

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

DISSERTATION

Endogene Neurogenese im adulten Hippocampus und der Substantia  
Nigra am Mausmodell für das idiopathische Parkinsonsyndrom und  
Multiple Sklerose

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anne Lesemann

aus Berlin

Datum der Promotion: 05. Dezember 2014



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>4</b>
<b>Abstract (deutsch)</b> .....	<b>6</b>
<b>Abstract (englisch)</b> .....	<b>7</b>
<b>Einleitung</b> .....	<b>8</b>
<b>Methodik</b> .....	<b>10</b>
1. Tiere und Tiermodelle .....	10
1.1 MPTP-Mausmodell für das idiopathische Parkinsonsyndrom.....	10
1.2 EAE-Modell für Multiple Sklerose .....	12
2. Perfusion und Gewebegewinnung.....	13
3. Histologie und Zellquantifizierung .....	13
3.1 Immunhistochemie .....	13
3.2 Immunfluoreszenz .....	13
4. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) .....	14
5. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	14
6.1 Light/dark-Box für Angstverhalten .....	14
6.2 Startle response-Box für Schreckreaktion.....	15
6.3 Shuttle-Box für depressives Verhalten.....	15
7. Zellkulturen (Neurosphären) .....	15
8. Statistik.....	16
<b>Ergebnisse</b> .....	<b>17</b>
1. Einfluss des SSRI Fluoxetin auf die MPTP-induzierten zellulären und molekularen Veränderungen im Gyrus dentatus des adulten Hippocampus .....	17
2. Proliferation oligodendrozytärer Vorläuferzellen in der SN unter Dopamindepletion und dem Einfluss physiologischer proliferatorischer Stimuli.....	19
3. Hippocampale Neurogenese im Kontext einer ZNS-spezifische Autoimmunreaktion induziert durch EAE.....	21
<b>Diskussion</b> .....	<b>22</b>
1. Eine reaktive Proliferation neuronaler Vorläuferzellen im DG nach Dopamindepletion kann durch Flx weiter gesteigert werden, resultiert jedoch nicht in der Neubildung reifer Neurone. ....	22
2. Eine gestörte aktivitäts-induzierte Oligodendrogenese unter Dopamindepletion kann durch Levodopa wieder angehoben werden.....	23
3. Eine ZNS-spezifische Autoimmunreaktion führt zu einer gesteigerten Proliferation, jedoch gestörten Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen.....	24
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>26</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>29</b>
<b>Anteilerklärung an den ausgewählten Publikationen</b> .....	<b>30</b>
<b>Druckexemplare der ausgewählten Publikationen</b> .....	<b>31</b>
<b>Lebenslauf</b> .....	<b>77</b>
<b>Komplette Publikationsliste</b> .....	<b>78</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>79</b>

## Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
5HT1a-R	Serotoninrezeptor 5HT1a
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BrdU	5-Bromo-2-deoxyuridin
cm	Zentimeter
CNPase	2,3-Cyclic-nucleotid-3-phosphodiesterase
Ctr	Kontrollgruppe (gegenüber MPTP)
d	Tage
D1-R	Dopaminrezeptor D1
D2-R	Dopaminrezeptor D2
DCX	Doublecortin
DG	Gyrus Dentatus
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ENR	Käfige mit einem reizreichen Umfeld
Fig.	Abbildungen in Veröffentlichungen (engl. figure)
Flx	Fluoxetin / Fluoxetin-Behandlung
GFAP	glial fibrillary acid protein
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunden
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
i.p.	intraperitoneale Applikation
IPS	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
lx	Lux – Einheit der Beleuchtungsstärke
Lx	Lux (Licht)
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minuten
mm	Millimeter
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (Peptid 35-55)
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
ms	Millisekunden
MS	Multiple Sklerose
NaCl	Kochsalzlösung
ng	Nanogramm
NG2	neuron-glia antigen 2
Ngn1	Neurogenin-1
Ngn2	Neurogenin-2
NPC	neuronal Vorläuferzelle (engl. neural precursor cells)
OPC	oligodendrozytäre Vorläuferzelle (engl. oligodendrocytic precursor cells)
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PFA	Paraformaldehyd
p.o.	per os, orale Gabe
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RUN	Käfige mit freiem Zugang zu Laufrädern

s	Sekunden
Sal	NaCl-Behandlung (gegenüber Fluoxetin-Behandlung)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SN	Substantia nigra
STAN	Standardbedingungen
SVZ	Subventrikuläre Zone
SSRI	selektive Serotonin-WiederaufnahmeHemmer
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TH	Tyrosinhydroxylase
Upm	Umdrehungen pro Minute
VEGF	vascular endothelial growth factor
ZNS	Zentrales Nervensystem

## **Abstract (deutsch)**

Viele Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) gehen mit einem Untergang von Nervenzellen einher. Bisher gibt es für diese Erkrankungen nur symptomatische Therapien. Da im adulten Gehirn neuronale Stammzellen existieren, die Neurogenese betreiben und in funktionellen reifen Neuronen resultieren, wäre eine Kenntnis um die Beeinflussbarkeit der adulten Neurogenese ein möglicher zukünftiger Therapieansatz um den Zellverlust durch endogene Neurogenese ausgleichen zu können. Eine intakte endogene hippocampale Neurogenese spielt eine wesentliche Rolle für neuropsychologische Funktionen wie das Gedächtnis und den Affekt. Sowohl beim idiopathischen Parkinsonsyndrom als auch bei der Multiplen Sklerose ist im Krankheitsverlauf eine gestörte hippocampale Neurogenese zu beobachten. Folglich treten in beiden Krankheitsbildern regelmäßig kognitive Defizite und depressive Symptome auf. Von verschiedenen Neurotransmittern und Wachstumsfaktoren ist bereits gezeigt worden, dass sie an der Regulation der hippocampalen Neurogenese beteiligt sind, doch auch andere Faktoren wie das Immunsystem und körperliche Aktivität beeinflussen sie wesentlich. Ziel dieser Arbeit ist es die Pathomechanismen einer gestörten hippocampalen Neurogenese an Tiermodellen für das idiopathische Parkinsonsyndrom und Multiple Sklerose zu untersuchen.

Wir konnten zeigen, dass in unserem Modell eine Dopamindepletion zu einer reaktiven Proliferation hippocampaler Vorläuferzellen führt. Ein endogener Reparaturmechanismus, der durch eine medikamentöse Steigerung des Serotonins weiter unterstützt wird. Allerdings ist die Interaktion der beiden Neurotransmittersysteme nicht ausreichend, um degenerierte Neuronen zu ersetzen, da sie nicht in einer erhöhten Anzahl neugenerierter reifer Neurone resultierte. In der Substantia Nigra, dem Ort der Dopamindepletion beim idiopathischen Parkinsonsyndrom, zeigte sich eine Proliferation oligodendrozytärer Vorläuferzellen, die in Abhängigkeit von Dopamin durch freiwillige körperliche Aktivität gesteigert werden kann. Die aktivitätsinduzierte Proliferation war durch eine Dopamindepletion unterdrückt und konnte durch Levodopa wieder gesteigert werden. Da oligodendrozytäre Vorläuferzellen neuroprotektive und neuroregenerative Kapazitäten besitzen, könnte eine aktivitätsinduzierte Proliferationssteigerung einen möglichen additiven Therapieansatz beim idiopathischen Parkinsonsyndrom darstellen. Infolge einer ZNS-spezifischen, autoimmunen Neuroinflammation fanden wir eine gesteigerte Proliferation und ein gesteigertes Überleben neuronaler Vorläuferzellen, deren Ausdifferenzierung zu reifen Neuronen jedoch gestört war. Auf molekularer Ebene fanden wir Veränderungen in für die Neurogenese relevanten Signalwegen, als möglicher zugrunde liegender molekularer Mechanismus.

Unsere Daten liefern eine Erweiterung der Kenntnisse über die Pathomechanismen einer gestörten adulten hippocampalen Neurogenese und mögliche Angriffspunkte für zukünftige Therapieformen.

## **Abstract (englisch)**

Many diseases of the central nervous system (CNS) are associated with a loss of neurons. So far, only symptomatic therapies of these diseases exist. On the other hand, neural stem cells in the adult brain exist, which have the capacity to differentiate into mature integrated neurons. The knowledge about the controllability of the adult neurogenesis could possibly open new therapeutic approaches to compensate cell loss after neurodegeneration. Deficits in the hippocampal neurogenesis seem to be a key mechanism of neuropsychiatric deficits in memory and mood. In both, Parkinson's disease and multiple sclerosis, an impaired hippocampal neurogenesis has been observed. Consequently in both diseases cognitive decline as well as mood disorders appear frequently. Many factors such as neurotransmitters and growth factors as well as the immune system and voluntary physical activity have been shown to influence the hippocampal neurogenesis.

In this work we aimed to investigate the changes in hippocampal neurogenesis in the context of Parkinson's disease and multiple sclerosis and possible underlying pathomechanisms.

In our model for Parkinson's disease we found a hippocampal precursor proliferation following dopamine depletion as an endogenous regenerative mechanism, which is further increased by the stimulation of serotonin. However, the interaction between both neurotransmitter systems is not sufficient to replace degenerating neurons, as net neurogenesis remained unaffected. In the substantia nigra, the area of dopamin depletion in Parkinson's disease, the proliferation oligodendrocytic precursors can be enhanced by physical activity. The effects of physiological stimuli are suppressed by dopamine depletion and can be re-activated by levodopa. As oligodendrocytic precursors have been reported to bear neuroprotective and neuroregenerative capacities, microenvironmental changes in the substantia nigra following activity might be a potential therapeutic approach in parkinson's disease. Due to a CNS -specific, autoimmune neuroinflammation, we observed an enhanced generation and survival of immature neurons. However, the capacity of these cells to differentiate into mature neurons was reduced. On a molecular level, these effects were associated with dysbalance of signaling pathways, relevant for adult hippocampal neurogenesis.

Our data provide an extension of our knowledge about pathogenic mechanisms of impaired adult hippocampal neurogenesis and potential targets for future therapies.

## Einleitung

Entgegen früherer Annahmen findet auch im adulten Gehirn eine kontinuierliche Ausreifung neuronaler Stammzellen zu funktionell integrierten Neuronen statt. Die adulte Neurogenese findet in zwei Regionen des Gehirns statt: Der subventrikulären Zone (SVZ) des Seitenventrikels und dem Gyrus dentatus (engl. dentate gyrus, DG) des Hippocampus. In der subgranulären Zone des DG befindet sich ein Pool neuraler Vorläuferzellen (engl. neural precursor cells, NPC), die über mehrere Zwischenstufen zu reifen Neuronen ausdifferenzieren [1]. Bei vielen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) wie das idiopathische Parkinsonsyndrom (IPS) oder die Alzheimererkrankung finden sich strukturelle und funktionelle Veränderungen des Hippocampus [2, 3], was wiederum mit kognitiven Einbußen und depressiven Symptomen einhergeht. Die Aufrechterhaltung einer intakten hippocampalen Neurogenese wird durch verschiedene Faktoren, wie Wachstumsfaktoren und Neurotransmitter, aber auch körperliche Aktivität und das Lebensumfeld beeinflusst [4, 5]. Eine Beeinflussbarkeit der adulten endogenen Neurogenese könnte einen zukünftigen Therapieansatz darstellen, um eine Neurodegeneration im Rahmen von ZNS-Erkrankungen mit endogenen Stammzellen ausgleichen zu können.

