

Aus dem
CharitéCentrum für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie
Klinik für Neurologie
Direktor: Prof. Dr. med. Matthias Endres

Habilitationsschrift

Regeneration als therapeutisches Prinzip nach Schlaganfall

zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach Neurologie

vorgelegt vor dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Karen Gertz

geboren am 24. Mai 1976 in Berlin

Eingereicht: Oktober 2013

Dekanin: Frau Prof. Dr. med. A. Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. M. Schwaninger / Lübeck

2. Gutachter: Herr PD Dr. T. Magnus / Hamburg

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	3
1. Einleitung	4
1.1 Regeneration nach Schlaganfall: Angiogenese, Neurogenese und das Konzept der neuro-vaskulären Nische	4
1.2 Zielstellung	9
2. Eigene Arbeiten	10
2.1 Angiogenese nach Schlaganfall	10
2.1.1 Die Auswirkung von freiwilliger regelmäßiger körperlicher Aktivität auf die Blutgefäßneubildung und das Langzeitergebnis nach Schlaganfall	
2.1.2 Der Einfluss inflammatorischer Mechanismen auf die Blutgefäßneubildung und das Langzeitergebnis nach Schlaganfall – Rolle von Interleukin-6	21
2.2 Neurogenese nach Schlaganfall	39
2.2.1 Eigenschaften residenter neuronaler Vorläuferzellen nach Schlaganfall	
2.2.2 Neuronale Vorläuferzellen als therapeutisches „Target“ zur Induktion von Neurogenese nach Schlaganfall	52
2.3 Die neuro-vaskuläre Nische	60
2.3.1 Die Charakterisierung der neuro-vaskulären Nische – Einfluss des Zytoskeletts	
3. Diskussion	74
4. Zusammenfassung	80
5. Literaturverzeichnis	81
Danksagung	88
Eidesstattliche Erklärung	89

Abkürzungen

BDNF	brain-derived neurotrophic factor
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
EPC	endotheliale Vorläuferzellen
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
IGF-1	insulin-like growth factor type 1
IL-6	Interleukin-6
MCAo	middle cerebral artery occlusion
NO	Stickstoffmonoxid
rtPA	recombinant tissue plasminogen activator
SGZ	subgranuläre Zone
STAT-3	signal transducer and activator of transcription-3
SVZ	subventrikuläre Zone
TUNEL	Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling
VEGF	vascular-endothelial growth factor

1. Einleitung

1.1 Regeneration nach Schlaganfall: Angiogenese, Neurogenese und das Konzept der neuro-vaskulären Nische

Der Schlaganfall (ICD-10 Pos.-Nr.: I64) gehört mit 21.594 Sterbefällen im Jahre 2011 zu den zehn häufigsten Todesursachen in Deutschland (Quelle: Statistisches Bundesamt, <http://www.destatis.de>). Bei einem ischämischen Schlaganfall kommt es nach einem arteriellen Gefäßverschluss zur Unterbrechung der Blutversorgung. Dies führt zu einer verminderten Bereitstellung von Sauerstoff und Nährstoffen, was eine Schädigung des Hirngewebes verursacht (Quelle: „Health topics, Stroke, Cerebrovascular accident“, <http://www.who.int>).

Routinemäßig wird in der Akutphase die rekanalisierende Therapie mittels intravenöser Thrombolyse mit „recombinant tissue plasminogen activator“ (rtPA) innerhalb von viereinhalb Stunden nach Beschwerdeauftritt durchgeführt. Bei proximalen intrakraniellen Arterienverschlüssen werden bei wenigen Patienten auch interventionelle Verfahren wie die intraarterielle Lysetherapie oder mechanische Thrombektomieverfahren angewendet, die jedoch in spezialisierten Zentren durchgeführt werden müssen. Darüber hinaus fokussieren sich die Therapiekonzepte in der Akutphase vor allem auf die Basistherapie (Kontrolle von Blutdruck, Blutzucker und Körpertemperatur etc.), die Analyse des kardiovaskulären Risikoprofils, die Behandlung von Komplikationen und den Beginn einer frühen Sekundärprophylaxe sowie einer frühen Rehabilitation (Quelle: Leitlinie 22 2012 Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls, <http://www.dgn.org>).

Trotz der hohen ökonomischen Kosten und der hohen individuellen Relevanz für die betroffenen Patienten stehen seit der Zulassung von Actilyse® in Deutschland im Jahre 2000 (Quelle: Fachinformation Actilyse®, Boehringer Ingelheim) keine neuen

klinisch anwendbaren Medikamente zur Therapie des ischämischen Schlaganfalls zur Verfügung. Dabei bestand aufgrund der erfolgreichen experimentellen Datenlage lange Zeit große Zuversicht, schnell geeignete neuroprotektive Medikamente für die humane Anwendung bereitzustellen. Ein weiteres aktuelles Beispiel für das bestehende Translationsdefizit stellt eine Phase-2-Studie an über 300 Patienten dar. Obwohl hier tierexperimentelle Daten und auch eine humane Vorstudie positive Ergebnisse bei der Anwendung des „granulocyte-colony stimulating factor“ (G-CSF, AX200) erbracht hatten, verfehlte die Anwendung von G-CSF einen positiven Effekt auf das Schlaganfallergebnis in dieser randomisierten, doppelblinden, plazebo-kontrollierten, multizentrischen, humanen Studie (Schäbitz & Schneider, 2006; Ringelstein EB, 2012).

Über die Ursachen dieser ungenügenden Translation grundlagenwissenschaftlicher Daten in humane Therapiestrategien wird nach wie vor intensiv diskutiert. Als ein wesentlicher Grund gilt die Tatsache, dass bisher vor allem die Erforschung akuter Vorgänge zu frühen Zeitpunkten nach Schlaganfall im wissenschaftlichen Fokus stand. Dabei ging es meist um die Untersuchung von Mechanismen, die lediglich auf die Protektion der Neuronen im durch den Schlaganfall geschädigten Hirnareal abzielten. Die Untersuchung komplexer pathophysiologischer Vorgänge zu späten Zeitpunkten nach Schlaganfall – wie Blutgefäßneubildung, Umbauvorgänge der extrazellulären Matrix, chronische Inflammation sowie synaptische und neuronale Plastizität – fanden bisher nur wenig Beachtung. Dabei sind jedoch gerade regenerative Prozesse und die Untersuchung des funktionellen Defizits Wochen und Monate nach einem Schlaganfall relevant, um das Langzeitergebnis von Schlaganfallpatienten aussagekräftig abzubilden (Endres et al., 2008).

