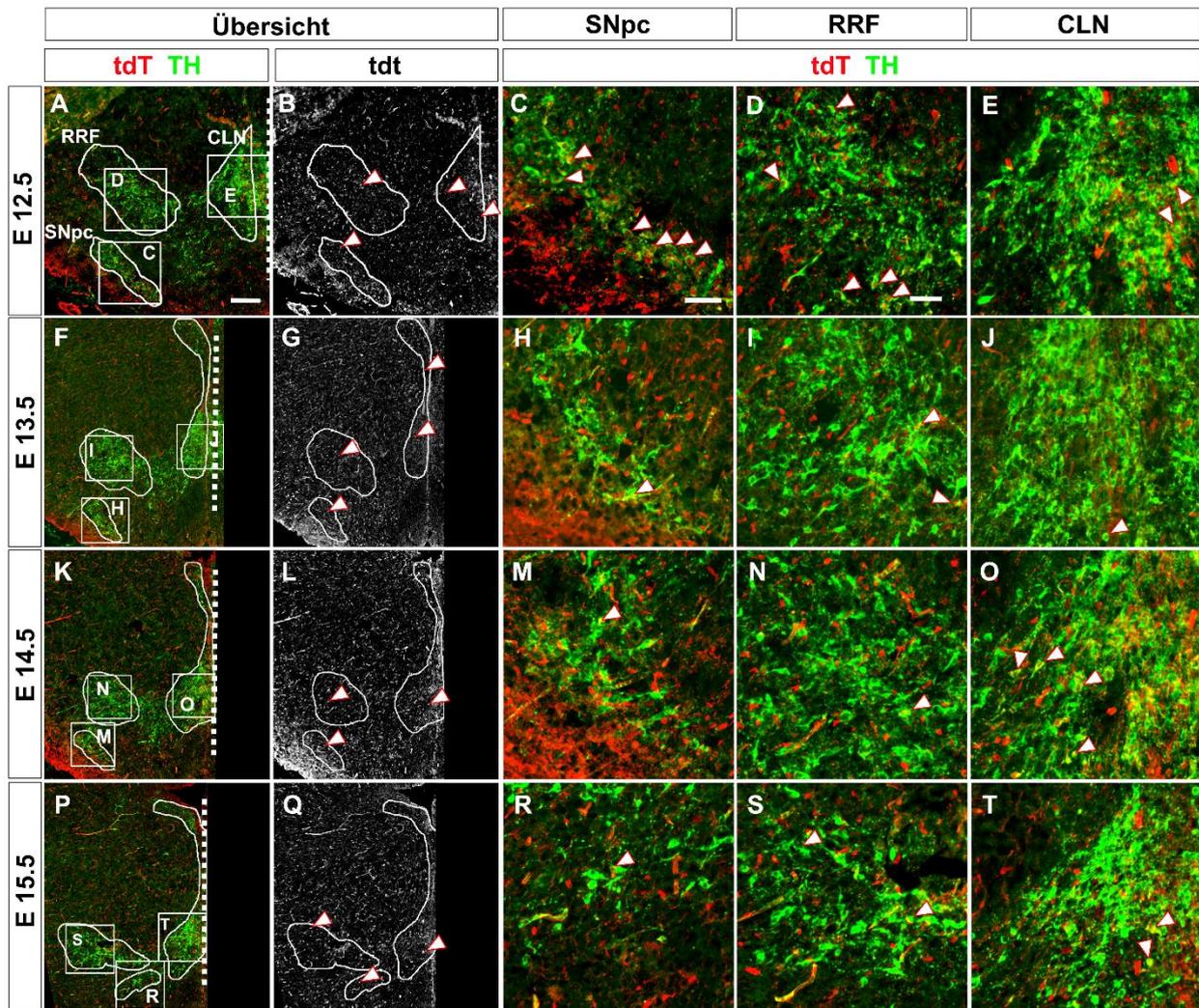


Abb. 27: Koronare Hirnschnitte aus dem ventralen Mittelhirn im d-Bereich, *Cxcr4*-Linie zum Induktionszeitpunkt TM E12.5 bis E15.5 markiert. Analysezeitpunkt E18.5 oder P0. Genotyp *Cxcr4*^{CreER/+} *R26*^{Ai9/+}, *Cxcr4*-Linie (Antikörperfärbung auf das Fluoreszenzprotein tdT, rot) und mDAN (Antikörperfärbung für TH, grün); A, E, I, M: Übersichtsausschnitt aus dem ventralen Mittelhirn, DA Zellcluster weiß umrandet, vergrößert dargestellte Ausschnitte als Quadrate markiert; Mittellinie als gestrichelte Linie dargestellt; B, G, L, Q: *Cxcr4*-abstammende Zellen (Antikörperfärbung auf das Fluoreszenzprotein tdT, weiß), mDA Gebiete weiß umrandet, *Cxcr4*-Linie exemplarisch durch Dreiecke markiert; C, H, M, R, D, I, N, S, E, J, O, T: mDAN der *Cxcr4*-Linie exemplarisch durch Dreiecke markiert; A-E: TM E12.5, F-J: TM E13.5, K-O: TM E14.5, P-T: TM E15.5. Es handelt sich um Beispielbilder. Analysiert wurden für die Zeitpunkte TM E11.5 n=3, E12.5 n=3, E13.5 n=6, E14.5 n=5, E15.5 n=4 und E17.5 n=2 Mäuse mit dem angegebenen Genotyp. Maßstabsleiste A, B, F, G, K, L, P, Q: 100 µm; C, D, E, H, I, J, M, N, O, R, S, T: 50 µm

3.2 Analyse des Beitrages *Cxcr4*-abstammender Zellen zu mDAN nach Induktion zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten – quantitative Analyse

Um den Beitrag der *Cxcr4*-abstammenden Zellen über die verschiedenen Zeitpunkte und Regionen vergleichen zu können, sollte idealerweise der Anteil (%) der TH-positiven Zellen, die auch tdT exprimieren für die verschiedenen Regionen SNpc, VTA, CLN und RRF quantifiziert werden. Angesichts der umfangreichen tdT-Expression im ventralen Mittelhirn insbesondere bei TM E11.5 und TM E12.5 (Vgl. **Abb. 20 und 24-27**) war es allerdings nicht möglich, tdT und TH koexprimierende und TH+, aber auch tdT negative Zellen zweifelsfrei zu identifizieren.

Die qualitative Analyse zum Zeitpunkt E18.5 oder P0 zeigte uns eine zunehmende Reduktion der markierten *Cxcr4*-abstammenden Zellen im ventralen Mittelhirn von frühen bis späten Induktionszeitpunkten. Um dieses qualitative Ergebnis messbar zu machen, nutzen wir einen Plugin im Bildbearbeitungsprogramm Fiji, das es erlaubt Kolokalisierung von fluoreszenten Signalen automatisiert zu detektieren (Fiji-Plugins „Colocalization Threshold“). Hierfür wurden auf jedem Gehirnschnitt die Kerngebiete VTA, SNpc, CLN und RRF markiert und die Fläche des jeweiligen Areals (in Pixel) ausgemessen. Anschließend wurde automatisiert die Kolokalisierung der Fluoreszenzsignale (Cy3 für *Cxcr4*-abstammende Zellen und Alexa 488 für TH+ Zellen) innerhalb des markierten Areals (in Pixel) bestimmt. Es wurde dann ein KoLokAn (siehe Material und Methoden) bestimmt, indem die Anzahl der Pixel der Kolokalisierung durch die Anzahl der Pixel des jeweiligen Areals geteilt wurde (Vgl. Abschnitt 2.8). Untersucht wurden die Induktionszeitpunkte TM E12.5 bis E15.5 in Schnitten von E18.5 oder P0 Gehirnen.

Zuerst stellten wir anhand eines rostro-kaudalen Bereichs für jeden Induktionszeitpunkt visuell dar, wie sich die Verteilung des KoLokAn verhält (**Vgl. Abb. 28**), bevor wir in einem zweiten Schritt eine quantitative Auswertung durchführten. Für die quantitative Auswertung wurde der KoLokAn von den Gewebeproben von mindestens drei Mäusen pro Induktionszeitpunkt genutzt, wenn nicht anders angegeben.

3.2.1 Kolokalisierung in den Kerngebieten SNpc und VTA über verschiedene Induktionszeitpunkte hinweg

Für die Quantifizierung des KoLokAn der SNpc und des VTA nutzen wir die a bis c-Bereiche entlang der rostro-kaudalen Achse des ventralen Mittelhirns. Der d-Bereich enthält nur einen kleinen Anteil der mDAN der SNpc und keinen Teil des VTA, daher wurde dieser nicht in die Berechnung einbezogen.

In der SNpc zeigt sich visuell eine breite Kolokalisierung zu den Induktionszeitpunkten TM E12.5 und TM E13.5, v.a. auch in lateralen Anteilen der SNpc (**Abb. 28 C,F**), während zu TM E14.5 und TM E15.5 kaum Kolokalisierung detektiert wurde (**Abb. 28 I,L**). Die quantitative Auswertung des KoLokAn und der statistische Vergleich der Zeitpunkte zeigt für die SNpc eine signifikante Abnahme des KoLokAn über die Induktionszeitpunkte hinweg (Post-Hoc-Test für linearen Trend) und signifikante Unterschiede des KoLokAn zwischen den Induktionszeitpunkten TM E12.5 und TM E14.5, sowie zwischen den Induktionszeitpunkten TM E12.5 und TM E15.5 (**Abb. 29 A**).

Im VTA konnte der größte KoLokAn zum Zeitpunkt TM E13.5 dargestellt werden (**Abb. 28 E**). Der Abfall des KoLokAn zu den Zeitpunkten TM E14.5 und TM E15.5 erschien deutlich geringer, als bei der SNpc. (**Abb. 28 H,K**). In der Betrachtung ergab sich außerdem der Eindruck einer leichten Verschiebung des KoLokAn hin zu medialen Anteilen des VTA über die Induktionszeitpunkte hinweg (**Abb. 28 B,E,H,K**).

Die quantitative Auswertung des KoLokAn für das VTA und der statistische Vergleich der Zeitpunkte zeigten den größten KoLokAn zum Zeitpunkt TM E13.5, wobei sich jedoch keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte des KoLokAn zwischen den Induktionszeitpunkten ergaben (**Abb. 29 B**).

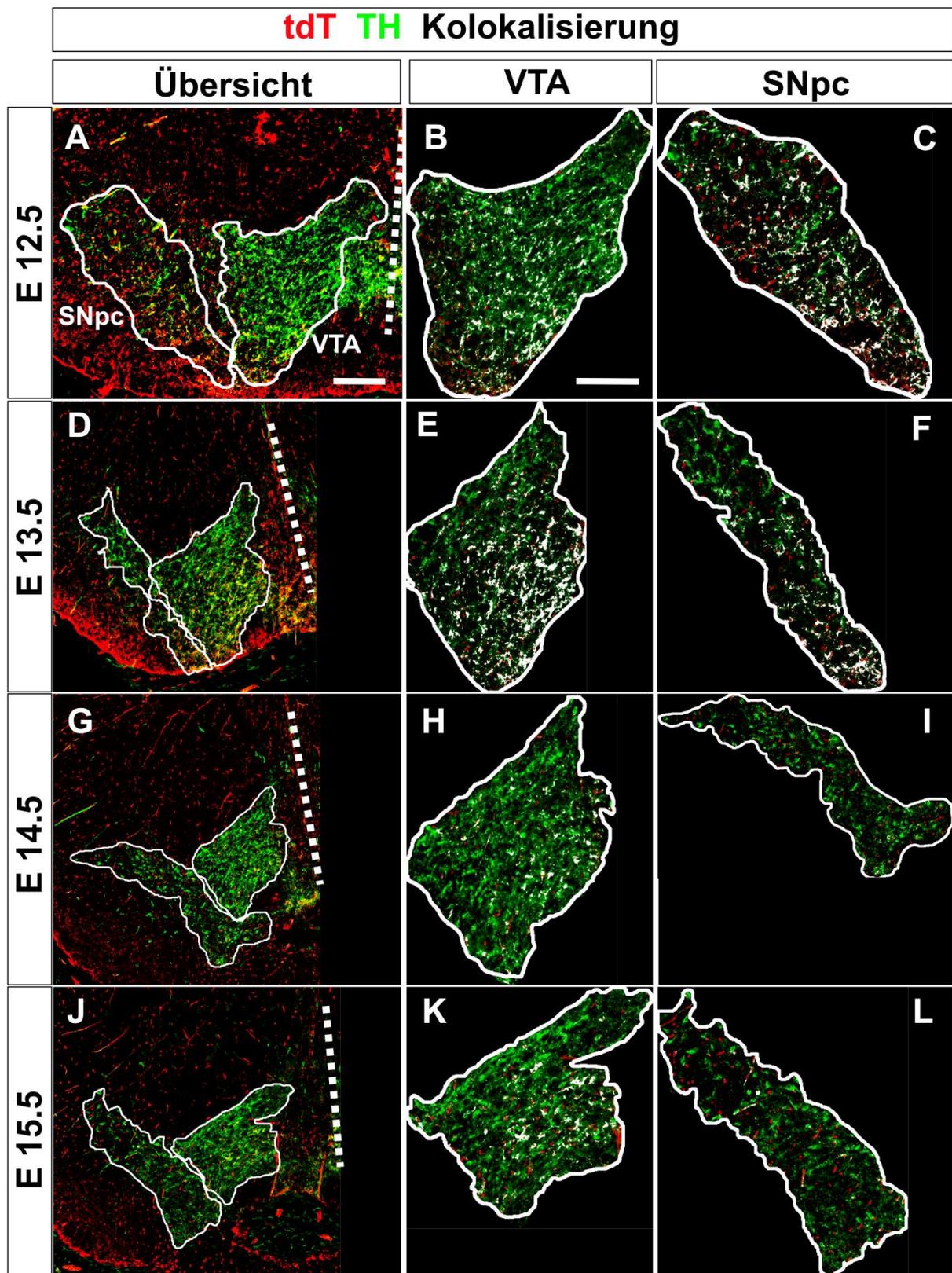


Abb. 28: Darstellung der Kolokalisierung des roten und grünen Fluoreszenzsignals.
(Fortsetzung der Legende auf der nächsten Seite)

Koronare Hirnschnitte und einseitige Darstellung auf Höhe des ventralen Mittelhirns des b-Bereichs, Analysezeitpunkt E18.5 oder P0. Mittellinie durch eine gestrichelte Linie markiert. *Cxcr4*-Linie (tdT +, rot, Cy3) und mDAN (TH+, Alexa 488, grün). Die Kolokalisierung wurde durch das Fiji-Plugin „Colocalization Threshold“ bestimmt und ist als weißes Signal dargestellt. Die mDAN Kernregionen sind umrandet. Maßstabsleisten: A,D,G,J: 100 μ m und B,C,E,F,H,I,KL: 50 μ m. Es handelt sich um Beispielbilder. Analysiert wurden für die Induktionszeitpunkte TM E11.5 n=3, E12.5 n=3, E13.5 n=6, E14.5 n=5 und E15.5 n=4 Mäuse mit dem angegebenen Genotyp

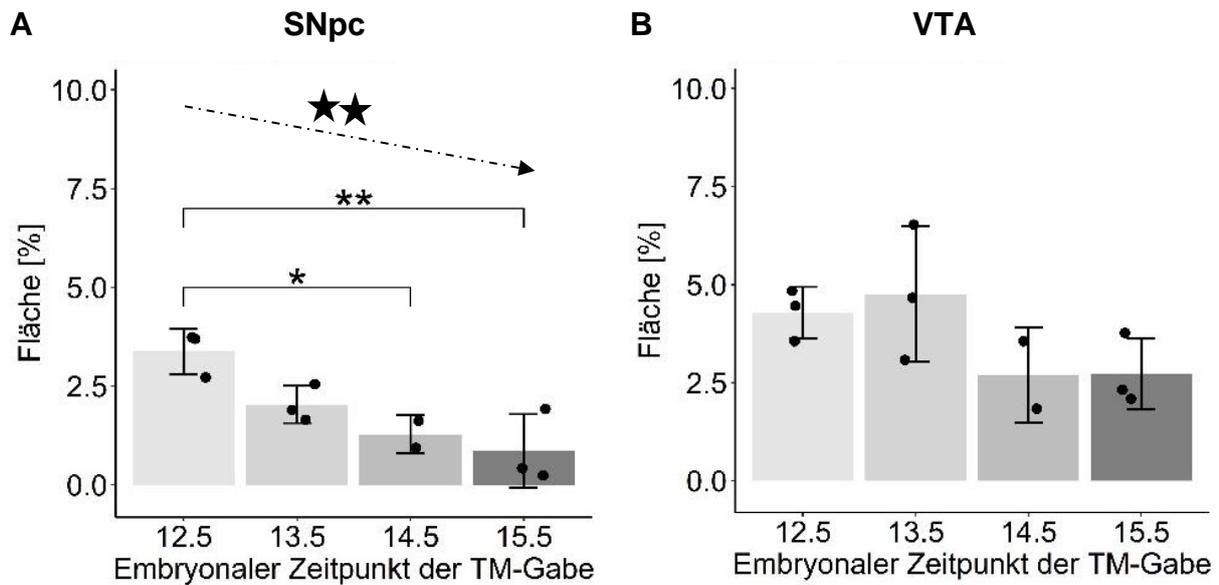


Abb. 29: KoLokAn in der SNpc (A) und im VTA (B) über die Induktionszeitpunkte hinweg. Zeitpunkt der Analyse: E18.5 oder P0. N=3 Tiere pro Region für TM E12.5, E 13.5, E15.5, n=2 Tiere für E14.5 pro Zeitpunkt und Bereich. Messungen des KoLokAn über den a-c-Bereich hinweg sowohl für die SNpc wie auch den. VTA Statistische Analyse: One-Way-ANOVA gefolgt von einem Tukey Post-Hoc-Test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) oder einem Post-Hoc Test für linearen Trend. Der Post-Hoc Test für linearen Trend zeigt einen signifikanten Abfall des KoLokAns in der SNpc über die Induktionszeitpunkte hinweg (★★ $p=0.0019$). Für das VTA ist das nicht der Fall ($p=0.0740$). Fehlerbalken: Standardabweichung

3.2.2 Vergleich des KoLokAn der rostro-kaudalen a bis c Bereiche

Im nächsten Schritt differenzierten wir genauer wie die Kolokalisierung innerhalb der Kerngebiete SNpc und VTA zu den verschiedenen Zeitpunkten in der rostro-kaudalen Achse verteilt war.

