

Aus dem  
CharitéCentrum 15 für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie  
Klinik für Neurologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Matthias Endres

## **Habilitationsschrift**

# **Vorläuferzellbasierte Plastizität und Neurogenese im erwachsenen Gehirn als endogener Reparatursmechanismus bei Neurodegeneration**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Neurologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. med. Barbara Steiner**  
**geboren am 16. Dezember 1971**  
**in Kosice**

Eingereicht: Mai 2012

Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter/in: Prof. Dr. med. Ludwig Aigner

2. Gutachter/in: Prof. Dr. med. Otto W. Witte

## **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>Abkürzungen</b>	<b>3</b>
<b>Vorwort</b>	<b>4</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>2. Eigene Arbeiten</b>	
2.1. Meilensteine adulter Neurogenese im Hippocampus	19
2.2. Beeinflussbarkeit adulter neuraler Vorläuferzellen durch exogene Stimuli	31
2.3. Auswirkungen endogener Veränderungen des Immunsystems auf adulte hippocampale Neurogenese	42
2.4. Plastizität adulter neuraler Vorläuferzellen ausserhalb des Hippocampus	50
2.5. Exogene Manipulation neuraler Vorläuferzellen in der Substantia nigra stimuliert potentielle Reparationsmechanismen nach Neurodegeneration	61
<b>3. Diskussion</b>	<b>69</b>
<b>4. Zusammenfassung</b>	<b>73</b>
<b>5. Literatur</b>	<b>74</b>
<b>Danksagung</b>	<b>80</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>81</b>

## ABKÜRZUNGEN

Abb	Abbildung
AD	Alzheimer´s disease, Morbus Alzheimer
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
APP	Amyloid-precursor protein
BDNF	brain derived neurotrophic factor
BLBP	brain lipid binding protein
BrdU	Bromodesoxyuridin
DBS	deep brain stimulation
DCX	Doublecortin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HD	Huntigton´s disease
IGF	insulin-like growth factor
IPS	idiopathisches Parkinson-Syndrom
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridin
MS	Multiple Sklerose
MOG	myelin-oligodendrozytisches Protein
NG2	neuro-glial antigen
PD	Parkinson´s disease, Morbus Parkinson
Prox1	prospero-related homeobox 1
SN	Substantia nigra
SGZ	subgranuläre Zone
SVZ	subventrikuläre Zone
ZNS	Zentrales Nervensystem

## VORWORT

Akute und chronische neurodegenerative Erkrankungen gehören zu den häufigsten Krankheitsbildern der zunehmend älter werdenden Bevölkerung in den Industrienationen und gehen mit irreversiblen Untergang des neuronalen Gewebes und bleibenden neurologischen Ausfällen einher.

Die bisherige Therapie beschränkt sich einerseits auf symptomatische Behandlung der Hauptbeschwerden, andererseits auf Sekundärprävention im Sinne von Minderung möglicher Risikofaktoren. Da bei den meisten vor allem chronischen neurodegenerativen Prozessen jedoch die Ätiologie bisher nicht eindeutig bekannt ist, ist hier eine Vermeidung oder Minimierung der Erkrankungsrisiken nicht möglich. Die symptomatische Therapie umfasst zumeist die medikamentöse Intervention, die in einigen Fällen spezifisch (pharmakologischer Levodopa Ersatz bei Morbus Parkinson) jedoch nicht nebenwirkungsfrei und dadurch limitiert ist. Bei anderen neurodegenerativen Prozessen wie im Rahmen von Morbus Alzheimer oder Chorea Huntington ist die medikamentöse Therapie beschränkt auf die unspezifische Gabe von Antidementiva, Antipsychotika und Dopaminagonisten, die zumeist unzureichend und lediglich kurzfristig eine Besserung der Beschwerden bewirken. Seit einigen Jahren gehört die stereotaktische neurochirurgische Therapie, die so genannte tiefe Hirnstimulation (*deep brain stimulation*, DBS) zu den Standardverfahren bei Morbus Parkinson, Dystonien und anderen Bewegungsstörungen (Deuschl et al, 2006, Kupsch et al, 2006). Aufgrund der extrem belastenden Operation und ihrer Durchführung lediglich in wenigen spezialisierten Zentren bleibt diese Therapieoption jedoch lediglich einem geringen Anteil an (konstitutiv stabilen) Patienten vorbehalten und bietet trotz zunehmender Optimierung keine Alternative zur medikamentösen Therapie.

Da jedoch die meisten neurodegenerativen Erkrankungen zu Krankheiten des Alters gehören, stellt sich nach wie vor die Frage nach alternativen, den Patienten so wenig wie möglich belastenden, für viele Patienten erreichbaren und sozio-ökonomisch vertretbaren Therapien.