Mittlerweile wird anerkannt, dass Strategien zur Verbesserung von Regeneration nach Schlaganfall Umbauvorgänge der zerebralen Blutgefäße und Blutgefäßneubildung berücksichtigen müssen (Ergul et al., 2012).

Während der Embryonalentwicklung wird der primäre vaskuläre Plexus durch die Differenzierung vaskulärer endothelialer Vorläuferzellen, der sogenannten Angioblasten, gebildet. Dieser Prozess wird als embryonale Vaskulogenese bezeichnet. Anschließend wird die weitere embryonale Blutgefäßbildung durch Angiogenese fortgesetzt. Angiogenese beinhaltet dabei zum einen die Bildung von Kapillaren durch „Aussprossung“ aus bereits existierenden Gefäßen („sprouting“), zum anderen die Bildung von Kapillaren durch Intussusception bzw. Invagination. Für die weitere Entwicklung intakter Arterien und Venen sind jedoch noch sogenannte „pruning“- und Maturationsvorgänge notwendig. Jeder dieser Vorgänge wird durch verschiedene komplexe molekulare Signalwege beeinflusst, die bis dato nicht vollständig verstanden sind. Auch im adulten Organismus sind Endothelzellen keine postmitotischen Zellen, sondern besitzen die Fähigkeit zur Angiogenese, sowohl unter physiologischen (z. B. Ovarialzyklus) als auch pathologischen Bedingungen, wie z. B. der Bildung von Malignomen (Risau W, 1997).

Schon vor vielen Jahren wurde berichtet, dass auch im Schadensfall einer zerebralen Ischämie die Neubildung von Blutgefäßen induziert wird. So wurden Ergebnisse aus humanen Autopsieproben veröffentlicht, die eine höhere Blutgefäßdichte in der Infarkttrandzone mit einer längeren Überlebenszeit korrelieren konnten (Krupinski et al., 1993; Ergul et al., 2012).

In letzter Zeit finden sich einige experimentelle Untersuchungen, die sich mit der Stimulation von Blutgefäßneubildung nach Schlaganfall und den zugrunde liegenden Mechanismen befasst haben. Aktuelle Beispiele stellen Experimente mit dem neuen Proteasom Inhibitor BSc2118, mit Resveratrol, einem Phytoalexin aus der roten

Weintraube oder nach Überexpression von Netrin-1, welches als axonales „guidance“ Molekül bekannt ist, dar. Hier wird gezeigt, dass Angiogenese und Endothelproliferation nach Schlaganfall prinzipiell stimuliert werden können und das Schlaganfallergebnis positiv beeinflussen (Doepfner et al., 2012; Simão et al., 2012; Lu et al., 2012). Dabei untersuchen diese Arbeiten relativ unterschiedliche pathophysiologische Signalwege, was auf die Komplexität der Vorgänge hinweist, aber auch unterschiedliche Therapieansätze aufzeigt.

Als ein weiterer wichtiger Angriffspunkt zur Stimulation regenerativer Prozesse nach Schlaganfall gilt die Modulation neuronaler Plastizität. Adulte Neuronen besitzen als post-mitotische Zellen *per se* nicht die Fähigkeit zur Zellteilung und Proliferation (Kornack & Rakic, 2001; Ruggiero et al., 2012). Nach einer ischämischen Schädigung lässt sich zwar bei einzelnen Neuronen der Wiedereintritt in die S-Phase des Zellzyklus beobachten. Dies führt aber nicht zum Ersatz der geschädigten Neuronen durch neu gebildete intakte Neuronen, sondern geht eher mit der Induktion von Apoptose und nachfolgendem Zelltod einher (Katchanov et al., 2001).

Grundsätzlich finden sich im Gehirn jedoch spezialisierte Regionen, wie die subgranuläre Zone (SGZ) des Gyrus dentatus im Hippocampus oder die subventrikuläre Zone (SVZ) der Seitenventrikel, in denen über die gesamte Lebensspanne reife Neuronen aus Vorläuferzellen differenziert werden (Seri et al., 2004; Quiñones-Hinojosa et al., 2006). Unter pathologischen Bedingungen wie einer zerebralen Ischämie wurde beobachtet, dass es zur Proliferation der neuronalen Vorläuferzellen und verstärkten Neurogenese in der SGZ und SVZ kommt (Jin et al., 2001; Macas et al., 2006; Martí-Fàbregas et al., 2010). In den letzten Jahren wird ebenso diskutiert, dass sich auch außerhalb von SGZ und SVZ Vorläuferzellen im Hirnparenchym befinden, die durch eine zerebrale Ischämie aktiviert werden können (Buffo et al., 2005 und 2008).

Der Einsatz verschiedener Wachstumshormone oder neurotropher Faktoren, wie z. B. Östrogen und Meteorin, zeigt dabei, dass auch im Kontext Schlaganfall neuronale Plastizität stimuliert werden kann und positiv auf das Schlaganfallergebnis wirkt (Li et al., 2011; Wang et al., 2012).

Besonders interessant ist dabei die Beobachtung, dass sich neuronale Vorläuferzellen in einer pro-angiogenen Umgebung, der sogenannten „neuro-vaskulären Nische“, differenzieren. Die Theorie der „neuro-vaskulären Nische“ wurde erstmals für die adulte hippocampale Neurogenese unter physiologischen Bedingungen beschrieben (Palmer et al., 2000). Auch für den Schadensfall der zerebralen Ischämie gibt es bereits erste Hinweise, dass sich die Prozesse der Blutgefäßneubildung und Neurogenese gegenseitig positiv beeinflussen (Ohab et al., 2006). So wurde beobachtet, dass Neuroblasten aus der SVZ bevorzugt entlang von Blutgefäßen in Richtung der ischämischen Läsion migrieren und dabei Gebiete mit Blutgefäßneubildung durchwandern (Thored et al., 2007).

1.2 Zielstellung

Um regenerative Vorgänge zu stimulieren und nach Schlaganfall therapeutisch nutzen zu können, müssen diese komplexen pathophysiologischen Prozesse zunächst genauer charakterisiert und verstanden werden. Aufgrund der Vielzahl und Komplexität dieser Prozesse und Mechanismen wurde in der vorliegenden Arbeit auf die folgenden für das Verständnis von Regeneration nach Schlaganfall relevanten Fragen fokussiert:

a) Beeinflusst Blutgefäßneubildung das Langzeitergebnis nach Schlaganfall?

Welche Rolle spielt dabei regelmäßige körperliche Aktivität?

b) Welchen Einfluss entfalten chronische inflammatorische Vorgänge auf die Blutgefäßneubildung und das Langzeitergebnis nach Schlaganfall?