Innerhalb der SNpc nahm der KoLokAn von rostral nach kaudal in der qualitativen Betrachtung zu allen Induktionszeitpunkten zu, wobei der Unterschied zu frühen Induktionszeitpunkten schon aufgrund der initial starken Markierung größer erschien (Vgl. nicht gezeigtes Material). Auch in der quantitativen Analyse nahmen die Mittelwerte des KoLokAn von rostral nach kaudal zu. In der Vergleichsanalyse ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied zum Zeitpunkt TM E12.5 zwischen rostralem a-Bereich und kaudalem c-Bereich, während sich die Unterschiede zwischen rostralem und kaudalem KoLokAn zu den späteren Induktionszeitpunkten bei vergleichsweise größerer Varianz als nicht signifikant erwiesen (**Abb. 30**).

Im VTA zeigte sich ein deutlicherer Unterschied zwischen rostralem eher niedrigem KoLokAn und kaudal hohem KoLokAn für fast alle Induktionszeitpunkte. Auch im VTA ergaben sich Unterschiede des KoLokAn in den a-c-Bereichen, welche sich zum Zeitpunkt TM E12.5 am ausgeprägtesten darstellten. Im Gegensatz zur SNpc blieben die Unterschiede des KoLokAn jedoch auch für die Zeitpunkte TM E13.5 und TM E15.5 statistisch signifikant (**Abb. 31**).

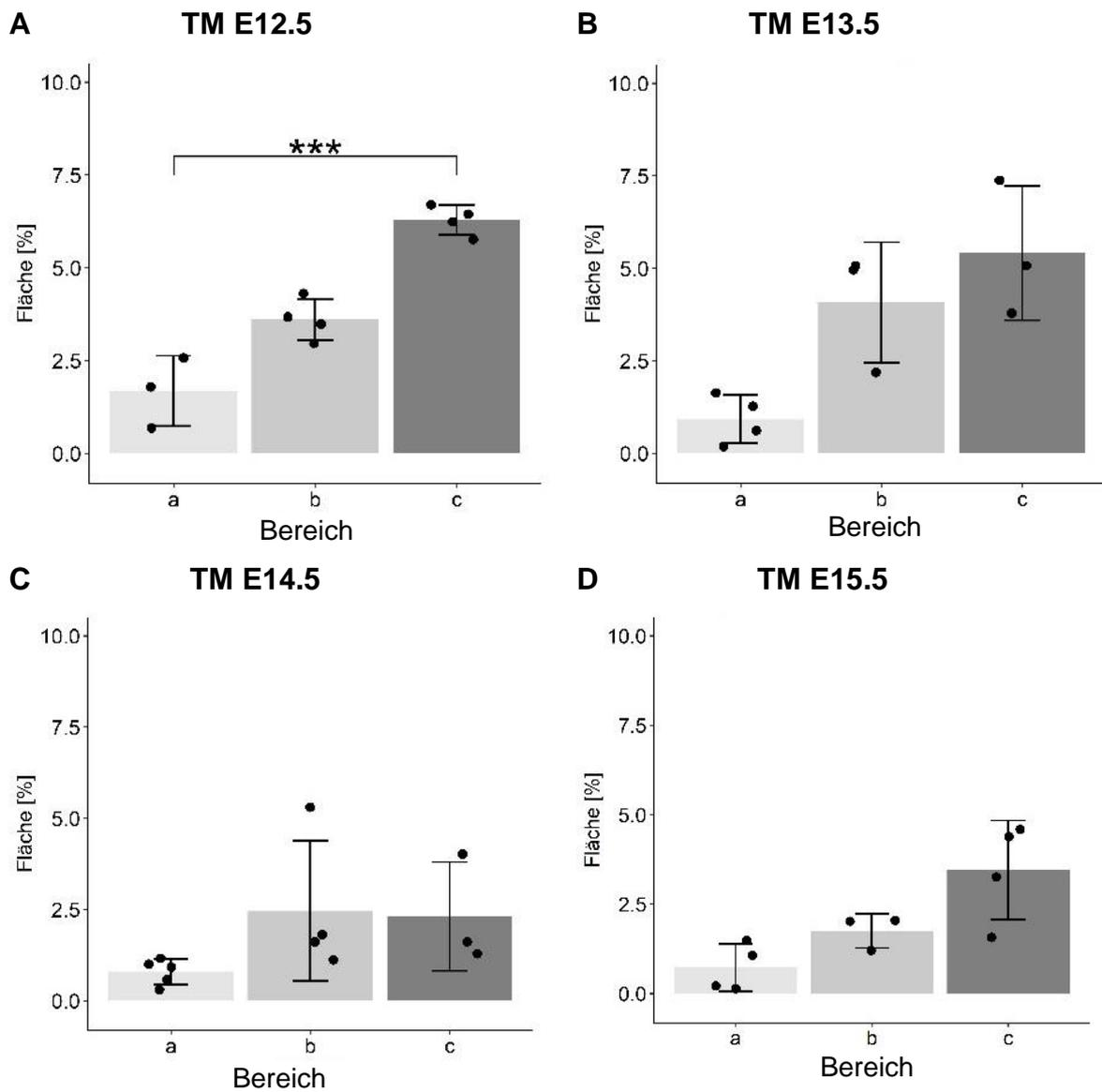


Abb. 30: KoLokAn in der SNpc im Vergleich von drei rostro-kaudalen Bereichen (a-c) für die Induktionszeitpunkte TM E 12.5 bis E15.5; $n \geq 3$ pro Tier pro Region. Analysezeitpunkt E18.5 oder P0. Statistische Analyse: One-Way-ANOVA gefolgt von einem Tukey Post-Hoc-Test (***) $p < 0.001$). Zum Zeitpunkt E12.5 können signifikant höhere KoLokAn im kaudalen c-Bereich im Vergleich zum rostralen b-Bereich gezeigt werden. Dies ist zu den Zeitpunkten TM E13.5 bis E15.5 nicht mehr der Fall; Fehlerbalken geben die Standardabweichung an

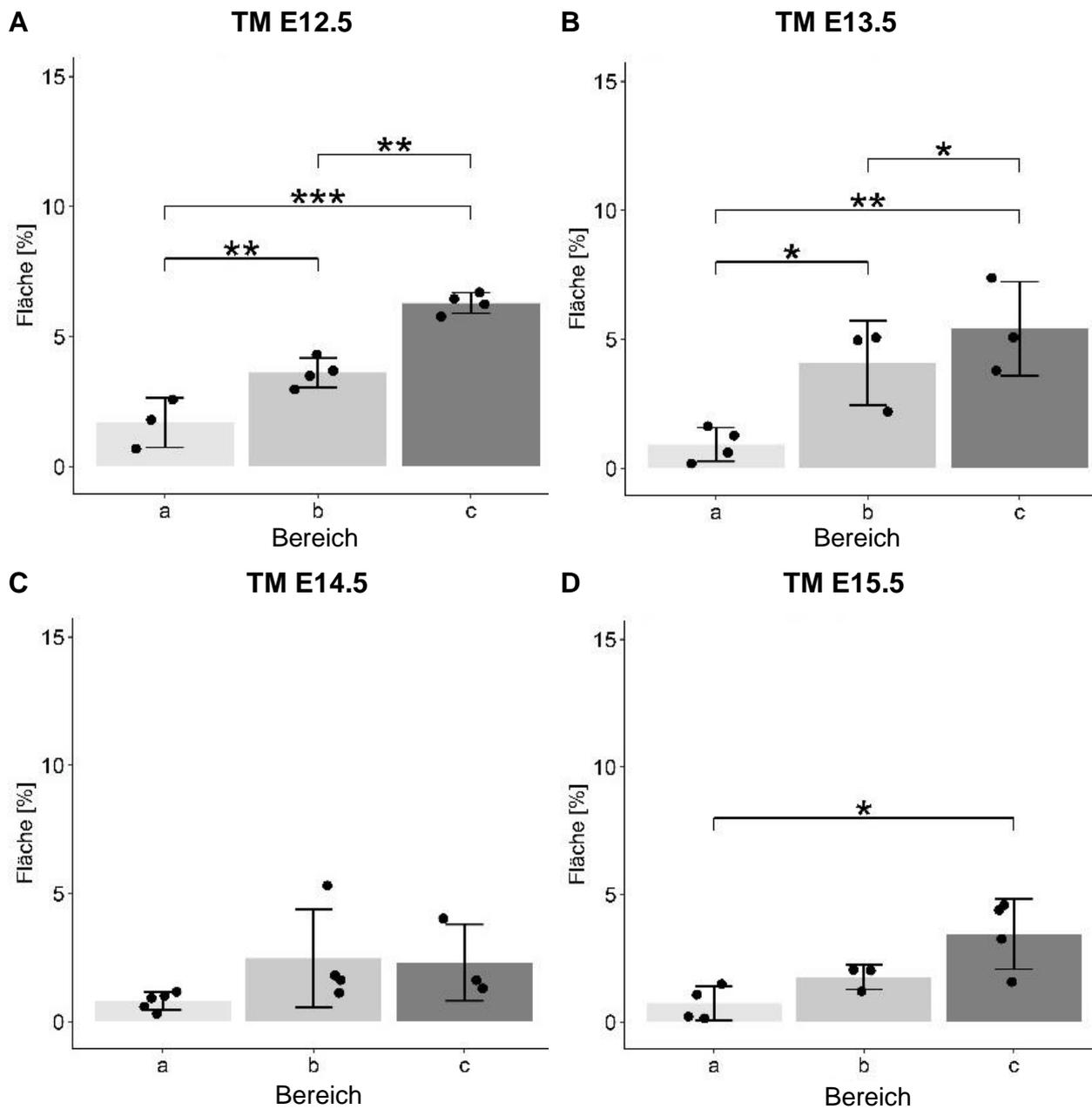


Abb. 31: KoLokAn im VTA im Vergleich von drei rostro-kaudalen Bereichen (a-c) zu vier Induktions-Zeitpunkten TM E12.5 - E15.5; Analysezeitpunkt E18.5 oder P0. $n \geq 3$ pro Tier pro Region. Statistische Analyse: One-Way-ANOVA gefolgt von einem Tukey Post-Hoc-Test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Fehlerbalken geben die Standardabweichung an

3.2.3 Detaillierte Analyse der Unterschiede des KoLokAn nach Induktionszeitpunkt in verschiedenen rostro-kaudalen Bereichen der SNpc und des VTA

Unterschiede des KoLokAn in der rostro-kaudalen Achse warfen die Frage auf, aus welchen rostro-kaudalen Bereichen sich die in der ersten Überblicks-Analyse bzgl. SNpc und VTA gezeigten Ergebnisse ergaben. Bereits in der Durchsicht der Hirnschnitte ergab sich die Vermutung, dass sich besonders im c-Bereich deutliche Unterschiede zwischen den Zeitpunkten erkennen lassen (Vgl. **Abb. 24-27**).

Daher verglichen wir im Folgenden den Beitrag der *Cxcr4*-Linie zu den mDAN der Kerngebiete SNpc und VTA für die a-, b- und c-Bereiche. In dieser Analyse zeigten sich nur signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten für den c-Bereich der SNpc (**Abb. 32E**). Weiterhin fiel eine große Varianz der Werte auf (**Abb. 32**).

In den a- und b-Bereichen sehen wir für die SNpc eine Abnahme der Mittelwerte des KoLokAn mit steigendem Induktionszeitpunkt (**Abb. 32 A,C**). Im VTA ist der größte Mittelwert des KoLokAn im a-Bereich zum Induktionszeitpunkt TM E12.5 und in den b- und c-Bereichen zum Induktionszeitpunkt TM E13.5 erreicht und fällt anschließend ab. Ebenfalls zeigt sich eine große Varianz des KoLokAn (**Abb. 32 B,D,F**).

Im d-Bereich untersuchten wir die Kerngebiete CLN und RRF. Hier konnte jedoch kein signifikanter Trend im Sinne einer Abnahme des KoLokAn gezeigt werden (**Abb. 33**).

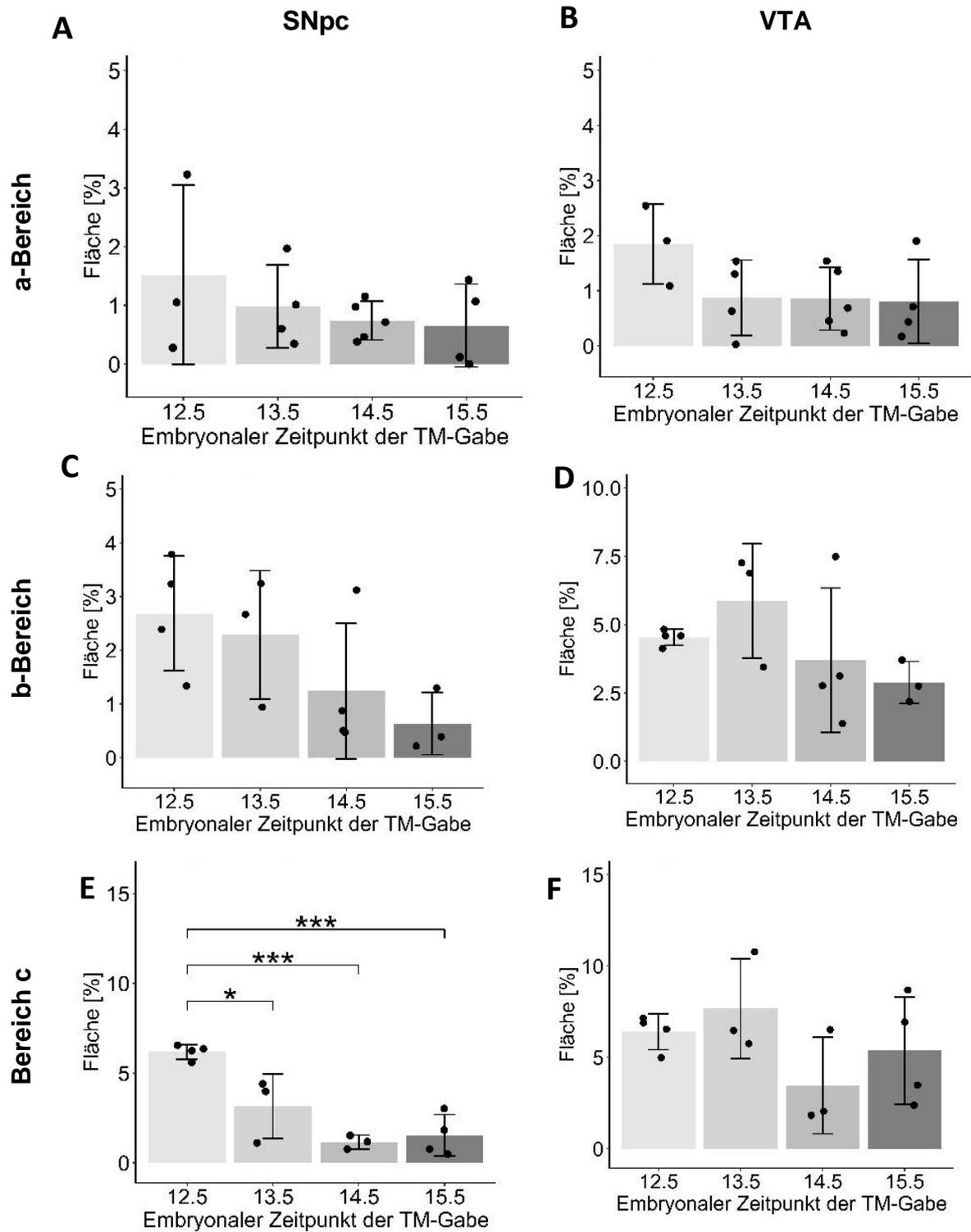


Abb. 32: KoLokAn in SNpc (A,C,E) und VTA (B,D,F) den rostro-kaudalen a- bis c-Bereichen im Vergleich der Induktionszeitpunkte TM E12.5 bis E15.5. (Fortsetzung der Legende auf der nächsten Seite)

$n \geq 3$ pro Tier pro Region. Analysezeitpunkt: E18.5 oder P0. Statistische Analyse: One-Way-ANOVA gefolgt von einem Tukey Post-Hoc-Test ($*p < 0.05$; $***p < 0.001$). Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. A-D: Es zeigt sich eine große Varianz innerhalb der Zeitpunkte. Zwischen den Zeitpunkten konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden. E, F: Es zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen dem KoLokAn zum Induktionszeitpunkt TM E12.5 und TM E13.5, 14.5 und 15.5 in der SNpc. Im VTA zeigt sich eine große Varianz zwischen den KoLokAn der verschiedenen Zeitpunkte

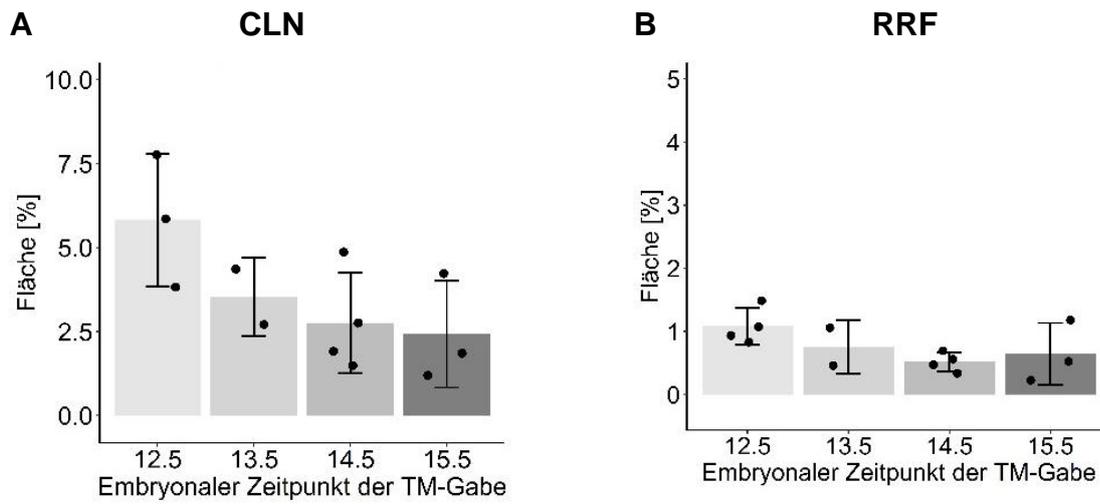


Abb. 33: Relativer Beitrag der *Cxcr4*-abstammenden Zellen zum CLN (A) und zur RRF (B) im d-Bereich über die Induktionszeitpunkte TM E 12.5 bis E15.5. Bestimmung pro Tier (für TM E13.5 $n=2$; für alle weiteren Zeitpunkte $n \geq 3$). Analysezeitpunkt E18.5 oder P0. Statistische Analyse: One-Way-ANOVA gefolgt von einem Post-Hoc Test für linearen Trend. Der Post-Hoc Test für linearen Trend zeigt einen signifikanten Abfall des relativen Beitrags zum CLN ($p = 0.0275$) aber nicht zur RRF ($p = 0.0595$) über die verschiedenen Induktionszeitpunkte hinweg. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Es zeigt sich ein sehr geringer Färbungsanteil im RRF

3.3 Intersektionelle Kartierung des Beitrags der *Cxcr4*-Linie zu mDAN

Die qualitative Auswertung der Hirnschnitte zeigte, dass der Beitrag der *Cxcr4*-Linie zum ventralen Mittelhirn im frühesten untersuchten Stadium (TM E11.5) sehr breit war und nach und nach eingeschränkter wurde (**Abb. 20**). Mit TM E11.5 trug die *Cxcr4*-Linie nicht nur in großem Umfang zu mDAN bei, sondern auch zu nicht-DA Zellen, wie im CLN und RRF, zur SNr, zu den TH-negativen Teilen des rostralen und kaudalen linearen Kerns und zu anderen Regionen des ventralen und dorsalen Mittelhirns (**Abb. 20, 24 bis 27** und nicht dargestelltes Material).