Das Idiopathische Parkinsonsyndrom (IPS) ist eine neurodegenerative Erkrankung, bei der dopaminerge Neurone in der Substantia Nigra (SN) degenerieren [6]. Neben den bekannten motorischen Symptomen treten im Krankheitsverlauf regelmäßig auch kognitive Defizite und depressive Symptome auf [7, 8]. Dies weist darauf hin, dass auch der Hippocampus an der Pathogenese des klinischen Bildes beteiligt ist. Es ist gezeigt worden, dass eine Dopamindepletion mit einer verminderten Genese und Differenzierung von Neuronen im adulten Hippocampus einhergeht [2, 9]. Sowohl bei der Entstehung kognitiver Defizite als auch einer endogenen Depression scheint eine gestörte hippocampale Neurogenese eine entscheidende Ursache zu sein [10, 11]. Studien haben gezeigt, dass eine Abnahme des Neurotransmitters Serotonin mit einer verminderten hippocampalen Neurogenese einhergeht, und umgekehrt antidepressive Medikamente zu einer Zunahme der hippocampalen Neurogenese und Verbesserung der neuropsychologischen Defizite führen [12, 13]. Die Therapie der Wahl depressiver Symptome beim IPS sind derzeit selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (engl. selective serotonin reuptake inhibitors, SSRI), welche den Serotoninspiegel anheben und die hippocampale Neurogenese steigern [14, 15]. Eine weitere wichtige Rolle für die hippocampale Neurogenese und neuronale Plastizität scheint der neurotrophe Faktor Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) zu spielen. Einem anderen Wachstumsfaktor, dem Vascular endothelial growth factor (VEGF), wird eine wichtige Rolle bei der antidepressiven Wirkung von SSRIs zugeschrieben [16, 17].



Wie die beiden Neurotransmitter Dopamin und Serotonin bei der Regulation der hippocampalen Neurogenese und bei der Entstehung neuropsychologischer Symptome bei IPS interagieren ist bisher unklar.

Die Substantia Nigra selber zählt nicht zu den eigentlichen neurogenen Zonen des adulten Gehirns. Dennoch werden hier kontinuierlich neue Zellen gebildet, die Charakteristiken oligodendrozytärer Vorläuferzellen (engl. oligodendrocytic precursor cells, OPC) aufweisen und das Proteoglykan Neuro-glial antigen-2 (NG2) exprimieren [18, 19]. Es konnte gezeigt werden, dass freiwillige körperliche Aktivität (RUN) sowie eine Anreicherung des Umfeldes mit neuen Reizen (engl. environmental enrichment, ENR) einen starken Einfluss auf die Proliferation der OPCs haben [20], also physiologische proliferationssteigernde Faktoren sind. Im Tiermodell für IPS ist gezeigt worden, dass die Dopamindepletion mit einer verminderten Proliferation der nigralen OPCs einhergeht. Diese konnte durch körperliche Aktivität und Anreicherung des Umfeldes wieder gesteigert werden [20]. Eine Regeneration nigraler dopaminergener Neurone durch adulte Neurogenese wird kontrovers diskutiert [19, 21, 22]. Die OPCs differenzieren *in vivo* hauptsächlich zu Oligodendrozyten, jedoch wurde *in vitro* auch eine Ausreifung zu Mikroglia und Nervenzellen beobachtet [19]. Ob und inwiefern diese Zellen zu endogenen Reparaturvorgängen nach Neurodegeneration beitragen, ist bisher ungeklärt. Auch ist ungeklärt, welchen Einfluss der Neurotransmitter Dopamin auf die aktivitätsinduzierte Proliferation der OPCs hat.

Neben neurodegenerativen Erkrankungen wie das IPS gehen auch andere ZNS-Erkrankungen mit einer gestörten hippocampalen Neurogenese einher. Entzündliche Prozesse innerhalb des ZNS und damit verbundene Störungen im Gleichgewicht des Immunsystems führen zu einer Abnahme der hippocampalen Neurogenese und einer Aktivierung von Mikroglia [23, 24]. Zur Aufrechterhaltung der hippocampalen Neurogenese spielen CD4-positive T-Zellen eine relevante Rolle [25]. In Tiermodellen für eine ZNS-spezifische Autoimmunreaktion führte die T-Zell-Reaktion zu einer gesteigerten Proliferation hippocampaler Zellen, wobei jedoch kognitive Funktionen stark beeinträchtigt waren [26, 27]. Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche ZNS-Erkrankung, bei der sich das Immunsystem T-Zell-vermittelt gegen die Myelinscheiden im ZNS richtet [28]. Neben motorischen und sensorischen Symptomen kommt es im Krankheitsverlauf auch zu kognitiven Symptomen [29] und Stimmungsstörungen [30, 31]. MRT-Studien zeigten degenerative Veränderungen im Hippocampus von MS-Patienten [32, 33]. Diese Daten weisen darauf hin, dass eine Myelin-gerichtete Immunreaktion, wie sie bei MS zu beobachten ist, auch die hippocampale Neurogenese beeinträchtigt. Die Mechanismen für die

veränderte hippocampale Neurogenese im Rahmen einer ZNS-spezifischen Autoimmunreaktion sind bisher unklar.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Pathomechanismen einer gestörten hippocampalen Neurogenese an Tiermodellen für das idiopathische Parkinsonsyndrom und Multiple Sklerose zu untersuchen.

Dabei soll im Einzelnen untersucht werden:

1. Der Einfluss des SSRI Fluoxetin auf die MPTP-induzierten zellulären und molekularen Veränderungen im Gyrus dentatus des adulten Hippocampus sowie deren Zusammenhang mit neuropsychologischen Symptomen.
2. Die Interaktion physiologischer proliferationssteigernder Stimuli und dopaminerger Medikation bei der Proliferation NG2-positiver OPCs in der adulten SN und deren mögliche Beteiligung an Reparaturvorgängen in der SN.
3. Der Einfluss einer ZNS-spezifischen T-Zell-vermittelten Immunreaktion auf die hippocampale Neurogenese sowie mögliche zugrunde liegende molekulare Mechanismen.

## **Methodik**

### **1. Tiere und Tiermodelle**

#### **1.1 MPTP-Mausmodell für das idiopathische Parkinsonsyndrom**

Das Opioidderivat 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,4-Tetrahydropyridin (MPTP) ist ein Neurotoxin, das spezifisch die nigrostriatalen dopaminergen Neurone zerstört. Seit den 1980er Jahren wird es in Tierversuchen zur Induktion eines IPS eingesetzt [34].

Acht-12 Wochen alten weiblichen transgenen C57BL/6-Mäusen, die grün fluoreszierendes Protein (GFP) unter dem Promotor für Nestin exprimieren, wurden unter Standardbedingungen (12h-Tag/Nacht-Rhythmus und freier Zugang zu Futter und Wasser, 5-6 Tiere pro Käfig) gehalten. Zur Induktion des IPS wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen MPTP (20mg/kg KG) intraperitoneal (i.p.) injiziert. Kontrolltieren wurde 0,9%-Kochsalzlösung (NaCl) injiziert. Am ersten Injektionstag wurde zusätzlich das Thymidinanalogon 5-Bromo-2-deoxyuridin (BrdU) i.p. appliziert. BrdU wird anstelle von Thymidin in die DNA sich teilender Zellen eingebaut und dient somit als Proliferationsmarker.

Versuchsaufbau - Experiment 1: Die Versuchstiere wurden zufällig in eine MPTP-Gruppe und eine Kontrollgruppe (Ctr) aufgeteilt und erhielten nach o.g. Schema MPTP bzw. NaCl und BrdU. Ab dem 3.Tag wurden die Tiere mit dem SSRI Fluoxetin (Flx) per Schlündeln behandelt. Als Kontrollsubstanz wurde NaCl verabreicht (Sal). Ein Teil der Tiere wurde zum Zeitpunkt der höchsten Dopamindepletion (10 Tage, 10d) getötet, ein anderer Teil der Tiere zum Zeitpunkt

einer teilweisen funktionellen Erholung nach 28 Tagen (28d). Jeweils an den 5 Tagen vor Tötung wurden Verhaltensexperimente durchgeführt. Zwei Wochen vor der Verhaltenstestung wurden die Tiere in Einzelhaltung überführt.

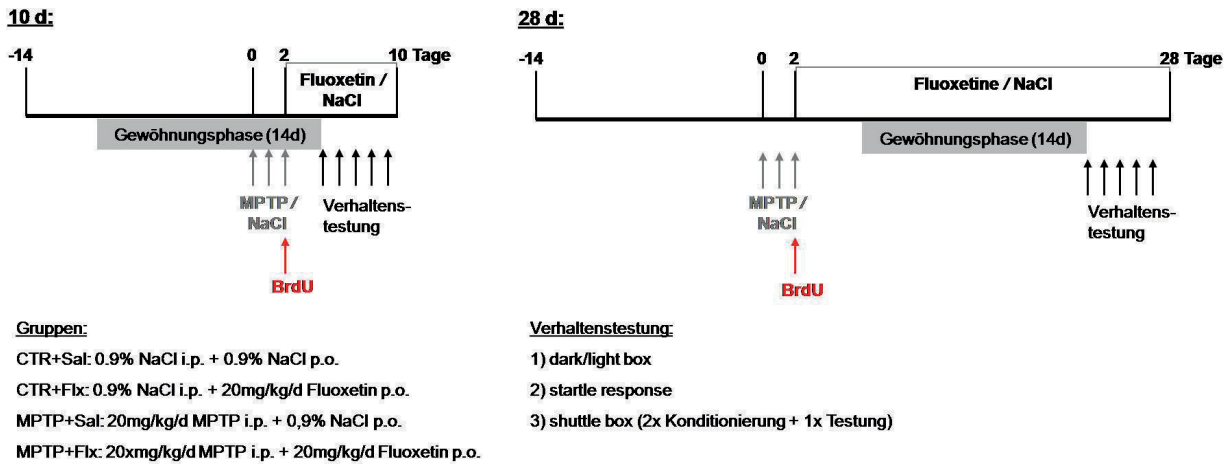


Abbildung 1: schematischer Versuchsaufbau von Experiment 1

Versuchsaufbau – Experiment 2: Die Tiere wurden in 3 Haltungsbedingungen randomisiert:

- Standardbedingungen (STAN),
- Käfige mit freiem Zugang zu Laufrädern (RUN),
- Käfige mit einem reizreichen Umfeld, wie z.B. sich ändernde Fressstellen, Kletter- und Versteckmöglichkeiten, (engl. enriched environment; ENR).