Welche Rolle spielt dabei das pro-inflammatorische Zytokin Interleukin-6?

c) Kann die Neubildung von Neuronen aus Neuroblasten das Langzeitergebnis nach Schlaganfall verbessern?

Welche Rolle spielen hierbei residente neuronale Vorläuferzellen?

d) Unter welchen Bedingungen wird neuronale Regeneration und Neurogenese unterstützt?

Welchen Einfluss entfaltet hierbei die Modulation des Zytoskeletts?

2. Eigene Arbeiten

2.1 Angiogenese nach Schlaganfall

2.1.1 Die Auswirkung von freiwilliger regelmäßiger körperlicher Aktivität auf die Blutgefäßneubildung und das Langzeitergebnis nach Schlaganfall

Gertz K, Priller J, Kronenberg G, Fink KB, Winter B, Schrock H, Ji S, Milosevic M, Harms C, Bohm M, Dirnagl U, Laufs U, Endres M. Physical Activity Improves Long Term Stroke Outcome via Endothelial Nitric Oxide Synthase-Dependent Augmentation of Neovascularization and Cerebral Blood Flow. *Circulation Research*. 2006; 99: 1132-1140.

Endothelial freigesetztes Stickstoffmonoxid (NO) gilt als potenter Vasodilatator, stimuliert den zerebralen Blutfluss und führt zu Neuroprotektion nach Schlaganfall (Endres et al. 2003). Bisher war jedoch unklar, ob endotheliales NO regenerative Prozesse wie die Neubildung von Blutgefäßen stimuliert und ob dies das Langzeitergebnis nach Schlaganfall positiv beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit zeigen wir, dass durch regelmäßige freiwillige körperliche Aktivität die Expression der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) induziert und eine verstärkte Blutgefäßneubildung in der ischämischen Läsion vermittelt wird. Viele Wochen nach Schlaganfall ließen sich nach körperlicher Aktivität vermehrt neu gebildete Endothelzellen und eine höhere Dichte perfundierter Blutgefäße im ischämisch geschädigten Striatum nachweisen. Dies war mit einem verbesserten zerebralen Blutfluss und einem geringeren Defizit in den funktionellen Untersuchungen verbunden. Zusammengefasst können wir zeigen, dass regelmäßige freiwillige körperliche Aktivität eNOS-vermittelt insbesondere Mechanismen der Neubildung von Blutgefäßen unterstützt und dabei das Langzeitergebnis nach Schlaganfall verbessert.

Physical activity improves long-term stroke outcome via endothelial nitric oxide synthase-dependent augmentation of neovascularization and cerebral blood flow. Gertz K, Priller J, Kronenberg G, Fink KB, Winter B, Schröck H, Ji S, Milosevic M, Harms C, Böhm M, Dirnagl U, Laufs U, Endres M. *Circ Res.* 2006 Nov 10;99(10):1132-40. doi: 10.1161/01.RES.0000250175.14861.77

2.1.2 Der Einfluss inflammatorischer Mechanismen auf die Blutgefäßneubildung und das Langzeitergebnis nach Schlaganfall – Rolle von Interleukin-6

Gertz K*, Kronenberg G*, Kälin RE, Baldinger T, Werner C, Balkaya M, Eom GD, Hellmann-Regen J, Kröber J, Miller KR, Lindauer U, Laufs U, Dirnagl U, Heppner FL, Endres M. Essential role of interleukin-6 in post-stroke angiogenesis. *Brain*. 2012; 135: 1964-1980.

In der Akutphase nach Schlaganfall korrelieren im Blutplasma gemessene erhöhte Interleukin(IL)-6-Spiegel mit einem ungünstigeren Ergebnis nach Schlaganfall (Smith et al., 2004). Andererseits werden aber auch protektive Effekte von IL-6 auf das Langzeitergebnis diskutiert (Suzuki et al., 2009). In dieser Arbeit wurde am Beispiel des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 der Einfluss von chronischer Neuroinflammation auf regenerative Vorgänge nach Schlaganfall untersucht.

Zu frühen Zeitpunkten nach Schlaganfall zeigten IL-6-defiziente Mäuse eine deutlich reduzierte Induktion des Angiogenese-assoziierten Gennetzwerkes und des „signal transducer and activator of transcription-3“ (STAT3). Mehrere Wochen nach Schlaganfall wiesen IL-6-defiziente Mäuse vergrößerte Läsionsvolumina und schlechtere Testergebnisse in den funktionellen Untersuchungen auf. Dies ging mit einer reduzierten Dichte perfundierter Blutgefäße und verringerten absoluten Blutflusswerten im ischämisch geschädigten Striatum einher. Die Transplantation von IL-6-kompetentem Knochenmark konnte den reduzierten Langzeitphänotyp der IL-6-defizienten Mäuse nicht aufheben. Dagegen können wir zeigen, dass residente Hirnzellen als Hauptressource von IL-6 nach Schlaganfall dienen und IL-6 mittels eines selbstinduzierenden und -amplifizierenden Vorganges produzieren. Insgesamt beweisen unsere Daten, dass chronische Neuroinflammation protektive Effekte auf das Langzeitergebnis nach Schlaganfall entfalten kann.

Essential role of interleukin-6 in post-stroke angiogenesis. Gertz K, Kronenberg G, Kälin RE, Baldinger T, Werner C, Balkaya M, Eom GD, Hellmann-Regen J, Kröber J, Miller KR, Lindauer U, Laufs U, Dirnagl U, Heppner FL, Endres M. *Brain*. 2012 Jun;135(Pt 6):1964-80. doi: 10.1093/brain/aws075

2.2 Neurogenese nach Schlaganfall

2.2.1 Eigenschaften residenter neuronaler Vorläuferzellen nach Schlaganfall

Kronenberg G, Wang LP, Synowitz M, **Gertz K**, Katchanov J, Glass R, Harms C, Kempermann G, Kettenmann H, Endres M. Nestin-expressing cells divide and adopt a complex electrophysiologic phenotype after transient brain ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2005; 25: 1613-1624.