Angesichts der umfangreichen Markierung von Zellen im ventralen Mittelhirn insb. bei TM E11.5 und TM E12.5 war es nicht möglich, den Beitrag der *Cxcr4*-Linie zu verschiedenen anatomischen Untergruppen von mDAN quantitativ im Sinne einer Auszählung der *Cxcr4*-abstammenden mDAN zu bewerten, weshalb wir uns im ersten Schritt mit dem Colocalization Tool beholfen hatten. Um die Genauigkeit der Analyse *Cxcr4*-abstammender mDAN zu verbessern, wählten wir anschließend die *intersektionelle* induzierbare genetische Strategie zur Kartierung des Zellschicksals *Cxcr4*-abstammender Zellen. Bei dieser kann die Markierung auf Zellen durch die Expression von zwei definierten Genen spezifiziert werden (Vgl. Abschnitte 1.4.1 und 2.4.3, **Abb. 9 und 11**). Zusätzlich zu *Cxcr4*, wählten wir das Gen *Pitx3*.

Es wird angenommen, dass *Pitx3* generell in ausdifferenzierten mDAN exprimiert wird (Bodea et al. 2014; Korotkova et al. 2005). Durch Beschränkung der Expression des Reporterproteins auf *Pitx3*-exprimierende Zellen, in denen zu bestimmten Zeitpunkten eine durch TM induzierter Rekombination abgelaufen war, sollte eine spezifische Markierung *Cxcr4*-abstammender Zellen nur in mDAN erfolgen.

Zuerst sollte die Annahme überprüft werden, dass alle mDAN gleichmäßig durch die *PITX3^{tTA/+}* – Linie markiert werden. Hierfür nutzten wir eine zweite Mauslinie, *En1^{Cre}* (Kimmel et al. 2000), welche Zellen des Mittelhirns markiert. Zervas et al. zeigten 2004, dass durch die *En1^{Cre}*-Linie eine breite Markierung im gesamten Mittelhirn stattfindet, ohne dass es zu selektiver Verteilung der Markierung kommt (Zervas et al. 2004). Wir erwarteten also, dass durch die Kombination der *PITX3^{tTA}*-Linie (The Jackson Laboratory 2022) und der *En1^{Cre}* -Linie mit der Reporterlinie *Ai82^{TRE}* (Madisen et al. 2015) eine Markierung aller mDAN im Mittelhirn stattfindet (Vgl. **Abb. 34**). Diese sollte sich durch eine Koexpression von EGFP und TH zeigen.

Es wurden 2 Mäuse zum adulten Zeitpunkt P21 analysiert. Entgegen unserer Erwartungen zeigte sich keine gleichmäßige Koexpression von EGFP in den mDAN Regionen des Mittelhirns. Insbesondere in lateralen Teilen der SNpc waren mDAN sparsam markiert (**Abb. 34**).

Da nicht alle mDAN durch die *PITX^{tTA}*-Linie markiert werden, ist die Voraussetzung für eine Analyse der markierten Zellen nicht gegeben, d.h. die *PITX^{tTA}*-Linie eignet sich nicht

für eine intersektionelle induzierbare genetische Strategie zur Kartierung des Zellschicksals zur Erforschung der Hypothese einer möglichen progredienten Schicksalsrestriktion der Zellen während der embryonalen Entwicklung der mDAN. Die Verkreuzung der *Cxcr4^{CreER}*-, *PITX^{tTA}*, und *Ai82^{TRE}* - Linie brachen wir daher vorzeitig ab (N=1 Tier für TM E 13.5 und N= 2 für TM E14.5).

Unsere ersten Ergebnisse des Experiments unterstützen nichtsdestotrotz für die Zeitpunkte TM E13.5 und TM E14.5 die bisherige Annahme bzgl. des VTA, dass der Anteil *Cxcr4*-abstammender mDAN im c-Bereich größer ist als in den a- und b-Bereichen. Für die SNpc ergaben sich keine klaren Unterschiede zwischen den Bereichen (**Abb. 35**).

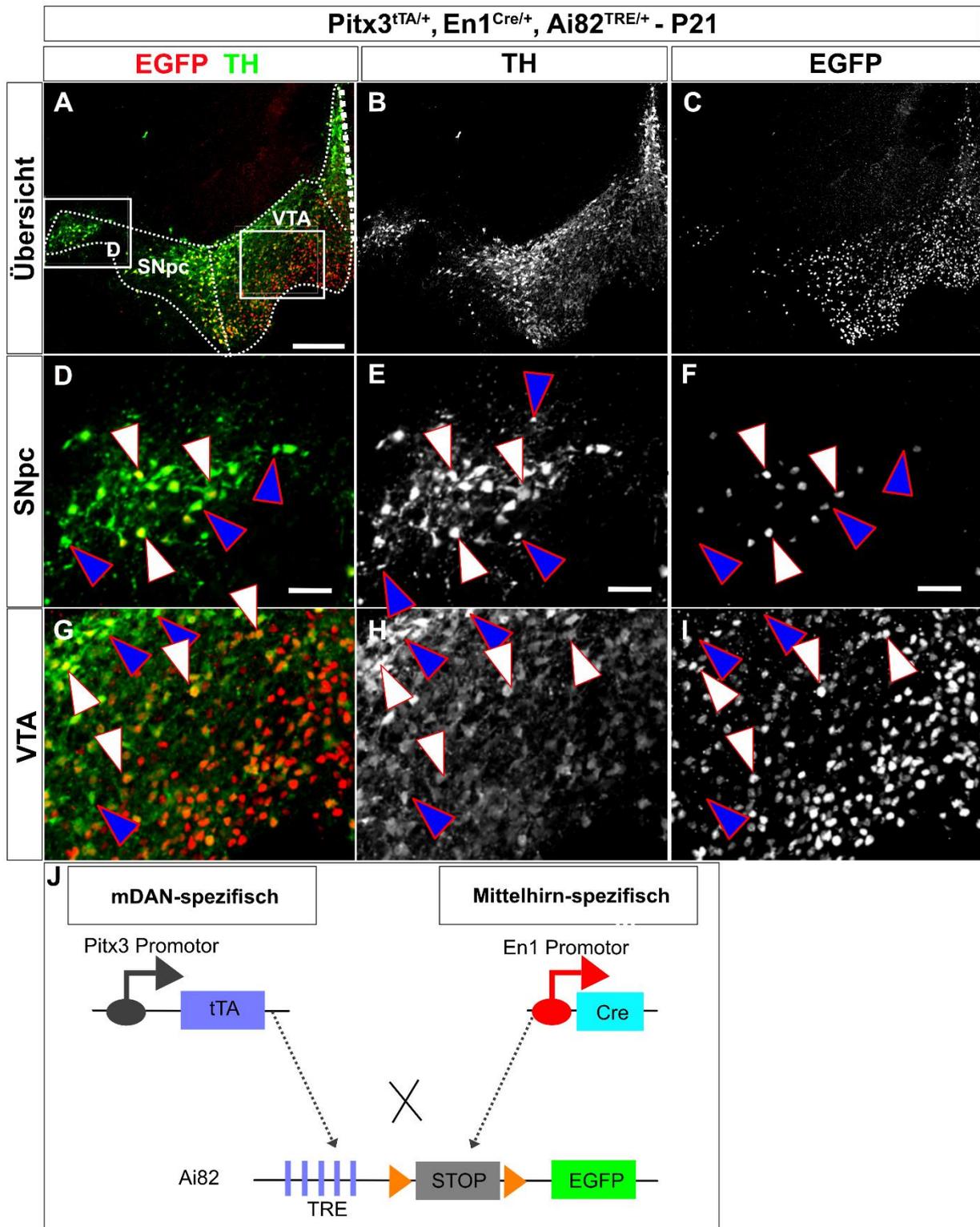


Abb. 34: Intersektionelle Genetische Strategie zur Kartierung des Zellschicksals mit den Mauslinien *Pitx3^{tTA/+}*, *Ai82^{TRE/+}* und *En1^{Cre/+}*. Ausschnitt aus dem ventralen Mittelhirn, Induktionszeitpunkt TM E14.5. (Fortsetzung der Legende auf der nächsten Seite)

Koronar Hirnschnitt und einseitige Darstellung auf Höhe des ventralen Mittelhirns im c-Bereich, Analysezeitpunkt P21. A: Mittellinie durch eine gestrichelte Linie markiert. Die mDAN Kernregionen sind umrandet. D-I: Weiße Dreiecke markieren exemplarisch Koexpression von EGFP und TH. Grüne Dreiecke markieren exemplarisch Expression von TH ohne Koexpression von EGFR. Maßstabsleisten: A, bis C: 100 μm und D bis I: 50 μm . Es handelt sich um Beispielbilder. Analysiert wurden n=3 Mäuse. J: Mauslinie und Kreuzung für die Intersektionelle Genetische Strategie zur Kartierung des Zellschicksals. Unter dem *En1*-Promotor wird eine Cre Rekombinase (Cre) abgelesen. Diese vermittelt im Zellkern die Rekombination der loxP Seiten (▶). Dadurch wird das von den loxP Seiten flankierte Stopcodon herausgeschnitten. EN1 ist während der Embryonalentwicklung spezifisch im Mittelhirn, Cerebellum und Pons exprimiert. Der Promotor (Tetracycline Response Element, TRE) ist nur unter Vorhandensein des Tetracycline-Controlled Transaktivator (tTA) aktiv, welches unter Kontrolle des *Pitx3*-Promotors abgelesen wird. *Pitx3* ist in mDAN exprimiert. Nur wenn die beiden Gene *En1* und *Pitx3* abgelesen werden, wird das Reporterprotein EGFP exprimiert (Jensen und Dymecki 2014). Experimente durchgeführt von Herrn Alessandro Petese unter der Leitung von Prof. Dr. Sandra Blaess

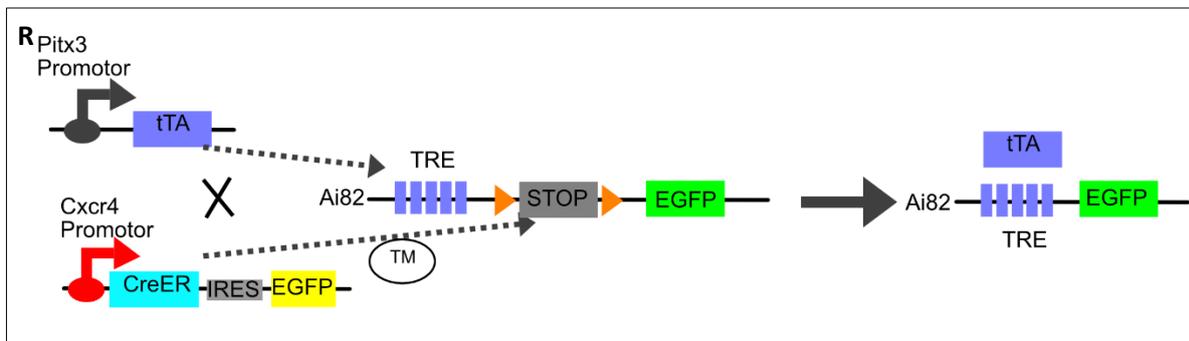
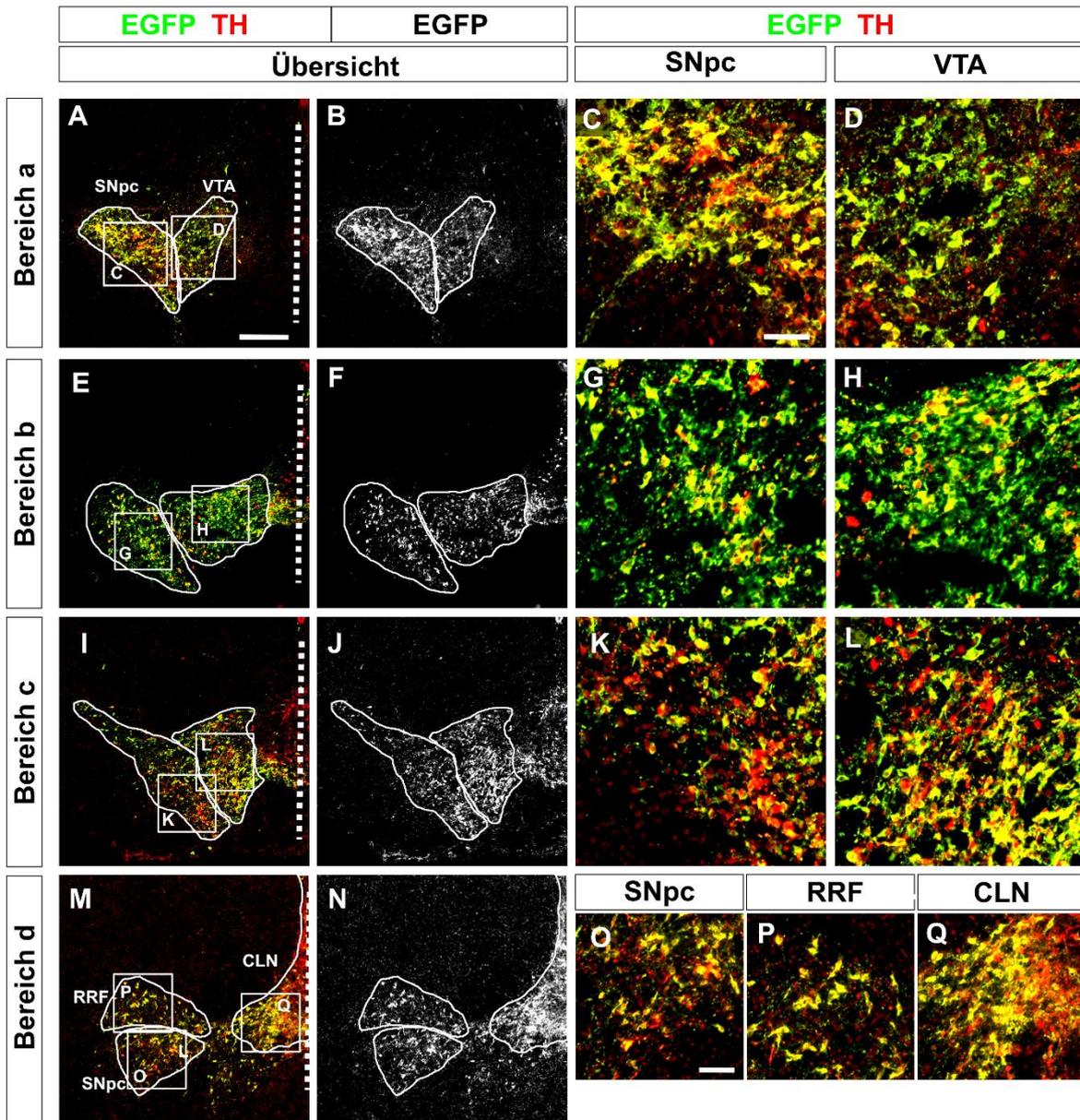


Abb. 35: Intersektionelle Genetische Strategie zur Kartierung des Zellschicksals. Ausschnitt aus dem ventralen Mittelhirn, Induktionszeitpunkt TM E14.5. (Fortsetzung der Legende auf der nächsten Seite)

Analysezeitpunkt E18.5 oder P0. Genotyp *Cxcr4*^{CreER/+}, *Pitx3*^{tTA/+}, *Ai82*^{TRE/+}. *Cxcr4*-abstammende Zellen (Antikörperfärbung auf das Fluoreszenzprotein EGFP, grün) und mDA Neurone (Antikörperfärbung für TH, rot); A,E,I,M: Übersichtsausschnitt aus dem ventralen Mittelhirn, DA Zellcluster weiß umrandet, vergrößert dargestellte Ausschnitte als Quadrate markiert; Mittellinie durch eine gestrichelte Linie --- markiert. B,F,J,N: *Cxcr4* abstammende Zellen (Antikörperfärbung auf das Fluoreszenzprotein tdT, weiß), mDA Gebiete weiß umrandet. Maßstabsleisten: A,B,E,F,I,J,M,N: 100 µm und C,D,G,H,K,L,O,P,Q: 50 µm. Es handelt sich um Beispielbilder. Analysiert wurden für die Zeitpunkte TM E13.5 n=1 und E14.5 n=2. R: Mauslinien und Kreuzungen für die Intersektionelle Genetische Strategie zur Kartierung des Zellschicksals. Unter dem *Cxcr4*-Promotor wird eine an einen Estrogenrezeptor (ER) gekoppelte Cre Rekombinase (CreER) abgelesen. Nach Bindung von Tamoxifen (TM) an CreER kann diese in den Zellkern gelangen und die Rekombination der loxP Seiten (▶) vermitteln. Dadurch wird das von den loxP Seiten flankierte Stopcodon herausgeschnitten. Der Promotor (Tetracycline Response Element, TRE) ist nur unter Vorhandensein des Tetracycline-Controlled Transactivator (tTA) aktiv, welches unter Kontrolle des *Pitx3*-Promotors abgelesen wird. Das Reporterprotein GFP kann exprimiert werden (Madisen et al. 2015), (Vgl. Abschnitt 2.3, **Abb. 11**)

4. Diskussion

Die Heterogenität der mDAN besteht auf verschiedenen Ebenen wie etwa in ihrer Funktion, anatomischen Lokalisation, Konnektom, Expressionsprofil, und in elektrophysiologischen Merkmalen. Es ist eine fundamentale Frage im Feld der Erforschung der mDAN, wie die Diversität der mDAN etabliert wird. Zusammenfassend stehen sich zwei denkbare Modelle bezüglich der embryonalen Entwicklung und Etablierung der Diversität der mDAN in Vorläuferzellen gegenüber, welche ebenfalls zusammenwirken könnten. Im ersten Modell differenzieren sich Subgruppen der mDAN je nach Lage der Vorläuferzellen in verschiedene Subgruppen (Modell A: räumlich). Im zweiten Modell differenzieren sich Subgruppen der mDAN zu verschiedenen embryonalen Zeitpunkten (Modell B: zeitlich) (Vgl. Abschnitt 1.4). Wir nutzten die Expression von *Cxcr4* von E10.5 bis E16.5, um Zellen des Mittelhirns und ihre Nachkommen zu embryonalen Zeitpunkten zu markieren, und so Modell B zu testen.

