

Aus der Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Endogene Neurogenese im adulten Hippocampus bei
neurodegenerativen und chronisch-inflammatorischen
Erkrankungen des Zentralnervensystems im Tiermodell

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Petra Hühnchen

aus Pirna

Datum der Promotion: 14.02.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Abstract	7
Einführung	9
Methodik	10
1 Tiere und Tiermodelle	10
1.1 EAE	10
1.2 MPTP	11
2 Histologie und Zellquantifizierung	12
2.1 Immunhistochemie	12
2.2 Immunfluoreszenz	12
3 Molekularbiologie (qPCR)	13
4 Enzyme-linked immunoabsorbant assay	13
5 Zellkultur	13
6 Verhaltensexperimente	14
6.1 Light/ dark box	14
6.2 Startle response	14
6.3 Shuttle box	14
7 Statistik	15
Ergebnisse	16
1 Autoimmune Neuroinflammation führt zu initialer hippocampaler Zellproliferation aber gestörter Zelldifferenzierung zu reifen Neuronen	16
2 Dopamindepletion steigert selektiv die Proliferation von Typ1- und Typ2a-Zellen bei eingeschränkter Differenzierung zu reifen Neuronen	19
3 Gestörte Oligodendrogenese unter Dopamindepletion	20
Diskussion	22
1 Beitrag lokaler und systemischer Inflammation an der Regulation der endogenen Neurogenese	22
2 Korrelation von hippocampaler Neurogenese und kognitiven Defiziten bei MS und Parkinson	23
Literaturverzeichnis	24

Anteilerklärung	27
Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	28
1 Modulation of adult hippocampal neurogenesis during myelin-directed autoimmune neuroinflammation	29
2 MPTP-induced hippocampal effects on serotonin, dopamine, neurotrophins, adult neurogenesis and depression-like behavior are partially influenced by fluoxetine in adult mice	40
3 Physical activity and environmental enrichment regulate the generation of neural precursors in the adult substantia nigra in a dopamine-dependent manner	59
Lebenslauf	74
Komplette Publikationsliste	76
Eidesstattliche Versicherung	77
Danksagung	78

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BrdU	5-Bromo-2-deoxyuridin
CFA	komplettes Freund'sches Adjuvans
CNPase	2,3-Cyclic-nucleotid-3-phosphodiesterase
CTR	Kontrolle
DAB	Diaminobenzidin
Dcx	Doublecortin
DG	Gyrus dentatus
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked immunoabsorbant assay
ENR	angereicherte Umgebung
FGF	fibroblast growth factor
Flx	Fluoxetin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCL	Granulärzellschicht
GFAP	glial fibrillary acid protein
GFP	green fluorescent protein
h	Stunden
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff
i.p.	intraperitoneal
IPS	idiopathisches Parkinson-Syndrom
KG	Körpergewicht
MOG ₃₅₋₅₅	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (Peptid 35-55)
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mRNA	Boten-RNA
min	Minuten
MS	Multiple Sklerose
NaCl	Kochsalzlösung

NeuN	Neuronal Nuclei
NG2	neuron-glial antigen 2
Ngn	Neurogenin
NPCs	neuronal Vorläuferzellen
NSCs	neurale Stammzellen
OPCs	Oligodendrozytenvorläuferzellen
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
qPCR	quantitative PCR
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD	Parkinson's disease
PFA	Paraformaldehyd
PTX	Pertussis-Toxin
RNA	Ribonukleinsäure
RUN	Haltung in Käfig mit Laufrad
RT	Reverse Transkriptase
Sal	Kochsalzlösung
s.c.	subkutan
s	Sekunden
SEM	Standardfehler
SGZ	subgranuläre Zone
SN	Substantia nigra
SSRI	selektiver Serotonin Wiederaufnahme-Hemmer
STAN	Standardhaltung
SVZ	Subventrikulärzone
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
Upm	Umdrehungen pro Minute
TH	Tyrosinhydroxylase
VEGF	vascular endothelial growth factor
ZNS	Zentralnervensystem

Abstract

Das idiopathische Parkinson Syndrom (IPS) und die Multiple Sklerose (MS) zählen zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen, dennoch existieren bisher keine kurativen Therapien. Stammzelltransplantation bzw. die Induktion der endogenen Neuroneogenese könnten einen vielversprechenden regenerativen Therapieansatz bieten. Die der Neurogenese zugrundeliegenden regulatorischen Mechanismen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen sind bisher nicht vollständig verstanden. Diese Arbeit evaluiert, wie sich der Prozess der Neuroneogenese bei autoimmuner Neuroinflammation vom Ablauf in neurodegenerativen Erkrankungen unterscheidet. Im Tiermodell der MS, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis, konnte mithilfe des Proliferationsmarkers Bromodeoxyuridin gezeigt werden, dass die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen im Hippocampus erhöht, jedoch der Differenzierungsprozess dieser Zellen zu reifen Neuronen gestört ist. Neurogene Transkriptionsfaktoren zeigten eine herabgesetzte Expression bei gleichzeitiger Überexpression glialer Differenzierungsfaktoren als Hinweis auf einen möglichen Zelllinienwechsel während der Ausreifung unter Neuroinflammation im Sinne einer reaktiven Gliose. Im Tiermodell des IPS, durch die neurotoxische Wirkung von 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) auf dopaminerge Neurone in der Substantia nigra ausgelöst, fand sich auch eine erhöhte Zellproliferation von neuronalen Vorläuferzellen im Hippocampus, die nicht in eine gesteigerte Zahl reifer Neurone mündete. Eine initial gesteigerte Zellproliferation konnte auch in der Substantia nigra von MPTP-Tieren nachgewiesen werden, wobei die größte Anzahl dieser Zellen positiv für das Proteoglykan neuron-gliale Antigen 2 (NG2) waren. Neuronale Vorläufer oder reife Neuronen im Sinne einer Neuroneogenese ließen sich selbst unter Substitution mit L-Dopa oder anderen neurotrophen Stimuli nicht nachweisen.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass endogene Neuroneogenese durch viele Faktoren eng reguliert ist. Eine Beeinflussung der Regulationsmechanismen durch Inflammation oder Neurotransmitterverlust hat deutliche Folgen. Im Hippocampus könnten Alterationen der Neurogenese ein möglicher Pathomechanismus bei der Entstehung kognitiver Defizite sein, wie sie häufig bei Patienten mit MS und IPS auftreten. Zudem bleibt eine gestörte hippocampale Neurogenese als ein Kofaktor in der Entwicklung affektiver Störungen wie Depression, die in MS- und Parkinsonpatienten häufig zu finden sind, zu diskutieren.

Abstract

Idiopathic Parkinson's disease (PD) and Multiple Sclerosis (MS) are two of the most common neurological diseases. Up to this date, curative therapies are non-existent. Stem cell transplantation and induction of endogenous neurogenesis are regarded as two potential regenerative therapeutic approaches. But the underlying regulatory mechanisms under physiological and pathological conditions are still insufficiently understood. Here we investigated if the process of neurogenesis differs in a state of autoimmune inflammation from conditions in neurodegenerative diseases with loss of neurotransmitters. We used the animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) to study cellular differences in acute and chronic conditions of neuroinflammation and found, with the use of the proliferations marker Bromodeoxyuridine, that cell proliferation of stem cells and neuronal precursors was elevated in the hippocampus of EAE-animals, however the differentiation process was impaired. We were able to show that an upregulation of glial and a downregulation of neuronal transcription factors might be suggestive of a switch in cell differentiation from neurons to glia cells under neuroinflammation as measures of a reactive gliosis. Similar results could be detected in the model of PD, which was induced by a loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra due to neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP), where we found an increased hippocampal cell proliferation of neuronal precursors that however did not translate into an increase of mature neurons. Increased cell proliferation was also found in the substantia nigra of MPTP-animals, however the majority of those cells expressed the neuron-glia antigen 2 (NG2) and no neuronal precursors or mature neurons could be detected, not even after dopamine substitution or under other neurotrophic stimuli.

Taken together, these findings suggest that neurogenesis is tightly regulated by many factors. Any changes in the neurogenic microenvironment, whether due to neuroinflammation or loss of neurotransmitters, have extensive implications on the process of neurogenesis. Especially in the hippocampus, which is an important structure for learning and (spatial) memory, alterations of neurogenesis could be one possible pathomechanism of cognitive deficits in patients with MS and PD. Furthermore, impaired neurogenesis might also be considered a confounding factor for the development of affective disorders such as depression, also commonly found in MS and PD patients.