Nestin gilt als ein Marker multipotenter Stammzellen und wird unter physiologischen Bedingungen im Gyrus dentatus und der SVZ exprimiert (Fukuda et al., 2003; Doetsch et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurden Nestin-GFP-transgene Mäuse einer zerebralen Ischämie unterzogen und die Expression von Nestin bis zu acht Wochen nach Schlaganfall immunhistochemisch und elektrophysiologisch charakterisiert. Im Gegensatz zu „sham“-operierten Tieren fanden sich bereits zu frühen Zeitpunkten nach Schlaganfall Nestin-positive Zellen in der striatalen ischämischen Läsion. Diese Zellen starben nicht ab, sondern konnten über den gesamten Beobachtungszeitraum nachgewiesen werden. Im Wesentlichen wanderten die Zellen nicht aus der SVZ in die ischämische Läsion ein. Die Nestin-positiven Zellen zeigten typischerweise keine Ko-Expression von astrozytären Markern, aber auch keine Ko-Expression mit NeuN, einem Marker reifer Neurone. Die Nestin-positiven Zellen bildeten einen charakteristischen elektrophysiologischen Phänotyp mit komplexen Membraneigenschaften in den „Patch-Clamp“-Ableitungen aus.

Unsere Arbeit unterstützt die These, dass auch außerhalb der neurogenen Zonen im Gehirn ortsständige Vorläuferzellen im Hirnparenchym vorhanden sind. Diese residenten Vorläuferzellen könnten ein therapeutisches Ziel zur Stimulation neuronaler Regeneration nach Schlaganfall darstellen.

Nestin-expressing cells divide and adopt a complex electrophysiologic phenotype after transient brain ischemia. Kronenberg G, Wang LP, Synowitz M, Gertz K, Katchanov J, Glass R, Harms C, Kempermann G, Kettenmann H, Endres M. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005 Dec;25(12):1613-24. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600156

2.2.2 Neuronale Vorläuferzellen als therapeutisches „Target“ zur Stimulation von Neurogenese nach Schlaganfall

Kronenberg G*, **Gertz K***, Cheung G, Buffo A, Kettenmann H, Götz M, Endres M. Modulation of fate determinants Olig2 and Pax6 in resident glia evokes spiking neuroblasts in a model of mild brain ischemia. *Stroke*. 2010; 41: 2944-2949.

Olig2 und Pax6 sind Transkriptionsfaktoren, die gegenläufige Effekte bei der Differenzierung von Vorläuferzellen in adulte Neurone bewirken (Buffo et al., 2005). Während Olig2 als pro-glialer Faktor gilt, vermittelt Pax6 einen neurogenen Phänotyp. Residente Vorläuferzellen nach Schlaganfall exprimieren den pro-glialen Faktor Olig2 (Buffo et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels retroviralem Gentransfer die Expression von Olig2 in residenten Vorläuferzellen antagonisiert bzw. die Expression des pro-neurogenen Faktors Pax6 induziert. Die retrovirale Transduktion erfolgte zwei Tage nach milder zerebraler Ischämie mittels stereotaktischer Injektion in das Infarktareal. Nach 10 und 17 Tagen wurden die histologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften der transduzierten Zellen charakterisiert. Dabei führte die Expression von Pax6 und die Antagonisierung von Olig2 zu einer signifikanten Anzahl von Zellen, die sich in „Doublecortin“-positive Neurone differenziert haben. In den „Patch-Clamp“-Untersuchungen bedingte die Antagonisierung von Olig2 und Expression von Pax6 einen höheren Anteil an Natriumströmen. Darüber hinaus fanden sich Zellen, die einzelne Aktionspotentiale generieren konnten und synaptische Eingangsströme aufwiesen. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die Eigenschaften residenter Vorläuferzellen nach einer zerebralen Ischämie modulierbar sind. Die Arbeit belegt prinzipiell die Möglichkeit einer neuronalen Regeneration nach Schlaganfall.

Modulation of fate determinants Olig2 and Pax6 in resident glia evokes spiking neuroblasts in a model of mild brain ischemia. Kronenberg G, Gertz K, Cheung G, Buffo A, Kettenmann H, Götz M, Endres M. *Stroke*. 2010 Dec;41(12):2944-9. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.583039

2.3 Die neurovaskuläre Nische

2.3.1 Die Charakterisierung der neurovaskulären Nische – Einfluss des Zytoskeletts

Kronenberg G*, **Gertz K***, Baldinger T, Kirste I, Eckart S, Yildirim F, Ji S, Heuser I, Schröck H, Hörtnagl H, Sohr R, Djoufack PC, Jüttner R, Glass R, Przesdzing I, Kumar J, Freyer D, Hellweg R, Kettenmann H, Fink KB, Endres M. Impact of actin filament stabilization on adult hippocampal and olfactory bulb neurogenesis. *Journal of Neuroscience*. 2010; 30: 3419-3431.

Dynamische zelluläre Prozesse setzen eine intakte Funktion des Zytoskeletts mit ungestörtem Auf- und Abbau von Aktin voraus (Gourlay & Ayscough, 2005). Ziel der Arbeit war es, den Einfluss eines rigiden Zytoskeletts auf die Funktion neuronaler Vorläuferzellen und den Prozess der Neurogenese näher zu untersuchen. In der Gelsolin-defizienten Maus migrierten neuronale Vorläuferzellen verlangsamt entlang des rostralen Migrationstranges. Dabei waren Proliferation und Differenzierung der Vorläuferzellen jedoch nicht verändert. Messungen in Synaptosomen und organotypischen Schnittkulturen von Gelsolin-defizienten Mäusen zeigten, dass die Funktion der neuronalen Vorläuferzellen durch einen stärkeren depolarisations-induzierten Einstrom von Calcium und eine erhöhte exozytotische Freisetzung von Neurotransmittern beeinflusst wird. Gelsolin-defiziente Mäuse wiesen eine erhöhte Netto-Neurogenese im Hippocampus auf, was mit einer höheren Dichte an perfundierten Blutgefäßen, einem erhöhten zerebralen Blutfluss und einer verstärkten eNOS-Expression einherging. Zusammengefasst liefern diese Daten einen weiteren Beleg für den Zusammenhang von neuronaler Regeneration und Angiogenese. Die Arbeit zeigt ferner, dass Neurogenese in einer spezialisierten neurovaskulären Umgebung modulierbar bzw. stimulierbar ist.