Unsere Hypothese war, dass (1) die *Cxcr4*-Expression als Marker zur Bestimmung des Zeitpunktes, zu dem die mDAN gebildet werden (engl. „Birthdating“-Studien) genutzt werden kann und (2) dass sich bei Induktion der Rekombination zu verschiedenen embryonalen Zeitpunkten eine räumliche Häufung der zu einem bestimmten Zeitpunkt markierten Zellen im histologischen Schnitt in verschiedenen Kerngebieten ergibt, was dafür sprechen würde, dass bestimmte mDA Subgruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Embryonalentwicklung entstehen. Die von uns genutzte Mauslinie könnte in diesem Fall ein hilfreiches Modell zur weiteren Erforschung des Ablaufs der Entwicklung von mDAN darstellen.

Wir nutzen eine induzierbare Strategie zur Kartierung des Zellschicksals (Madisen et al., 2010; Werner et al., 2020) und in einem zweiten Schritt eine intersektionelle induzierbare Strategie zur Kartierung des Zellschicksals, um zu verschiedenen embryonalen Zeitpunkten (E11.5 bis E17.5) *Cxcr4*-abstammende Zellen (sog. *Cxcr4*-Linie) mit dem Reporterprotein tdT zu markieren (Jensen und Dymecki 2014). Die Analyse fand zum Zeitpunkt E18.5 oder P0 statt. *Cxcr4*-abstammende Zellen wurden mittels einer Antikörperfärbung gegen tdT und einem Cy3-konjugierten sekundären Antikörper (Fluoreszenzsignal im orangen Bereich) visualisiert, mDAN mittels einer Antikörperfärbung gegen TH und einem Alexa 488-konjugierten sekundären Antikörper (Fluoreszenzsignal im grünen Bereich). Zur genaueren anatomischen Einteilung der mDAN ordneten wir die histologischen

Schnitte vier rostro-kaudalen Bereichen (a-d) zu und in jedem Bereich den entsprechenden Kerngebieten (SNpc, VTA, RRF, CLN) (Vgl. **Abb. 13**). Für eine semi-quantitative Analyse wurde der prozentuale Anteil von Pixeln an der Gesamtfläche eines Kerngebietes ermittelt, welcher eine Koexpression der beiden Fluoreszenzsignale aufwies und als Ko-lokationsanteil (KoLokAn) bezeichnet.

4.1 Induzierbare Strategie zur Kartierung des Zellschicksals der *Cxcr4*-Linie markiert auch Vorläuferzellen in der Ventrikularzone

Interessanterweise zeigen sich in der Analyse zu den Zeitpunkt E18.5 oder P0 für alle Induktionszeitpunkte TM E11.5, E12.5, E13.5, E14.5, E15.5 und E17.5 Zellen der *Cxcr4*-Linie (tdT positiv) in der Ventrikularzone. In der Ventrikularzone befinden sich, wie Vorstudien zeigen, Vorläufer der Zellen des ventralen Mittelhirns, welche im Verlauf der Embryonalentwicklung proliferieren. Die Beobachtung widersprach unserer initialen Annahme, dass die Expression des CXCR4 Proteins erst in neu geborenen mDAN hochreguliert wird (Blaess et al. 2011) und deutete darauf hin, dass zumindest das *Cxcr4* Transkript in den Mittelhirnvorläuferzellen zu den untersuchten Induktionszeitpunkten breit exprimiert wird. Wir sichteten daher erneut publizierte Expressionsdaten für das CXCR4 Protein und *Cxcr4* mRNA, wobei sich tatsächlich zeigte, dass das *Cxcr4*-Transkript in ventralen Vorläuferzellen von E10.5 bis mindestens E13.5 zwar schwach, aber relativ breit exprimiert ist (Yang et al. 2013) (Vgl. **Abb. 19**), während das Protein in Vorläuferzellen nicht detektierbar ist. In neu geborenen mDAN bleibt das Protein noch eine Weile länger als das *Cxcr4*-Transkript nachweisbar (Bodea et al. 2014; Petese et al. 2022) (Vgl. **Abb. 19**, Abschnitt 3.1.1). Somit interpretieren wir, dass wir in unserem Versuchsaufbau sowohl Zellen in der Ventrikularzone, als auch Zellen in der Intermediärzone kurz vor der Hochregulation von TH und während der Hochregulation von TH markieren (Vgl. **Abb.19**).

Passend zur Expression von *Cxcr4* in Vorläuferzellen in der gesamten Ventrikularzone des Mittelhirns, konnten wir neben der ausgedehnten Markierung durch tdT in der Ventrikularzone zeigen, dass Abkömmlinge der *Cxcr4*-Linie außerhalb der Ventrikularzone nicht auf TH-positive Zellen, d.h. mDAN beschränkt sind, sondern, zu allen Induktionszeitpunkten TH-positive, wie auch TH-negative Zellen hervorbrachten (**Abb. 21 bis 23**, nicht gezeigtes Material). Zu allen untersuchten Induktionszeitpunkten brachten die *Cxcr4*-expri-

mierenden Zellen außerdem Zellen mit der Morphologie radialer Glia hervor, d.h. länglichen schweifartigen Zellfortsätzen, v.a. in der Mittellinie (**Abb. 18**), die sehr wahrscheinlich von Vorläuferzellen in der Ventrikularzone ausgehen. In einer Analyse zu einem adulten Zeitpunkt (Postnataler Tag 30) bei Induktion zum Zeitpunkt TM E12.5 durch Petese et al. zeigte eine Färbung gegen Glutaminsynthetase, einem Marker für Astrozyten, zudem dass die *Cxcr4*-Linie auch Astrozyten ausbildet (Petese et al. 2022).

Zusammenfassend zeigte sich, dass schon in Vorläuferzellen von mDAN (sowie anderen Vorläuferzellen des Mittelhirns) eine Expression des *Cxcr4*-Transkriptes stattfindet. Neben mDAN hat die *Cxcr4*-Linie im Mittelhirn somit eine Vielzahl anderer Nachkommen. Aus der daraus resultierenden großen Anzahl markierter Zellen ergibt sich für die Zukunft die Möglichkeit weitere von der *Cxcr4*-Linie abstammende Zelltypen im Mittelhirn neben den mDAN zu charakterisieren.

Im Gegensatz zur Geburtsdatierung werden bei unserer Strategie zur Kartierung des Zellschicksals nicht Kohorten mit einem bestimmten Geburtsdatum gekennzeichnet, sondern alle Nachkommen der *Cxcr4*-exprimierenden Vorläufer (proliferierend und differenziert), die während des Zeitfensters der Cre-Aktivität markiert wurden. Das Vorhandensein von *Cxcr4* sowohl in proliferierenden Vorläufern als auch die vorübergehende Expression von *Cxcr4* in frisch differenzierten mDA Vorläufern ermöglichte uns zu untersuchen, ob sich über die embryonale Entwicklung hinweg die Kompetenz der markierten Vorläufer ändert (**Abb. 19 B,C**).

4.2 Kartierung des Zellschicksals der *Cxcr4*-Linie deutet auf eine zunehmenden Kompetenzrestriktion der DA Vorläuferzellen im Verlauf der embryonalen Entwicklung hin
Für die gesamte SNpc zeigte sich in der semiquantitativen Auswertung mithilfe des Colocalization Tools ein Trend zur Abnahme der *Cxcr4*-abstammenden Zellen vom Induktionszeitpunkt TM E12.5 hin zu den Zeitpunkten TM E14.5 und TM E15.5, während sich im VTA im Gesamtüberblick kein signifikanter Trend hin zu einer Abnahme oder Zunahme der *Cxcr4*-abstammenden Zellen über die Induktionszeitpunkte hinweg ergab. Zu Beginn der Differenzierung der mDAN werden also mDAN des VTA und der SNpc markiert. Zu späteren Entwicklungszeitpunkten verschiebt sich die Bildung der mDAN hin zu Zellen des

VTA und es werden kaum noch mDAN der SNpc gebildet. Dies spricht für eine zunehmende Kompetenzrestriktion der *Cxcr4*-exprimierenden mDAN Vorläufer im Laufe der Embryonalentwicklung.

Um die Markierung der *Cxcr4*-Linie auf mDAN zu beschränken, führten wir anschließend eine intersektionelle Strategie zur Kartierung des Zellschicksals durch. Hierfür nutzen wir neben der *Cxcr4^{CreER}*-Mauslinie, und der Reportermauslinie *Ai82^{TRE}* die Mauslinie *Pitx3^{tTA}* (Tetracyclin-Transaktivator, der unter der Kontrolle des *Pitx3*-Locus exprimiert wird). Die Expression des Gens *Pitx3* wird als essentiell für mDAN beschrieben und es wird daher angenommen, dass *Pitx3* in allen mDAN exprimiert ist (Bodea et al. 2014; Korotkova et al. 2005). In der *Ai82^{TRE}*-Mauslinie wird ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) nur in Zellen exprimiert, in denen die Cre-vermittelte Rekombination stattgefunden hat und welche tTA exprimieren (Vgl. **Abb. 11 und 34**). Unsere ersten Ergebnisse der Auswertung unterstützen für die Induktionszeitpunkte TM E13.5 und TM E14.5 die bisherige Annahme bzgl. des VTA, dass der Anteil *Cxcr4*-abstammender mDAN im c-Bereich größer ist als in den a- und b-Bereichen. Für die SNpc ergaben sich keine klaren Unterschiede zwischen den Bereichen (**Abb. 35**). Analysiert wurden für die Zeitpunkte TM E13.5 ein Gehirn und für TM E14.5 2 Gehirne (Vgl. Abschnitt 3.3).

Leider zeigte sich im Laufe der Experimente ein ungleiches Verteilungsmuster der Expression des Fluoreszenzproteins durch die *Pitx3^{tTA}*-Linie innerhalb der mDAN, das unabhängig von der mittels der *Cxcr4*-Linie durchgeführte Kartierung war (Vgl. **Abb. 34**). Somit eignet sich die *Pitx3^{tTA}*-Linie nicht für eine intersektionelle genetische Strategie zur Kartierung des Zellschicksals zur Erforschung der Hypothese einer möglichen zunehmenden Kompetenzrestriktion in der Entstehung der Diversität der mDAN während der Embryonalperiode, weshalb wir diesen Ansatz vorzeitig abbrechen.

Petese et al. führten diese Untersuchungen mit einem sehr ähnlichen Ansatz (d.h. einer intersektionellen genetischen Strategie zur Kartierung des Zellschicksals) aber einer anderen tTA-Linie fort: Sie nutzten die *Dat^{tTA}*-Mauslinie (Tetracyclin-Transaktivator, der Tetracyclin-Transaktivator, der unter der Kontrolle des *Slc6a3* (*Dat*)-Locus exprimiert wird), eine Mauslinie, die bereits in mehreren Publikationen genutzt wurde (Poulin et al. 2018) und die potentiell alle mDAN markiert, in Verbindung mit der *Cxcr4^{CreER}*-Mauslinie (Werner et al. 2020) und der *Ai82^{TRE}*-Reporterlinie (Madisen et al. 2015), um spezifisch

mDAN der *Cxcr4^{CreER}*-Linie zu markieren. Da die Expression von *Dat* (Dopamintransporter) auf mDAN beschränkt ist, sollte die tTA Expression mDAN-spezifisch sein. Es wurde herausgearbeitet, dass die *Cxcr4* abstammenden Zellen zum Zeitpunkt TM E12.5 im Vergleich zu TM E11.5 in der lateralen SNpc bereits leicht reduziert sind und in der medialen SNpc ab dem Induktionszeitpunkt TM E12.5 abnehmen. Ab dem Induktionszeitpunkt TM E14.5 ist in der SNpc der Anteil *Cxcr4*-abstammender mDAN deutlich reduziert (Petese et al. 2022).

Für das VTA wurde festgestellt, dass zwischen TM E11.5 und TM E12.5 eine Zunahme der *Cxcr4*-abstammenden Zellen des ventralen mittleren bis dorsalen VTA erfolgt, die Menge der *Cxcr4*-abstammenden Zellen des VTA zwischen den Induktionszeitpunkten TM E12.5 und E13.5 insgesamt abnimmt und nur im ventralen VTA gleichbleibt und zum Zeitpunkt TM E14.5 im Vergleich in allen Kerngebieten abnimmt (Petese et al. 2022).

Zusammenfassend zeigt sich also in unseren und den Ergebnissen von Petese et al. im Verlauf der embryonalen Entwicklung der mDAN eine zunehmende Restriktion des Entwicklungsschicksals der *Cxcr4*-exprimierenden Vorläuferzellen auf mDAN im VTA und dort auf die ventro-medialen Bereiche.

Ergänzend zur Untersuchung des VTA und der SNpc untersuchten wir auch die kleineren mDAN Kerngebiete RRF und CLN. Wir zeigten mithilfe des Post-Hoc Tests für linearen Trend einen signifikanten Trend zur Abnahme des KoLokAn im kaudal gelegenen RRF ($p= 0.0275$) von TM E12.5 bis TM E15.5, nicht jedoch im CLN. Dies wurde mithilfe der intersektionellen genetischen Strategie zur Kartierung des Zellschicksals unter Verwendung der *Dat^{tTA}*-Mauslinie durch Petese et al. bislang nicht untersucht und sollte in zukünftigen Experimenten erfolgen.

4.3 Einordnung in bisherige Studienergebnisse

Erste Untersuchungen bezüglich des Zeitpunkts der Entstehung der mDAN nutzten den Einbau von [3H]Thymidin oder BrdU in die DNA der mDA Vorläufer als Marker, sowie Antikörperfärbung gegen TH. [3H]Thymidin oder BrdU wird ins Gewebe injiziert und in Zellen, die sich kurz nach der Injektion in der Zellteilung befinden in die DNA eingebaut und markiert so Zellen, die sich anschließend differenzieren, dauerhaft. Zu einem späteren

Zeitpunkt kann das Schicksal der markierten Zellen analysiert werden (Vgl. Abschnitt 1.4.) (Llorens-Martín und Trejo 2011). Bayer et al. stellten mithilfe der Injektion von [3H]Thymidin fest, dass der Höhepunkt der Entstehung der mDAN der SNpc und des dorsolateralen VTA etwa zum Zeitpunkt E11.5 vor dem des ventromedialen VTA bei E12.5 liegt. Außerdem zeigte sich, dass rostrale mDAN generell früher geboren wurden als kaudale (Bayer et al. 1995). In einer weiteren Studie wurde BrdU embryonal injiziert. In der Studie ergibt sich eine Abnahme der markierten Zellen zwischen den Injektionszeitpunkten E10.5 und E12.5 und ebenfalls eine latero-mediale Verschiebung der markierten mDAN in diesem Zeitraum. Zum Zeitpunkt E10.5 werden sowohl Zellen der SNpc und Zellen des VTA zu gleichen Anteilen markiert. Zellen, welche zum Zeitpunkt E11.5 markiert werden, beinhalten verhältnismäßig mehr Zellen des VTA als der SNpc. Für mDAN, welche zum Zeitpunkt E12.5 geboren werden, wird die lateromediale Verschiebung noch deutlicher und die wenigen Zellen, die in der SNpc markiert sind befinden sich in medialen Anteilen der SNpc (Bodea und Blaess 2015) (Vgl. Abschnitt 1.4).