Die Tiere erhielten nach o.g. Schema MPTP bzw. NaCl und BrdU. Ein Teil der MPTP- und Kontrolltiere wurde für 10 Tage mit Levodopa+Benserazid (L-Dopa, 20mg/kg + 5mg/kg) i.p. behandelt. Kontrolltiere erhielten NaCl. Die Mäuse wurden nach 3, 10, 28 oder 70 Tagen (3d/10d/28d/70d) getötet.

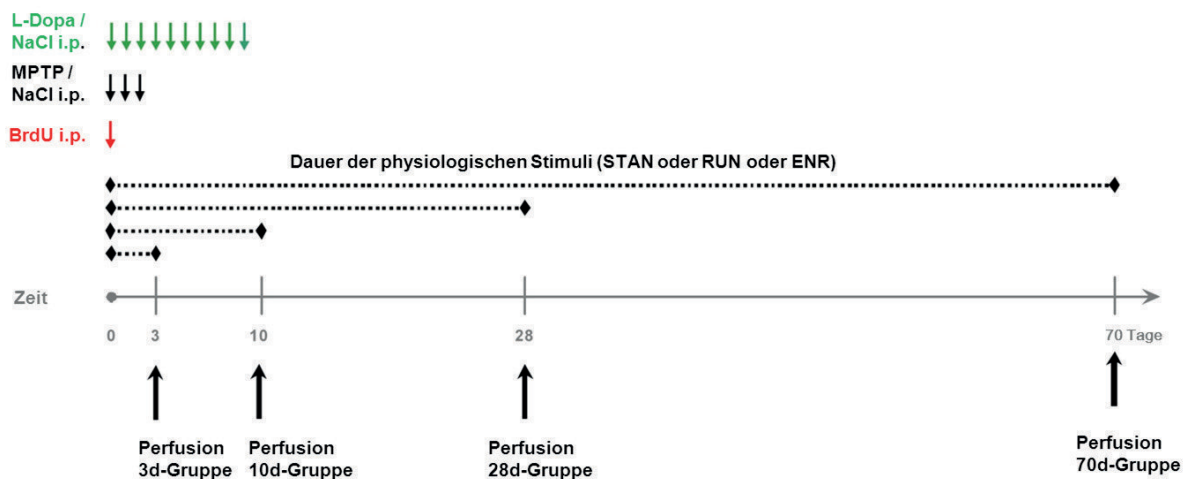


Abbildung 2: schematischer Versuchsaufbau von Experiment 2

## 1.2 EAE-Modell für Multiple Sklerose

Die experimentelle autoimmune Enzephalitis (EAE) ist ein etabliertes Tiermodell für Multiple Sklerose (MS). Durch die Injektion des Proteins Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), welches ein Bestandteil des Myelins im ZNS ist, kommt es im ZNS der Versuchstiere zu einer T-Zell-vermittelten Autoimmunreaktion. Die EAE ist ein Modell, das der MS in vielen klinischen Charakteristika gleicht und sich für histopathologische Untersuchungen der Inflammation, Demyelinisierung und Neurodegeneration in MS eignet [35].

Versuchsaufbau - Experiment 3: Die Versuchstiere erhielten 200µg MOG, gelöst in komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA, beinhaltet 6 mg/ml Mycobacterium tuberculosis H37Ra) und phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS), subkutan appliziert [36]. Um die ZNS-spezifische Immunreaktion von einer nicht-ZNS-spezifischen Immunreaktion zu unterscheiden, erhielten die Kontrolltiere die gleiche Lösung mit Ovalbumin (OVA) anstelle des MOG. Allen Tieren wurde am Tag der Immunisierung und zwei Tage später 400ng Pertussis-Toxin i.p. injiziert. Die Tiere wurden täglich nach einer klinischen Skala von 0 (gesund) bis 5 (tetraplegisch/moribund/tot) beurteilt. Um die Effekte sowohl einer akuten als auch einer chronischen EAE zu verschiedenen Zeitpunkten zu untersuchen, wurden die Tiere folgenden Gruppen zugeteilt:

*Ia: BrdU-Injektion zum Zeitpunkt des Krankheitsmaximums, Tötung 24h später.*

*Ib: BrdU- Injektion zum Zeitpunkt des Krankheitsmaximums, Tötung 4 Wochen später.*

*IIa: BrdU- Injektion im chronischen Stadium des Krankheitsbildes, Tötung 24h später.*

*IIb: BrdU- Injektion im chronischen Stadium des Krankheitsbildes, Tötung 4 Wochen später.*

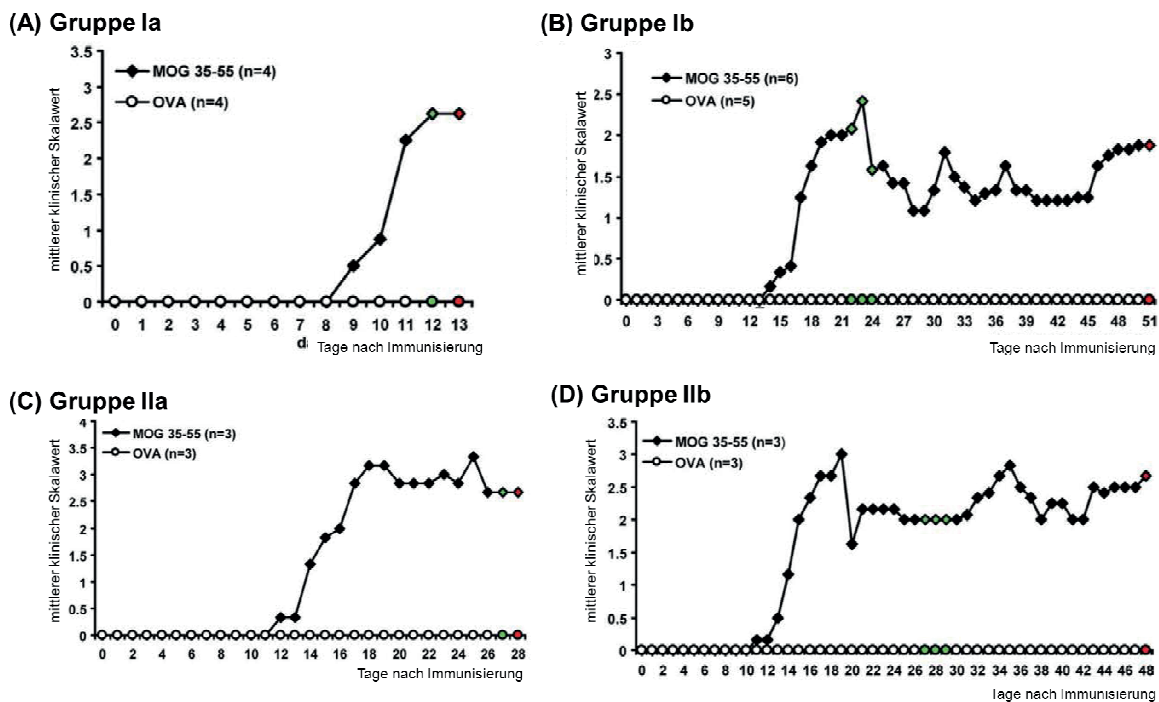


Abbildung 3: Median der klinischen Skalawerte (grüne Punkte: BrdU-Injektion, rote Punkte: Perfusion)

Alle Experimente sind zuvor durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt worden.

## **2. Perfusion und Gewebegewinnung**

Die Mäuse wurden mit einer Überdosis Ketamin tief anästhesiert und mit 4%-Paraformaldehyd (PFA) transkardial perfundiert. Die Gehirne wurden dem Schädel entnommen und über Nacht in PFA bei 4°C fixiert. Zur Dehydratation des Gewebes wurden die Gehirne am Folgetag in 20%-Saccharoselösung transferiert. Nach 3 Tagen wurden sie in flüssigem Stickstoff gefroren und mit einem Kryostat in 40µm dicke koronare Schnitte geschnitten und bei -20°C gelagert. Für PCR- und ELISA-Analysen wurden die Hippocampi herauspräpariert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

## **3. Histologie und Zellquantifizierung**

### **3.1 Immunhistochemie**

Die Gehirnschnitte wurden mit 0,6%-Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) behandelt und für BrdU-Analysen anschließend für 30min mit Chlorwasserstoff (2N HCl) inkubiert, dann mit Boratpuffer und Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) gewaschen und über Nacht mit dem Erstantikörper (anti-BrdU, anti-TH) bei 4°C inkubiert. Nach erneuter Waschung wurden die Schnitte für 2h bei Raumtemperatur (RT) mit dem biotinierten Zweitantikörper und anschließend für 1h mit ABC-Reagenz inkubiert. Als Chromogen wurde Diaminobenzidin (DAB) in TBS mit 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 0,04% Nickelchlorid verwendet. Die Schnitte wurden gewaschen, in Alkohol entwässert und mit Entellan auf Objektträgern eingedeckelt. Zur Bestimmung der absoluten Zahlen BrdU-positiver oder TH-positiver Zellen wurde jeder 6.Schnitt eines jeden Gehirns DAB-gefärbt, die DAB-positiven Zellen innerhalb des DG oder der SN lichtmikroskopisch quantifiziert und anschließend mit 6 multipliziert.

### **3.2 Immunfluoreszenz**

Die Gehirnschnitte wurden mit 0,1M Boratpuffer gespült und mit TBS gewaschen. Die Erst- und Zweitantikörper wurden in TBS+ (bestehend aus TBS, 0,1% TritonX-100 und 3% donkey serum) verdünnt. Die Schnitte wurden mit dem Erstantikörper für 24h bei 4°C inkubiert, anschließend mit TBS und TBS+ gewaschen und für 4h lichtgeschützt bei RT mit dem Zweitantikörper inkubiert. Nach einer erneuten Waschung wurden die Schnitte mit Polyvinylalkohol auf Objektträgern eingedeckelt. Mit diesem Verfahren können Mehrfachfärbungen durchgeführt werden. Zur Quantifizierung mehrfachmarkierter Zellen wurde jeder 6. Schnitt eines Gehirns nach o.g. Verfahren gefärbt. Mittels konfokaler Mikroskopie

wurden innerhalb des DG pro Gehirn 50 BrdU-positive Zellen identifiziert und hinsichtlich ihrer Koexpression zusätzlicher Marker analysiert.

#### **4. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)**

Für die quantitativen PCR-Analysen wurden aus den Hippocampus-Proben die Boten-Ribonukleinsäuren (mRNA) unter Verwendung eines RNA/Protein Kit extrahiert. Die reverse Transkription zu komplementärer DNA (cDNA) und deren Amplifizierung wurde mit kommerziellen Kits (TaqMan/RT kit) durchgeführt. Als interne Kontrolle wurde glial fibrillary acid protein (GFAP) oder Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase verwendet. Die Ergebnisse der Quantifizierung wurden gegenüber den Kontrollwerten normiert.

#### **5. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Die Hippocampi wurden für 20s mittels einem Ultraschallzerkleinerer in 0,7ml Extraktionspuffer (100mM Tris-HCl, 400mM NaCl, 0,1% NaN<sub>3</sub> und Proteaseinhibitoren; [37]) homogenisiert. Die Homogenate wurden zentrifugiert (13.000Upm, 10min, 4°C) und der Überstand wurde bei -80°C eingefroren. Die Bestimmung der endogenen Neurotrophine Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) und Vascular endothelial growth factor (VEGF) erfolgte mit kommerziellen ELISA-Kits. Die Neurotrophin-Level werden in Picogramm pro Milligramm Nassgewicht angegeben.