Die Suche nach regenerativen Therapien im Sinne von Zell- und Gewebeersatz rückte in den letzten Jahren zunehmend in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Die Vorstellung, akut und/oder chronisch untergegangenes Gewebe im Zentralen Nervensystem (ZNS) dauerhaft durch funktionell gleichwertiges Gewebe ersetzen zu können, führte zur umfassenden Erforschung von Zellersatztherapien. Der Einsatz von fetalen, embryonalen und adulten Stammzellen aus unterschiedlichen Geweben im Tiermodell und teilweise in Pilotstudien am Menschen ist jedoch aufgrund limitierter Ressourcen, teilweise ausgeprägter immunologischer Reaktionen, lokaler und systemischer Nebenwirkungen sowie aufgrund nicht unerheblicher ethischer Bedenken, bisher lediglich experimentell möglich (Olanow et al, 2003).

Die endogene Kapazität des ZNS neue neurale Zellen zu bilden, die in einigen Gehirnregionen zu reifen und funktionell integrierten Neuronen differenzieren können und bereits durch physiologische Stimuli wie körperliche Aktivität und verstärkte soziale Interaktion hinsichtlich Anzahl und Reifestadium stimuliert werden können, stellt daher eine mögliche therapeutische Alternative dar. Bisher ist in tierexperimentellen Studien und Grundlagenuntersuchungen gezeigt worden, wie die neu gebildeten Zellen charakterisiert und stimuliert werden können und inwieweit sie möglicherweise eine funktionelle Relevanz im gesunden und erkrankten adulten ZNS besitzen. Erste Hinweise auf die Bildung solcher

Zellen im humanen Gehirn wurden ebenfalls in *post mortem* Studien bereits geliefert. Zurzeit wird intensiv erforscht, welche molekularen und zellulären Mechanismen diesem Phänomen zugrunde liegen, was die neurogenen und nicht-neurogenen Zonen im Gehirn voneinander unterscheidet und wie sich diese gehirneigenen Zellen in pathologischen Prozessen verhalten.

Die vorliegenden Arbeiten verstehen sich als Beitrag zu der Beschreibung grundlegender Mechanismen adulter Neurogenese und neuraler zellulärer Plastizität, deren detaillierte Kenntnis unabdingbare Voraussetzung für den Einsatz dieser Zellen als regenerative Therapieoption bei neurodegenerativen Prozessen darstellt.

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Stamm- und Vorläuferzellen im adulten Gehirn

Adulte Stammzellen besitzen per definitionem die Fähigkeit zur Teilung und weiteren Differenzierung in alle Zell- und Gewebstypen (Omnipotenz), in viele verschiedene Zelltypen (Pluripotenz) oder in verschiedene Zelltypen eines spezifischen Gewebsverbands (Multipotenz). Im Gehirn von Säugetieren wurden aus unterschiedlichen Regionen multipotente Stammzellen isoliert, die *in vitro* die Fähigkeit besitzen in die drei großen neuroektodermalen Zelltypen des Gehirns – Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten- zu differenzieren. Das therapeutische Potential dieser adulten Stammzellen aus dem Gehirn ist zurzeit Gegenstand intensiver Untersuchungen, da zunehmend deutlich wird, dass diese Zellen eine Alternative zu embryonalen und fetalen Zellen bei neurodegenerativen Erkrankungen darstellen. Die Vorteile adulter Stammzellen liegen einerseits in der gesetzlich geregelten Möglichkeit ihrer Gewinnung und Anwendung im Gegensatz zur deutschen Gesetzeslage hinsichtlich embryonaler Stammzellen innerhalb des Embryonenschutzgesetzes. Andererseits gibt es Daten aus anderen Ländern (Schweden, USA), die embryonale bzw. fetale Stammzellen als potentiellen Zellersatz bei Neurodegeneration bereits in klinischen Studien einsetzen durchaus problematische Ergebnisse, die die Entwicklung von Malignomen und irreversiblen neuropsychiatrischen Nebenwirkungen zeigen (Übersicht in Olanow et al, 2003).

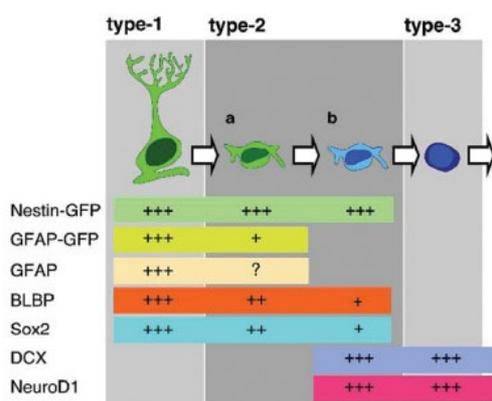
Die Voraussetzung für Untersuchung hinsichtlich der Funktionalität und therapeutischen Einsetzbarkeit, ist eine detaillierte Kenntnis über die Morphologie und die biologischen Eigenschaften adulter Stammzellen. *In vivo* ist die Darstellung multipotenter Stammzellen im adulten Gehirn bisher nicht gelungen, möglicherweise aufgrund fehlender technischer Möglichkeiten (keine geeigneten Antikörper, die eindeutig eine Stammzelle charakterisieren würden). Andererseits ist es jedoch auch denkbar, dass im adulten Gehirn die multipotenten Zellen bereits einen determinierten Vorläuferzellcharakter aufweisen, d.h. Zellen sind, die sich noch teilen können, jedoch hinsichtlich ihrer Differenzierung bereits auf einen Zelltyp festgelegt sind. Diese Vorläufer (Progenitoren) weisen im Gehirn typische Eigenschaften auf, wie die Expression des Intermediärfilaments Nestin, der eben diese neuronalen Vorläufer charakterisiert (Lendahl et al, 1990). Da der eindeutige Nachweis pluripotenter Stammzellen im adulten Gehirn *in vivo* bisher nicht gelungen ist, wird in den folgenden Abschnitten und in den vorgelegten Forschungsergebnissen die Bezeichnung „neurale Vorläuferzelle“ verwendet.