Obwohl in den beiden zitierten Studien leicht unterschiedliche Höhepunkte der Generierung neuer mDAN der einzelnen Kerngebiete genannt werden, bleibt doch die Verschiebung von rostro-lateral nach medio-kaudal im zeitlichen Verlauf der Embryonalentwicklung ein wiederholtes Ergebnis, welches wir ebenfalls reproduzierten. Eine mögliche Erklärung für die verschiedenen Zeiträume, welche für den Höhepunkt der Generierung neuer Zellen angegeben wird, ist die Nutzung verschiedener Markierungs-Techniken (Bodea und Blaess 2015). In unserer Studie werden sowohl proliferierende, als auch sich differenzierende Zellen markiert, was erklärt, weshalb der von uns berechnete Höhepunkt der markierten Zellen etwas später als bei den beiden bereits publizierten Studien liegt, nämlich für die SNpc etwa beim Induktionszeitpunkt TM E11.5 (wobei wir TM E10.5 aufgrund der hohen Anzahl markierter Zellen nicht untersuchten und somit TM E11.5 der erste untersuchte Zeitpunkt ist) und im VTA etwa bei TM E12.5 bis 13.5 ein erstes Abfallen des KoLokAn zu verzeichnen ist (Petese et al. 2022).

Da eine spezifische anatomische Verteilung von mDAN zu verschiedenen Induktionszeitpunkten festgestellt worden war, untersuchten Petese et al. 2022 mithilfe der intersektionellen Strategie zur Kartierung des Zellschicksals die axonalen Projektionen der aus der *Cxcr4*-Linie stammenden mDAN. Das Vorderhirn ist die Zielregion der mDAN Axone (Vgl.

Abschnitt 1.2.1, **Abb.2**). Es wurden Vorderhirnschnitte aus sechs rostro-kaudalen Ebenen des Vorderhirns für TH angefärbt, um den gesamten von mDAN innervierten Bereich zu untersuchen, und für GFP angefärbt, um die Projektionen der kartierten mDAN sichtbar zu machen. Die Analyse konzentrierte sich auf das Striatum. Andere axonale Ziele der mDAN wie der Präfrontale Kortex (PFC), die laterale Area septalis und die Amygdala (Vgl. **Abb.2**) wurden nicht untersucht. Die Projektionen von GFP-exprimierenden mDAN zum Induktionszeitpunkt TM E11.5 erschienen im dorsomedialen Striatum (DMS) und im dorsolateralen Striatum (DLS), sowie im kaudalen Anteil des Striatums (kSt) dicht gepackt. Die GFP-positive Innervation der Schalenregion des Nucleus accumbens (NAc) und des Tuberculum olfactorium (TO) erschien spärlicher als im dorsalen Striatum und fehlte im NAc-Kern teilweise vollständig. Mit TM E12.5 waren die GFP-positiven Projektionen im kSt weniger dicht und im lateralsten Teil des DLS fast nicht vorhanden. Da DLS und kSt die beiden Hauptprojektionsziele der mDAN des lateralen Bereichs der SNpc sind, steht dies im Einklang mit dem sehr geringen Beitrag der *Cxcr4*-Linie zur lateralen SNpc zum Induktionszeitpunkt TM E12.5. Die GFP-positive Innervation des DMS, einem Ziel von mDAN der medialen SNpc, sowie des NAc und TO zeigte ein ähnliches Muster der Verteilung der GFP-positiven Zellen mit TM E11.5 und TM E12.5 (Petese et al. 2022). Beier et al. beschrieben 2015 dass es innerhalb des VTA zwei Subgruppen der mDAN gibt, welche sich bezüglich ihrer Eingangssignale und ihrer axonalen Projektionen grob in einen lateralen Anteil und einen medialen Anteil gliedern lassen (Beier et al. 2015). Bezüglich der SNpc kamen Lerner et al. 2015 zu dem Schluss, dass der mediale Bereich der SNpc Axone zum DLS, während der laterale Bereich der SNpc v.a. Axone zum DMS, sendet (Lerner et al. 2015). Die unterschiedlichen Merkmale der medialen und lateralen Anteile von SNpc und VTA, sowie ihre verschiedenen Projektionsziele sind somit gut vereinbar mit den durch uns und Petese et al. gefundenen unterschiedlichen anatomischen Lokalisationen und Projektionszielen der *Cxcr4*-Linie für die untersuchten Induktionszeitpunkte (Petese et al. 2022).

In der Analyse durch Petese et al. zum Induktionszeitpunkt TM E13.5 war die GFP-positiv Innervation der DLS noch stärker eingeschränkt als bei TM E12.5. Interessant ist, dass das DMS rostral immer noch stark GFP-positiv war, während die Innervation im intermediären Bereich und kaudal deutlich reduziert war und die Innervation des kSt sehr

spärlich. Die Dichte der GFP-exprimierenden Projektionen zum NAc und TO war vergleichbar mit TM E12.5 und E11.5. Somit spielt sich die zunehmend eingeschränkte Kompetenz der *Cxcr4*-exprimierenden mDA-Vorläufer auch im immer stärker eingeschränkten Innervationsmuster der neuronalen mDAN Zielstrukturen im Striatum wider.

In Bezug auf das VTA gibt es auch anatomische, molekulare, elektrophysiologische und funktionellen Hinweise, dass sich das ventrale und dorsale VTA (auch als medial und lateral bezeichnet) unterscheiden (Lammel et al., 2008; Poulin et al., 2018; de Jong et al., 2019). Diesen Studien zufolge sendet das ventrale (oder mediale) VTA Axone in die ventralen und medialen Schalen des NAc. Die zunehmend eingeschränkte Kompetenz der *Cxcr4*-exprimierenden mDA-Vorläufer spiegelt sich also auch in dem immer eingeschränkteren Innervationsmuster der neuronalen mDAN Ziele im Striatum wider.

Dies stimmt mit den Daten von Petese et al. überein, die zeigen, dass die ventrale VTA-Population, die v.a. zum Induktionszeitpunkt TM E13.5 markiert wurde, dichte Projektionen in der NAc-Hülle, aber nicht im NAc-Kern zeigt. Ob diese Population zu anderen zuvor beschriebenen Zielen der ventralen VTA-mDAN wie dem PFC und der basolateralen Amygdala projiziert, sollte in zukünftigen Studien untersucht werden.

4.4 Methodische Limitationen dieser Studie

4.4.1 Anzahl untersuchter Embryonen/Tiere pro Induktionszeitpunkt

Ursprünglich war für diese Studie geplant, nach einer ersten Analyse der Zellkartierung mit der Cre-Reporter Linie die Kartierung der *Cxcr4*-abstammenden Zellen mittels der induzierbaren intersektionellen genetischen Strategie zur Kartierung des Zellschicksals weiterzuführen, um mDAN der *Cxcr4*-Linie spezifisch zu markieren. Daher arbeiteten wir u.a. aus Tierschutz-rechtlichen Gründen mit maximal kleinen Versuchszahlen (zwischen 3 und 6 Mäuse pro Induktionszeitpunkt für die genetische Strategie zur Kartierung des Zellschicksals). Unser experimenteller Ansatz bedingt eine relativ hohe Variabilität der Ergebnisse (s. folgende Abschnitte). Relativ kleine Tierzahlen führen deshalb dazu, dass die Chance, einen echten Effekt zu entdecken und die Wahrscheinlichkeit, dass ein statistisch signifikantes Ergebnis einen echten Effekt widerspiegelt, verringert wird. Das wiederum hat eine geringe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zur Folge (Button et al. 2013). Unsere

Studie war also vorwiegend mit einem qualitativen und nicht einem quantitativen Anspruch konzipiert.

4.4.2 Induzierbare genetische Methode zur Kartierung des Zellschicksals

Mauslinien, in denen eine induzierbare Cre-Rekombinase unter bestimmten Promotoren exprimiert ist, sind ein wertvolles Werkzeug, da sie uns die Kartierung von Nachkommen einer bestimmten Subgruppe von Zellen zu bestimmten Zeiträumen ermöglichen. Dies erfordert die Verwendung von TM zur Aktivierung der Cre-Rekombinase. Zur Interpretation der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass nach Gabe von TM, die Zellen nach etwa 6 h über einen Zeitraum von ca. 24 bis 48 h markiert werden (Vgl. **Abb.16**). Es wurde berichtet, dass die Serumlebensdauer von TM etwa 24 Stunden beträgt (Danielian et al. 1998), höhere Dosen können jedoch auch länger im mütterlichen Serum überdauern (Robinson et al. 1991). Dementsprechend sind etwa die Ergebnisse einer TM Gabe zum Zeitpunkt TM E12.5 für den Zeitraum E12.5 bis etwa E14.5 zu werten, jedoch mit einem Maximum zum Zeitpunkt E12.5 bis E13.5. Die variable Halbwertszeit von TM hat demnach potenziell eine Variabilität der Ergebnisse zur Folge.

Weiterhin wurde die Rekombination als abhängig von der Tamoxifenkonzentration beschrieben. Da TM mit steigender Dosierung ein erhöhtes Abortrisiko bewirkt, sollte die notwendige, aber keine zu hohe und damit Abort-fördernde Dosierung gewählt werden, sodass also die tatsächlich am Zielorgan Gehirn ankommende Dosis eine Relevanz für die Anzahl der Rekombinationen hat. Mehrere Mechanismen können eine Schwankung der Tamoxifenkonzentration am Zielorgan Gehirn zur Folge haben. Bei der Gabe von Tamoxifen über eine Schlundsonde bei sich bewegendem Tier, muss von einer diskreten Ungenauigkeit der Tamoxifendosierung ausgegangen werden, da Tamoxifen fälschlicherweise im Mundraum verbleiben kann, wenn das Versuchstier einen Teil nicht regelrecht schluckt. Ebenso kann sich die gastrointestinale Resorption zwischen den Versuchstieren unterscheiden.

Um das Abortrisiko zu senken, gaben wir den Versuchstieren weiterhin eine Mischung aus Tamoxifen und Progesteron, was jedoch aufgrund des stets gleich durchgeführten Experiments keinen Einfluss auf die Ergebnisse haben sollte. Arbogast et al. untersuchten 2001 die Wirkung von Progesteron auf die TM-Aktivität in tuberoinfundibulären DA Zellen der Ratte. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Suppression von TM (Arbogast

2001). Daraus lässt sich eine mögliche Änderung der wirksamen Tamoxifenkonzentration durch den Progesteronspiegel ableiten. Die körpereigenen hormonellen Schwankungen des Progesteronspiegels der Versuchstiere könnten Schwankungen der wirksamen TM-Menge zur Folge haben, was bisher nicht erforscht ist.

Durch die induzierbare genetische Methode zur Kartierung des Zellschicksals kommt es potenziell zu einer Mosaik-Rekombination. Das heißt, möglicherweise wird nur ein Teil der *Cxcr4*-exprimierenden Zellen markiert. Unsere Daten zeigten eine massive tdT-Expression im gesamten Mittelhirn, die es schwierig machte, einzelne Zellen zu identifizieren. Wir können also davon ausgehen, dass der größte Teil der Zellen, die von *Cxcr4*-exprimierenden Zellen abstammen tatsächlich markiert ist. Trotzdem muss für die Interpretation der Ergebnisse geprüft werden, ob die Rekombination der räumlichen Verteilung der Gen-Expression entspricht. Dadurch lässt sich feststellen, ob die durch die induzierbare genetische Strategie zur Kartierung des Zellschicksals entstandene Markierung über alle untersuchten Bereiche im Verhältnis zur realen Expression von *Cxcr4* zum gewählten Zeitpunkt steht. Durch Petese et al. wurde ein Induktionszeitpunkt zu TM E12.5 und ein Analysezeitpunkt etwa 48 h nach Induktion zu E14.5 gewählt und mit Bildmaterial bzgl. der *Cxcr4*-mRNA- und der CXCR4-Protein-Expression von (Bodea et al. 2014; Yang et al. 2013) verglichen, was eine Annäherung zulässt, ob die durch das Fluoreszenzprotein markierten Zellen mit den *Cxcr4*-exprimierenden Zellen übereinstimmen (Vgl. **Abb. 19**). In diesem experimentellen Ansatz zeigte die Immunfärbung für TH und tdT eine umfangreiche tdT Expression in den, aufgrund der *Cxcr4*-mRNA-Expressionsdaten zu erwartenden Bereichen: Vorläuferzellen in der ventrikulären Zone des Mittelhirns und direkt unterhalb der ventralsten Vorläuferzone die der Region entspricht, die TH-negative mDA-Vorläufer in den rostralen und intermediären Ebenen des ventralen Mittelhirns enthält. Darüber hinaus exprimierten TH-positive mDAN tdT, insb. direkt benachbart zur TH-negativen mDA-Vorläufer-Region. Das weist darauf hin, dass die Hochregulierung der TH-Expression in den tdT-positiven Neuronen wahrscheinlich ein relativ neues Ereignis der Neurone war (Petese et al. 2022) und zum Zeitpunkt der Induktion mit Tamoxifen teilweise wahrscheinlich noch nicht stattgefunden hatte. Das Experiment gibt eine Annäherung an das Verhältnis der Markierung durch die Kartierungsmethode und der realen *Cxcr4*-Expression, da wir davon ausgehen, dass die maximale Rekombination bereits nach 24 h

abgelaufen ist. Nach 48 h zeigt sich in den Ergebnissen wie erwartet bereits eine Weiterentwicklung des Gehirns und wir müssen davon ausgehen, dass die Zellen bereits weiter migriert, differenziert und damit Nachkommen miterfasst sind.

Wir schlussfolgerten also, dass die Mosaikrekombination für unsere Fragestellung kein Hindernis darstellt, da wir davon ausgehen, dass die Rekombination in der *Cxcr4^{CreER}* Linie, im größten Teil der *Cxcr4*-exprimierenden Zellen stattfindet. Außerdem stimmt die Verteilung der durch das Fluoreszenzprotein markierten Zellen mit den *Cxcr4*-exprimierenden Zellen übereinstimmt.

Für zukünftige Studien mit dem Anspruch eines Wissensgewinns bezüglich funktioneller Eigenschaften des Proteins CXCR4 sollte beachtet werden, dass durch die Methode Zellen markiert werden, welche das *Cxcr4*-Transkript exprimieren und somit keine Aussage über die Translation des Proteins und weiterer Prozessierung möglich ist. Diese Limitation sollte zukünftig vor allem beachtet werden, da gezeigt wurde, dass phosphoryliertes CXCR4 die aktive Form des Proteins darstellt und somit durch unsere Methode auf mRNA Level keine Aussage bezüglich einer funktionellen Bedeutung von CXCR4 stattfindet. Für unsere Fragestellung, welche eine mögliche Kompetenzrestriktion der Vorläufer und mDAN im Laufe der Embryonalentwicklung adressiert, spielt diese funktionelle Ebene keine Rolle, da wir die Transkription von *Cxcr4* als Werkzeug zur Markierung von Zellen zu bestimmten embryonalen Zeitpunkten nutzten.

4.4.3 Bildbearbeitung- und Auswertung

Um den KoLokAn in den Kerngebieten getrennt zu untersuchen, wurden die Kerngebiete freihand anhand von Vergleichsdarstellungen im Allen Brain Atlas (Allen Institute 2020) eingezeichnet. Da die SNpc und das VTA eine kontinuierliche Struktur darstellen, ist es schwierig klare Grenzen zwischen den beiden Zellhaufen auszumachen (Björklund und Dunnet, 2007). Dies könnte Messungenauigkeiten in der vorliegenden Studie bedingt haben. Um dies möglichst zu minimieren, wurden die Zellclustergrenzen stets von 2 Personen bestimmt.

Eine weitere mögliche Fehlerquelle stellt die, im Rahmen eines festgelegten Schemas, individualisierte Bildbearbeitung dar, um eine optimale Darstellung der Zellen auf unseren

histologischen Schnitten zu erreichen. Die Herstellung der Kryoschnitte bedingt Variationen in der Intensität der Antikörperfärbung. Die Trockenzeit der Schnitte verändert sich zwischen dem ersten und zehnten Schnitt pro Objektträger, es kommt zu Schwankungen der Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit. In der Aufnahme der histologischen Fotografien kommt es etwa durch die im Laufe der Zeit abnehmende Leistung der UV-Lampe durch die Nutzung zu einer unvermeidbaren Veränderung des Versuchsaufbaus. Dadurch entsteht die Notwendigkeit, Bildwerte wie Helligkeit und Kontrast individuell für jedes Bild neu anzupassen. Schwankungen waren wir bestrebt durch eine stets gleiche Formel zur Berechnung des Thresholds auszugleichen.

Bezüglich des Algorithmus des „Colocalization Tool“ und insbesondere Thresholding muss beachtet werden, dass dieser unter optimalen Bedingungen die besten Ergebnisse bringt. Als suboptimale Bedingungen werde unter anderem Hintergrundrauschen, Sättigung von Bildern und Variationen in den Histogrammen der Bilder genannt.

Weiterhin beruhte die semiquantitative Auswertung der histologischen Bilder nicht auf der Auszählung von Zellen, da hierfür die Zellen in der Antikörperfärbung gegen tdT nicht klar genug abgrenzbar waren. Die Zellkörper klar abgrenzbar zu markieren, gelang leider trotz vieler Versuche mit verschiedensten Antikörperkonstellationen (Vgl. Abschnitt 2.6.1) nicht. Unsere Methode Pixel zu quantifizieren, welche Signal für tdT und TH aufwiesen, beinhaltet den Fehler, dass hierbei zufällig im Schnitt übereinander liegende Pixel in die Berechnung einfließen und nicht nur doppeltes Signal kolokalisierter neuronaler Zellkörper.

4.5 Ausblick

Neuere Einteilungsmodelle der mDAN werden proklamiert, in denen das Expressionsprofil der mDAN im Vordergrund steht und das klassische anatomisch geprägte Einteilungsmodell verlassen wird (Poulin et al. 2020). Eine Analyse, der mithilfe der genetischen Strategie zur Kartierung des Zellschicksals ermittelten verschiedenen *Cxcr4*-abstammenden Zellpopulationen in Bezug auf ihr Expressionsprofil in adulten Mäusen mittels Einzelzellgenomik wäre interessant, um Übereinstimmungen des Induktionszeitpunktes und Expressionsprofil-Muster von mDAN zu beleuchten, wodurch sich ggf. weitere Rückschlüsse auf die Funktionen der Populationen der *Cxcr4*-abstammenden mDAN ziehen lassen.