#### **6. Verhaltenstests**

Nach einer zweiwöchigen Gewöhnung der Versuchstiere an den Untersucher und die Testapparaturen wurde jedes Tier in einer standardisierten Testbatterie für Angstverhalten, Schreckreaktion und depressives Verhalten untersucht. Alle Verhaltensexperimente wurden tagsüber durchgeführt und es lagen jeweils 24h zwischen den einzelnen Tests.

##### **6.1 Light/dark-Box für Angstverhalten**

Diese Testung beruht auf dem Konflikt zwischen der Aversion gegen helle Räume und dem natürlichen Explorationsdrang der Maus. Wir nutzten eine Untersuchungsbox, welche durch eine Plastikwand in zwei gleich große Kammern (18x18x30cm) unterteilt wird. Durch eine kleine Öffnung in der Wand (6x7cm) kann die Maus frei zwischen den beiden Kammern wechseln. Während eine Kammer hell erleuchtet ist (600lx), ist die andere vom Umgebungslicht abgeschirmt und dunkel. Die Bewegungen der Maus werden per Infrarotsensoren gemessen. Die Maus wird zu Beginn des Experiments in die dunkle Kammer gesetzt. Über 5min hinweg wird die Zeit bis zum ersten Wechsel in die helle Kammer, die Anzahl der Wechsel zwischen den Kammern und die gesamte in der hellen Kammer verbrachte Zeit erfasst.

## **6.2 Startle response-Box für Schreckreaktion**

In der Startle response-Box wird die Schreckreaktion des Versuchstieres auf einen unangenehmen akustischen Reiz gemessen. Die Maus wird in einem kleinen Käfig (90x40x40mm), in einem schallisolierten Raum auf einer piezoelektrischen Plattform platziert. Über zwei Lautsprecher wird die Versuchsmaus mit genau definierten Tönen beschallt (90, 105, 120 dB, je 40ms, insgesamt 30 Töne, computerrandomisiert). Die Schreckreaktion der Versuchsmaus bewirkt eine Bewegung der Plattform, welche registriert und über eine Computerschnittstelle aufgezeichnet wird. Eine Schreckreaktion wurde definiert als der stärkste Ausschlag innerhalb von 200ms nach dem akustischen Reiz.

## **6.3 Shuttle-Box für depressives Verhalten**

Dieser Versuchsaufbau beruht auf der Theorie der erlernten Hilflosigkeit nach Seligman [38], nach der das Versuchstier aufgrund früherer Erlebnisse gelernt hat, Situationen in seiner Umwelt durch eigenes Handeln nicht kontrollieren zu können. Es wird wieder eine Box genutzt, die durch eine Plastikwand in zwei Kammern unterteilt wird, und deren Boden aus Gitterstäben (Durchmesser 4mm, Abstand zwischen den Stäben 8,9mm) besteht. Während einer Konditionierungsphase wird die Maus in eine der beiden Kammern gesetzt, ohne die Möglichkeit in die andere zu wechseln. Über einen Zeitraum von 32min ist die Maus unausweichlichen elektrischen Fußschocks (0,2mA, 200ms, Inter-Schock-Intervall 1 bis 12s, computerrandomisiert) ausgesetzt. Nach 24h wird diese Prozedur wiederholt. Am dritten Tag findet die Testphase statt. Die Maus wird wieder in die Versuchsbox gesetzt, diesmal mit der Möglichkeit zwischen den Kammern zu wechseln. Nach einer zweiminütigen Gewöhnungsphase wird die Versuchsmaus ‚Schockphasen‘ ausgesetzt, bestehend aus 30 einzelnen Fußschocks (0,2mA, 200ms) über 10s, denen sie diesmal durch Wechsel der Kammer ausweichen kann. Vor jeder Schockphase wird für 5s ein Licht präsentiert, das die Schockphase ankündigt. Zwischen den einzelnen Schockphasen liegen 30s Pause. Wechselt die Maus während der Licht- oder der Schockphase die Kammer führt dies zur Beendigung der Fußschocks. Unterschieden wurde zwischen ‚avoidance‘ (Wechsel während der Lichtphase), ‚escape‘ (Wechsel während der Schockphase) und ‚failures‘ (kein Wechsel der Kammer). Bei der Datenanalyse wurden die Anzahl von avoidance/escape-Reaktionen und die Latenz bis zum Wechsel berücksichtigt.

## **7. Zellkulturen (Neurosphären)**

Für die Neurosphären wurden die Versuchsmäuse mittels zervikaler Dislokation getötet, und die entnommenen Gehirne in Hank's Salzlösung transferiert. Anschließend wurde unter aseptischen Bedingungen Gewebe der SN sowie der SVZ isoliert. Die Zellkulturen wurden in einem Medium

(Neurobasal, angereichert mit 1% Glutamat, 2% B27, 1% Penicillin/Streptomycin, 20ng/ml EGF (epidermal growth factor) und FGF-2 (fibroblast growth factor 2)) angezüchtet. Nach 2 Wochen wurden die Zellsuspensionen seriell 1:2 verdünnt und in 96-Well-Platten transferiert (mit 5 bis 20.000 Zellen pro Well). Nach 7 Tagen in vitro wurde die Fraktion der Neurosphären-negativen Wells quantifiziert. Die Daten wurden mit einer Software (Origin 5.0) logarithmisch transformiert. Der Schnittpunkt von log (37%) gab die Frequenz der Zellen mit dem Potential Neurosphären zu bilden an.

## 8. Statistik

Alle statistischen Analysen erfolgten mit StatView 5.0.1 und GraphpadPrism 5.1. Alle Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte (SEM) angegeben. Für Gruppenvergleiche wurden one-way ANOVAs mit anschließendem Fisher's Post-hoc-Test durchgeführt. Für Analysen mit mehreren Variablen wurden two- und three-way ANOVAs mit den Faktoren Behandlung und Intervention sowie Interaktionsanalysen durchgeführt. Eine statistische Signifikanz wurde bei  $p < 0,05$  angenommen.

Tabelle 1 gibt die verwendeten Substanzen und Geräte ggf. mit der jeweiligen Verdünnung bzw. Dosierung wieder:

Substanz	Abkürzung	Verdünnung/Dosierung	Hersteller
1- Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin	MPTP	2 mg/ml, 20 mg/kg KG	Sigma-Aldrich
5-Bromo-2 deoxyuridin-Antikörper	anti-BrdU	1:500	AbD Serotec, Biozol, Harlan Seralab
5-Bromo-2-deoxyuridin	BrdU	5 mg/ml, 50 mg/kg KG	Sigma-Aldrich
ABC-Reagenz	ABC	9 µl/ml	Vector Laboratories
BDNF ELISA kit			Promega
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
Donkey-Serum		3ml/100ml	
Doublecortin-Antikörper	anti-DCX	1:200	SantaCruz Biotechnology
Entellan		unverdünnt	Sigma-Aldrich
Epidermal growth factor	EGF	20 ng/ml	Biochrom AG
Fibroblast Growth Factor 2	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
Grün fluoreszierendes Protein-Antikörper	anti-GFP	1:200	Abcam
Hank's Salzlösung	HBSS	unverdünnt	Gibco
Hes5-Antikörper	anti-Hes5	1:250	Millipore
Komplettes Freund'sches Adjuvans	CFA	1+1	Difco
Levodopa + Benserazid	L-Dopa	2 mg/ml, 20 mg/kg KG + 0,5 mg/ml, 5 mg/kg KG	Ferak Berlin Sigma-Aldrich
Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein	MOG	1,25 mg/ml, 12,5 mg/kg KG	Pepceuticals
Neurobasal Medium	NBM	unverdünnt	Life Technologies
Neurogenin 2-Antikörper	anti-Ngn2	1:500	SantaCruz Biotechnology
Neuronal Nuclei-Antikörper	anti-NeuN	1:100	Millipore
Neuron-glial antigen 2-Antikörper	anti-NG2	1:200	Chemicon International
Nickelchlorid	Ni <sub>2</sub> 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



Polyvinylalkohol			Sigma-Aldrich
Rhodamin	Rhod	1:250	Dianova
RNA/Protein kit			Macherey-Nagel
Saccharose	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	200 g/l	Sigma-Aldrich
TaqMan/RT kit			Applied Biosystems
Tetraborat	Borat	0,1 M	Sigma-Aldrich
Triton X-100 10%	Triton	10 ml/l	Sigma-Aldrich
Tyrosinhydroxylase-Antikörper	anti-TH	1:10000	Sigma-Aldrich
VEGF ELISA kit			R&D Systems Inc.
Wasserstoffperoxid 30%	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20 ml/l	Sigma-Aldrich
Xylol	Xylol	unverdünnt	Sigma-Aldrich
<b>Geräte:</b>			
Cryocut 1800			Reichert-Jung
Passive-/Active-Avoidance Box			TSE systems
Startle-Response-Box			TSE systems
TCS SP2 confocal microscope			Leica

Tabelle 1: Verwendete Substanzen und Geräte

## Ergebnisse

### 1. Einfluss des SSRI Fluoxetin auf die MPTP-induzierten zellulären und molekularen

#### Veränderungen im Gyrus dentatus des adulten Hippocampus

MPTP führte zu einer signifikanten Dopamindepletion in der Substantia Nigra (SN), die sich in einer verminderten Tyrosinhydroxylase (TH)-Expression widerspiegelt. (10d:  $p=0,001$ ; 28d:  $p=0,003$ ). Flx hatte keinen Effekt auf die nigrale TH-Expression (s. Fig.2 in [39]). Um die Effekte von MPTP auf das hippocampale dopaminerge und serotoninerge System zu untersuchen, quantifizierten wir die mRNA-Expression der Dopamin-Rezeptoren D1 (D1-R) und D2 (D2-R) und des Serotoninrezeptors 5HT1a (5HT1a-R) im Hippocampus mittels qPCR. Durch MPTP blieb die Expression der 5HT1a-R mRNA unverändert, wohingegen eine Flx-Behandlung bei gesunden Tieren zu einer Verminderung der 5HT1a-R Expression führte (Ctr+Flx  $0,124\pm 0,182$ , Ctr+Sal  $1\pm 0,182$ ,  $p=0,004$ ; s. Fig 1a in [39]). MPTP führte zu einem trendweisen Anstieg der hippocampalen D2-R mRNA-Expression (MPTP  $1,103\pm 0,154$ , Ctr  $0,641\pm 0,173$ ,  $p=0,066$ ). Überraschenderweise war durch Flx die D2-R mRNA-Expression im Hippocampus signifikant erniedrigt (Flx  $0,505\pm 0,164$ , Sal  $1,239\pm 0,164$ ,  $p=0,007$ ; s. Fig.1c in [39]). Die D1-R mRNA-Expression war in keiner Gruppe durch MPTP oder Flx verändert. Um den Effekt von MPTP und Flx auf die Anzahl proliferierender Zellen im Hippocampus zu untersuchen, quantifizierten wir die BrdU-positiven Zellen im DG. Weder MPTP noch eine alleinige Flx-Gabe hatte einen Einfluss auf die Anzahl BrdU-positiver Zellen im DG. Interessanterweise erhöhte aber die Kombination aus MPTP und langfristiger Flx-Behandlung signifikant die Anzahl BrdU-positiver Zellen im DG (MPTP+Flx  $432\pm 24,59$ , Ctr+Sal  $328\pm 19,33$ ,  $p=0,016$ ; Ctr+Flx  $308,4\pm 24,05$ ,  $p=0,007$ ; s. Fig.3 in [39]). Anhand eindeutiger morphologischer Merkmale und Antigenexpressions-Muster können wir die neugeborenen Zellen