Einführung

Als endogene Neurogenese wird die Fähigkeit des Gehirns bezeichnet aus pluripotenten Stammzellen neuronale Vorläufer und schließlich reife Neuronen zu bilden. Das dies auch noch im erwachsenen Gehirn möglich ist, wurde nunmehr bereits in vielen Studien bewiesen (1, 2). Dieser Prozess geschieht im adulten Zentralnervensystem (ZNS) im Gyrus dentatus (DG) des Hippocampus und der Subventrikulärzone (SVZ) der Seitenventrikel. Die neuralen Stammzellen (NSCs) teilen sich und differenzieren zu neuronalen Vorläuferzellen (NPCs) und schließlich zu reifen Neuronen, die in das bestehende Netzwerk integriert werden (3). Zunehmend zeigt sich, dass auch andere Areale im adulten ZNS wie die dopaminerge Substantia nigra (SN) Zellen mit neuralen Vorläufereigenschaften bilden können (4). Neurogenese gilt daher als vielversprechende Option für regenerative Therapien, da es bisher für viele neurodegenerative Erkrankungen des Gehirns, wie auch der Multiplen Sklerose (MS) und dem idiopathischen Parkinson-Syndrom (IPS), bis heute keine kurativen Therapien gibt. Beim IPS steht die Neurodegeneration von dopaminergen Neuronen in der SN im Vordergrund (5); die MS ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung autoimmunen Ursprungs, die zu einer Demyelinisierung der zentralen Axone und zunehmenden Neurodegeneration führt (6). Viele Regulationsmechanismen, über die positive und negative Stimuli Einfluss auf die Neurogenese nehmen, sind noch nicht vollständig verstanden (7). Für viele inflammatorische Reaktionen wurde bereits ein Einfluss auf die Neurogenese belegt (8-10). Eine Aktivierung von Mikroglia kann zu einer Abnahme der Neurogenese führen, während T-Zell-vermittelte autoimmunologische Prozesse einen Anstieg der Neurogenese bewirken (11, 12). Auch für neurodegenerative Erkrankungen wie dem IPS (13, 14) und affektive Störungen wie die Depression (15, 16) wurden Effekte auf die Neurogenese nachgewiesen. Störungen der Neurogenese unter autoimmuner Neuroinflammation und Dopamindepletion könnten demnach bei Erkrankungen wie MS (17) und IPS (18) ebenfalls ursächlich für das gehäufte Auftreten von Depression sein. Das Ziel dieser Arbeit war es: 1. den Einfluss einer T-Zell-vermittelten Immunreaktion auf die Neurogenese in verschiedenen Stadien der Inflammation zu charakterisieren und 2. mögliche (genomische) Regulationsmechanismen zu identifizieren, 3. hippocampale Neurogenese unter Dopamindepletion und den Einfluss von Fluoxetin auf diese zu beschreiben und 4. die neurogene Kapazität der Substantia nigra bei Dopamindepletion zu untersuchen.

Methodik

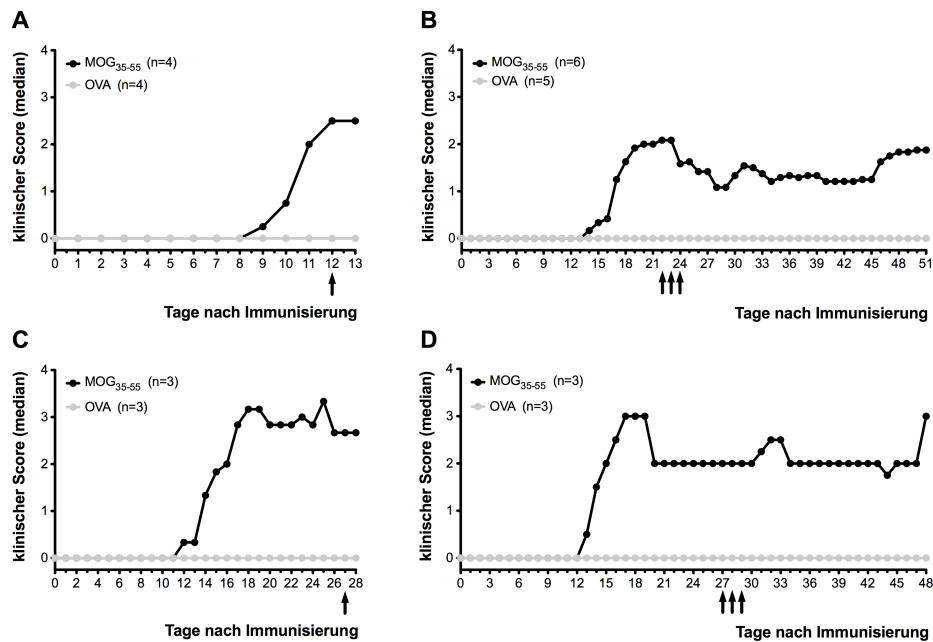
1 Tiere und Tiermodelle

1.1 Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) als Modell der MS

Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) wird seit den 1970er Jahren regelhaft als Tiermodell der Multiplen Sklerose verwendet, da sich mit ihr die MS-typischen klinischen und histopathologischen Charakteristika wie der schubförmig-remittierende Verlauf, die Demyelinisierung und (axonale) Neurodegeneration basierend auf einer T-Zell-vermittelten Immunreaktion gut simulieren lassen (19). Zur Induktion der EAE wurden adulten weiblichen C57BL/6 Mäusen Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein-Antigen (MOG₃₅₋₅₅), gelöst in komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA, beinhaltet 6 mg/ml Mycobacterium tuberculosis H37Ra) und Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS), subkutan appliziert (20). Die Kontrolltiere erhielten CFA mit Ovalbumin (OVA). Um die Suszeptibilität zu steigern wurde als weiteres Co-Adjuvans Pertussis-Toxin (PTX) benutzt, welches zweimalig im Abstand von 48 Stunden (h) allen Tieren intraperitoneal (i.p.) verabreicht wurde. Im Anschluss wurden die Tiere täglich gewogen und nach einer klinischen Skala bewertet, die Werte von 0 (gesund) bis 5 (tetraplegisch/ moribund/ tot) umfasste mit Zwischenintervallen von 0,5. Die Tiere entwickelten im Durchschnitt mit Tag 9 nach Immunisierung erste klinische Symptome.

Zur Beurteilung der Neurogenese unter Inflammation wurde einem Teil der Tiere im Krankheitsmaximum (Gruppe I) und einem anderen Teil in einer chronischen Phase (Gruppe II) das Thymidinanalogon 5-Bromo-2-deoxyuridin (BrdU) i.p. appliziert. Um Effekte dieser entzündlichen Milieus auf die Proliferation der Zellen zum Einen und die Differenzierung bzw. das Überleben der Zellen zum Anderen beurteilen zu können, wurden von beiden Gruppen jeweils Tiere 24 h (Gruppen Ia und IIa) oder 3 bis 4 Wochen (Gruppen Ib und IIb) nach BrdU-Injektion durch Anästhesie mit Ketamin und anschließende intrakardiale Perfusion getötet. Alle Experimente waren zuvor durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt. Abbildung (Abb.) 1 zeigt den Median des klinischen Scores in den jeweiligen Gruppen.

Abbildung 1: Median der klinischen Scores. **A**, Gruppe Ia: Injektion von BrdU im Krankheitsmaximum und Tötung der Tiere nach 24 h; **B**, Gruppe Ib: BrdU-Injektion an drei aufeinander folgenden Tagen im Erkrankungsmaximum und Tötung der Tiere nach 4 Wochen; **C**, Gruppe IIa: BrdU-Injektion in einer chronischen Phase der Erkrankung und Tötung nach 24 h; **D**, Gruppe IIb: Injektion von BrdU an drei aufeinander folgenden Tagen in der chronischen Phase und Tötung nach 3 Wochen. Die Injektionszeitpunkte von BrdU (50 mg/kg Körpergewicht (KG)/ Tag) sind durch Pfeile entlang der X-Achse dargestellt.



1.2 Das 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP)-Modell des IPS

MPTP, ein Opioid-Derivat, wurde in den 1980er Jahren bekannt, weil es bei Drogenabhängigen nach Einnahme eine Parkinson-ähnliche Symptomatik hervorrief, die auch histopathologisch auf eine Reduzierung dopaminerger Neurone zurückgeführt werden konnte (21). Seitdem wird MPTP zur Induktion eines Parkinson-Syndroms in Tierversuchen eingesetzt. Transgene, weibliche adulte C57BL/6 Mäuse, die das green fluorescent protein (GFP) unter dem Promotor Nestin exprimieren (22), wurden mit MPTP oder 0,9%iger Kochsalzlösung (NaCl, Sal) als Kontrolle an drei aufeinanderfolgenden Tagen i.p. injiziert. Am 3. Tag erhielten alle Tiere zusätzlich BrdU i.p. Ein Teil der Tiere wurde im Verlauf der Erkrankung verschiedener Verhaltenstests auf klinische Anzeichen depressiver Symptomatik unterzogen. Um den Einfluss des selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmers (SSRI) Fluoxetin auf die hippocampale Neurogenese und den klinischen Verlauf der depressiven Symptome zu untersuchen, wurden MPTP- und Kontrolltieren Fluoxetin (Fix) oder NaCl durch Schlündeln für 10 oder 28 Tage verabreicht. Die Tötung der Tiere erfolgte jeweils nach Ablauf der Behandlungsperiode durch tiefe Anästhesie mit Ketamin und anschließender intrakardialer Perfusion. Alle Experimente waren zuvor durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt. Abbildung 8 in (23) gibt den beschriebenen Versuchsaufbau schematisch wieder.