Impact of actin filament stabilization on adult hippocampal and olfactory bulb neurogenesis. Kronenberg G, Gertz K, Baldinger T, Kirste I, Eckart S, Yildirim F, Ji S, Heuser I, Schröck H, Hörtnagl H, Sohr R, Djoufack PC, Jüttner R, Glass R, Przesdzing I, Kumar J, Freyer D, Hellweg R, Kettenmann H, Fink KB, Endres M. *J Neurosci*. 2010 Mar 3;30(9):3419-31. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4231-09.2010

3. Diskussion

Bereits vor einhundert Jahren veröffentlichte der spanische Mediziner und spätere Nobelpreisträger Santiago Ramón y Cajal seine Beobachtungen zu degenerativen und regenerativen Vorgängen im peripheren und zentralen Nervensystem nach einer Schädigung (Cajal SR, 1913a und 1914a). Ab dem Jahr 1928 war eine englische Übersetzung verfügbar. In seiner Publikation erläutert Cajal, dass im Hirngewebe regenerative Vorgänge im Wesentlichen ineffektiv stattfänden. Selbst der Versuch zu regenerieren, wirke instabil und ende innerhalb weniger Tage. Cajal betont aber auch, dass Regeneration als wichtiges biologisches Phänomen des Gehirns, wenn auch ineffektiv, existiere. Diese Tatsache widerlegt zweifelsfrei die fatalistische Vorstellung von der Irreparabilität zentraler Bahnen („definitely refutes the fatalist concept of the essential irregenerability of central paths“; Cajal SR, 1928).

Trotzdem wurde der Untersuchung alternativer bzw. ergänzender Therapieoptionen, die die Regeneration nach zerebraler Ischämie stimulieren können, bisher nur wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Dabei erscheint die Charakterisierung regenerativer Vorgänge wie Blutgefäßneubildung, Umbauvorgänge der extrazellulären Matrix, chronische inflammatorische Vorgänge sowie synaptische und neuronale Plastizität geeignet, neue Wege zur Verbesserung des Langzeitergebnisses von Schlaganfallpatienten zu eröffnen (Endres et al., 2008).

Eine wichtige Voraussetzung für die Untersuchung regenerativer Vorgänge zu späteren Zeitpunkten nach Schlaganfall stellt die Untersuchung in geeigneten experimentellen Modellen dar. Deshalb etablierten und charakterisierten wir zunächst ein *in vivo*-Schlaganfallmodell, in dem für 30 Minuten die linke *Arteria cerebri media* (30-minütige MCAo) verschlossen wird (Katchanov et al., 2001 und 2003). Dieses Modell produziert kleine, im Wesentlichen striatale Läsionen und erreicht eine

Erholung der Tiere innerhalb weniger Tage bei einer Mortalität von ca. 10%. Dadurch wird die Untersuchung regenerativer Vorgänge viele Wochen und Monate nach einem Schlaganfall ermöglicht. Interessanterweise lässt sich in der striatalen ischämischen Läsion ein selektiver neuronaler Zelltod mit einem Verlust der Projektionsneurone beobachten. Interneurone und gliale Zellen sterben jedoch nicht (Katchanov et al., 2003). Dieses Modell gilt auch als Apoptosemodell, da die Projektionsneurone eine zunehmende DNA-Fragmentation mit einem Maximum nach 72 Stunden aufweisen, die sich mittels „Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling“-assay (TUNEL-Methode) nachweisen lässt (Katchanov et al., 2001). Dies ist insofern relevant, da Filamentmodelle mit längeren Okklusionszeiten (z. B. 60- oder 90-minütige MCAo) regelhaft kortikostriatale Pannekrosen induzieren (Carmichael ST, 2005). In der Regel überleben die Mäuse nach längeren Okklusionszeiten auch nur wenige Tage. Unserer Meinung nach sollten daher Untersuchungen zu späten Zeitpunkten in den MCAo-Modellen mit längeren Okklusionszeiten kritisch beurteilt werden, weil mortalitätsbedingt die Datenerhebung an selektierten Tieren stattfindet. Darüber hinaus muss der zeitabhängige Umbau der ischämischen Läsion berücksichtigt werden. Während auch Wochen nach einer 30-minütigen MCAo die Gewebeatrophie nur eine geringe Rolle spielt und die Gewebeintegrität im Wesentlichen erhalten bleibt, stellen Atrophie, Narben- und Hygrombildung in murinen MCAo-Modellen mit längeren Okklusionszeiten eine weitere Limitierung in der Untersuchung und Aussagekraft regenerativer Vorgänge dar (Fernández-Klett et al., 2013). Bei der Auswahl geeigneter Schlaganfallmodelle zur korrekten Abbildung von Regeneration müssen zusätzlich auch Stamm- und Speziesunterschiede berücksichtigt werden (Carmichael ST, 2005). Nach eigenen Beobachtungen erscheint z. B. der 129S6/SvEv-Wildtypstamm geeigneter, um späte Zeitpunkte zu untersuchen, da der C57BL6-

Wildtypstamm selbst nach 30-minütiger MCAo häufiger zu Atrophie und Narbenbildung mit starker Autofluoreszenz neigt, so dass z. B. die histologische Erfassung eines zellulären Signals innerhalb der ischämischen Läsion erschwert ist. Die Stimulation bzw. Modulation von Blutgefäßneubildung erscheint als ein vielversprechender regenerativer Ansatz zur Verbesserung des Langzeitergebnisses nach Schlaganfall (Endres et al., 2008). Ähnlich wie in der Embryonalentwicklung, wo eine relative Gewebhypoxie die Ausbildung des vaskulären Plexus induziert (Ramirez-Bergeron et al., 2006), stellt die zerebrale Ischämie einen angiogenetischen Stimulus dar, der zu Endothelzellproliferation mit nachfolgender Blutgefäßformation führt (Wei et al., 2001). Im Modell der 30-minütigen MCAo lässt sich dies am Zeitpunkt vier Wochen nach Schlaganfall durch eine Zunahme der Blutgefäßdichte um bis zu 80 % nachvollziehen (Gertz et al., 2012).

In unterschiedlichen Arbeiten konnte mittlerweile gezeigt werden, dass die Blutgefäßneubildung nach Schlaganfall durch verschiedene Interventionen stimuliert werden kann und zu einem verbesserten Schlaganfallergebnis führt (Doeppner et al., 2012; Lu et al., 2012; Simão et al., 2012). Allerdings gab es auch schon früh Hinweise, dass bei der Stimulation von Blutgefäßneubildung nach Schlaganfall in komplexe pathophysiologische Vorgänge eingegriffen wird. So bewirkte die Applikation des „vascular-endothelial growth factor“ (VEGF) eine Stunde nach zerebraler Ischämie eine Verstärkung des Blut-Hirn-Schranken-Schadens und eine Verschlechterung des Schlaganfallergebnisses. Wird VEGF jedoch erst 48 Stunden nach dem Ereignis eingesetzt, wird die Blutgefäßneubildung stimuliert, was zu einer Verbesserung des Schlaganfallphänotyps führt (Zhang et al., 2000). Hierbei spielt auch der Applikationsweg von VEGF (systemisch vs. intrazerebroventrikulär) eine Rolle (Kaya et al., 2005). Diese Daten zeigen, dass dasselbe Molekül sowohl protektive als auch schadensverstärkende Wirkungen vermitteln kann. Gerade im

Hinblick auf eine erfolgreiche Translation tierexperimenteller Daten ist es daher notwendig, ausreichende Kenntnisse über die zugrunde liegenden Schadenswege und Mechanismen zu gewinnen, um erfolgreiche Behandlungsstrategien zu entwickeln.