Subpopulationen neuronaler Vorläuferzellen (NPCs) zuordnen und quantifizieren [1]. Die Nestin-exprimierenden Typ1- und Typ2a-Zellen, stellen einen Pool sich langsam teilender NPCs dar (s. Fig.5b,c in [39]). MPTP führte zu einem signifikanten Anstieg der neugeborenen Typ1- und Typ2a-Zellen (10d: MPTP+Sal 87,4±8,05, Ctr+Sal 44,2±4,59,  $p=0,001$ ; 28d: MPTP+Sal 62±6,72; Ctr+Sal 22±1,32,  $p<0,001$ ). Eine Behandlung mit Flx konnte diese Proliferation zusätzlich steigern (10d: MPTP+Flx 145±10,92, MPTP+Sal 87,4±8,05,  $p<0,001$ ; 28d: MPTP+Flx 103,6±5,95, MPTP+Sal 62±6,72,  $p<0,001$ ; Ctr+Flx 47,17±3,8, Ctr+Sal 22±1,32,  $p<0,001$ ; s. Fig.4a in [39]). Die größte Proliferationssteigerung durch MPTP war bei den Typ2b-Zellen zu beobachten. Typ2b-Zellen sind Nestin-exprimierende NPCs, die sich durch die Koexpression von Nestin und des unreifen neuronalen Markers Doublecortin (DCX) auszeichnen (s. Fig.5d in [39]). Zehn Tage nach MPTP war die Zahl neugeborener Typ2b-Zellen um ein 2,5faches im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (MPTP 383,8±32,38, Ctr 143,6±14,87,  $p<0,001$ ). Die Anzahl neuer Typ2b-Zellen nahm, vermutlich aufgrund des Nestin-Verlustes im Rahmen ihrer Ausreifung, über die Zeit signifikant ab. Auch nach 28 Tagen war die Anzahl von Typ2b-Zellen durch MPTP gegenüber den Kontrollen deutlich erhöht (Ctr+Sal 17±0,97, MPTP+Sal 55±6,03,  $p<0,001$ ). Flx hatte keinen Effekt auf die Proliferation der Typ2b-Zellen (s. Fig.4b in [39]). Typ3-Zellen sind unreife Neurone, die DCX, aber kein Nestin mehr exprimieren, und eine Morphologie unreifer Neurone aufweisen (s. Fig.5e in [39]) Nach 10 Tagen führte MPTP zu einer deutlich verminderten Anzahl neugeborener Typ3-Zellen gegenüber den Kontrollen (Ctr 581±60,61, MPTP 410,6±38,33,  $p=0,016$ ). Im Gegensatz dazu war nach 28 Tagen die Anzahl neuer Typ3-Zellen durch MPTP signifikant erhöht (Ctr 53,67±3,22, MPTP 97±10,57,  $p<0,001$ ). Flx hatte keinen Einfluss auf die Anzahl neugeborener Typ3-Zellen (s. Fig.4c in [39]). Die Anzahl reifer Neurone im DG, quantifizierbar anhand des Kernproteins Neuronal Nuclei (NeuN), war nach 10 Tagen durch MPTP signifikant vermindert (Ctr+Sal 149,73±15,62, MPTP+Sal 109,77±10,22,  $p=0,032$ ). Während Flx nach 10 Tagen zu einer Zunahme neugenerierter reifer Neurone in MPTP-Tieren führte (MPTP+Sal 109,77±10,22, MPTP+Flx 154,51±11,74,  $p=0,019$ ), war nach 28 Tagen kein Effekt mehr von MPTP oder Flx auf die Anzahl neugeborener reifer Neurone zu beobachten (s. Fig.4d in [39]). Bei der Betrachtung der absoluten Zahlen der NPCs, unabhängig von ihrer BrdU-Inkorporation zeigte sich, dass Flx bei MPTP-Tieren zu einem signifikanten Anstieg der Typ2b-Vorläuferzellen führte (MPTP+Flx 1383,33±88,78, Ctr+Sal 966,75±113,59,  $p=0,007$ ; s. Fig.4g in [39]). MPTP und Flx wirkten sich auf keine andere Zellpopulation in Veränderungen der absoluten Anzahl des Zellpools aus. Auf den hippocampalen Neurotrophingehalt (BDNF und VEGF) hatte MPTP keinen Einfluss. Flx führte nach 28 Tagen zu einem VEGF-Anstieg, der bei den gesunden

Mäusen signifikant war (Ctr+Flx  $23,75 \pm 5,01$ , Ctr+Sal  $12,4 \pm 1,44$ ,  $p=0,017$ ; MPTP+Flx  $17,42 \pm 3,36$ , MPTP+Sal  $9,58 \pm 1,11$ ,  $p=0,068$ ). Der hippocampale BDNF-Gehalt war nach 10 Tagen durch Flx in MPTP-behandelten signifikant erhöht (MPTP+Sal  $10,47 \pm 15,5$ , MPTP+Flx  $43,78 \pm 15,5$ ,  $p=0,009$ ), nach 28 Tagen führte Flx nur in gesunden Mäusen zu einem BDNF-Anstieg (Ctr+Sal  $10,82 \pm 1,18$ , Ctr+Flx  $225,06 \pm 141,34$ ,  $p=0,027$ ). Wir fanden keinen Einfluss von MPTP auf das Verhalten der Tiere bezüglich Angstverhalten, Schreckreaktion und depressivem Verhalten. Eine Flx-Behandlung über 28 Tage hatte bei allen Tieren in der Shuttle-Box eine verkürzte Latenz dem Schock zu entfliehen zur Folge ( $p=0,016$ ).

## **2. Proliferation oligodendrozytärer Vorläuferzellen in der SN unter Dopamindepletion und dem Einfluss physiologischer proliferatorischer Stimuli**

In der SN führte MPTP kurzfristig zu einem Anstieg BrdU-positiver Zellen in der SN, der nach 10 und 28 Tagen nicht mehr zu beobachten war. Nach 70 Tagen zeigte sich ein signifikanter Abfall neugeborener Zellen in der SN MPTP-behandelter Mäuse (s. Fig.1b,c in [40]). Eine 10-tägige Levodopa-Behandlung führte zu einem Anstieg der BrdU-positiven Zellen in MPTP-behandelten Mäusen (s. Fig.1d,e in [40]). Zu allen untersuchten Zeitpunkten exprimierten ein Großteil der neugenerierten BrdU-positiven Zellen das neuro-gliale Antigen 2 (NG2), ein Marker für oligodendrozytäre Vorläuferzellen (OPCs). Während 3 und 10 Tage nach BrdU-Injektion noch 46-56% der BrdU-positiven Zellen NG2 exprimierten, nahm dieser Anteil in der Folgezeit auf 13% nach 70 Tagen ab. MPTP führte akut (nach 3 Tagen) zu einem Anstieg neugeborener OPCs, hatte aber zu keinem anderen Zeitpunkt einen Effekt auf ihre Anzahl in der SN. Levodopa führte nur bei MPTP-Mäusen zu einer Zunahme neugeborener OPCs (s. Fig.3b in [40]). Da in allen Gruppen eine kontinuierliche Abnahme der nigralen BrdU-positiven OPCs über den gesamten Zeitraum zu beobachten war, nahmen wir eine Ausreifung dieser Zellen zu Oligodendrozyten an. Reife Oligodendrozyten können anhand ihrer 2,3-Cyclic-nucleotid-3-phosphodiesterase (CNPase)-Expression detektiert werden. Die ersten neugeborenen reifen Oligodendrozyten fanden wir nach 10 Tagen in der SN sowohl der MPTP-Mäuse als auch der gesunden Kontrollen. Parallel zu der beobachteten Abnahme der OPCs war bei gesunden Mäusen die Anzahl neuer Oligodendrozyten nach 28 Tagen weiter angestiegen und blieb dann konstant (s. Fig.3c in [40]). Dieser Anstieg spiegelte sich auch im prozentualen Anteil reifer Oligodendrozyten an BrdU-positiven Zellen wieder (10d: 13%, 28d: 29%, 70d: 26%; s. Fig.2A in [40]) In MPTP-Mäusen hingegen wurde kein weiterer Anstieg reifer Oligodendrozyten gefunden und auch der prozentuale Anteil dieser Zellen an den neugeborenen Zellen blieb zu allen Zeitpunkten (10d, 28d, 70d) stabil bei 10-13%. Auch Levodopa konnte zu keinem Anstieg

neuer Oligodendrozyten führen (s. Fig.3d in [40]). Um einen möglichen Effekt der Dopamindepletion und -substitution auf neuronale Vorläuferzellen (NPCs) zu untersuchen, quantifizierten wir Nestin-positive Zellen in der SN. Einen kleinen Anteil aller BrdU-positiven Zellen machten Nestin-positive NPCs in der SN aus. Weder MPTP noch Levodopa hatten einen langfristigen Effekt auf die Proliferation dieser Zellen. Es konnte lediglich eine vorübergehende Zunahme der neugeborenen NPCs durch MPTP nach 3 Tagen beobachtet werden, der am ehesten als unspezifische post-toxische Proliferation zu bewerten ist. Zu keinem Zeitpunkt konnte weder eine Koexpression unreifer (DCX) oder reifer (NeuN) neuronaler Marker, noch eine Koexpression des astrozytären Gliafilament-protein (engl. glial fibrillary acidic protein, GFAP), als Zeichen einer weiteren Differenzierung der gefundenen Nestin-positiven Zellen, gefunden werden. Physische Aktivität (RUN) und ein angereichertes Umfeld (ENR) führten bei gesunden Mäusen zu allen beobachteten Zeitpunkten zu einer gesteigerten Zellproliferation in der SN (s. Fig.4a in [40]). RUN und ENR hatten bei den MPTP-Mäusen zu keinem Zeitpunkt einen Einfluss auf die Anzahl BrdU-positiver Zellen in der SN. Nach einer 10-tägigen Behandlung der MPTP-Mäuse mit Levodopa zeigte sich jedoch ein Anstieg der BrdU-positiven Zellen in der SN nach RUN und ENR (s. Fig.4b in [40]). Eine Levodopa-Behandlung gesunder Mäuse hatte keinen Effekt auf die Zellproliferation in der SN. Bei der Phänotypisierung der proliferierenden Zellen zeigte sich, dass RUN und ENR bei gesunden Mäusen zu fast allen Zeitpunkten zu einer gesteigerten Proliferation der OPCs führten (s. Fig.4c in [40]). Bei MPTP-Mäusen erhöhten ENR und RUN nur kurzfristig die Anzahl neuer OPCs (nach 3 Tagen). Dieser Effekt war zu keinem späteren Zeitpunkt zu beobachten. Der fehlende Anstieg der OPCs bei dopamindepletierten Tieren konnte durch eine Levodopa-Gabe wiederhergestellt werden. Levodopa führte bei den MPTP-Tieren zu einer deutlichen Steigerung der aktivitäts-induzierten Proliferation der OPCs (s. Fig.4d in [40]). Bei den gesunden Kontrollmäusen hatte Levodopa keinen Effekt auf die Anzahl neuer OPCs. Die Anzahl neugeborener reifer Oligodendrozyten war zu keinem Zeitpunkt und in keiner Gruppe durch ENR oder RUN verändert. Abschließend untersuchten wir, ob die *in vivo* gefundenen Nestin-positiven NPCs in der SN *in vitro* das Potential besitzen Neurosphären zu formen, und verglichen sie mit neuronalen Stammzellen aus der SVZ. Nach 7-10 Tagen konnten unabhängig vom Herkunftsort *in vitro* Neurosphären mit identischer Morphologie beobachtet werden. Die Anzahl Neurosphären-bildender Zellen innerhalb der SN war jedoch wesentlich geringer als in der SVZ, so dass keine weitere Charakterisierung möglich war. Die Neurosphären der SVZ zeigten durch MPTP keine Unterschiede in der Morphologie oder ihrer Expression zellulärer Marker.