Da unser Markierungsansatz das Schicksal der mDA-Vorläufer nicht anhand von einzelnen Zellen verfolgt, können unsere Ergebnisse keinen Aufschluss darüber geben, ob aus einer Vorläuferzelle nacheinander verschiedene Typen von mDAN hervorgehen (z. B. laterale SNpc bei TM E11.5, dorsales VTA und mediale SNpc bei TM E12.5, ventrale VTA bei TM E13.5), ob verschiedene Vorläuferzellen aus verschiedenen Arten von Vorläuferzellen in unterschiedlichen Zeitfenstern entstehen, oder ob die beiden Mechanismen kombiniert werden. Eine klonale Markierungsmethode [z. B. die Mosaikanalyse mit einem doppelten Zellmarker, engl. „Mosaic analysis with double markers“ (MADM)] (Contreras et al. 2021)) wäre notwendig, um dies weiter zu untersuchen.

Würden die beiden genannten Modelle kombiniert stattfinden, so würde dies die unterschiedliche Kompetenz von Vorläuferzellen in der medialen und lateralen mDA-Vorläuferdomäne mit Veränderungen der Kompetenz der Vorläufer im Laufe der Embryonalentwicklung erklären (Blaess et al. 2011; Brown et al. 2011; Ono et al. 2007; Panman et al. 2014; Pereira Luppi et al. 2021; Petese et al. 2022).

Die Anwendung der (intersektionellen) genetischen Strategie zur Kartierung des Zellschicksals (Vgl. Abschnitt 1.4.1) hat unser Verständnis für die Entstehung der Diversität der mDAN (Vgl. Abschnitt 1.2) ohne Zweifel vorangebracht. In Zukunft wird die Kombination von Entwicklungs- und Funktionsforschungsansätzen, welche etwa mit Methoden der Einzelzellgenomik oder optogenetischen Ansätzen in den letzten Jahren an Relevanz gewonnen, wesentlich zu einem besseren Verständnis darüber beitragen, was mDAN Untergruppen ausmacht und wie diese entstehen (Kamath et al. 2022; Solanelles-Farré und Telley 2021). Poulin et al. beschrieben in einem systematischen Review sieben verschiedene Subtypen der mDAN aufgrund von Einzelzellgenomik-Studien (Poulin et al. 2020). Eine intersektionelle genetische Strategie zur Kartierung des Zellschicksals in Kombination mit optogenetischen Verfahren, könnte genutzt werden, um möglicherweise gemeinsame funktionelle Eigenschaften von Subgruppen von mDAN zu ergründen. Möglicherweise lässt die Expression dieser definierenden Gene zu bestimmten embryonalen Zeitpunkten ebenfalls Rückschlüsse auf deren Entwicklung zu (Poulin et al. 2020). In der Zukunft sollte die Frage adressiert werden, ob mDAN, die zu verschiedenen Zeitpunkten

entstehen, nicht nur in ihrer anatomischen Lokalisation und ihrem axonalen Konnetom variieren, sondern auch bzgl. ihrer Funktion.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit sowie in der Arbeitsgruppe die Frage, welche nicht-DA Zellen aus der *Cxcr4*-Linie hervorgehen, noch nicht vollständig untersucht. Diesbezüglich könnten Antikörperfärbungen gegen neuronale Zellmarker für GABAerge, glutamaterge Neurone und Gliazellen, sowie eine Auswertung im Vergleich der verschiedenen Induktionszeitpunkte interessante weitere Erkenntnisse bringen.

4.5.1 Kausalität

Die vorliegende Arbeit fokussiert auf die Beschreibung der Entstehung der Diversität der mDAN während der embryonalen Entwicklung ohne ursächliche Mechanismen, wie etwa in Abschnitt 1.3 beschriebene Signalkaskaden, hierfür zu suchen.

Unabhängig davon, welches Modell die mDA-Vorläuferzellkompetenz widerspiegelt, wird es in Zukunft von Interesse sein, ob die Veränderungen der mDA-Vorläuferzell-Kompetenz zellintern bestimmt werden (z. B. ob sich die Expression von Transkriptionsfaktoren im Laufe der Zeit verändert) oder extrinsisch (d. h., ob die Vorläuferzellen im Laufe der Zeit unterschiedlichen Umweltsignalen ausgesetzt sind, die ihre Kompetenz beeinflussen) und welche molekularen Mechanismen dabei eine Rolle spielen (Petese et al. 2022).

Inwiefern hier ein kausaler Zusammenhang mit der Funktion dieser Moleküle besteht, ist noch zu großen Teilen ungeklärt (Bodea und Blaess 2015) (Vgl. Abschnitt 4.4.2). Für CXCR4 ist bekannt, dass es bei der radialen Migration, d. h. der Zellmigration der mDAN von der ventrikulären Zone zur Mantelzone, eine Rolle spielt (Bodea et al. 2014). Weiterhin ist bekannt, dass ein Großteil der Zellen, die in die SNpc einwandern in einem ersten Schritt radial migrieren, wobei eine Herunterregulation von CXCR4 bei Annäherung an CXCL12 stattfindet, dem Liganden des Rezeptors, welcher von den Meningen exprimiert wird. In einem zweiten Schritt findet die tangentielle, d.h. Migration nach lateral statt (Vgl. Abschnitt 1.3, **Abb. 5**). Inaktivierung der CXCR4-vermittelten Signalübertragung bei Mäusen führt zu subtilen Veränderungen im Migrationsmuster von mDAN. Somit ergibt sich hier ein extrinsischer kausaler Zusammenhang in der Expression von CXCR4 mit der Migrationsroute von mDAN (Bodea et al. 2014; Yang et al. 2013). Ob jedoch die Neurogenese oder die Subtyp-Spezifikation von mDAN in diesen Mausmutanten verändert ist, wurde

nicht untersucht, u.a. weil homozygote mutierte Mäuse noch vor der Geburt sterben. Beispiele für CXCR4-vermittelte Signalübertragung, die die Neurogenese beeinflusst, stammen aus dem postnatalen Gyrus dentatus, wo CXCL12 von Körnerzellen exprimiert wird, um die korrekte Positionierung und die Reifung neugeborener Körnerzellen zu medieren (Petese et al. 2022).

Über die Rolle von Transkriptionsfaktoren hinaus wird es von großem Interesse sein, die Rolle epigenetischer Mechanismen bei der Entstehung der mDAN Subtypen zu untersuchen (Solanelles-Farré und Telley 2021).

4.5.2 Translation der Erkenntnisse auf humane Zellentwicklung und Therapiestrategien
Es wäre wünschenswert, die in der Grundlagenforschung aus Tiermodellen gewonnenen Erkenntnisse anzuwenden, um humane DA Zellentwicklung besser zu verstehen (Bissonette und Roesch 2016) und neue Therapiestrategien für Erkrankungen, wie M. Parkinson zu generieren. In verschiedenen Modellorganismen und Bereichen des ZNS durchgeführte Studien deuten daraufhin, dass neuronale Zellvielfalt u.a. auf einem genetischen Bauplan basiert. Dieser spezifiziert die regelrechte Entwicklung neuronaler Vorläuferzellen. Durch erfahrungsabhängige Mechanismen wird die weitere Plastizität des ZNS gewährleistet. Der Einfluss der genetischen und erfahrungsabhängigen Prozesse auf die Entwicklung der Neurone scheint zwischen verschiedenen Regionen des ZNS zu variieren (Blaess und Ang 2015; Wakhloo et al. 2022). Somit wird eine große Herausforderung der nächsten Jahre sein, zu erforschen, welchen Einfluss die präpartale Entwicklung der mDAN auf die spätere Entwicklung und eine akzelerierte Neurodegeneration haben (**Abb. 36**) (Prakash 2022).

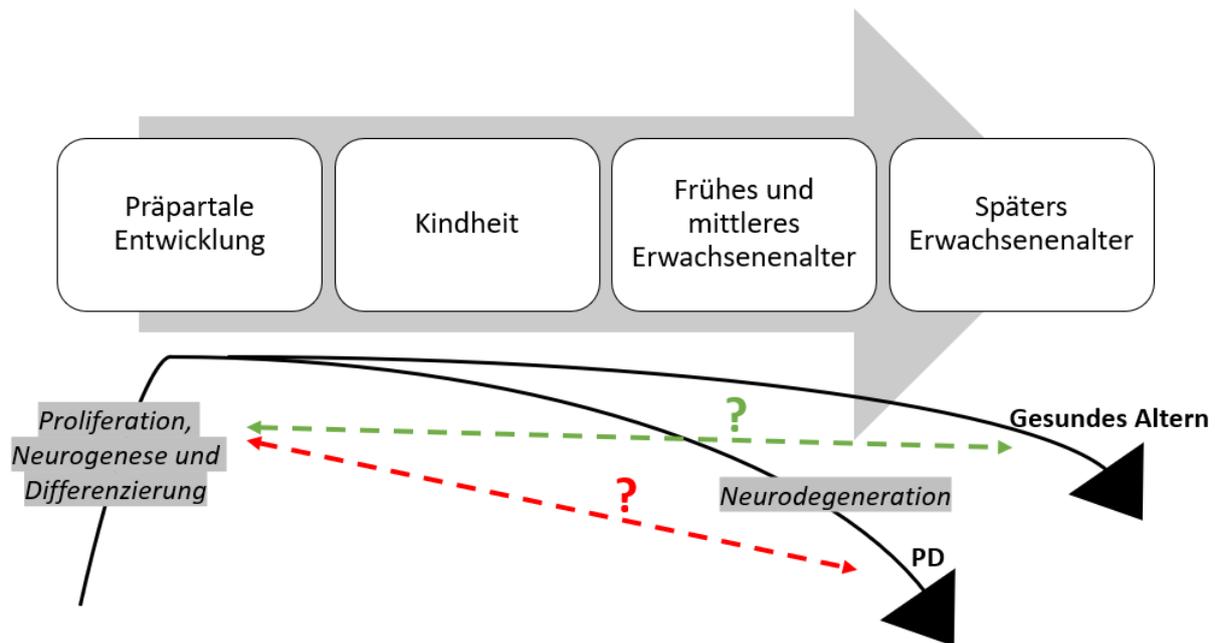


Abb. 36: Entwicklung der mDAN über die gesamte Lebenszeit. Die Grafik verdeutlicht den frühen Untergang von mDAN beim M. Parkinson und weist auf mögliche Zusammenhänge in der pränatalen Entwicklung hin. Angelehnt an (Kilzheimer et al. 2019)

Während der begrenzte Beitrag der sich spät bildenden mDAN zur medialen SNpc gut vereinbar mit dem bisherigen Wissen über das axonale Konnektom der mDAN ist, korreliert er nicht mit der Lokalisierung vulnerabler mDAN bei neurodegenerativen Erkrankungen wie dem M. Parkinson oder Schädigung durch Umweltgifte. Die ventrale Schicht der SNpc ist anfälliger für Neurodegeneration als die dorsale Schicht, welche sich diesbezüglich resilienter zeigt (Kordower et al. 2013; Petese et al. 2022). Eine aktuelle Studie hat gezeigt, dass die mDAN der ventralen Schicht, die im adulten Gehirn den Transkriptionsfaktor SOX6 exprimieren, aus einer SOX6-exprimierenden medialen mDA-Vorläuferdomäne abstammen (Luppi et al., 2021). Diese Daten könnten darauf hinweisen, dass die räumliche Lage und das molekulare Profil eines Vorläufers die Position der mDAN in der ventralen oder dorsalen SNpc (und möglicherweise auch ihre Anfälligkeit) bestimmt, während der Zeitpunkt der Neurogenese ihre Position in der medialen oder lateralen SNpc (und ihre axonalen Verbindungen mit dem DMS gegenüber dem DLS) bestimmt (Petese et al. 2022).

5. Zusammenfassung

Dopaminerge Neurone des Mittelhirns (mDAN) sind eine heterogene Gruppe, in der sich die Neurone durch verschiedene Merkmale, wie etwa ihre anatomische Lokalisation, Konnektom, ihre Funktion und ihrer Vulnerabilität in Bezug auf neurodegenerative Erkrankungen unterscheiden. Sie werden aus einer ventralen Vorläuferzone des Mittelhirns über einen Zeitraum von mehreren Tagen [Embryonaltag 10.0 (E10.0) bis E14.5 bei der Maus] gebildet. Innerhalb dieses neurogenen Zeitraums könnte ein sich progressiv veränderndes Schicksalspotenzial der mDA-Vorläufer zur Bildung verschiedener neuronaler Subpopulationen der mDAN beitragen. Um diese Theorie zu prüfen, kombinierten wir eine induzierbare genetische Strategie zur Kartierung des Zellschicksals und intersektionelle Markierungsansätze im Mausmodell, um die Abstammung von Zellen zu verfolgen, die die das Chemokinrezeptor C-X-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor 4 (CXCR4)-Transkript exprimieren. Das *Cxcr4*-Transkript wird in mDA-Vorläufern von E10.5 bis E16.5, nicht aber in vollständig differenzierten mDAN exprimiert. Diese Methode ermöglicht zu untersuchen, ob der Zeitpunkt der Markierung mit der späteren Lokalisation der *Cxcr4*-abstammenden Zellen innerhalb verschiedener anatomischer mDAN Gruppen korreliert, wobei davon ausgegangen wird, dass die finale anatomische Lokalisation der mDAN teilweise mit ihrer Funktion und Konnektivität korreliert. Die detaillierte Analyse der markierten Zellen im Mittelhirn wurde um den Geburtszeitpunkt der Mäuse herum vorgenommen.

Cxcr4-exprimierende mDA-Vorläufer, die bei E11.5 markiert werden, entwickeln sich zu einer breiten Palette von mDAN, während die Markierung der *Cxcr4*-Linie zu späteren Zeitpunkten (E12.5-E15.5) zu einem zunehmend eingeschränkten Beitrag zu mDAN führt. Dieser Beitrag verläuft mit fortschreitender Embryonalentwicklung in der SNpc von lateral nach medial und im VTA von dorsal nach ventral. Zusammenfassend unterstützen die Ergebnisse die Theorie einer zunehmenden Kompetenzrestriktion der Vorläuferzellen der mDAN im Verlauf ihrer embryonalen Entwicklung.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Verschiedene Diversitätsmerkmale der mDAN	12
Abbildung 2:	Schematische Darstellung des adulten Gehirns der Maus	16
Abbildung 3:	Überblick über die embryonale Entwicklung der mDAN	19
Abbildung 4:	Gliederung der dorso-ventralen Achse im embryonalen Mittelhirn	22
Abbildung 5:	Schematische Darstellung der Migrationsrouten von mDAN während der Embryonalentwicklung	24
Abbildung 6:	Schema der induzierbaren genetischen Strategie zur Kartierung des Zellschicksals (engl.: Genetic Inducible Fate Mapping) auf genetischer Ebene	32
Abbildung 7:	Induzierbare intersektionelle genetischen Strategie zur Kartierung des Zellschicksals auf genetischer Ebene	33
Abbildung 8:	Schema der induzierbaren genetischen Strategie zur Kartierung des Zellschicksals spezifisch dargestellt für die Markierung von Vorläuferzellen	34
Abbildung 9:	Induzierbare intersektionelle genetischen Strategie zur Kartierung des Zellschicksals spezifisch dargestellt für die Markierung von Vorläuferzellen	35
Abbildung 10:	Mauslinien und Kreuzungen für die induzierbare genetische Strategie zur Kartierung des Zellschicksals und deren Funktionsweise	50
Abbildung 11:	Mauslinien und Kreuzungen für die induzierbare intersektionelle genetische Strategie zur Kartierung des Zellschicksals	52
Abbildung 12:	Beispieldarstellung der Genotypisierung eines Wurfs	57
Abbildung 13:	Schematische Darstellungen der vier Bereiche entlang der rostro-kaudalen Achse der Mittelhirnregion	63
Abbildung 14:	Vergleich der Induktionszeitpunkte pro Kerngebiet für SNpc und VTA am Bsp. der SNpc	65
Abbildung 15:	Vergleich der rostrokaudalen Bereiche	67

Abbildung 16:	Zeitraum der <i>Cxcr4</i> -Expression im Mittelhirn. Beispielhafte Beschreibung des Wirkverhaltens von Tamoxifen (TM) bei Verabreichung zum Zeitpunkt TM E11.5 mit Wirkmaximum nach ca. 6 h (Joyner, Zervas, 2006)	69
Abbildung 17:	Koronarschnitte des ventralen Mittelhirns mit den Induktionszeitpunkten TM 12.5 bis TM15.5 und Detailansichten der Ventrikularzone (VZ)	72
Abbildung 18:	Übersichtsdarstellung des ventralen Mittelhirns mit dem Induktionszeitpunkt TM E14.5 und Detailansichten der Mittellinie	73
Abbildung 19:	Bildung von mDAN und <i>Cxcr4</i> -Linie im ventralen Mittelhirn	74
Abbildung 20:	Übersichten des ventralen Mittelhirns zu verschiedenen Induktionszeitpunkten	76
Abbildung 21:	Detailansicht von VTA und SNpc, <i>Cxcr4</i> -Linie zum Induktionszeitpunkt TM E12.5 markiert	78
Abbildung 22:	Detailansicht von VTA und SNpc, <i>Cxcr4</i> -Linie zum Induktionszeitpunkt TM E13.5 markiert	79
Abbildung 23:	Detailansicht von VTA und SNpc, <i>Cxcr4</i> -Linie zum Induktionszeitpunkt TM E14.5 markiert	80
Abbildung 24:	Koronare Hirnschnitte aus dem ventralen Mittelhirn im a-Bereich, <i>Cxcr4</i> -Linie zum Induktionszeitpunkt TM E12.5 bis E15.5 markiert	83
Abbildung 25:	Koronare Hirnschnitte aus dem ventralen Mittelhirn im b-Bereich, <i>Cxcr4</i> -Linie zum Induktionszeitpunkt TM E12.5 bis E15.5 markiert	84
Abbildung 26:	Koronare Hirnschnitte aus dem ventralen Mittelhirn im c-Bereich, <i>Cxcr4</i> -Linie zum Induktionszeitpunkt TM E12.5-E15.5 markiert	85
Abbildung 27:	Koronare Hirnschnitte aus dem ventralen Mittelhirn im d-Bereich, <i>Cxcr4</i> -Linie zum Induktionszeitpunkt TM E12.5 bis E15.5 markiert	86
Abbildung 28:	Darstellung der Kolokalisierung des roten und grünen Fluoreszenzsignals	89