In einem weiteren Versuchsaufbau sollte die zelluläre Plastizität in der Substantia nigra im MPTP-Modell sowie der Einfluss verschiedener neurotropher Stimuli darauf untersucht werden. Die Induktion des IPS erfolgte analog wie oben beschrieben. Anschließend wurden MPTP- und Kontrolltiere in unterschiedlichen Käfigen gehalten: 1. Standardhaltung (STAN), 2. angereicherte Umgebung (ENR) und 3. mit Laufrad (RUN). Zusätzlich erfolgte bei einem weiteren Teil der Tiere eine Substitutionstherapie mit Levodopa und Benserazid i.p. über 10 Tage. Die Tötung der Tiere erfolgte nach oben genannter Methode nach 3, 10, 28 oder 70 Tagen. Alle Experimente waren zuvor durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt. Abbildung 6 in (24) zeigt den schematischen Aufbau.

2 Histologie und Zellquantifizierung

Nach der Fixierung der perfundierten Hirne in Paraformaldehyd (PFA), Dehydratation in Saccharose und Einfrieren in Methylbutan mittels flüssigem Stickstoff wurden mit einem Kryostat (Cryocut 1800, Reichert-Jung) koronare Schnitte des gesamten Hippocampus und der Substantia nigra von 40 µm Dicke hergestellt.

2.1 Immunhistochemie

Die Schnitte wurden mit 0,6%igem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) behandelt, für 30 Minuten (min) in Chlorwasserstoff (HCl) bei 37°C inkubiert und im Anschluss mit Boratpuffer und PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte bei 4°C über Nacht zusammen mit dem Primärantikörper anti-BrdU bzw. anti-Tyrosinhydroxylase (anti-TH) inkubiert und am Folgetag mit PBS gewaschen und für 2 h mit dem biotinylierten Zweitantikörper inkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit ABC Reagenz für 1 h. Als Chromogen wurde Diaminobenzidin (DAB) gelöst in PBS mit 0,01%igem H_2O_2 und Nickelchlorid verwendet. Nach abschließender Waschung erfolgte die Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe und die Schnitte wurden nach Vorbehandlung mit Xylol in Entellan eingedeckelt. Zur Bestimmung der absoluten Zahlen BrdU-positiver Zellen wurde jeder 6. Schnitt (240 µm Abstände) auf BrdU-Expression DAB-gefärbt und die positiven Zellen in beiden DG und der SN unter einem Lichtmikroskop (Nikon Eclipse E200) mit 40x Objektiv ausgezählt. Die so ermittelten Zahlen wurden im Anschluss mit sechs multipliziert um die Gesamtzahl pro Hirn zu erhalten.

2.2 Immunfluoreszenz

Nach Inkubation in HCl bei 37°C und anschließender Waschung mit Boratpuffer und PBS erfolgte die Applikation der Primärantikörper bei 4°C über Nacht. Die Inkubation

mit dem Zweitantikörper wurde bei Raumtemperatur für 4 h durchgeführt. Nach abschließender Waschung erfolgte die Eindeckelung in wasserlöslichem Eindeckmedium. Nach Färbung jedes 12. Schnittes wurden zur Quantifizierung der Zellsubpopulationen die BrdU-positiven Zellen mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops (Leica TCS SP2) gezählt und Kolokalisationen mit weiteren Markern durch Scannen von Z-Stapeln mittels 63x Objektiv identifiziert. Die so ermittelte Ratio wurde anschließend auf die Gesamtzahl BrdU-positiver Zellen angewandt, um die absolute Zahl pro Hirn zu erhalten.

3 Molekularbiologie (quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR))

Nach intrakardialer Perfusion mit PBS wurden die Hippocampi von EAE- und OVA-Tieren im Stadium akuter und chronischer autoimmuner Neuroinflammation extrahiert und die Ribonukleinsäuren (RNA) mit Hilfe des RNeasy bzw. RNA/Protein kit isoliert. Gleiches wurde mit MPTP- bzw. Kontrolltieren zum Zeitpunkt von 10 bzw. 28 Behandlungstagen durchgeführt. Die reverse Transkription erfolgte mittels TaqMan RT kit. Real-time PCR wurde jeweils mit zwei Proben mit dem ABI PRISM 7000 und dem SYBR Green Mix durchgeführt und je eine Probe ohne Reverse Transkriptase (RT) diente als Negativkontrolle. Die Menge an spezifischer Boten-RNA (mRNA) wurde normiert gegenüber Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bzw. glial fibrillary acid protein (GFAP) als interne Kontrolle.

4 Enzyme-linked immunoabsorbant assay (ELISA)

Die Tiere wurden durch intrakardiale Perfusion mit PBS getötet und die Hippocampi extrahiert und anschließend mittels Ultraschall für 20 Sekunden (s) in 0,7 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 0,1% NaN₃, Proteaseinhibitoren) homogenisiert. Das Homogenisat wurde zentrifugiert (13000 Umdrehungen/ min, 10 min, 4°C) und die Überstände gewonnen. Endogene vascular endothelial growth factor (VEGF) und brain derived neurotrophic factor (BDNF) Level wurden gemessen mit einem kommerziellen ELISA und angegeben als pg/mg Nassgewebe.

5 Zellkultur

Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet, die Hirne entnommen und in eisgekühlte Hank's Salzlösung platziert und anschließend die SN aseptisch präpariert. Neurosphären wurden in Neurobasal Medium (supplementiert mit 1% Glutamat, 2%

Vitamin-B27, 1% Penicillin/ Streptomycin, epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF)) gezüchtet. Nach zwei Wochen wurden die Zellen passagiert und in 96-Well-Platten transferiert. Die Wells enthielten NSCs in absteigenden Konzentrationen (1:2 Verdünnungen von 5 bis 20000 Zellen/ Well). Nach 7 Tagen *in vitro* wurde die Fraktion der Wells, in denen keine Neurosphären gewachsen sind, bestimmt. Die Daten wurden logarithmisch transformiert und die Kurve angepasst mit der Origin 5.0 Software. Der Schnittpunkt von log (37%) spiegelt die Frequenz der Zellen wider, die in der Lage sind zu proliferieren und Neurosphären zu bilden.

6 Verhaltensexperimente

Nach einer zweiwöchigen Akklimatisierungsphase an den Untersucher, wurden MPTP- und Kontrolltiere folgenden Verhaltenstests unterzogen:

6.1 Light/ dark box

Dieses System (TSE) besteht aus einem Kompartiment, das durch eine Plastikwand mit einer 6 × 7 cm Öffnung in zwei gleichgroße Kammern geteilt ist, wovon eine hell erleuchtet (600 lx) und die zweite verdunkelt ist. Infrarotsensoren messen die Bewegung des Tieres. Das Tier wurde in die dunkle Kammer platziert und über einen Zeitraum von 5 min die Latenz bis zum Transfer in die erleuchtete Kammer, die Gesamtanzahl der Transfers und die Gesamtzeit, die das Tier in der hellen Kammer verbringt, gemessen.

6.2 Startle response box

Die Tiere wurden in einen Käfig von 90 × 40 × 40 mm platziert. Der Käfig besteht aus Edelstahlgitterstäben (4 mm Durchmesser in 8,9 mm Abständen) und einem verschiebbaren Boden mit einem Sensor, der vertikale Bewegungen detektiert. Der Käfig wird in eine schallgedämpfte Kammer (TSE) platziert. Die Schreckreaktion wird durch einen akustischen Reiz ausgelöst. Die Reaktionslatenz und die vertikal ausgeübte Kraft werden über den Sensor über einen Zeitraum von 260 ms aufgezeichnet. Zunächst wurden die Tiere über 5 min an den 65 dB starken Hintergrundton gewöhnt. Anschließend wurden drei verschiedene akustische Stimuli von 90, 105 und 120 dB für jeweils 40 ms appliziert in einer randomisierten Abfolge. Die Reaktionen aus je 10 Versuchen pro Stimulus pro Tier wurden aufgezeichnet.

6.3 Shuttle box

Dieses System (TSE) besteht aus einer Kammer mit einem Gitterrostfußboden (4 mm Durchmesser in 8,9 mm Abständen). Zwei flexibel einsetzbare Wände, eine mit einer

Öffnung ausgestattet, erlauben die Teilung der Kammer in zwei separate Kompartimente während der Konditionierung und zwei verbundene Kompartimente während der Testphase. Ein Generator appliziert randomisiert Elektroschocks von 0,2 mA Stärke über die Gitterroststäbe. Zur Konditionierung wurden die Tiere in die Kammer mit zwei separaten Kompartimenten gesetzt und für 32 min unausweichlichen Schocks (0,2 mA Stärke, 200 ms Dauer) ausgesetzt. Die Konditionierung wurde 24 h später wiederholt. In der Testphase wurden die Tiere in die Kammer gesetzt, die nun durch die Wand mit der Öffnung in zwei Kompartimente unterteilt war. Nach einer Habituation von 2 min wurden 30 ausweichliche Schocks (0,2 mA Stärke, 10 s Dauer) appliziert. Jeder Schock wurde von einem Lichtsignal eingeleitet, welches 5 s zuvor aufleuchtete. Der Transfer in die benachbarte Kammer während des Licht- oder Schockimpulses resultierte in einem Abbruch des Experiments. So konnte zwischen Verhalten aktiver Vermeidung (Transfer während des Lichtimpulses und vor Schockapplikation), Fluchtverhalten (Transfer während des Schocks) und Inaktivität unterschieden werden.