### 3. Hippocampale Neurogenese im Kontext einer ZNS-spezifische Autoimmunreaktion induziert durch EAE

Die Mäuse zeigten erste Krankheitssymptome 9 Tage nach Immunisierung und erreichten ein Krankheitsmaximum (klinischer Skalawert 2,5) an Tag 19. Ein chronisches Stadium wurde 28 Tage nach Immunisierung mit einem mittleren klinischen Skalawert von 1,75 erreicht (s. Fig.1 in [41]). In der Akutphase der Erkrankung (Gruppen Ia, Ib) führte die ZNS-spezifische Immunreaktion zu einer erhöhten Proliferation im DG, die sich nach 24h trendweise zeigte und nach 4 Wochen signifikant war (Ia MOG:  $3889,5 \pm 756,8$ , OVA:  $2609,5 \pm 610,6$ ,  $p=0,20$ ; Ib MOG:  $792 \pm 65,3$ , OVA:  $309,6 \pm 74,1$ ,  $p < 0,001$ ). Die Neuroinflammation führte zu einem erhöhten Überleben der neugeborenen Zellen. Nach 4 Wochen waren noch  $24 \pm 2\%$  der initial BrdU-positiven Zellen zu finden, während in der Kontrollgruppe nur  $14,8 \pm 3,6\%$  der BrdU-positiven Zellen überlebten ( $p=0,043$ ). Auch in der chronischen Phase der Erkrankung wurde eine Proliferationssteigerung durch EAE gefunden, die nach 4 Wochen signifikant war (IIa MOG:  $1452 \pm 270,5$ , OVA:  $712 \pm 150,6$ ,  $p=0,075$ ; IIb MOG:  $568 \pm 80,3$ , OVA:  $184 \pm 34,2$ ,  $p=0,012$ ). Der Anteil BrdU+-Zellen nach 4 Wochen an initial gefundenen BrdU+-Zellen war wieder in EAE-Mäusen höher als in den OVA-Kontrollen (MOG:  $41,7 \pm 5,9\%$ , OVA:  $27,99 \pm 5,2\%$ ,  $p=0,16$ ; s. Fig. 3a in [41]). Einen entscheidenden Anteil an der gesteigerten Proliferation trugen unreife postmitotische NPCs, die sich durch die Koexpression von DCX auszeichnen. Eine akute Neuroinflammation führte zu einer trendweisen Erhöhung der NPCs nach 24h (Ia MOG:  $2310,6 \pm 350,9$ , OVA:  $1319,6 \pm 364,7$ ,  $p=0,098$ ). Wie erwartet nahm die absolute Anzahl der NPCs über den beobachteten Zeitraum ab [20]. Vier Wochen nach BrdU-Gabe zeigten die EAE-Mäuse signifikant mehr neugeborene NPCs im DG als die Kontrolltiere (Ib MOG:  $396 \pm 49,2$ , OVA:  $132 \pm 25,3$ ,  $p=0,002$ ) Dies entspricht erhaltenen  $19 \pm 2,4\%$  der nach 24h gefundenen NPCs bei MOG-Mäusen gegenüber  $12,12 \pm 2,41\%$  bei OVA-Mäusen ( $p=0,073$ ). In der chronischen Phase der EAE (IIa,b) zeigte sich ebenfalls eine trendweise erhöhte Proliferation der NPCs (IIa MOG:  $750,8 \pm 135,1$ , OVA:  $371,6 \pm 48$ ,  $p=0,057$ ; IIb MOG:  $276 \pm 96$ , OVA:  $140 \pm 98,6$ ,  $p=0,379$ ; s. Fig.3b in [41]). Aufgrund der gesteigerten NPC-Proliferation, und da nach früheren Studien [1] nach 4 Wochen eine volle Ausreifung der neugeborenen NPCs zu beobachten ist, erwarteten wir im Verlauf einen Anstieg reifer Neuronen infolge der EAE. Tatsächlich waren nach 4 Wochen die absoluten Zahlen BrdU-positiver reifer Neurone bei EAE-Mäusen leicht, wenn auch nicht signifikant, höher als bei den Kontrollen (Ib MOG:  $75,4 \pm 17,2$ , OVA:  $64,1 \pm 10,6$ ,  $p=0,607$ ; IIb MOG:  $36 \pm 6,9$ , OVA:  $12 \pm 6,9$ ,  $p=0,071$ ). Betrachtet man jedoch den Anteil neugeborener reifer Neurone an allen BrdU-positiven Zellen, ist dieser bei den EAE-Mäusen nach 4 Wochen niedriger als bei gesunden Kontrollen (Ib MOG:  $9,8 \pm 2,2\%$ , OVA:  $22,5 \pm 2,9\%$ ,  $p=0,006$ ; IIb

MOG:  $6 \pm 2,4\%$ , OVA:  $8,1 \pm 4,8\%$ ,  $p = 0,845$ ). Auf der anderen Seite waren bei den EAE-Tieren sowohl in der akuten als auch in der chronischen Gruppe die Anzahl neuer Gliazellen, erkennbar an der Koexpression von GFAP, signifikant erhöht (Ib MOG:  $62 \pm 14$ , OVA:  $7,2 \pm 4,8$ ,  $p = 0,011$ ; Iib MOG:  $68 \pm 10,6$ , OVA:  $8 \pm 4$ ,  $p = 0,006$ ). Dies zeigte sich ebenfalls in der anteiligen Betrachtung an der BrdU-Gesamtzahl (Ib MOG:  $8,5 \pm 2,4\%$ , OVA:  $2,1 \pm 1,3\%$ ,  $p = 0,056$ ; Iib MOG:  $11,8 \pm 3,6\%$ , OVA:  $2,4 \pm 1,5\%$ ,  $p = 1,072$ ). Zur Untersuchung möglicher molekularer Mechanismen der gestörten Neurogenese im Rahmen der EAE, untersuchten wir mittels PCR die Expression pro-neurogener Transkriptionsfaktoren im Hippocampus. Hierbei zeigte sich, dass im Hippocampus von EAE-Tieren die Expression von Transkriptionsfaktoren, welche die Neurogenese fördern, wie Ngn1 und Ngn2 [42], signifikant erniedrigt ist (Ngn1:  $-3,5 \pm 2,15$ ,  $p = 0,033$ ; Ngn2:  $-3,02 \pm 1,27$ ,  $p = 0,011$ ), wohingegen pro-gliale Faktoren wie Hes5 [42] vermehrt exprimiert werden ( $2,49 \pm 0,81$ ,  $p = 0,044$ ). Die Lef1-Expression, mitverantwortlich für die Proliferation der NPCs [43], war wiederum signifikant erhöht ( $3,01 \pm 1,18$ ,  $p = 0,003$ ). Die Expression von BDNF, einem neurotrophen Faktor, der wichtig für die Differenzierung reifer Neurone ist, war hingegen signifikant erniedrigt ( $-2,62 \pm 0,9$ ,  $p = 0,031$ ; s. Fig.4 in [41]).

## Diskussion

### 1. Eine reaktive Proliferation neuronaler Vorläuferzellen im DG nach Dopamindepletion kann durch Flx weiter gesteigert werden, resultiert jedoch nicht in der Neubildung reifer Neurone

In unserem Experiment führte eine MPTP-induzierte Abnahme dopaminergener Neurone in der SN zu einer Zunahme der D2-R mRNA-Expression im Hippocampus, die jedoch nicht signifikant war. Eine exogene Serotonin-Steigerung durch Flx führte zu einer Abnahme der 5HT1a-R-Expression [44]. Beides auf einen negativen Rückkopplungsmechanismus zwischen Neurotransmittern und der Expression ihrer Rezeptoren hinweisend. Interessanterweise zeigte sich, dass durch Flx auch die Expression der D2-R-mRNA abnahm. Dies weist auf eine Interaktion zwischen den Neurotransmittersystemen von Dopamin und Serotonin hin. Eine andere Studie zeigte, dass MPTP zu dopaminergen und serotoninen Veränderungen im Striatum und anderen Gehirnarealen führt [45], ebenfalls auf eine Interaktion der Transmittersysteme hinweisend. Auf zellulärer Ebene führte MPTP zu einem selektiven Anstieg der NPCs. Dieser Anstieg konnte durch eine Behandlung mit Flx noch weiter gesteigert werden. Diese gesteigerte NPC-Proliferation führte jedoch nicht zu einer langfristig gesteigerten Bildung reifer Neurone im DG, vermutlich aufgrund einer gestörten Differenzierung. Dies führt zu der Hypothese, dass die pathologischen Effekte von MPTP durch endogene Reparaturvorgänge

teilweise kompensiert werden können, diese jedoch aufgrund einer gestörten Differenzierung nicht in einer erhöhten Anzahl reifer Neurone resultieren [46]. Santarelli und Kollegen zeigten am Mausmodell, dass ein Serotoninanstieg durch Flx im gesunden Gehirn zu einer gesteigerten hippocampalen Neurogenese führt [14]. Andere Studien wiederum zeigten, dass Flx zwar die hippocampale Proliferation unreifer neuronaler Vorläuferzellen steigert, jedoch nicht in einer gesteigerten Ausreifung zu integrierten Neuronen resultiert [47]. Auch in unserem Modell hatte Flx einen zusätzlichen Effekt auf die Proliferation der Typ1- und Typ2a-Vorläuferzellen. Interessanterweise war bei den MPTP-Tieren nach 28 Tagen die absolute Anzahl von Typ2b-Zellen, unabhängig von ihrer BrdU-Inkorporation, durch Flx erhöht. Dass durch Flx die Anzahl neugeborener Typ2b-Zellen unverändert blieb, jedoch die Gesamtzahl dieser Zellen anstieg, könnte dafür sprechen, dass Flx protektiv auf untergehende unreife Neurone im MPTP-geschädigten DG wirkt. Auf die Anzahl neuer reifer Neurone hatte Flx langfristig keinen Einfluss. In unserem Modell für IPS konnten wir kein depressives Verhalten durch MPTP feststellen. Dies passt zu den Daten von Vuckovic und Kollegen, die im MPTP-Modell dopaminerge und serotonerge Veränderungen (in diesem Fall striatal), ohne Korrelation mit dem Verhalten beobachteten [45]. Dies trägt zu der Hypothese bei, dass die IPS-assoziierten neuropsychiatrischen Symptome sich von der endogenen Depression unterscheiden. Die therapeutische Wirksamkeit von Flx bei IPS-assoziiierter Depression ist weiterhin umstritten [48]. Unsere Ergebnisse könnten eine mögliche Erklärung für eine fehlende Wirksamkeit bei IPS-assoziiierter Depression darstellen.