Mittlerweile wird auch diskutiert, dass die reine Vermehrung von Blutgefäßen nach Schlaganfall für eine erfolgreiche vaskuläre Regeneration zu kurz greift. Vielmehr stellt die Ausbildung funktionell intakter Blutgefäße die wesentliche Herausforderung dar. Dies beinhaltet weitere Reifungs- bzw. Maturationsvorgänge, damit neugebildete Blutgefäße als physiologischer Bestandteil der neurovaskulären Einheit fungieren und zur zerebralen Blutversorgung bzw. Regulation des zerebralen Blutflusses beitragen können. Dabei müssen z. B. die Differenzierung in arterielle oder venöse Gefäße, die Ausbildung einer intakten Blut-Hirn-Schranke sowie die Stabilisierung des Blutgefäßes („mural cell recruitment“) berücksichtigt werden (Carmeliet P, 2003; Gaengel et al., 2009).

In diesem Kontext wird auch die Relevanz von knochenmarksstämmigen endothelialen Vorläuferzellen (EPCs) diskutiert. Ähnlich wie in der Embryonalentwicklung, wo der primäre vaskuläre Plexus durch die Differenzierung vaskulärer endothelialer Vorläuferzellen entsteht (Risau W, 1997), wird eine Beteiligung von EPCs an adulter bzw. therapeutischer Vaskulogenese diskutiert (Asahara & Isner, 2002; Carmeliet P, 2003). Dabei werden den EPCs Reparatoreigenschaften am geschädigten Endothel zugeschrieben (Werner et al., 2002). Darüber hinaus tragen EPCs zur Blutgefäßneubildung und zu einem verbesserten Schlaganfallergebnis bei (Gertz et al., 2006; Hayakawa et al., 2012).

Blutgefäßneubildung nach Schlaganfall stellt einen subakuten bis chronischen Vorgang dar, der erst Tage bis Wochen nach Schlaganfallauftakt zum Tragen kommt. Ein wesentlicher Kritikpunkt am Konzept der regenerativen Blutgefäßbildung

nach Schlaganfall besteht daher in der Tatsache, dass der unmittelbare Untergang von Neuronen in der Akutphase nach Schlaganfall nicht verhindert werden kann. Hierbei muss auch bedacht werden, dass adulte Neurone *per se* nicht die Fähigkeit zur Zellerneuerung durch Zellteilung bzw. Proliferation besitzen (Kornack & Rakic, 2001; Ruggiero et al., 2012).

Aktuelle Konzepte erklären jedoch, wie Blutgefäßneubildung nach Schlaganfall zu funktioneller Verbesserung führen könnte. So beschreibt die Theorie der neurovaskulären Nische, dass sich neuronale Vorläuferzellen bevorzugt in einer vasophilen Umgebung differenzieren (Palmer et al., 2000; Massouh & Saghatelyan, 2010). Auch im Schadensfall der zerebralen Ischämie beeinflussen sich Blutgefäßneubildung und Neurogenese gegenseitig (Ohab et al., 2006). So migrieren Neuroblasten in kettenförmiger Anordnung bevorzugt entlang von Blutgefäßen zum geschädigten Gewebe (Zhang et al., 2004; Thored et al., 2007; Massouh & Saghatelyan, 2010). Dabei wiesen Neuroblasten aus der SVZ, die mit Endothelzellen aus dem Schlaganfallrandgebiet ko-kultiviert wurden, eine vermehrte Proliferation und neuronale Differenzierung auf (Teng et al., 2008; Massouh & Saghatelyan, 2010). Hierbei scheint die endotheliale Freisetzung neurotropher Faktoren wie z. B. des „brain-derived neurotrophic factors“ (BDNF), eine protektive Rolle zu spielen (Leventhal et al., 1999; Massouh & Saghatelyan, 2010).

Allerdings werden die Neurogenese-basierten Regenerationsvorgänge nach Schlaganfall auch als insuffizient angesehen, da nur eine geringe Anzahl von Neuroblasten erfolgreich in die geschädigten Netzwerke integriert wird und längerfristig überlebt (Massouh & Saghatelyan, 2010). Dies gilt sowohl für die Neuroblasten der neurogenen Zonen des Gehirns als auch für residente Vorläuferzellen (Massouh & Saghatelyan, 2010; Buffo et al., 2005; Kronenberg et al., 2005).

Interessanterweise lassen sich die Prozesse der Blutgefäßneubildung vor allem im Infarkttrandgebiet beobachten (Beck & Plate, 2009). Dabei verhindert die verbesserte Versorgung der Infarkttrandzone mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren, wie z. B. „insulin-like growth factor type 1“ (IGF-1), den neuronalen Zelltod (Li et al., 2010; Overman & Carmichael, 2013). Daher wird diskutiert, dass sich Neuronen, die im Infarktgewebe überleben, auch viele Wochen nach Schlaganfall in einem wachstumsfaktorabhängigen Status befinden (Overman & Carmichael, 2013). Dies bietet die Basis zur Förderung neuronaler Plastizität, welche axonale Aussprossung, Änderungen der dendritischen Morphologie und der synaptischen Konnektivität beinhaltet. Dabei wird die Ausbildung alternativer neuronaler Netzwerke vermittelt, was letztlich zum funktionellen Ausgleich des Defizits beiträgt (Overman & Carmichael, 2013). Darüber hinaus führen auch lebensstilrelevante Interventionen wie regelmäßige körperliche Aktivität zur Aktivierung subkortikaler Netzwerke und neuronaler Plastizität (Luft et al., 2008; Overman & Carmichael, 2013).

4. Zusammenfassung

Regeneration stellt ein bisher zu wenig beachtetes Prinzip zur Therapie des ischämischen Schlaganfalls dar. Dabei bieten gerade die komplexen Langzeitprozesse nach Schlaganfall vielfältige Ansatzpunkte zur Modulation und Stimulation, um letztlich eine Verbesserung des neurobehavioralen Defizits und Langzeitergebnisses nach Schlaganfall herbeizuführen.

Blutgefäßneubildung nach Schlaganfall kann durch verschiedene Interventionen stimuliert werden und das Schlaganfallergebnis verbessern. Hierbei müssen jedoch Maturationsvorgänge beachtet werden, die zur Ausbildung einer intakten und funktionsfähigen neurovaskulären Einheit führen.