7 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Die PCR-Expressionsdaten wurden gegenüber der internen Kontrolle (GFAP, GAPDH) und dann auf die Kontrolltiere normalisiert und sind als Differenz gegenüber der Kontrolle \pm SEM angegeben. Für die statistische Analyse und graphische Aufarbeitung kam Statview 5.0.1 bzw. Graphpad Prism 5.1 zum Einsatz. Nach einer Analyse hinsichtlich Normalverteilung (Shapiro-Wilk) wurden für Vergleiche von zwei Gruppen ungepaarte t-Tests verwendet. Unterschiede wurden als statistisch signifikant gewertet bei $p \leq 0,05$. Für Vergleiche mehrerer Gruppen gegeneinander wurde eine one-way ANOVA durchgeführt. Im Falle von Signifikanzen ($p \leq 0,05$) schloss sich eine post hoc Analyse (Tukey) für multiple Vergleiche an. Für Analysen mit zwei Variablen wurde eine two-way ANOVA mit den Faktoren Behandlung und Intervention sowie eine Interaktionsanalyse durchgeführt. Im Falle von statistischen Signifikanzen ($p \leq 0,05$) folgte eine Holm-Sidak post hoc Analyse für multiple Vergleiche.

Tabelle 1 fasst die verwendeten Substanzen mit ihren Verdünnungen bzw. Dosierungen zusammen:

Substanz	Abkürzung	Lösungsverhältnis/ Dosis	Hersteller
ABC-Reagenz	ABC	9 µl/ml	Vector Laboratories
BDNF ELISA kit	BDNF ELISA		Promega
Benserazid	Benserazid	0,5 mg/ml, 5 mg/kg KG	Sigma-Aldrich
5-Bromo-2-deoxyuridin	BrdU	5 mg/ml, 50 mg/kg KG	Sigma-Aldrich
5-Bromo-2-deoxyuridin-Antikörper	Anti-BrdU	1:500	Harlan-Seralab
Chlorwasserstoff	HCl	2 N	Sigma-Aldrich
CNPase-Antikörper	Anti-CNPase	1:1000	Abcam
Cyanin5	Cy5	1:250	Dianova
Diaminobenzidin	DAB	0,025 mg/ml	Sigma-Aldrich
Doublecortin-Antikörper	Anti-Dcx	1:250	SantaCruz Biotechnology
Epidermal growth factor	EGF	20 ng/ml	Biochrom AG
Entellan	Entellan	unverdünnt	Sigma-Aldrich
Fibroblast Growth Factor	FGF-2	20 ng/ml	Biochrom AG
Fluorescein Isothiocyanat	FITC	1:250	Dianova
Fluoxetin	Flx	2 mg/ml, 20 mg/kg KG	Genericon Austria
Glial fibrillary acid protein-Antikörper	Anti-GFAP	1:1000	Advanced ImmunoChemistry
Hank's Salzlösung	HBSS	unverdünnt	Gibco
Hes5-Antikörper	Anti-Hes5	1:250	Millipore
Komplettes Freund'sches Adjuvans	CFA	1+1	Difco
Levodopa	L-Dopa	2 mg/ml, 20 mg/kg KG	Ferak Berlin
Methylbutan	C ₁₅ H ₁₂	unverdünnt	Sigma-Aldrich
1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin	MPTP	2 mg/ml, 20 mg/kg KG	Sigma-Aldrich
Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein	MOG ₃₅₋₅₅	1,25 mg/ml, 12,5 mg/kg KG	Pepceuticals
NeuroD6-Antikörper	Anti-NeuroD6	1:500	Abcam
Neuronal Nuclei-Antikörper	Anti-NeuN	1:500	Millipore
Neurobasal Medium	NBM	unverdünnt	Life Technologies
Neuron-glial antigen 2-Antikörper	Anti-NG2	1:200	Chemicon International
Neurogenin 2-Antikörper	Anti-Ngn2	1:500	SantaCruz Biotechnology
Nickelchlorid	Ni ₂ Cl	0,4 ml/l	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd	PFA	40 g/l	Sigma-Aldrich
Pertussis-Toxin	PTX	1 ng/ml, 1 µg/kg KG	Sigma-Aldrich
Rhodamin	Rhod	1:250	Dianova
RNA/Protein kit	RNA/Protein		Macherey-Nagel
RNeasy kit	RNeasy		NucleoSpin
Saccharose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	200 g/l	Sigma-Aldrich
SYBR Green qPCR SuperMix-UDG	SYBR Green		Invitrogen
TaqMan RT kit	TaqMan		Applied Biosystems
Tetraborat	Borat, B ₄ O ₅ (OH) ₄ ²⁻	0,1 M	Sigma-Aldrich
Tyrosinhydroxylase-Antikörper	Anti-TH	1:10000	Sigma-Aldrich
Triton X-100 10%	Triton	10 ml/l	Sigma-Aldrich
VEGF ELISA kit	VEGF ELISA		R&D Systems Inc.
Wasserstoffperoxid 30%	H ₂ O ₂	20 ml/l	Sigma-Aldrich
Xylol	Xylol	unverdünnt	Sigma-Aldrich

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Substanzen mit ihren Dosierungen bzw. Verdünnungen.

Ergebnisse

1 Autoimmune Neuroinflammation führt zu initialer hippocampaler Zellproliferation aber gestörter Zelldifferenzierung zu reifen Neuronen

Um die Zellproliferation unter autoimmuner Inflammation zu beurteilen, wurde einem Teil der Tiere in der Akutphase der Erkrankung und einem anderen Teil in einer chronischen Phase das Thymidinanalogon BrdU injiziert, das sich folgend in die DNA proliferierender Zellen einbaut. Es zeigte sich, dass die gegen das zentrale Myelin gerichtete Neuroinflammation in der Akutphase der Erkrankung zu einer erhöhten Zellproliferation im Hippocampus führt. Dies war angedeutet bereits nach 24 h (Gruppe

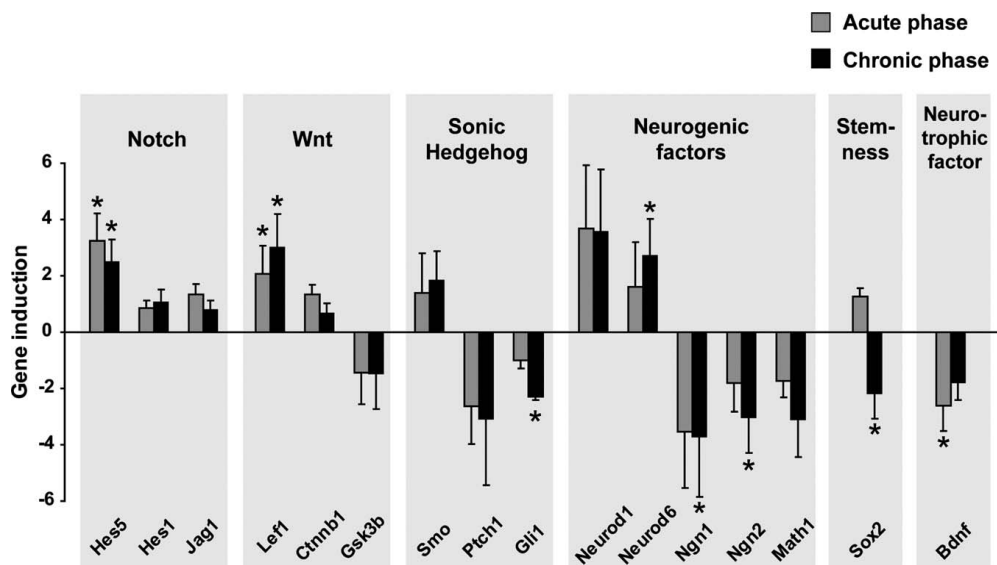
la), aber v.a. für den späten Zeitpunkt (Gruppe lb) nachweisbar (la: MOG 3889,5±756,8 vs. OVA 2509,5±610,6, p=0,20; lb: MOG 792±65,3 vs. OVA 309,6±74,1, p=0,0008). Auch im chronischen Krankheitsstadium war die Zellproliferation (Gruppe IIa) in EAE-Tieren gesteigert und noch deutlicher wurde dies nach 4 Wochen (Gruppe IIb) (IIa: MOG 1452±270,5 vs. OVA 712±150,6, p=0,075; IIb: MOG 568±80,3 vs. OVA 184±34,2, p=0,012). Die EAE-Tiere wiesen auch ein zum Teil signifikant höheres Überleben neu entstandener Zellen auf sowohl in der akuten als auch in der chronischen Phase (akut: MOG 24±2% vs. OVA 14,8±3,6%, p=0,043; chronisch: MOG 41,7±5,9% vs. OVA 27,99±5,2%, p=0,16). Hierbei scheint v.a. chronische Neuroinflammation einen positiven Stimulus darzustellen (akut 24±2% vs. chronisch 41,7±5,9%; p=0,0078; siehe Abb. 3A in (25)). Besonders die neuronalen Vorläuferzellen profitierten von den proliferativen Effekten. Doublecortin (Dcx)-positive Zellen repräsentieren eine solche Kohorte unreifer postmitotischer Neurone. Bereits nach 24 h war ein Trend, v.a. unter chronischer Neuroinflammation, in den EAE-Tieren absehbar (la: MOG 2310,6±350,9 vs. OVA 1319,6±364,7, p=0,098; IIa: MOG 750,8±135,1 vs. OVA 371,6±8,0, p=0,0573). Nach 4 Wochen waren die Unterschiede zum Teil noch ausgeprägter (lb: MOG 396±49,2 vs. OVA 132±26,3, p=0,0016; IIb: MOG 276±96 vs. OVA 140±98,6; p=0,3789), was als ein gesteigertes Überleben dieser Zellen oder als eine verlangsamte Differenzierung interpretiert werden kann. Dies wurde auch in den prozentualen Zahlen reflektiert (MOG 19±2,4% vs. OVA 12,12±2,41%, p=0,073; siehe Abb. 3B in (25)). Zusammengefasst konnte unter Neuroinflammation eine Steigerung der Bildung von NPCs nachgewiesen werden.