Zusammengefasst konnten wir in dieser Studie zeigen, dass eine MPTP-induzierte Dopamindepletion zu einer reaktiven Proliferation hippocampaler Vorläuferzellen führt. Ein endogener Reparaturmechanismus, der durch Serotonin (Flx-Gabe) weiter gesteigert werden kann, jedoch nicht in einer gesteigerten Proliferation reifer Neurone resultiert.

## **2. Eine gestörte aktivitäts-induzierte Oligodendrogenese unter Dopamindepletion kann durch Levodopa wieder angehoben werden**

Da das IPS durch eine dopaminerge Neurodegeneration in der SN gekennzeichnet ist, wäre ein möglicher Therapieansatz ein Ersatz der untergehenden Nervenzellen durch endogene Stammzellen. In Tiermodellen für IPS wurde eine kontinuierliche Neubildung NG2-positiver OPCs in der SN gefunden. Die Proliferation dieser Zellen ist zum einen erheblich durch physische Aktivität und eine angereicherte Umgebung reguliert, zum anderen wurde bei IPS eine verminderte Proliferation der OPCs gefunden [20]. Wie erwartet konnte in unserem Experiment die Proliferation oligodendrozytärer Vorläuferzellen in der SN gesunder Mäuse durch die

physiologischen Stimuli RUN und ENR gesteigert werden [20, 49]. Entgegen früherer Studien blieb eine aktivitätsinduzierte Proliferation der OPCs nach Dopamindepletion aus, konnte jedoch durch eine Behandlung mit Levodopa wiederhergestellt werden. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass eine aktivitätsinduzierte Zellproliferation entscheidend von Dopamin abhängt. Obwohl weiterhin ungeklärt bleibt, inwiefern diese Zellen zu Wiederherstellungsprozessen der untergegangenen Neurone beitragen können, weist ihre Reagibilität auf die Dopamindepletion und –substitution auf eine funktionelle Rolle nach Dopamindepletion hin. Während *in vivo* der Großteil der OPCs im adulten Gehirn zu Oligodendrozyten ausreift [18], wurde *in vitro* auch eine Differenzierung zu Mikroglia oder in Nervenzellen beobachtet [19]. Außerdem ist gezeigt worden, dass OPCs neurotrophe Faktoren sezernieren, als potentiellen endogenen neuroprotektiven Mechanismus nach Neurodegeneration [50]. In unserem Experiment zeigte sich bei gesunden Mäusen parallel zur Abnahme der OPCs eine Zunahme reifer Oligodendrozyten, hinweisend auf eine physiologische Ausreifung dieser Zellen. Bei MPTP-Mäusen konnten wir zwar eine Abnahme der OPCs beobachten, aber keine weitere Zunahme reifer Oligodendrozyten. Dieser fehlende Anstieg reifer Oligodendrozyten könnte auf eine gestörte Oligodendrogenese infolge der Dopamindepletion hinweisen, wie es auch in anderen Studien beobachtet wurde [51]. Zwar könnte auch eine Differenzierung zu anderen neuronalen Zelltypen ein Grund für den fehlenden Anstieg reifer Oligodendrozyten sein, wobei wir jedoch in keiner anderen Zellpopulation einen Anstieg der BrdU-positiven Zellen parallel zum NG2-Abfall fanden. Auf die Anzahl reifer Oligodendrozyten hatten RUN und ENR keinen Einfluss. Die aktivitätsinduzierte Plastizität der SN scheint also nur auf Vorläuferzellebene aufzutreten und nicht hinreichend zu sein, weitere Reifungsprozesse zu induzieren.

Zusammengefasst weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass die aktivitätsinduzierte Proliferation NG2-positiver OPCs in der SN entscheidend von der Anwesenheit von Dopamin abhängt. Da OPCs neuroprotektive und neuroregenerative Kapazitäten besitzen, könnte eine Proliferationssteigerung durch physiologische Stimuli wie körperliche Aktivität sowie eine reizreiche Umgebung in Kombination mit einer dopaminergen Medikation ein möglicher additiver zukünftiger Therapieansatz bei IPS sein.

### **3. Eine ZNS-spezifische Autoimmunreaktion führt zu einer gesteigerten Proliferation, jedoch gestörten Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen**

In dieser Arbeit untersuchten wir die hippocampale Neurogenese im Kontext einer ZNS-spezifischen Autoimmunreaktion. Im EAE-Modell für MS fanden wir eine gesteigerte Proliferation im DG sowohl im akuten als auch im chronischen Stadium der Erkrankung. Ein



Großteil dieser Zellen waren NPCs, die den Marker für unreife Nervenzellen DCX exprimieren. In Übereinstimmung mit anderen Studien stellte die autoimmune Reaktion einen Stimulus für die hippocampale Proliferation der NPCs dar [26]. Die infolge der Neuroinflammation proliferierten NPCs zeigten im Vergleich zu den Kontrollmäusen eine erhöhte Lebenszeit, wohingegen eine weitere Ausreifung dieser Zellen zu Neuronen hinter den gesunden Kontrollen zurücklag. Darüber hinaus fanden wir eine gesteigerte Anzahl neugeborener GFAP-positiver glialer Vorläuferzellen, die den pro-glialen Transkriptionsfaktor Hes5 exprimieren. Diese sogenannten Typ1-Vorläuferzellen, die den Großteil der proliferierenden Vorläuferzellen darstellen, zeigen eine selektive Reaktivität auf externe Einflussfaktoren [52]. Der beobachtete Anstieg der Typ1-Zellen könnte Ausdruck einer vermehrten Proliferation der Vorläuferzellen sein, aber auch eine Akkumulation inaktivierter Zellen bedeuten. Auch in der SVZ ist bei chronischer EAE eine vermehrte Inaktivierung der Vorläuferzellen durch die Neuroinflammation gezeigt worden [53]. In einer anderen Studie konnte wiederum eine Umprogrammierung der NPCs und Ausreifung zu glialen Zellen beobachtet werden [54]. Neuronale Vorläuferzellen können zu Oligodentroyten generieren und in die demyelinisierenden Läsionen einwandern [55]. Wir konnten in unserer Studie keine Hinweise auf eine Umprogrammierung der Vorläuferzellen (wie z.B. eine gleichzeitige Expression von GFAP und DCX) finden. Auf der Suche nach möglichen molekularen Mechanismen für die gestörte Neurogenese im Rahmen der autoimmunen Neuroinflammation fanden wir, dass pro-neurogene Faktoren wie Ngn1 und Ngn2 bei EAE vermindert exprimiert wurden, während die Expression anti-neurogener und proglialer Faktoren wie Hes5 hochreguliert waren. Hes5 wird in den zuvor erwähnten Typ1-Zellen exprimiert [52] und unterdrückt die neuronale Ausdifferenzierung dieser Zellen. Desweiteren fanden wir, dass BDNF, ein wichtiger neurotropher Faktor für die neuronale Ausreifung [56], in EAE runterreguliert ist.

Unsere Ergebnisse zeigen eine gesteigerte Proliferation hippocampaler NPCs infolge einer ZNS-spezifischen, autoimmunen Neuroinflammation, wobei dieser kompensatorische Prozess nicht in einer erhöhten Ausreifung dieser Zellen zu integrierten Neuronen resultiert. Nachdem andere Studien eine Verbindung zwischen dem Immunsystem und der adulten Neurogenese, kognitiven Funktionen und Verhaltensänderungen herstellten [27], konnten wir mögliche molekularen Mechanismen für die gestörte Neurogenese im Verlauf einer chronischen gegen Myelinscheiden gerichteten Autoimmunreaktion aufweisen.

Da auch andere Autoimmunerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ1 oder systemischer Lupus erythematodes in einer veränderten Neurogenese im DG resultieren [57, 58] und auch neurodegenerative Prozesse mit entzündlichen Veränderungen und einer gestörten

hippocampalen Neurogenese einhergehen [59, 60], könnte eine antiinflammatorische Therapie einen ergänzenden Therapieansatz zum Erhalt einer intakten hippocampalen Neurogenese darstellen.

## Literaturverzeichnis

1. Kempermann, G., et al., *Milestones of neuronal development in the adult hippocampus*. Trends Neurosci, 2004. **27**(8): p. 447-52.
2. Hoglinger, G.U., et al., *Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease*. Nat Neurosci, 2004. **7**(7): p. 726-35.
3. Faure, A., et al., *Impaired neurogenesis, neuronal loss, and brain functional deficits in the APPxPS1-Ki mouse model of Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2011. **32**(3): p. 407-18.
4. Hagg, T., *Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view*. Trends Neurosci, 2005. **28**(11): p. 589-95.
5. Kempermann, G., H.G. Kuhn, and F.H. Gage, *More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment*. Nature, 1997. **386**(6624): p. 493-5.
6. Hirsch, E., A.M. Graybiel, and Y.A. Agid, *Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease*. Nature, 1988. **334**(6180): p. 345-8.
7. Cummings, J.L., *Depression and Parkinson's disease: a review*. Am J Psychiatry, 1992. **149**(4): p. 443-54.
8. Pillon, B., et al., *Cognitive slowing in Parkinson's disease fails to respond to levodopa treatment: the 15-objects test*. Neurology, 1989. **39**(6): p. 762-8.
9. Santiago, R.M., et al., *Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2010. **34**(6): p. 1104-14.
10. Kalia, M., *Neurobiological basis of depression: an update*. Metabolism, 2005. **54**(5 Suppl 1): p. 24-7.
11. Snyder, J.S., et al., *Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour*. Nature, 2011. **476**(7361): p. 458-61.
12. Encinas, J.M., A. Vaahtokari, and G. Enikolopov, *Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(21): p. 8233-8.
13. Malberg, J.E., et al., *Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus*. J Neurosci, 2000. **20**(24): p. 9104-10.
14. Santarelli, L., et al., *Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants*. Science, 2003. **301**(5634): p. 805-9.
15. Perera, T.D., et al., *Necessity of hippocampal neurogenesis for the therapeutic action of antidepressants in adult nonhuman primates*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e17600.
16. Greene, J., et al., *Vascular endothelial growth factor signaling is required for the behavioral actions of antidepressant treatment: pharmacological and cellular characterization*. Neuropsychopharmacology, 2009. **34**(11): p. 2459-68.
17. Lee, J.S., et al., *Induction of neuronal vascular endothelial growth factor expression by cAMP in the dentate gyrus of the hippocampus is required for antidepressant-like behaviors*. J Neurosci, 2009. **29**(26): p. 8493-505.