Das Prinzip der neuro-vaskulären Nische zeigt auf, wie durch Blutgefäßneubildung nach Schlaganfall optimale Bedingungen geschaffen werden, um eine neuronale Regeneration auch unter pathologischen Bedingungen zu ermöglichen. Dies schließt die Differenzierung und erfolgreiche Integration neuronaler Vorläuferzellen, die Aktivierung alternativer neuronaler Netzwerke und die Stimulation von neuronaler Plastizität mit ein.

Zusammenfassend erscheint die Erforschung regenerativer Vorgänge nach Schlaganfall als ein realistischer Ansatz mit großem Potential für die Translation in klinische Behandlungsstrategien. Nachdem bislang die therapeutischen Bemühungen auf die Akutphase der zerebralen Ischämie fokussierten, könnte die Förderung von spezifischen regenerativen Prozessen eine neue Perspektive in der Behandlung von Schlaganfallpatienten eröffnen.

5. Literaturverzeichnis

Asahara T, Isner JM. Endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *J Hematother. Stem Cell Res.* 2002; 11, 171-178

Beck H, Plate KH. Angiogenesis after cerebral ischemia *Acta Neuropathol.* 2009; 117: 481–496

Buffo A, Vosko MR, Ertuerk D, Hamann GF, Jucker M, Rowitch D, Götz M. Expression pattern of the transcription factor Olig2 in response to brain injuries: implications for neuronal repair. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102: 18183–18188

Buffo A, Rite I, Tripathi P, Lepier A, Colak D, Horn AP, Mori T, Götz M. Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(9): 3581-3586

Cajal SR. Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso. Madrid.: Moya. 1913a, 1914a

Cajal SR. Degeneration and regeneration of the nervous system. May R, translator. New York: Hafner. 1928

Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003; 9(6): 653-660

Carmichael ST. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx.* 2005; 2(3): 396-409

Doeppner TR, Mlynarczuk-Bialy I, Kuckelkorn U, Kaltwasser B, Herz J, Hasan MR, Hermann DM, Bähr M. The novel proteasome inhibitor BSc2118 protects against cerebral ischaemia through HIF1A accumulation and enhanced angiogenesis. *Brain.* 2012; 135(Pt 11): 3282-3297

Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci.* 1997; 17(13): 5046-5061

Endres M, Gertz K, Lindauer U, Katchanov J, Schultze J, Schröck H, Nickenig G, Kuschinsky W, Dirnagl U, Laufs U. Mechanisms of stroke protection by physical activity. *Ann Neurol.* 2003; 54(5): 582-590

Endres M, Engelhardt B, Koistinaho J, Lindvall O, Meairs S, Mohr JP, Planas A, Rothwell N, Schwaninger M, Schwab ME, Vivien D, Wieloch T, Dirnagl U. Improving outcome after stroke: overcoming the translational roadblock. *Cerebrovasc Dis.* 2008; 25(3): 268-278

Ergul A, Alhusban A, Fagan SC. Angiogenesis: a harmonized target for recovery after stroke. *Stroke.* 2012; 43(8): 2270-2274

Fernández-Klett F, Potas JR, Hilpert D, Blazej K, Radke J, Huck J, Engel O, Stenzel W, Genové G, Priller J. Early loss of pericytes and perivascular stromal cell-induced scar formation after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013; 33(3): 428-439

Fukuda S, Kato F, Tozuka Y, Yamaguchi M, Miyamoto Y, Hisatsune T. Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci.* 2003; 23:9357–9366

Gaengel K, Genové G, Armulik A, Betsholtz C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29(5): 630-638

Gertz K, Kronenberg G, Kälin RE, Baldinger T, Werner C, Balkaya M, Eom GD, Hellmann-Regen J, Kröber J, Miller KR, Lindauer U, Laufs U, Dirnagl U, Heppner FL, Endres M. Essential role of interleukin-6 in post-stroke angiogenesis. *Brain.* 2012; 135(Pt 6): 1964-1980

Gertz K, Priller J, Kronenberg G, Fink KB, Winter B, Schröck H, Ji S, Milosevic M, Harms C, Böhm M, Dirnagl U, Laufs U, Endres M. Physical activity improves long-term stroke outcome via endothelial nitric oxide synthase-dependent augmentation of neovascularization and cerebral blood flow. *Circ Res.* 2006; 99(10):1132-1140

Gourlay CW, Ayscough KR. The actin cytoskeleton: a key regulator of apoptosis and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 583–589

Hayakawa K, Pham LD, Katusic ZS, Arai K, Lo EH. Astrocytic high-mobility group box 1 promotes endothelial progenitor cell-mediated neurovascular remodeling during stroke recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(19): 7505-7510

Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Batteur S, Simon RP, Greenberg DA. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(8): 4710-4715

Katchanov J, Harms C, Gertz K, Hauck L, Waeber C, Hirt L, Priller J, von Harsdorf R, Bruck W, Hortnagl H, Dirnagl U, Bhide PG, Endres M. Mild cerebral ischemia induces loss of cyclin-dependent kinase inhibitors and activation of cell cycle machinery before delayed neuronal cell death. *J Neurosci*. 2001; 21(14): 5045-5053

Katchanov J, Waeber C, Gertz K, Gietz A, Winter B, Brück W, Dirnagl U, Veh RW, Endres M. Selective neuronal vulnerability following mild focal brain ischemia in the mouse. *Brain Pathol*. 2003; 13(4): 452-464

Kaya D, Gürsoy-Ozdemir Y, Yemisci M, Tuncer N, Aktan S, Dalkara T. VEGF protects brain against focal ischemia without increasing blood-brain permeability when administered intracerebroventricularly. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005; 25(9): 1111-1118

Kornack DR, Rakic P. Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex. *Science*. 2001; 294(5549): 2127-2130

Kronenberg G, Wang LP, Synowitz M, Gertz K, Katchanov J, Glass R, Harms C, Kempermann G, Kettenmann H, Endres M. Nestin-expressing cells divide and adopt a complex electrophysiologic phenotype after transient brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005; 25(12): 1613-1624

Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, Wang M, Kumar S. Prognostic value of blood vessel density in ischaemic stroke. *Lancet*. 1993; 342(8873): 742

Leventhal C, Rafii S, Rafii D, Shahar A, Goldman SA. Endothelial trophic support of neuronal production and recruitment from the adult mammalian subependyma. *Mol. Cell Neurosci.* 1999; 13: 450–464

Li J, Siegel M, Yuan M, Zeng Z, Finnucan L, Persky R, Hurn PD, McCullough LD. Estrogen enhances neurogenesis and behavioral recovery after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011; 31(2): 413-425

Li S, Overman JJ, Katsman D, Kozlov SV, Donnelly CJ, Twiss JL, Giger RJ, Coppola G, Geschwind DH, Carmichael ST. An age-related sprouting transcriptome provides molecular control of axonal sprouting after stroke. *Nat Neurosci.* 2010; 13(12): 1496-1504

Lu H, Wang Y, He X, Yuan F, Lin X, Xie B, Tang G, Huang J, Tang Y, Jin K, Chen S, Yang GY. Netrin-1 hyperexpression in mouse brain promotes angiogenesis and long-term neurological recovery after transient focal ischemia. *Stroke.* 2012; 43(3): 838-843.