Dies legte die Hypothese nahe, dass auch die Zahl neuer reifer Neurone, erkennbar an der Koexpression von Neuronal Nuclei (NeuN), in EAE-Tieren erhöht ist. Passend hierzu konnte ein Trend v.a. während der chronischen Phase nachgewiesen werden (lb: MOG 75,4±17,2 vs. OVA 64,1±10,6, p=0,6068; IIb: MOG 36±6,9 vs. OVA 12±6,9, p=0,0705). Eine Analyse des prozentualen Anteils NeuN-positiver Zellen an der Gesamtheit proliferierender Zellen zeigte jedoch eine (signifikant) verringerte Kapazität in der Ausreifung von NPCs zu reifen Neuronen (lb: MOG 9,8±2,2% vs. OVA 22,5±2,9%, p=0,0059; IIb: MOG 6±2,4% vs. OVA 8,1±4,8%, p=0,8448). Zugleich fanden sich mehr neu entstandene Gliazellen, erkennbar an der Koexpression von GFAP (lb: MOG 62±14 vs. OVA 7,2±4,8, p=0,0109; IIb: MOG 68±10,6 vs. OVA 8±4, p=0,0061). Dies konnte auch prozentual an der Gesamtheit neu entstandener Zellen nachvollzogen werden (lb: MOG 8,5±2,4% vs. OVA 2,1±1,3%, p=0,0558; IIb: MOG

11,8±3,6% vs. OVA 2,4±1,5%, p=0,0721; siehe Abb. 3C in (25)). Somit konnte gezeigt werden, dass eine autoimmune Neuroinflammation einen Reiz für das Gehirn darstellt, der Neurodegeneration mit gesteigerter Zellproliferation entgegenzuwirken, die Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen zu reifen Neuronen aber gestört ist.

Um sich den hierfür zugrundeliegenden Pathomechanismen zu nähern, wurde eine Evaluierung der Expression verschiedener an der Neuro- und Gliogenese beteiligter Transkriptionsfaktoren vorgenommen. In EAE-Tieren waren Faktoren, welche die Neurogenese fördern (Neurogenin1 und 2 (Ngn1, Ngn2) (26), Sox2 (27)), signifikant herabreguliert gemessen an den Kontrolltieren (Ngn1: -3,7±2,15, p=0,037; Ngn2: -3,02±1,27, p=0,011; Sox2: -2,17±0,9, p=0,051). Faktoren, die die gliale Ausreifung fördern, wie Hes5 (26), zeigten sich signifikant hochreguliert (2,49±0,81, p=0,044). Gleichsam fand sich eine mit -2,62±0,9 (p=0,031) signifikant abgeschwächte Expression von BDNF, der ein wichtiger Faktor für die Differenzierung neuronaler Vorläufer ist (28). Transkriptionsfaktoren des Wnt/ β -catenin-Signalweges zeigten sich, übereinstimmend mit den histologischen Daten, hochreguliert, da sie v.a. Proliferation von NPCs im DG fördern (Lef1: 3,01±1,18, p=0,003, NeuroD1: 3,55±2,22, p=0,424; siehe Abb. 2) (29).

Abbildung 2: Genexpressionsanalyse aus dem adulten Hippocampus von EAE-Tieren. qPCR wurde für Faktoren des Notch-, Wnt-, Shh-Signalweges sowie neurogenetische und neurotrophe Faktoren durchgeführt. Dargestellt ist die Differenz nach Normalisierung auf die Kontrolltiere (OVA).



Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass es unter autoimmuner Neuroinflammation zu einer verzögerten Ausdifferenzierung neuronaler Vorläuferzellen

oder gar zu einer Transdifferenzierung von NPCs hin zu Gliazellen im Sinne einer reaktiven Gliose kommen könnte.

2 Dopamindepletion steigert selektiv die Proliferation von Typ1- und Typ2a-Zellen bei eingeschränkter Differenzierung zu reifen Neuronen

Im Tiermodell des IPS kommt es nach Applikation von MPTP zu einer Verringerung von dopaminergen Neuronen in der SN, die nachweisbar ist durch eine verminderte Expression des Enzyms Tyrosinhydroxylase (10 Tage: CTR 2712±57 vs. MPTP 1611±45, p= 0,001; 28 Tage: CTR 2406±150 vs. MPTP 1482±132, p=0,003; siehe Abb. 2C in (23)). Diese zellulären Veränderungen führten jedoch nicht zu ängstlich-depressivem Verhalten der Tiere im Sinne einer Parkinson-assoziierten Depression (siehe Abb. 7 in (23)). Passend hierzu fanden sich keine Unterschiede in der Expression des 5HT1A-Rezeptors im DG, außer einer tendenziellen Verringerung nach SSRI-Behandlung, am ehesten im Sinne eines negativen Rückkopplungsmechanismus (CTR+Flx 0,124±0,182 vs. CTR+Sal 1±0,182, p=0,004; MPTP+Flx 0,294±0,163 vs. MPTP+Sal 0,641±0,163, p=0,155; siehe Abb. 1A in (23)). Die MPTP-induzierte Dopamindepletion führte zu einer leichten Zunahme der Expression von Dopamin-2-Rezeptoren im DG (CTR 0,641±0,173 vs. MPTP 1,103±0,154, p=0,066; siehe Abb. 1C in (23)). Weiterhin ließ sich tendenziell eine reaktive Zellproliferation unter Dopamindepletion im DG nachweisen. Fluoxetin war in der Lage, diesen Effekt zu verstärken (MPTP+Flx 432±24,59 vs. CTR+Flx 308,4±24,04 und CTR+Sal 328±19,33, p=0,016; siehe Abb. 3C in (23)). Besonders die Typ1- und Typ2a-Zellen profitierten von der Zellproliferation unter Dopaminmangel (10 Tage: MPTP 87,4±8,05 vs. CTR 44,2±4,59, p=0,0012; 28 Tage: MPTP 62±6,72 vs. CTR 22±1,32, p=0,0001). Auch hier wurde dieser Effekt durch Fluoxetin weiter begünstigt (10 Tage: MPTP+Flx 145±10,92 vs. MPTP+Sal 87,4±8,05, p=0,0001; 28 Tage: MPTP+Flx 103,6±5,95 vs. MPTP+Sal 62±6,72, p=0,0001, CTR+Flx 47,17±3,8 vs. CTR+Sal 22±1,32, p=0,0008; siehe Abb. 4A in (23)). Typ 1- und Typ 2a-Zellen sind gekennzeichnet durch ihre Koexpression von Nestin und repräsentieren eine Zellsubpopulation mit stammzellartigen, glialen Charakteristika, die als Ursprung unreifer Neurone gelten (30). Passend hierzu fand sich folgend eine gesteigerte Proliferation von Typ2b-Zellen unter MPTP, die eine Koexpression von Nestin mit dem Marker unreifer Neurone Dcx aufwiesen (10 Tage: MPTP 383,8±32,38 vs. CTR 143,6±14,87, p=0,0001; 28 Tage: MPTP 55±6,03 vs. CTR 17±0,97, p=0,0001; siehe Abb. 4B in (23)). Allerdings waren initial unter MPTP weniger