18. Dawson, M.R., J.M. Levine, and R. Reynolds, *NG2-expressing cells in the central nervous system: are they oligodendroglial progenitors?* J Neurosci Res, 2000. **61**(5): p. 471-9.
19. Lie, D.C., et al., *The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential.* J Neurosci, 2002. **22**(15): p. 6639-49.
20. Steiner, B., et al., *Enriched environment induces cellular plasticity in the adult substantia nigra and improves motor behavior function in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease.* Exp Neurol, 2006. **199**(2): p. 291-300.
21. Frielingsdorf, H., et al., *No evidence for new dopaminergic neurons in the adult mammalian substantia nigra.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(27): p. 10177-82.
22. Zhao, M., et al., *Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(13): p. 7925-30.
23. Monje, M.L., H. Toda, and T.D. Palmer, *Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis.* Science, 2003. **302**(5651): p. 1760-5.
24. Wolf, S.A., et al., *CD4-positive T lymphocytes provide a neuroimmunological link in the control of adult hippocampal neurogenesis.* J Immunol, 2009. **182**(7): p. 3979-84.
25. Wolf, S.A., et al., *Adaptive peripheral immune response increases proliferation of neural precursor cells in the adult hippocampus.* FASEB J, 2009. **23**(9): p. 3121-8.
26. Aharoni, R., R. Arnon, and R. Eilam, *Neurogenesis and neuroprotection induced by peripheral immunomodulatory treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis.* J Neurosci, 2005. **25**(36): p. 8217-28.
27. Ziv, Y., et al., *Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood.* Nat Neurosci, 2006. **9**(2): p. 268-75.
28. Hellings, N., J. Raus, and P. Stinissen, *Insights into the immunopathogenesis of multiple sclerosis.* Immunol Res, 2002. **25**(1): p. 27-51.
29. Chiaravalloti, N.D. and J. DeLuca, *Cognitive impairment in multiple sclerosis.* Lancet Neurol, 2008. **7**(12): p. 1139-51.
30. Minden, S.L. and R.B. Schiffer, *Affective disorders in multiple sclerosis. Review and recommendations for clinical research.* Arch Neurol, 1990. **47**(1): p. 98-104.
31. Feinstein, A., *Mood disorders in multiple sclerosis and the effects on cognition.* J Neurol Sci, 2006. **245**(1-2): p. 63-6.
32. Roosendaal, S.D., et al., *Structural and functional hippocampal changes in multiple sclerosis patients with intact memory function.* Radiology, 2010. **255**(2): p. 595-604.
33. Sicotte, N.L., et al., *Regional hippocampal atrophy in multiple sclerosis.* Brain, 2008. **131**(Pt 4): p. 1134-41.
34. Burns, R.S., et al., *A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(14): p. 4546-50.
35. Steinman, L., *Assessment of animal models for MS and demyelinating disease in the design of rational therapy.* Neuron, 1999. **24**(3): p. 511-4.
36. Prozorovski, T., et al., *Sirt1 contributes critically to the redox-dependent fate of neural progenitors.* Nat Cell Biol, 2008. **10**(4): p. 385-94.
37. Hellweg, R. and H.D. Hartung, *Endogenous levels of nerve growth factor (NGF) are altered in experimental diabetes mellitus: a possible role for NGF in the pathogenesis of diabetic neuropathy.* J Neurosci Res, 1990. **26**(2): p. 258-67.
38. Seligman, M.E., *Learned helplessness.* Annu Rev Med, 1972. **23**: p. 407-12.
39. Lesemann, A., 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**: p. 51-69.

40. Klaissle, 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**: p. 132.
41. Huehnchen, P., et al., *Modulation of adult hippocampal neurogenesis during myelin-directed autoimmune neuroinflammation*. Glia, 2011. **59**(1): p. 132-42.
42. Ross, S.E., M.E. Greenberg, and C.D. Stiles, *Basic helix-loop-helix factors in cortical development*. Neuron, 2003. **39**(1): p. 13-25.
43. Galceran, J., et al., *Hippocampus development and generation of dentate gyrus granule cells is regulated by LEF1*. Development, 2000. **127**(3): p. 469-82.
44. Messripour, M. and J.B. Clark, *The control of dopamine and serotonin synthesis in rat brain synaptosomes*. Neurochem Int, 1985. **7**(5): p. 811-8.
45. Vuckovic, M.G., et al., *Memory, mood, dopamine, and serotonin in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse model of basal ganglia injury*. Neurobiol Dis, 2008. **32**(2): p. 319-27.
46. Park, J.H. and G. Enikolopov, *Transient elevation of adult hippocampal neurogenesis after dopamine depletion*. Exp Neurol, 2010. **222**(2): p. 267-76.
47. Marlatt, M.W., P.J. Lucassen, and H. van Praag, *Comparison of neurogenic effects of fluoxetine, duloxetine and running in mice*. Brain Res, 2010. **1341**: p. 93-9.
48. Wood, L.D., et al., *Clinical review of treatment options for select nonmotor symptoms of Parkinson's disease*. Am J Geriatr Pharmacother, 2010. **8**(4): p. 294-315.
49. Kronenberg, G., et al., *Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli*. J Comp Neurol, 2003. **467**(4): p. 455-63.
50. Mena, M.A. and J. Garcia de Yebenes, *Glial cells as players in parkinsonism: the "good," the "bad," and the "mysterious" glia*. Neuroscientist, 2008. **14**(6): p. 544-60.
51. Takagi, S., et al., *Damage to oligodendrocytes in the striatum after MPTP neurotoxicity in mice*. J Neural Transm, 2007. **114**(12): p. 1553-7.
52. Lugert, S., 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): p. 445-56.
53. Pluchino, S., et al., *Persistent inflammation alters the function of the endogenous brain stem cell compartment*. Brain, 2008. **131**(Pt 10): p. 2564-78.
54. Jessberger, S. and F.H. Gage, *Fate plasticity of adult hippocampal progenitors: biological relevance and therapeutic use*. Trends Pharmacol Sci, 2009. **30**(2): p. 61-5.
55. Jablonska, B., et al., *Chordin-induced lineage plasticity of adult SVZ neuroblasts after demyelination*. Nat Neurosci, 2010. **13**(5): p. 541-50.
56. Ahmed, S., B.A. Reynolds, and S. Weiss, *BDNF enhances the differentiation but not the survival of CNS stem cell-derived neuronal precursors*. J Neurosci, 1995. **15**(8): p. 5765-78.
57. Beauquis, J., et al., *Brain alterations in autoimmune and pharmacological models of diabetes mellitus: focus on hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis disturbances*. Neuroimmunomodulation, 2008. **15**(1): p. 61-7.
58. Stanojic, M., et al., *Disturbed distribution of proliferative brain cells during lupus-like disease*. Brain Behav Immun, 2009. **23**(7): p. 1003-13.
59. Choi, S.H., et al., *Non-cell-autonomous effects of presenilin 1 variants on enrichment-mediated hippocampal progenitor cell proliferation and differentiation*. Neuron, 2008. **59**(4): p. 568-80.
60. Gron, G., et al., *Inhibition of hippocampal function in mild cognitive impairment: targeting the cholinergic hypothesis*. Neurobiol Aging, 2006. **27**(1): p. 78-87.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Anne Lesemann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: ‚*Endogene Neurogenese im adulten Hippocampus und der Substantia Nigra am Mausmodell für das idiopathische Parkinsonsyndrom und Multiple Sklerose*‘ 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](http://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 untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, 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.“

Datum

---

Anne Lesemann

## **Anteilserklärung an den ausgewählten Publikationen**

Anne Lesemann hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: 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: p. 51-69.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der Tier- und Verhaltensexperimente, Durchführung der immunhistologischen Färbungen und ELISAs, Erhebung und Auswertung der Daten, statistische Auswertung der Daten, Schreiben und Revision des Manuskripts.

Publikation 2: 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 2013; 13: p. 132.

Beitrag im Einzelnen: Immunhistologische Färbungen, Erhebung immunhistologischer Daten, Revision des Manuskripts.

Publikation 3: Huehnchen P, Prozorovski T, Klaissle P, Lesemann A et al.: Modulation of Adult Hippocampal Neurogenesis During Myelin-Directed Autoimmune Neuroinflammation. Glia 2011; 59(1): p. 132-42.

Beitrag im Einzelnen: Immunhistologische Färbungen, Erhebung immunhistologischer Daten, Revision des Manuskripts.

Unterschrift, Datum und Stempel PD Dr. med. Barbara Steiner

---

Unterschrift Anne Lesemann

---

## **Druckexemplare der ausgewählten Publikationen**

**Publikation 1: Lesemann et al., 2012**

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: p. 51-69.

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



**Publikation 2: Klaissle et al., 2013**

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 2013; 13: p. 132.

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

**Publikation 3: Huehnchen et al., 2011**

Huehnchen P, Prozorovski T, Klaissle P, Lesemann A et al.: Modulation of Adult Hippocampal Neurogenesis During Myelin-Directed Autoimmune Neuroinflammation. *Glia* 2011; 59(1): p. 132-42.

<http://dx.doi.org/10.1002/glia.21082>

## **Lebenslauf**

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

## **Komplette Publikationsliste**

List J, **Lesemann A**, Wiener E et al.: A new case of chronic lymphocytic inflammation with pontine perivascular enhancement responsive to steroids. *Brain* 2011; 134(8): e185.

Huehnchen P, Prozorovski T, Klaissle P, **Lesemann A** et al.: Modulation of Adult Hippocampal Neurogenesis During Myelin-Directed Autoimmune Neuroinflammation. *Glia* 2011; 59(1): p. 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: p. 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* 2013; 13: p. 132.

List J\*, **Lesemann A\***, Avirame K\* et al: Cerebral autoregulation and brain networks in occlusive processes of the internal carotid artery. Eingereicht.

## **Danksagung**

Ich danke sehr Frau PD Dr. Barbara Steiner für ihre Betreuung dieser Arbeit, ihre große Unterstützung und Geduld bei der Durchführung dieser Arbeit. Ich danke Frau Prof. Dr. Christine Winter und Herrn Prof. Dr. Andreas Kupsch für die Mitbetreuung. Großer Dank gilt meinen Mitstreitern Frau Petra Hühnchen und Herrn Philipp Klaissle sowie der gesamten Arbeitsgruppe, die mir immer hilfsbereit zur Seite standen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Vater Herrn Dr. Dierk Lesemann.