Abbildung 29: KoLokAn in der SNpc (A) und im VTA (B) über die Induktionszeitpunkte hinweg	90
Abbildung 30: KoLokAn in der SNpc im Vergleich von drei rostro-kaudalen Bereichen (a-c) für die Induktionszeitpunkte TM E 12.5 bis E15.5	92
Abbildung 31: KoLokAn im VTA im Vergleich von drei rostro-kaudalen Bereichen (a-c)	93
Abbildung 32: KoLokAn in SNpc (A,C,E) und VTA (B,D,F) den rostro-kaudalen a-c-Bereichen im Vergleich der Induktionszeitpunkte TM E12.5 bis E15.5	95
Abbildung 33: Relativer Beitrag der <i>Cxcr4</i> -abstammenden Zellen zum CLN (A) und zur RRF (B) im d-Bereich über die Induktionszeitpunkte TM E 12.5 bis E15.5	96
Abbildung 34: Intersektionelle Genetische Strategie zur Kartierung des Zellschicksals mit den Mauslinien <i>PITX3^{tTA/+}</i> , <i>Ai82^{TRE/+}</i> und <i>En1^{Cre/+}</i> . Ausschnitt aus dem ventralen Mittelhirn, Induktionszeitpunkt TM E14.5	99
Abbildung 35: Intersektionelle Genetische Strategie zur Kartierung des Zellschicksals. Ausschnitt aus dem ventralen Mittelhirn, Induktionszeitpunkt TM E14.5	101
Abbildung 36: Entwicklung der mDAN über die gesamte Lebenszeit	118

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Technische Ausstattung	40
Tabelle 2:	Software	41
Tabelle 3:	Verbrauchsmaterialien	42
Tabelle 4:	Weiteres Präparierbesteck	43
Tabelle 5:	Chemikalien und Reagenzien	43
Tabelle 6:	Antikörper	45
Tabelle 7:	Streptavidin-Konjugat	45
Tabelle 8:	Enzyme	46
Tabelle 9:	PCR Primer zur Genotypisierung der Mäuse	46
Tabelle 10:	Puffer und Lösungen	47
Tabelle 11:	Liste der Mauslinien	48
Tabelle 12:	Reaktionsmix	53
Tabelle 13:	PCR-Protokolle	54

8. Literaturverzeichnis

Abercrombie ED, Keefe KA, DiFrischia DS, Zigmond MJ. Differential effect of stress on in vivo dopamine release in striatum, nucleus accumbens, and medial frontal cortex. *J Neurochem* 1989; 52: 1655–1658

Allen Institute, 2020: Allen Reference Atlas – Mouse Brain [brain atlas]. <http://atlas.brain-map.org> (Zugriffsdatum: 21.05.2020)

Andersson E, Tryggvason U, Deng Q, Friling S, Alekseenko Z, Robert B, Perlmann T, Ericson J. Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons. *Cell* 2006; 124: 393–405

Arbogast. Progesterone Induces Dephosphorylation and Inactivation of Tyrosine Hydroxylase in Rat Hypothalamic Dopaminergic Neurons. *Neuroendocrinology* 2002; 75: 273–281

Arenas E, Denham M, Villaescusa JC. How to make a midbrain dopaminergic neuron. *Development* 2015; 142: 1918–1936

Bajetto A, Barbieri F, Dorcaratto A, Barbero S, Daga A, Porcile C, Ravetti JL, Zona G, Spaziante R, Corte G, Schettini G, Florio T. Expression of CXC chemokine receptors 1-5 and their ligands in human glioma tissues: role of CXCR4 and SDF1 in glioma cell proliferation and migration. *Neurochem Int.* 2006; 49: 423–432

Bassareo V, Luca MA de, Di Chiara G. Differential Expression of Motivational Stimulus Properties by Dopamine in Nucleus Accumbens Shell versus Core and Prefrontal Cortex. *J Neurosci.* 2002; 22: 4709–4719

Bayer SA, Wills KV, Triarhou LC, Ghetti B. Time of neuron origin and gradients of neurogenesis in midbrain dopaminergic neurons in the mouse. *Exp Brain Res.* 1995; 105: 191–199

Beier KT, Steinberg EE, DeLoach KE, Xie S, Miyamichi K, Schwarz L, Gao XJ, Kremer EJ, Malenka RC, Luo L. Circuit Architecture of VTA Dopamine Neurons Revealed by Systematic Input-Output Mapping. *Cell* 2015; 162: 622–634

Bentivoglio M, Morelli M. Chapter I The organization and circuits of mesencephalic dopaminergic neurons and the distribution of dopamine receptors in the brain. In: Dunnett SB, ed. Dopamine: S.B. Dunnett ... [et al.]. Volume 21. Handbook of chemical neuroanatomy, 0924-8196. Handbook of chemical neuroanatomy, 0924-8196. v. 21. Amsterdam, London: Elsevier; 2005: 1–107

Bentivoglio M, van der Kooy D, Kuypers HGJM. The organization of the efferent projections of the substantia nigra in the rat. A retrograde fluorescent double labeling study. *Brain Res.* 1979; 174: 1–17

Bissonette GB, Roesch MR. Development and function of the midbrain dopamine system: what we know and what we need to. *Genes Brain Behav.* 2016; 15: 62–73

Björklund A, Dunnett SB. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci.* 2007; 30: 194–202

Blaess S, Ang S-L. Genetic control of midbrain dopaminergic neuron development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2015; 4: 113–134

Blaess S, Bodea GO, Kabanova A, Chanet S, Mugniery E, Derouiche A, Stephen D, Joyner AL. Temporal-spatial changes in Sonic Hedgehog expression and signaling reveal different potentials of ventral mesencephalic progenitors to populate distinct ventral midbrain nuclei. *Neural Dev.* 2011; 6: 29

Bodea GO, Blaess S. Establishing diversity in the dopaminergic system. *FEBS Lett.* 2015; 589: 3773–3785

Bodea GO, Spille J-H, Abe P, Andersson AS, Acker-Palmer A, Stumm R, Kubitscheck U, Blaess S. Reelin and CXCL12 regulate distinct migratory behaviors during the development of the dopaminergic system. *Development* 2014; 141: 661–673

Brockmann K, Lohmann K. Genetische Risikovarianten beim Parkinson-Syndrom und anderen Bewegungsstörungen. *Nervenarzt* 2017; 88: 713–719

- Brown A, Machan JT, Hayes L, Zervas M. Molecular organization and timing of Wnt1 expression define cohorts of midbrain dopamine neuron progenitors in vivo. *J Comp Neurol.* 2011; 519: 2978–3000
- Burke RE, O'Malley K. Axon degeneration in Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2013; 246: 72–83
- Button KS, Ioannidis JPA, Mokrysz C, Nosek BA, Flint J, Robinson ESJ, Munafò MR. Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience. *Nat Rev Neurosci.* 2013; 14: 365–376
- Bye CR, Thompson LH, Parish CL. Birth dating of midbrain dopamine neurons identifies A9 enriched tissue for transplantation into parkinsonian mice. *Exp Neurol.* 2012; 236: 58–68
- Campehansen S von, Bornschein B, Wick R, Bötzel K, Sampaio C, Poewe W, Oertel W, Siebert U, Berger K, Dodel R. Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2005; 15: 473–490
- Carr DB, Sesack SR. Projections from the Rat Prefrontal Cortex to the Ventral Tegmental Area: Target Specificity in the Synaptic Associations with Mesoaccumbens and Mesocortical Neurons. *J. Neurosci.* 2000; 20: 3864–3873
- Chalasani SH, Baribaud F, Coughlan CM, Sunshine MJ, Lee VMY, Doms RW, Littman DR, Raper JA. Chalasani, 2003 // The chemokine stromal cell-derived factor-1 promotes the survival of embryonic retinal ganglion cells. *J. Neurosci.* 2003; 23: 4601–4612
- Cohen JY, Haesler S, Vong L, Lowell BB, Uchida N. Neuron-type-specific signals for reward and punishment in the ventral tegmental area. *Nature* 2012; 482: 85–88
- Contreras X, Amberg N, Davaatseren A, Hansen AH, Sonntag J, Andersen L, Bernthaler T, Streicher C, Heger A, Johnson RL, Schwarz LA, Luo L, Rüllicke T, Hippenmeyer S. A genome-wide library of MADM mice for single-cell genetic mosaic analysis. *Cell Rep.* 2021; 35: 109274

Corrales JD, Blaess S, Mahoney EM, Joyner AL. The level of sonic hedgehog signaling regulates the complexity of cerebellar foliation. *Development* 2006; 133: 1811–1821

Dahlstoem A, Fuxe K. Evidence For The Existence of Monamine-Containing Neurons In The Central Nervous System. I. Demonstration of monamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1964: SUPPL 232:1-55

Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM. The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain* 1999; 122 (Pt 8): 1437–1448

Danielian PS, Muccino D, Rowitch DH, Michael SK, McMahon AP. Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. *Curr Biol.* 1998; 8: 1323–1326

D'Ardenne K, McClure SM, Nystrom LE, Cohen JD. BOLD responses reflecting dopaminergic signals in the human ventral tegmental area. *Science* 2008; 319: 1264–1267

Daubner SC, Le T, Wang S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch Biochem Biophys.* 2011; 508: 1–12

Deng Q, Andersson E, Hedlund E, Alekseenko Z, Coppola E, Panman L, Millonig JH, Brunet J-F, Ericson J, Perlmann T. Specific and integrated roles of Lmx1a, Lmx1b and Phox2a in ventral midbrain development. *Development* 2011; 138: 3399–3408

Desai AR, McConnell SK. Progressive restriction in fate potential by neural progenitors during cerebral cortical development. *Development* 2000; 127: 2863–2872

Deschamps C, Faideau M, Jaber M, Gaillard A, Prestoz L. Expression of ephrinA5 during development and potential involvement in the guidance of the mesostriatal pathway. *Exp Neurol.* 2009; 219: 466–480

Deutsche Gesellschaft für Neurologie e.V., 2016: S3-Leitlinie Parkinsonsyndrom, idiopathisch: Langversion, AWMF-Register-Nummer: 030-010. https://register.awmf.org/assets/guidelines/030-010l_S3_Parkinson_Syndrome_Idiopathisch_2016-06-abgelaufen.pdf (Zugriffsdatum: 13.06.2021)

Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, Marshall FJ, Ravina BM, Schifitto G, Siderowf A, Tanner CM. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* 2007; 68: 384–386

Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996; 272: 872–877

Ferri ALM, Lin W, Mavromatakis YE, Wang JC, Sasaki H, Whitsett JA, Ang S-L. Foxa1 and Foxa2 regulate multiple phases of midbrain dopaminergic neuron development in a dosage-dependent manner. *Development* 2007; 134: 2761–2769

Frantz GD, McConnell SK. Restriction of Late Cerebral Cortical Progenitors to an Upper-Layer Fate. *Neuron* 1996; 17: 55–61

Gascon S, Giraldo Solano A, El Kheir W, Therriault H, Berthelin P, Cattier B, Marcos B, Virgilio N, Paquette B, Faucheux N, Lauzon M-A. Characterization and Mathematical Modeling of Alginate/Chitosan-Based Nanoparticles Releasing the Chemokine CXCL12 to Attract Glioblastoma Cells. *Pharmaceutics* 2020; 12

Gennet N, Gale E, Nan X, Farley E, Takacs K, Oberwallner B, Chambers D, Li M. Doublesex and mab-3-related transcription factor 5 promotes midbrain dopaminergic identity in pluripotent stem cells by enforcing a ventral-medial progenitor fate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108: 9131–9136

Grace AA. Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression. *Nat Rev Neurosci*. 2016; 17: 524–532

GraphPad Software, LLC, 2022: Graph Pad: Overview Test for linear Trend. https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/stat_posttesttrend.htm (Zugriffsdatum: 01.08.2022)

Halliday GM, McRitchie DA, Cartwright H, Pamphlett R, Hely MA, Morris JGL. Midbrain neuropathology in idiopathic Parkinson's disease and diffuse Lewy body disease. *J Clin Neurosci*. 1996; 3: 52–60

Hanaway J, McConnell JA, Netsky MG. Histogenesis of the substantia nigra, ventral tegmental area of Tsai and interpeduncular nucleus: an autoradiographic study of the mesencephalon in the rat. *J Comp Neurol.* 1971; 142: 59–73

Hidalgo-Sánchez M, Millet S, Bloch-Gallego E, Alvarado-Mallart RM. Formation de la frontière entre cerveaux moyen et postérieur: implication des gènes *Otx2* et *Gbx2*. *J Soc Biol.* 2000; 194: 113–118

Hidalgo-Sánchez M, Millet S, Bloch-Gallego E, Alvarado-Mallart R-M. Specification of the meso-isthmo-cerebellar region: the *Otx2/Gbx2* boundary. *Brain Res Brain Res Rev.* 2005; 49: 134–149

Hnasko TS, Chuhma N, Zhang H, Goh GY, Sulzer D, Palmiter RD, Rayport S, Edwards RH. Vesicular glutamate transport promotes dopamine storage and glutamate corelease in vivo. *Neuron* 2010; 65: 643–656

Hornykiewicz O. Biochemical aspects of Parkinson's disease. *Neurology* 1998; 51: S2-9

Hughes CE, Nibbs RJB. A guide to chemokines and their receptors. *FEBS J.* 2018; 285: 2944–2971

Ikemoto S. Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res Rev.* 2007; 56: 27–78

ImageJ, 2021: ImageJ Colocalization Analysis // Colocalization Analysis: ImageJDocs - Scientific Imaging. https://imagej.net/Colocalization_Analysis#Colocalization_Threshold (Zugriffdatum: 09.07.2021)

Inan M, Welagen J, Anderson SA. Spatial and temporal bias in the mitotic origins of somatostatin- and parvalbumin-expressing interneuron subgroups and the chandelier subtype in the medial ganglionic eminence. *Cereb Cortex* 2012; 22: 820–827

Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79: 368–376

Jensen P, Dymecki SM. Essentials of recombinase-based genetic fate mapping in mice. *Methods Mol Biol.* 2014; 1092: 437–454

Joyner AL, Zervas M. Genetic inducible fate mapping in mouse: establishing genetic lineages and defining genetic neuroanatomy in the nervous system. *Dev Dyn.* 2006; 235: 2376–2385

Kamath T, Abdulraouf A, Burris SJ, Langlieb J, Gazestani V, Nadaf NM, Balderrama K, Vanderburg C, Macosko EZ. Single-cell genomic profiling of human dopamine neurons identifies a population that selectively degenerates in Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 2022; 25: 588–595

Kawano H, Ohyama K, Kawamura K, Nagatsu I. Migration of dopaminergic neurons in the embryonic mesencephalon of mice. *Brain Res Dev Brain Res.* 1995; 86: 101–113

Kilzheimer A, Hentrich T, Burkhardt S, Schulze-Hentrich JM. The Challenge and Opportunity to Diagnose Parkinson's Disease in Midlife. *Front Neurol.* 2019; 10: 1328

Kim J-I, Ganesan S, Luo SX, Wu Y-W, Park E, Huang EJ, Chen L, Ding JB. Aldehyde dehydrogenase 1a1 mediates a GABA synthesis pathway in midbrain dopaminergic neurons. *Science* 2015; 350: 102–106

Kimmel RA, Turnbull DH, Blanquet V, Wurst W, Loomis CA, Joyner AL. Two lineage boundaries coordinate vertebrate apical ectodermal ridge formation. *Genes Dev.* 2000; 14: 1377–1389

Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. Erratum in: *Neuropsychopharmacology* 2010; 35: 217–238

Kordower JH, Olanow CW, Dodiya HB, Chu Y, Beach TG, Adler CH, Halliday GM, Bartus RT. Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease. *Brain* 2013; 136: 2419–2431

Korotkova TM, Ponomarenko AA, Haas HL, Sergeeva OA. Differential expression of the homeobox gene *Pitx3* in midbrain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci.* 2005; 22: 1287–1293

Lahti L, Peltopuro P, Piepponen TP, Partanen J. Cell-autonomous FGF signaling regulates anteroposterior patterning and neuronal differentiation in the mesodiencephalic dopaminergic progenitor domain. *Development* 2012; 139: 894–905

Lammel S, Hetzel A, Häckel O, Jones I, Liss B, Roeper J. Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. *Neuron* 2008; 57: 760–773

Lammel S, Lim BK, Malenka RC. Reward and aversion in a heterogeneous midbrain dopamine system. *Neuropharmacology* 2014; 76 Pt B: 351–359

Lavi E, Strizki JM, Ulrich AM, Zhang W, Fu L, Wang Q, O'Connor M, Hoxie JA, González-Scarano F. Lavi, 1997 // CXCR-4 (Fusin), a co-receptor for the type 1 human immunodeficiency virus (HIV-1), is expressed in the human brain in a variety of cell types, including microglia and neurons. *Am J Pathol.* 1997; 151: 1035–1042

Legué E, Joyner AL. Genetic Fate Mapping Using Site-Specific Recombinases. *Methods Enzymol.* 2010; 477: 153–181

Lerner TN, Shilyansky C, Davidson TJ, Evans KE, Beier KT, Zalocusky KA, Crow AK, Malenka RC, Luo L, Tomer R, Deisseroth K. Intact-Brain Analyses Reveal Distinct Information Carried by SNc Dopamine Subcircuits. *Cell* 2015; 162: 635–647

Lim L, Mi D, Llorca A, Marín O. Development and Functional Diversification of Cortical Interneurons. *Neuron* 2018; 100: 294–313

Lin L, Rao Y, Isacson O. Netrin-1 and slit-2 regulate and direct neurite growth of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Mol Cell Neurosci.* 2005; 28: 547–555

Lin X, Parisiadou L, Sgobio C, Liu G, Yu J, Sun L, Shim H, Gu X-L, Luo J, Long C-X, Ding J, Mateo Y, Sullivan PH, Wu L-G, Goldstein DS, Lovinger D, Cai H. Conditional expression of Parkinson's disease-related mutant α -synuclein in the midbrain dopaminergic neurons causes progressive neurodegeneration and degradation of transcription factor nuclear receptor related 1. *J Neurosci.* 2012; 32: 9248–9264