neu entstandene Typ3-Zellen, unreife Neuronen mit solitärer Expression von Dcx, nachweisbar (10 Tage: MPTP $410,6 \pm 38,33$ vs. CTR $581,8 \pm 60,61$, $p=0,016$). Dieser Effekt kehrte sich später um (28 Tage: MPTP $97 \pm 10,57$ vs. CTR $53,67 \pm 3,22$, $p=0,0001$; siehe Abb. 4C in (23)). Dies könnte auf einen verzögerten Differenzierungsprozess von NSCs und NPCs zu unreifen Neuronen unter Dopaminmangel zurückzuführen sein. Ähnliche Resultate fanden sich auch für die reifen Neuronen, die durch Koexpression von Neuronal Nuclei (NeuN) mit BrdU charakterisiert wurden. Allerdings kam es hier nach der initial erniedrigten Anzahl unter Dopamindepletion (MPTP $109,77 \pm 10,22$ vs. CTR $149,73 \pm 15,62$, $p=0,032$) nach 4 Wochen nicht zu einer gesteigerten Proliferation reifer Neuronen. Fluoxetin konnte aber diese Verminderung ausgleichen (MPTP+Flx $154,51 \pm 11,74$ vs. MPTP+Sal $109,77 \pm 10,22$, $p=0,0186$; siehe Abb. 4D in (23)). Die Effekte von Fluoxetin auf die Zellproliferation der NSCs und NPCs könnten partiell über VEGF und BDNF vermittelt sein, da größere Mengen hierunter nachweisbar waren (VEGF: CTR+Flx $23,75 \pm 5,01$ vs. CTR±Sal $12,4 \pm 1,44$, $p=0,017$; MPTP+Flx $17,42 \pm 3,36$ vs. MPTP+Sal $9,58 \pm 1,11$, $p=0,068$; BDNF: CTR+Flx $225,06 \pm 141,34$ vs. CTR+Sal $10,82 \pm 1,18$, $p=0,0266$; MPTP+Flx $90,13 \pm 25,67$ vs. MPTP+Sal $14,54 \pm 2,54$, $p=0,096$; siehe Abb. 6A+B in (23)).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Dopamindepletion nicht zu depressiven Verhaltensänderungen im MPTP-Modell führt. Sie stellt aber einen Stimulus für eine gesteigerte Zellproliferation von NSCs und NPCs dar, welche durch Behandlung mit dem SSRI Fluoxetin noch partiell verstärkt werden kann. Aber auch unter Dopaminmangel resultiert diese initiale Zellproliferation nicht in einer erhöhten Anzahl reifer Neuronen, sodass festzustellen bleibt, dass auch hier die Differenzierung von NPCs zu reifen Neuronen entweder verzögert oder gestört ist.

3 Gestörte Oligodendrogenese in der Substantia nigra unter Dopamindepletion

Im Gegensatz zum DG zählt die SN nicht zu den neurogenen Zonen des adulten Gehirns. Der Mangel dopaminergener Neurone unter MPTP (siehe Abb. 7B in (24)) führte aber auch hier zu einer initialen Zellproliferation, wenn auch in geringerem Ausmaß. Dopaminsubstitution steigerte signifikant die Anzahl proliferierender Zellen selektiv in MPTP-behandelten Tieren (siehe Abb. 1B-D in (24)). Ein großer Anteil der neu entstandenen Zellen exprimierte das Proteoglykan NG2, das als Marker für oligodendrozytäre Vorläuferzellen (OPCs) gilt. Bis auf die sehr frühe Phase (3 Tage) fanden sich keine Unterschiede in der Zahl dieser Zellen zwischen MPTP und

Kontrollen. L-Dopa-Gabe steigerte selektiv in MPTP-Tieren die Proliferation von neuen NG2-Zellen (siehe Abb. 3A-B in (24)). Der prozentuale Anteil NG2-positiver Zellen sank über die Zeit von initial 48% (MPTP) bzw. 56% (CTR) auf 25% (MPTP) bzw. 13% (CTR) (siehe Abb. 2A in (24)). Dies ist am ehesten auf eine Zellreifung hin zu reifen Oligodendrozyten zurückzuführen. Gleichförmig zur Abnahme der NG2-Zellen war ein Anstieg von neuen reifen Oligodendrozyten, gekennzeichnet durch die Koexpression von 2,3-Cyclic-nucleotid-3-phosphodiesterase (CNPase), in den Kontrolltieren zu verzeichnen. Unter MPTP allerdings stagnierte diese Zellzahl zwischen 10-13% (siehe Abb. 2A in (24)), sodass hier von einer gestörten Oligodendrogenese ausgegangen werden muss, die nicht durch L-Dopa-Substitution reversibel war (siehe Abb. 3C-D in (24)).

Eine sehr kleine Subpopulation der proliferierenden Zellen in der SN wies Charakteristika von NSCs auf, wie die Expression von Nestin. Der initial transiente Anstieg von proliferierenden NSCs unter MPTP (siehe Abb. 3E-F in (24)) ließ sich nachfolgend nicht durch den Nachweis von NPCs, reifen Neuronen oder Astrozyten replizieren, was die bisherige Annahme, dass die SN keine neurogene Zone im adulten Hirn darstellt, stützt. Auch unter neurotrophen Stimuli (ENR, RUN) ließ sich unter MPTP im Gegensatz zu gesunden Kontrollen keine Zellproliferation nachweisen, was Rückschlüsse auf die Notwendigkeit von Dopamin für diesen Prozess zulässt (siehe Abb. 4A in (24)). Diese Hypothese wird weiter gestützt durch die Beobachtung, dass dies selektiv in MPTP-Tieren durch Dopaminsubstitution ausgeglichen werden konnte (siehe Abb. 4B in (24)). Die Zellproliferation von OPCs war auch unter neurotrophen Stimuli in MPTP-Tieren eingeschränkt gegenüber gesunden Kontrollen. Auch dies ließ sich selektiv durch Dopamingabe wieder ausgleichen (siehe Abb. 4C-D in (24)).

Letztlich sollte noch evaluiert werden, ob die in der SN nachweisbaren NSCs unter neurogenen Bedingungen *in vitro* die Kapazität besitzen Neurosphären zu bilden. Nach 7-10 Tagen in Kultur zeigte sich eine deutlich reduzierte Kolonie-bildende Aktivität der NSCs aus der SN verglichen mit der Subventrikulärzone (SVZ), wobei sich kein Unterschied zwischen MPTP- und Kontrolltieren zeigte (siehe Abb. 5 in (24)).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die reaktive Zellproliferation in der SN unter MPTP zu keinem weiteren Effekt führt. Weiterhin ist die Oligodendrogenese unter MPTP deutlich eingeschränkt und kann auch durch Dopaminsubstitution nur partiell wiederhergestellt werden. Schließlich konnte gezeigt werden, dass die Stimulus-induzierte Zellproliferation in der SN dopaminabhängig ist. Die Kapazität der NSCs der

SN Neurosphären zu bilden bleibt selbst unter optimalen Bedingungen *in vitro* hinter den bekannten neurogenen Zonen wie dem DG und der SVZ zurück.

Diskussion

1 Beitrag lokaler und systemischer Inflammation an der Regulation der endogenen Neurogenese

In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Zellproliferation unter autoimmuner Neuroinflammation im DG gesteigert ist. Die Mehrzahl dieser Zellen exprimiert Dcx, den Marker für unreife Neuronen. Das lässt schlussfolgern, dass diese Autoimmunantwort einen Stimulus für die Zellproliferation darstellt, wie schon zuvor gezeigt werden konnte (12). Allerdings fanden sich eine Beeinträchtigung der Differenzierung von NPCs zu reifen Neuronen sowie eine erhöhte Anzahl von neu entstandenen Gliazellen, die den pro-glialen Transkriptionsfaktor Hes5 exprimierten. Diese Zellen gehören zu der Typ1-Zellsubpopulation neuronaler Vorläufer. Es scheint, dass gerade diese Zellen selektiv auf externe Stimuli reagieren (31). So konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine chronische Neuroinflammation wie in der EAE zu einer vermehrten Inaktivierung der NPCs in der SVZ führt (32), die eine Verzögerung in der Neurogenese nach sich ziehen würde. Ähnliches könnte auch im DG der Fall sein. Allerdings wurde auch gezeigt, dass unreife Neuronen noch während der Differenzierung „umprogrammiert“ werden können zu glialen Zellen und somit die Kapazität einer multipotenten Stammzelle behalten (33). Tatsächlich scheinen auch Dcx-positive Zellen Oligodendrozyten generieren zu können und in Läsionen mit Demyelinisierung einzuwandern (34). Dass das Immunsystem eng mit neurobiologischen Prozessen wie adulter Neurogenese, kognitiven Funktionen und Verhaltensänderungen in Verbindung steht, konnte bereits mehrfach gezeigt werden (35, 36). Aber insbesondere für die Neurogenese scheint der Einfluss immunkompetenter Zellen wichtig zu sein, gerade unter pathologischen Immunveränderungen (11, 37). Auch für systemische Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematoses, Diabetes mellitus Typ 1 oder Rheumatoide Arthritis konnten Veränderungen in der Neurogenese nachgewiesen werden (8, 9, 38). Da auch viele primär neurodegenerative Erkrankungen mit immunologischen Reaktionen und beeinträchtigter Neurogenese einhergehen (39-41), ist ein besseres Verständnis der

molekularen Mechanismen, über die Immunzellen die Neurogenese regulieren, dringend erforderlich, um so neue unterstützende Therapiestrategien zu entwickeln.