Luft AR, Macko RF, Forrester LW, Villagra F, Ivey F, Sorkin JD, Whitall J, McCombe-Waller S, Katzel L, Goldberg AP, Hanley DF. Treadmill exercise activates subcortical neural networks and improves walking after stroke: a randomized controlled trial. *Stroke.* 2008; 39(12): 3341-3350

Macas J, Nern C, Plate KH, Momma S. Increased generation of neuronal progenitors after ischemic injury in the aged adult human forebrain. *J Neurosci* 2006; 26: 13114–13119

Martí-Fàbregas J, Romaguera-Ros M, Gómez-Pinedo U, Martínez-Ramírez S, Jiménez-Xarrié E, Marín R, Martí-Vilalta JL, García-Verdugo JM. Proliferation in the human ipsilateral subventricular zone after ischemic stroke. *Neurology.* 2010; 74(5): 357-365

Massouh M, Saghatelian A. De-routing neuronal precursors in the adult brain to sites of injury: role of the vasculature. *Neuropharmacology.* 2010; 58(6): 877-883

Ohab JJ, Fleming S, Blesch A, Carmichael ST. A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci*. 2006; 26(50): 13007-13016

Overman JJ, Carmichael ST. Plasticity in the Injured Brain: More than Molecules Matter. *Neuroscientist*. 2013 Jun 11. [Epub ahead of print]

Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol*. 2000; 425: 479–494

Quiñones-Hinojosa A, Sanai N, Soriano-Navarro M, Gonzalez-Perez O, Mirzadeh Z, Gil-Perotin S, Romero-Rodriguez R, Berger MS, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J Comp Neurol*. 2006; 494(3): 415-434

Ramirez-Bergeron DL, Runge A, Adelman DM, Gohil M, Simon MC. HIF-dependent hematopoietic factors regulate the development of the embryonic vasculature. *Dev Cell*. 2006; 11: 81–92

Ringelstein EB. AXIS-2 Study: AX200 for the Treatment of Acute Ischemic Stroke. Abstract LB10, International Stroke Conference (ISC) 2012, <http://my.americanheart.org/>

Risau W: Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997; 386: 671–674

Ruggiero R, Kale A, Thomas B, Baker NE. Mitosis in neurons: Roughex and APC/C maintain cell cycle exit to prevent cytokinetic and axonal defects in *Drosophila* photoreceptor neurons. *PLoS Genet*. 2012; 8(11): e1003049

Schäbitz WR & Schneider A. Developing Granulocyte-Colony Stimulating Factor for the Treatment of Stroke: Current Status of Clinical Trials. *Stroke*. 2006; 37: 1654

Seri B, García-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol*. 2004; 478(4): 359-378

Simão F, Pagnussat AS, Seo JH, Navaratna D, Leung W, Lok J, Guo S, Waeber C, Salbego CG, Lo EH. Pro-angiogenic effects of resveratrol in brain endothelial cells: nitric oxide-mediated regulation of vascular endothelial growth factor and metalloproteinases. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012; 32(5): 884-895

Smith CJ, Emsley HC, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, Barberan EM, del Zoppo GJ, Hallenbeck JM, Rothwell NJ, Hopkins SJ, Tyrrell PJ. Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. *BMC Neurol.* 2004; 4: 2

Suzuki S, Tanaka K, Suzuki N. Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: inflammatory versus neurotrophic aspects. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009; 29(3): 464-479

Teng H, Zhang ZG, Wang L, Zhang RL, Zhang L, Morris D, Gregg SR, Wu Z, Jiang A, Lu M, Zlokovic BV, Chopp M. Coupling of angiogenesis and neurogenesis in cultured endothelial cells and neural progenitor cells after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008; 28(4): 764-771

Thored P, Wood J, Arvidsson A, Cammenga J, Kokaia Z, Lindvall O. Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. *Stroke.* 2007; 38(11): 3032-3039

Wang Z, Andrade N, Torp M, Wattananit S, Arvidsson A, Kokaia Z, Jørgensen JR, Lindvall O. Meteorin is a chemokinetic factor in neuroblast migration and promotes stroke-induced striatal neurogenesis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012; 32(2): 387-398

Werner N, Priller J, Laufs U, Endres M, Böhm M, Dirnagl U, Nickenig G. Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22(10): 1567-1572

Wei L, Erinjeri JP, Rovainen CM, Woolsey TA. Collateral growth and angiogenesis around cortical stroke. *Stroke*. 2001; 32(9): 2179-2184

Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Zhang R, Davies K, Powers C, Bruggen Nv, Chopp M. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest*. 2000; 106(7): 829-838

Zhang R, Zhang Z, Wang L, Wang Y, Gousev A, Zhang L, Ho KL, Morshead C, Chopp M. Activated neural stem cells contribute to stroke-induced neurogenesis and neuroblast migration toward the infarct boundary in adult rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2004; 24: 441-448

Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Matthias Endres danken, der meinen gesamten wissenschaftlichen Werdegang begleitet hat.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ulrich Dirnagl, der als Direktor der Abteilung für Experimentelle Neurologie der Charité ein wissenschaftlich-kreatives Umfeld geschaffen hat, welches die Grundlage jeder Projektarbeit darstellt.

Mein Dank gilt den Mitgliedern der Experimentellen Neurologie, mit denen ich seit 15 Jahren zusammenarbeite.

Insbesondere danke ich den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Endres für die wertvolle Zusammenarbeit, ohne die kein Projekt erfolgreich abgeschlossen werden kann. Besonders möchte ich dabei meinem Kollegen Prof. Dr. Golo Kronenberg für die langjährige Unterstützung und konstruktive Teamarbeit danken.

Nicht zuletzt gehört meiner Familie mein besonderer Dank für die fortwährende Anteilnahme, ohne die mein Werdegang nicht möglich gewesen wäre.

Eidesstattliche Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 09. Oktober 2013

Dr. Karen Gertz