Llorca A, Marín O. Orchestrated freedom: new insights into cortical neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol.* 2021; 66: 48–56

Llorens-Martín M, Trejo JL. Multiple birthdating analyses in adult neurogenesis: a line-up of the usual suspects. *Front Neurosci.* 2011; 5: 76

Lu M, Grove EA, Miller RJ. Abnormal development of the hippocampal dentate gyrus in mice lacking the CXCR4 chemokine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 7090–7095

Ma. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 9448-9453

Ma TP. Identification of the substantia nigra pars lateralis in the macaque using cytochrome oxidase and fiber stains. *Brain Res.* 1989; 480: 305–311

Madisen L, Garner AR, Shimaoka D, Chuong AS, Klapoetke NC, Li L, van der Bourg A, Niino Y, Egolf L, Monetti C, Gu H, Mills M, Cheng A, Tasic B, Nguyen TN, Sunkin SM, Benucci A, Nagy A, Miyawaki A, Helmchen F, Empson RM, Knöpfel T, Boyden ES, Reid RC, Carandini M, Zeng H. Transgenic mice for intersectional targeting of neural sensors and effectors with high specificity and performance. *Neuron* 2015; 85: 942–958

Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, Oh SW, Zariwala HA, Gu H, Ng LL, Palmiter RD, Hawrylycz MJ, Jones AR, Lein ES, Zeng H. A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci.* 2010; 13: 133–140

Marillat V, Cases O, Nguyen-Ba-Charvet KT, Tessier-Lavigne M, Sotelo C, Chédotal A. Spatiotemporal expression patterns of slit and robo genes in the rat brain. *J Comp Neurol.* 2002; 442: 130–155

Mavromatakis YE, Lin W, Metzakopian E, Ferri ALM, Yan CH, Sasaki H, Whisett J, Ang S-L. Foxa1 and Foxa2 positively and negatively regulate Shh signalling to specify ventral midbrain progenitor identity. *Mech Dev* 2011; 128: 90–103

McConnell SK, Kaznowski CE. Cell cycle dependence of laminar determination in developing neocortex. *Science* 1991; 254: 282–285

Menegas W, Bergan JF, Ogawa SK, Isogai Y, Umadevi Venkataraju K, Osten P, Uchida N, Watabe-Uchida M. Dopamine neurons projecting to the posterior striatum form an anatomically distinct subclass. *Elife*. 2015; 4: e10032

Metzger D, Chambon P. Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* 2001; 24: 71–80

Metzger D, Clifford J, Chiba H, Chambon P. Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 6991–6995

Miyoshi G, Butt SJB, Takebayashi H, Fishell G. Physiologically distinct temporal cohorts of cortical interneurons arise from telencephalic Olig2-expressing precursors. *J Neurosci*. 2007; 27: 7786–7798

Morales M, Margolis EB. Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nat Rev Neurosci*. 2017; 18: 73–85

Nagasawa T. CXCL12/SDF-1 and CXCR4. *Front Immunol*. 2015; 6: 301

Nair-Roberts RG, Chatelain-Badie SD, Benson E, White-Cooper H, Bolam JP, Ungless MA. Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience* 2008; 152: 1024–1031

Namen AE, Lupton S, Hjerrild K, Wignall J, Mochizuki DY, Schmierer A, Mosley B, March CJ, Urdal D, Gillis S. Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature* 1988; 333: 571–573

Omodei D, Acampora D, Mancuso P, Prakash N, Di Giovannantonio LG, Wurst W, Simone A. Anterior-posterior graded response to Otx2 controls proliferation and differentiation of dopaminergic progenitors in the ventral mesencephalon. *Development* 2008; 135: 3459–3470

Ono Y, Nakatani T, Sakamoto Y, Mizuhara E, Minaki Y, Kumai M, Hamaguchi A, Nishimura M, Inoue Y, Hayashi H, Takahashi J, Imai T. Differences in neurogenic potential in

floor plate cells along an anteroposterior location: midbrain dopaminergic neurons originate from mesencephalic floor plate cells. *Development* 2007; 134: 3213–3225

Panman L, Papathanou M, Laguna A, Oosterveen T, Volakakis N, Acampora D, Kurtzdotter I, Yoshitake T, Kehr J, Joodmardi E, Muhr J, Simeone A, Ericson J, Perlmann T. Sox6 and Otx2 control the specification of substantia nigra and ventral tegmental area dopamine neurons. *Cell rep.* 2014; 8: 1018–1025

Parkinson J. *An Essay on the Shaking Palsy* 1817

Pereira Luppi M, Azcorra M, Caronia-Brown G, Poulin J-F, Gaertner Z, Gatica S, Moreno-Ramos OA, Nouri N, Dubois M, Ma YC, Ramakrishnan C, Fenno L, Kim YS, Deisseroth K, Cicchetti F, Dombeck DA, Awatramani R. Sox6 expression distinguishes dorsally and ventrally biased dopamine neurons in the substantia nigra with distinctive properties and embryonic origins. *Cell rep.* 2021; 37: 109975

Perlmann T, Wallén-Mackenzie A. Nurr1, an orphan nuclear receptor with essential functions in developing dopamine cells. *Cell Tissue Res.* 2004; 318: 45–52

Petese A, Fries FL, Broske B, Stumm R, Blaess S. Lineage Analysis of Cxcr4-Expressing Cells in the Developing Midbrain Suggests That Progressive Competence Restriction in Dopaminergic Progenitor Cells Contributes to the Establishment of Dopaminergic Neuronal Diversity. *eNeuro* 2022; 9

Poulin J-F, Caronia G, Hofer C, Cui Q, Helm B, Ramakrishnan C, Chan CS, Dombeck DA, Deisseroth K, Awatramani R. Mapping projections of molecularly defined dopamine neuron subtypes using intersectional genetic approaches. *Nat Neurosci.* 2018; 21: 1260–1271

Poulin J-F, Gaertner Z, Moreno-Ramos OA, Awatramani R. Classification of Midbrain Dopamine Neurons Using Single-Cell Gene Expression Profiling Approaches. *Trends Neurosci.* 2020; 43: 155–169

Prakash N. Developmental pathways linked to the vulnerability of adult midbrain dopaminergic neurons to neurodegeneration. *Front Mol Neurosci.* 2022; 15: 1071731

- Price J, Thurlow L. Cell lineage in the rat cerebral cortex: a study using retroviral-mediated gene transfer. *Development* 1988; 104: 473–482
- Przedborski S. The two-century journey of Parkinson disease research. *Nat Rev Neurosci.* 2017; 18: 251–259
- Rakic P. Specification of cerebral cortical areas. *Science* 1988; 241: 170–176
- Roeper J. Dissecting the diversity of midbrain dopamine neurons. *Trends Neurosci.* 2013; 36: 336–342
- Saunders A, Macosko EZ, Wysoker A, Goldman M, Krienen FM, Rivera H de, Bien E, Baum M, Bortolin L, Wang S, Goeva A, Nemesh J, Kamitaki N, Brumbaugh S, Kulp D, McCarroll SA. Molecular Diversity and Specializations among the Cells of the Adult Mouse Brain. *Cell* 2018; 174: 1015-1030.e16
- Schultz W. Dopamine neurons and their role in reward mechanisms. *Curr Opin Neurobiol.* 1997; 7: 191–197
- Schultz W. Behavioral dopamine signals. *Trends Neurosci.* 2007; 30: 203–210
- Schultz W. Dopamine signals for reward value and risk: basic and recent data. *Behav Brain Funct.* 2010; 6: 24
- Schultz W. Reward prediction error. *Curr Biol.* 2017; 27: R369–R371
- Shepard PD. Electrophysiological and pharmacological evidence for the existence of distinct subpopulations of nigrostriatal dopaminergic neuron in the rat. *Neuroscience* 1988; 27: 537–546
- Solanelles-Farré L, Telley L. New insights into CNS development from multiomics approaches. *Curr Opin Neurobiol* 2021; 66: 116–124
- Sonnenschein SF, Gomes FV, Grace AA. Dysregulation of Midbrain Dopamine System and the Pathophysiology of Schizophrenia. *Front Psychiatry* 2020; 11: 613

Stuber GD, Hnasko TS, Britt JP, Edwards RH, Bonci A. Dopaminergic terminals in the nucleus accumbens but not the dorsal striatum corelease glutamate. *J Neurosci.* 2010; 30: 8229–8233

Stumm RK, Zhou C, Ara T, Lazarini F, Dubois-Dalcq M, Nagasawa T, Höllt V, Schulz S. CXCR4 regulates interneuron migration in the developing neocortex. *J Neurosci.* 2003; 23: 5123–5130

Sulzer D, Surmeier DJ. Neuronal vulnerability, pathogenesis, and Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2013; 28: 41–50

Surmeier DJ, Obeso JA, Halliday GM. Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. *Nat Rev Neurosci.* 2017; 18: 101–113

Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakano T, Honjo T. Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 1993; 261: 600–603

Tecuapetla F, Patel JC, Xenias H, English D, Tadros I, Shah F, Berlin J, Deisseroth K, Rice ME, Tepper JM, Koos T. Glutamatergic signaling by mesolimbic dopamine neurons in the nucleus accumbens. *J Neurosci.* 2010; 30: 7105–7110

The Comprehensive R Archive Network, 2022: ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots. <https://cran.r-project.org/web/packages/ggpubr/index.html> (Zugriffsdatum: 30.10.2022)

The Jackson Laboratory, 2022: B6.129(FVB)-Pitx3tm1.1Cai/J: Strain #:021962 RRID:IMSR_JAX:021962. PITX3+/IRES2-tTA KI mice may be useful when studying the pathogenic mechanism of α -syn-dependent dopaminergic dysfunction. <https://www.jax.org/strain/021962> (Zugriffsdatum: 07.09.2022)

Tian L, Al-Nusaif M, Chen X, Li S, Le W. Roles of Transcription Factors in the Development and Reprogramming of the Dopaminergic Neurons. *Int J Mol Sci.* 2022; 23

Tilton B, Ho L, Oberlin E, Loetscher P, Baleux F, Clark-Lewis I, Thelen M. Signal transduction by CXC chemokine receptor 4. Stromal cell-derived factor 1 stimulates prolonged

protein kinase B and extracellular signal-regulated kinase 2 activation in T lymphocytes. *J Exp Med.* 2000; 192: 313–324

Tran PB, Miller RJ. Chemokine receptors in the brain: a developing story. *J Comp Neurol.* 2003; 457: 1–6

Tritsch NX, Ding JB, Sabatini BL. Dopaminergic neurons inhibit striatal output through non-canonical release of GABA. *Nature* 2012; 490: 262–266

Tritsch NX, Oh W-J, Gu C, Sabatini BL. Midbrain dopamine neurons sustain inhibitory transmission using plasma membrane uptake of GABA, not synthesis. *eLife* 2014; 3: e01936

Vaswani AR, Blaess S. Reelin Signaling in the Migration of Ventral Brain Stem and Spinal Cord Neurons. *Front Cell Neurosci.* 2016; 10: 62

Vaswani AR, Weykopf B, Hagemann C, Fried HU, Brüstle O, Blaess S. Correct setup of the substantia nigra requires Reelin-mediated fast, laterally-directed migration of dopaminergic neurons. *Elife* 2019; 28.8: e41623

Volkow ND, Morales M. The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. *Cell* 2015; 162: 712–725

Wakhloo D, Oberhauser J, Madira A, Mahajani S. From cradle to grave: neurogenesis, neuroregeneration and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neural Regen Res.* 2022; 17: 2606–2614

Wallén A, Zetterström RH, Solomin L, Arvidsson M, Olson L, Perlmann T. Fate of mesencephalic AHD2-expressing dopamine progenitor cells in NURR1 mutant mice. *Exp Cell Res.* 1999; 253: 737–746

Werner Y, Mass E, Ashok Kumar P, Ulas T, Händler K, Horne A, Klee K, Lupp A, Schütz D, Saaber F, Redecker C, Schultze JL, Geissmann F, Stumm R. Cxcr4 distinguishes HSC-derived monocytes from microglia and reveals monocyte immune responses to experimental stroke. *Nat Neurosci.* 2020; 23: 351–362

White RB, Thomas MG. Moving Beyond Tyrosine Hydroxylase to Define Dopaminergic Neurons for Use in Cell REplacement Therapies for Parkinson's Disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2012; 11: 340-349

Wickham H. Ggplot2: Elegrant graphics for data analysis. Second Edition. in: Gentleman R, Hornik K, Parmigiani G eds. *Use R!* Switzerland: Springer, 2016

Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, McGowan L, François R, Grolemond G, Hayes A, Henry L, Hester J, Kuhn M, Pedersen T, Miller E, Bache S, Müller K, Ooms J, Robinson D, Seidel D, Spinu V, Takahashi K, Vaughan D, Wilke C, Woo K, Yutani H. Welcome to the Tidyverse. *JOSS* 2019; 4: 1686

Yamaguchi T, Qi J, Wang H-L, Zhang S, Morales M. Glutamatergic and dopaminergic neurons in the mouse ventral tegmental area. *Eur J Neurosci.* 2015; 41: 760–772

Yan CH, Levesque M, Claxton S, Johnson RL, Ang S-L. Lmx1a and lmx1b function cooperatively to regulate proliferation, specification, and differentiation of midbrain dopaminergic progenitors. *J Neurosci.* 2011; 31: 12413–12425

Yang S, Edman LC, Sánchez-Alcañiz JA, Fritz N, Bonilla S, Hecht J, Uhlén P, Pleasure SJ, Villaescusa JC, Marín O, Arenas E. Cxcl12/Cxcr4 signaling controls the migration and process orientation of A9-A10 dopaminergic neurons. *Development* 2013; 140: 4554–4564

Yetnikoff L, Lavezzi HN, Reichard RA, Zahm DS. An update on the connections of the ventral mesencephalic dopaminergic complex. *Neuroscience* 2014; 282: 23–48

Yi L, Zhou X, Li T, Liu P, Hai L, Tong L, Ma H, Tao Z, Xie Y, Zhang C, Yu S, Yang X. Notch1 signaling pathway promotes invasion, self-renewal and growth of glioma initiating cells via modulating chemokine system CXCL12/CXCR4. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019; 38: 339

Yue Y, Widmer DAJ, Halladay AK, Cerretti DP, Wagner GC, Dreyer J-L, Zhou R. Specification of Distinct Dopaminergic Neural Pathways: Roles of the Eph Family Receptor EphB1 and Ligand Ephrin-B2. *J Neurosci.* 1999; 19: 2090–2101

Zecca L, Tampellini D, Gerlach M, Riederer P, Fariello RG, Sulzer D. Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behaviour. *Mol Pathol.* 2001; 54: 414–418

Zervas M, Blaess S, Joyner AL. Classical embryological studies and modern genetic analysis of midbrain and cerebellum development. *Curr Top Dev Biol.* 2005: 101–138

Zervas M, Millet S, Ahn S, Joyner AL. Cell behaviors and genetic lineages of the mesencephalon and rhombomere 1. *Neuron* 2004; 43: 345–357

Zhang H, Kang D, Huang B, Liu N, Zhao F, Zhan P, Liu X. Discovery of non-peptide small molecular CXCR4 antagonists as anti-HIV agents: Recent advances and future opportunities. *Eur J Med Chem.* 2016; 114: 65–78

Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 1998; 11: 595–599

9. Danksagung

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meiner Doktormutter und Betreuerin für die vielen interessanten Anregungen, persönliche Betreuung und Ratschläge, schnelle Erreichbarkeit und den herzlichen Kontakt. Ich würde mich freuen, wenn der Kontakt über die Arbeit hinaus besteht.

Ein weiterer Dank geht an meine Familie und Freunde, die mir die Zeit und Möglichkeit gegeben haben, mich der Arbeit zu widmen und mich moralisch unterstützten. Ihr Verständnis ist mir viel wert.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Kolleg*innen aus der Arbeitsgruppe Neurdevelopmental Genetics bedanken, die die gemeinsame Arbeit so viel bunter und ereignisreicher machten und mir mit ihrer Expertise weiterhalfen.

Anlage 1 von 1: Makro Fiji (Original-Text):

```

macro "Macro 3 AnalyseROI [3]" {
    print("The user pressed '3'");
//The composite image and the lasso tool image must be opened
//The composite image must be chosen
//Step 1: GetTitles
a = getTitle();
run("Put Behind [tab]");
b= getTitle();

//Step 2 Split channels of the Composite image
selectWindow(a);
run("Split Channels");
selectWindow(a+ " (blue)");
close();
run("Restore Selection");
selectWindow(a+ " (red)");

//Step 3: Analyse particles of the ROI of the red channel
run("Duplicate...", " ");
// das neue Bild heißt jetzt a+ " (red)-1"
selectWindow(a+ " (red)-1");

//neu
saveAs("Tiff", "D:/16-RedChannel/"+b+"(redChannel)");

run("Restore Selection");
setAutoThreshold("Default dark");
//run("Threshold...");
setAutoThreshold("Huang dark");
setAutoThreshold("Default dark");
//setThreshold(109, 255);

```

```
setOption("BlackBackground", true);
run("Convert to Mask");
run("Restore Selection");
run("Analyze Particles...", "pixel display summarize in_situ");

// Step 4: Produce a Colocalized Image of the ROI and save it
// The colocalized image is called: b+"ColocalizedROI"
selectWindow(a+" (red)");
run("Restore Selection");
run("Colocalization Threshold", "channel_1=["+a+" (red)] channel_2=["+a+" (green)]
use=[Channel 1] channel=[Red : Green] show use_0 include");
saveAs("Tiff", "D:/17-Colocalized/"+b+"ColocalizedROI");

//Step 5: Clean up a bit ;) :
//Close all but Colocalized image
//Define a new variable for the Colocalized image
close("\\Others")
c = getTitle();

// Step 6: Analyse particles of the Colocalized image
run("Split Channels");
run("Restore Selection");
run("Analyze Particles...", "pixel display summarize in_situ");

//Step 7: Clean up part2
close("*")
}
```