2 Korrelation von hippocampaler Neurogenese und kognitiven Defiziten bei MS und Parkinson

Kognitive Defizite sind neben sensomotorischen Symptomen sehr häufige Beeinträchtigungen bei Patienten mit MS und treten in 40-70% aller Fälle auf (42). Während Demenz in Zusammenhang mit MS ein eher selteneres Phänomen ist, so sind hauptsächlich Lernen und Gedächtnis, Aufmerksamkeit, Informationsverarbeitung und exekutive Funktionen betroffen (42). Hinzu kommt, dass spezifische Areale, die wesentlich für diese kognitiven Funktionen sind, besonders anfällig für die Pathologie der MS zu sein scheinen. So haben radiologische Studien gezeigt, dass neben der weißen Substanz und den motorischen Kortexarealen besonders auch der Frontal- und Temporalkortex von Atrophie betroffen sind (43, 44). Auch der Hippocampus zählt zu einer Region, die empfindlich gegenüber (autoimmuner) Inflammation ist. Sowohl tierexperimentell als auch in klinischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass es zu einer hippocampalen Atrophie kommt, die zum Teil auch mit signifikanten Veränderungen in Verhaltens- und neuropsychologischen Tests einhergeht (45, 46). Parkinson-Patienten auf der anderen Seite haben ohnehin ein fünf- bis sechsfach erhöhtes Risiko eine Demenz zu entwickeln. Zusätzlich treten bei vielen aber auch kognitive Defizite, oft auch schon in einer frühen Phase der Erkrankung, auf (47). Auch hier fanden sich ähnlich wie bei MS-Patienten Atrophien im präfrontalen Kortex sowie dem (para-)limbischen System einschließlich des Hippocampus (48). Da der Hippocampus mitentscheidend für Lernvorgänge und (räumliches) Gedächtnis ist (49), kann geschlussfolgert werden, dass ein Teil der Defizite dieser Patienten auf die Pathologien dort zurückzuführen ist. Inwieweit adulte Neurogenese zur Intaktheit dieser Vorgänge notwendig ist, konnte noch nicht vollständig geklärt werden. Allerdings wurde in tierexperimentellen Arbeiten bereits belegt, dass neu entstandene hippocampale Neurone zur Flexibilität innerhalb der Lernvorgänge beitragen (50). Zudem untermauern Arbeiten, in denen eine Störung der hippocampalen Neurogenese nachgewiesen wurde, die auch mit klinischen Defiziten korrelierte, eine solche kausale Beziehung von adulter Neurogenese und kognitiven Funktionen (51, 52). Somit kann eventuell über eine Beeinflussung der Neurogenese auch Einfluss auf die Klinik genommen werden, was neue Behandlungsstrategien eröffnet.

Literaturverzeichnis

1. Espósito MS, Piatti VC, Laplagne DA, et al. Neuronal Differentiation in the Adult Hippocampus Recapitulates Embryonic Development. *J Neurosci* 2005;25(44):10074-86.
2. Li G, Pleasure SJ. Ongoing interplay between the neural network and neurogenesis in the adult hippocampus. *Curr Opin Neurobiol* 2010;20(1):126-33.
3. Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, et al. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 2004;27(8):447-52.
4. Zhao M, Momma S, Delfani K, et al. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *P Natl Acad Sci* 2003;100(13):7925-30.
5. Gibb WRG. Functional Neuropathology in Parkinson's Disease. *Eur Neurol* 1997;38(Suppl. 2):21-5.
6. Hauser SL, Oksenberg JR. The Neurobiology of Multiple Sclerosis: Genes, Inflammation, and Neurodegeneration. *Neuron* 2006;52(1):61-76.
7. Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells in human neurodegenerative disorders — time for clinical translation? *J Clin Invest* 2010;120(1):29-40.
8. Beauquis J, Homo-Delarche F, Revsin Y, et al. Brain alterations in autoimmune and pharmacological models of diabetes mellitus: focus on hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis disturbances. *Neuroimmunomodulation* 2008;15(1):61-7.
9. Wolf SA, Steiner B, Wengner A, et al. Adaptive peripheral immune response increases proliferation of neural precursor cells in the adult hippocampus. *FASEB J* 2009;23(9):3121-8.
10. Ideguchi M, Shinoyama M, Gomi M, et al. Immune or inflammatory response by the host brain suppresses neuronal differentiation of transplanted ES cell-derived neural precursor cells. *J Neurosci Res* 2008;86(9):1936-43.
11. Monje ML, Toda H, Palmer TD. Inflammatory Blockade Restores Adult Hippocampal Neurogenesis. *Science* 2003;302(5651):1760-5.
12. Aharoni R, Arnon R, Eilam R. Neurogenesis and Neuroprotection Induced by Peripheral Immunomodulatory Treatment of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Neurosci* 2005;25(36):8217-28.
13. Hoglinger GU, Rizk P, Muriel MP, et al. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci* 2004;7(7):726-35.
14. Park J-H, Enikolopov G. Transient elevation of adult hippocampal neurogenesis after dopamine depletion. *Exp Neurol* 2010;222(2):267-76.
15. Snyder JS, Soumier A, Brewer M, et al. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature* 2011;476(7361):458-61.
16. Kronenberg G, Kirste I, Inta D, et al. Reduced hippocampal neurogenesis in the GR(+/-) genetic mouse model of depression. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2009;259(8):499-504.
17. Patten SB, Beck CA, Williams JVA, et al. Major depression in multiple sclerosis. *Neurology* 2003;61(11):1524-7.
18. Nilsson FM, Kessing LV, Sørensen TM, et al. Major depressive disorder in Parkinson's disease: a register-based study. *Acta Psychiatr Scand* 2002;106(3):202-11.
19. Steinman L. Assessment of Animal Models for MS and Demyelinating Disease in the Design of Rational Therapy. *Neuron* 1999;24(3):511-4.
20. Aktas O, Waiczies S, Smorodchenko A, et al. Treatment of Relapsing Paralysis in Experimental Encephalomyelitis by Targeting Th1 Cells through Atorvastatin. *J Exp Med* 2003;197(6):725-33.

21. Brust JCM. Substance abuse and movement disorders. *Movement Disord* 2010;25(13):2010-20.
22. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RDG. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 1990;60(4):585-95.
23. Lesemann A, Reinel C, Hühnchen P, et al. MPTP-induced hippocampal effects on serotonin, dopamine, neurotrophins, adult neurogenesis and depression-like behavior are partially influenced by fluoxetine in adult mice. *Brain Res* 2012;1457(0):51-69.
24. Klaisle P, Lesemann A, Huehnchen P, et al. Physical activity and environmental enrichment regulate the generation of neural precursors in the adult mouse substantia nigra in a dopamine-dependent manner. *BMC Neurosci* 2012;13(1):132.
25. Huehnchen P, Prozorovski T, Klaisle P, et al. Modulation of adult hippocampal neurogenesis during myelin-directed autoimmune neuroinflammation. *Glia* 2011;59(1):132-42.
26. Kageyama R, Ohtsuka T, Kobayashi T. The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. *Development* 2007;134(7):1243-51.
27. Episkopou V. SOX2 functions in adult neural stem cells. *Trends Neurosci* 2005;28(5):219-21.
28. Ahmed S, Reynolds B, Weiss S. BDNF enhances the differentiation but not the survival of CNS stem cell- derived neuronal precursors. *J Neurosci* 1995;15(8):5765-78.
29. Galceran J, Miyashita-Lin EM, Devaney E, et al. Hippocampus development and generation of dentate gyrus granule cells is regulated by LEF1. *Development* 2000;127(3):469-82.
30. Steiner B, Klempin F, Wang L, et al. Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia* 2006;54(8):805-14.
31. Lugert S, Basak O, Knuckles P, et al. Quiescent and Active Hippocampal Neural Stem Cells with Distinct Morphologies Respond Selectively to Physiological and Pathological Stimuli and Aging. *Cell Stem Cell* 2010;6(5):445-56.
32. Pluchino S, Muzio L, Imitola J, et al. Persistent inflammation alters the function of the endogenous brain stem cell compartment. *Brain* 2008;131(10):2564-78.
33. Jessberger S, Toni N, Clemenson Jr GD, et al. Directed differentiation of hippocampal stem/progenitor cells in the adult brain. *Nat Neurosci* 2008;11(8):888-93.
34. Picard-Riera N, Decker L, Delarasse C, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis mobilizes neural progenitors from the subventricular zone to undergo oligodendrogenesis in adult mice. *P Natl Acad Sci* 2002;99(20):13211-6.
35. Chen S-K, Tvrdik P, Peden E, et al. Hematopoietic Origin of Pathological Grooming in Hoxb8 Mutant Mice. *Cell* 2010;141(5):775-85.
36. Ziv Y, Ron N, Butovsky O, et al. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci* 2006;9(2):268-75.
37. Wolf SA, Steiner B, Akpınarli A, et al. CD4-Positive T Lymphocytes Provide a Neuroimmunological Link in the Control of Adult Hippocampal Neurogenesis. *J Immunol* 2009;182(7):3979-84.
38. Stanojic M, Burstyn-Cohen T, Nashi N, et al. Disturbed distribution of proliferative brain cells during lupus-like disease. *Brain Behav Immun* 2009;23(7):1003-13.
39. Qian L, Flood P, Hong J-S. Neuroinflammation is a key player in Parkinson's disease and a prime target for therapy. *J Neurol Transm* 2010;117(8):971-9.
40. Choi SH, Veeraghavalu K, Lazarov O, et al. Non-Cell-Autonomous Effects of Presenilin 1 Variants on Enrichment-Mediated Hippocampal Progenitor Cell Proliferation and Differentiation. *Neuron* 2008;59(4):568-80.

41. Grön G, Brandenburg I, Wunderlich AP, et al. Inhibition of hippocampal function in mild cognitive impairment: targeting the cholinergic hypothesis. *Neurobiol Aging* 2006;27(1):78-87.
42. Rogers JM, Panegyres PK. Cognitive impairment in multiple sclerosis: Evidence-based analysis and recommendations. *J Clin Neurosci* 2007;14(10):919-27.
43. Sailer M, Fischl B, Salat D, et al. Focal thinning of the cerebral cortex in multiple sclerosis. *Brain* 2003;126(8):1734-44.
44. Morgen K, Sammer G, Courtney SM, et al. Evidence for a direct association between cortical atrophy and cognitive impairment in relapsing-remitting MS. *Neuroimage* 2006;30(3):891-8.
45. Ziehn MO, Avedisian AA, Tiwari-Woodruff S, et al. Hippocampal CA1 atrophy and synaptic loss during experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE. *Lab Invest* 2010;90(5):774-86.
46. Roosendaal SD, Hulst HE, Vrenken H, et al. Structural and Functional Hippocampal Changes in Multiple Sclerosis Patients with Intact Memory Function. *Radiology* 2010;255(2):595-604.
47. Ibarretxe-Bilbao N, Tolosa E, Junque C, et al. MRI and cognitive impairment in Parkinson's disease. *Movement Disord* 2009;24(S2):S748-S53.
48. Nagano-Saito A, Washimi Y, Arahata Y, et al. Cerebral atrophy and its relation to cognitive impairment in Parkinson disease. *Neurology* 2005;64(2):224-9.
49. Martin S, Clark R. The rodent hippocampus and spatial memory: from synapses to systems. *Cell Mol Life Sci* 2007;64(4):401-31.
50. Garthe A, Behr J, Kempermann G. Adult-Generated Hippocampal Neurons Allow the Flexible Use of Spatially Precise Learning Strategies. *Plos one* 2009;4(5):e5464.
51. Coras R, Siebzehnrbul FA, Pauli E, et al. Low proliferation and differentiation capacities of adult hippocampal stem cells correlate with memory dysfunction in humans. *Brain* 2010;133(11):3359-72.
52. Blanchard J, Wanka L, Tung Y-C, et al. Pharmacologic reversal of neurogenic and neuroplastic abnormalities and cognitive impairments without affecting A β and tau pathologies in 3xTg-AD mice. *Acta Neuropathol* 2010;120(5):605-21.

Anteilerklärung

Petra Hühnchen hat folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1:

Huehnchen P, Prozorovski T, Klaissle P, et al. Modulation of adult hippocampal neurogenesis during myelin-directed neuroinflammation. *Glia* 2011;59(1):132-42.

85 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Induktion des Krankheitsmodells, Durchführung der Experimente, Auswertung der Daten und Statistik, graphische Aufarbeitung, Schreiben des Manuskripts, Revision des Manuskripts

Publikation 2:

Lesemann A, Reinel C, Huehnchen P, et al. MPTP-induced hippocampal effects on serotonin, dopamine, neurotrophins, adult neurogenesis and depression-like behavior are partially influenced by fluoxetine in adult mice. *Brain Res* 2012;1457(0):51-69.

25 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Histologische Färbungen, Datenauswertung und Statistik, Revision des Manuskripts

Publikation 3:

Klaissle P, Lesemann A, Huehnchen P, et al. Physical activity and environmental enrichment regulate the generation of neural precursors in the adult mouse substantia nigra in a dopamine-dependent manner. *BMC Neurosci* 2012;13(1):132.

25 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der Experimente der L-Dopa-Gruppen, histologische Färbungen, Auswertung der Daten, Revision des Manuskripts

Berlin, 19.06.2013

Petra Hühnchen

Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

Huehnchen P, Prozorovski T, Klaissle P, et al. Modulation of adult hippocampal neurogenesis during myelin-directed neuroinflammation. *Glia* 2011;59(1):132-42.
<http://dx.doi.org/10.1002/glia.21082>.

Lesemann A, Reinel C, **Huehnchen P**, et al. MPTP-induced hippocampal effects on serotonin, dopamine, neurotrophins, adult neurogenesis and depression-like behavior are partially influenced by fluoxetine in adult mice. Brain Res 2012;1457:51-69.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2012.03.046>.

Klaissle P, Lesemann A, **Huehnchen P**, et al. Physical activity and environmental enrichment regulate the generation of neural precursors in the adult mouse substantia nigra in a dopamine-dependent manner. BMC Neurosci 2012;13(1):132.

<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2202-13-132>.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste in chronologischer Reihenfolge

Huehnchen P, Prozorovski T, Klaissle P, et al. Modulation of adult hippocampal neurogenesis during myelin-directed neuroinflammation. *Glia* 2011;59(1):132-42.

Lesemann A, Reinel C, **Huehnchen P**, et al. MPTP-induced hippocampal effects on serotonin, dopamine, neurotrophins, adult neurogenesis and depression-like behavior are partially influenced by fluoxetine in adult mice. *Brain Res* 2012;1457:51-69.

Klaissle P, Lesemann A, **Huehnchen P**, et al. Physical activity and environmental enrichment regulate the generation of neural precursors in the adult mouse substantia nigra in a dopamine-dependent manner. *BMC Neurosci* 2012;13(1):132.

Huehnchen P, Boehmerle W, Endres M. Assessment of paclitaxel induced sensory polyneuropathy with "Catwalk" automated gait analysis in mice. *Plos One* 2013;8(10):e76772.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Petra Hühnchen, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Endogene Neurogenese im adulten Hippocampus bei neurodegenerativen und chronisch-inflammatorischen Erkrankungen des Zentralnervensystems im Tiermodell“

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, 19.06.2013

Petra Hühnchen

Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. med. Andreas Kupsch, dass er mich als seine Promovendin aufgenommen hat und für seine Dienste als Doktorvater.

Ein noch größerer Dank gilt meiner wissenschaftlichen Betreuerin und späteren Doktormutter, PD Dr. med. Barbara Steiner, für die freundliche Überlassung des Themas und die warmherzige Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe. Sie hat mich stets geduldig und mit Freude durch diese Arbeit begleitet. Vielen Dank für die lehrreiche, produktive und freundschaftliche Zusammenarbeit sowie die motivierte Einführung in wissenschaftliches Arbeiten und die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. med. Orhan Aktas und Dr. Timour Prozorovski, sowie den zahlreichen Mitarbeitern der ehemaligen AG Zipp und des Neurowissenschaftlichen Forschungszentrums (NWFZ), die mich mit viel Geduld und Enthusiasmus in experimentelles Arbeiten im Labor eingeführt haben.

Ein weiterer Dank gilt meinen Doktoranden-Mitstreitern Anne, Philipp, Charlotte, Anne und Jürgen, mit denen die zahlreichen Laborstunden am Wochenende wie im Fluge und mit viel Spaß vergangen sind.

Einen weiteren Dank möchte ich Prof. Dr. med. Matthias Endres aussprechen, in dessen Arbeitsgruppe ich mittlerweile ein neues wissenschaftliches „Zuhause“ gefunden habe und der mir die Möglichkeit bietet, nebenbei meine klinische Ausbildung fortzusetzen.

Einen großen Dank möchte ich an Dr. med. Wolfgang Böhmerle richten. Meine Freundschaft zu ihm seit dem Studium ist nun durch ein produktives und humorvolles wissenschaftliches Zusammenarbeiten bereichert.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und Freunden, vor allem meinen Eltern, ohne deren kontinuierliche Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich widme diese Arbeit meinen Großeltern Fritz und Anita, deren emotionale Unterstützung, Interesse und Gespräche mir die Kraft gegeben haben, trotz kleineren Rückschlägen stets weiterzumachen und neue Motivation zu schöpfen.