Reynolds und Weiss zeigten erstmalig 1992 neurale Vorläuferzellen in der adulten subventrikulären Zone (SVZ) um die Seitenventrikel der Maus (Reynolds und Weiss, 1992). Diese Zellen waren *in vitro* in der Lage in Glia und Neurone zu differenzieren. Folgestudien zeigten, dass diese Vorläuferzellen in der SVZ zunächst astrozytäre Antigeneigenschaften besitzen und im Verlauf der Differenzierung und Migration neuronale Expressionsmuster aufweisen (Doetsch et al, 1999). In welchem zeitlichen Verlauf sich diese Vorläuferzellen teilen und differenzieren und ob ihre Teilung in symmetrischer (Entstehung zweier identischer Vorläuferzellen) oder asymmetrischer (Entstehung einer neuen Vorläuferzelle und einer differenzierteren Tochterzelle) Weise verläuft ist bisher in weiten Teilen ungeklärt.

Im der subgranulären Zone (SGZ) des Gyrus dentatus des adulten Hippocampus konnten ebenfalls

neurale Vorläuferzellen mit Differenzierungskapazität in Astrozyten, Oligodendrozyten und Neurone gezeigt werden (Ray et al, 1993, Palmer et al, 1999). Die vorgelegten Arbeiten zeigen die detaillierte Untersuchung dieser Differenzierung und ihre Beeinflussbarkeit durch intrinsische und extrinsische, physiologische und pathologische Stimuli. Die von uns aufgestellte derzeit anerkannte Hypothese beschreibt Nestin-positive Vorläuferzellen mit astrozytären Eigenschaften, die über mehrere Stufen (Intermediärstadium zwischen Glia und Neuron, frühneuronales Stadium, reife Nervenzelle) zu funktionell integrierten Neuronen ausreifen (s. Abbildung 1). Wir stellten ein Modell auf, in dem langsam und selten proliferierende gliale Typ-1 Zellen in den Folgegenerationen zu rasch proliferierenden neuronalen Typ-2 und Typ-3 Zellen differenzieren (Übersicht in Kempermann et al, 2004).

Vorläuferzellen, die *in vitro* zu Neuronen und Glia differenzieren können, konnten bis zum heutigen Zeitpunkt auch aus den meisten *in vivo* nicht-neurogenen Regionen des adulten Gehirns gewonnen werden (Palmer et al, 1999, Ehninger und Kempermann, 2003). Dieses Phänomen zeigt, dass die Begriffssystematik bezogen auf das adulte Gehirn bisher nicht eindeutig ist. Es scheint so zu sein, dass es sich bei Vorläuferzellen aus SVZ und SGZ um andere Zellen handelt, als bei den Vorläufern aus anderen Regionen. Ob diese Unterscheidung tatsächlich aufgrund der zellulären Eigenschaften allein zu treffen ist, oder ob, bzw. inwieweit regionale Faktoren des umgebenden Gewebes in die Charakterisierung einbezogen werden müssen, ist noch nicht abschließend geklärt. Die Hypothese einer neurogenen Nische, die ein pro-neurogenetisches Milieu für die Bildung und Differenzierung neuraler Vorläuferzellen zu reifen Neuronen bildet, wird durch die bisherige Datenlage unterstützt (Suhonen et al, 1996, Herrera et al, 1999, Shihabuddin et al, 2000). Den vorliegenden Arbeiten liegen die Fragen zugrunde welche zellulären und molekularen Faktoren eine neurogene Region von einer nicht-neurogenen unterscheiden, vor dem Hintergrund eines möglichen zukünftigen therapeutischen Einsatzes endogener Vorläuferzellen bei neurodegenerativen Prozessen im adulten Gehirn



**Abb.1 Meilensteine neuronaler Differenzierung im adulten Gyrus dentatus**

Typ-1 Zellen bilden eine langsam und selten proliferierende Population neuraler Vorläuferzellen mit astrozytären und radiär-glialen Eigenschaften. Im Verlauf der Differenzierung verändert sich die Morphologie und das Antigenexpressionsmuster der Zellen. In den Intermediärphasen (Typ-2a, Typ-2b) gibt es eine Überlappung glialer und früh-neuronaler Marker, im weiteren Verlauf reifen die Zellen zu funktionell integrierten Körnerzellen im DG aus (Typ-3).

## 1.2 Adulte Neurogenese in neurogenen Arealen des Gehirns

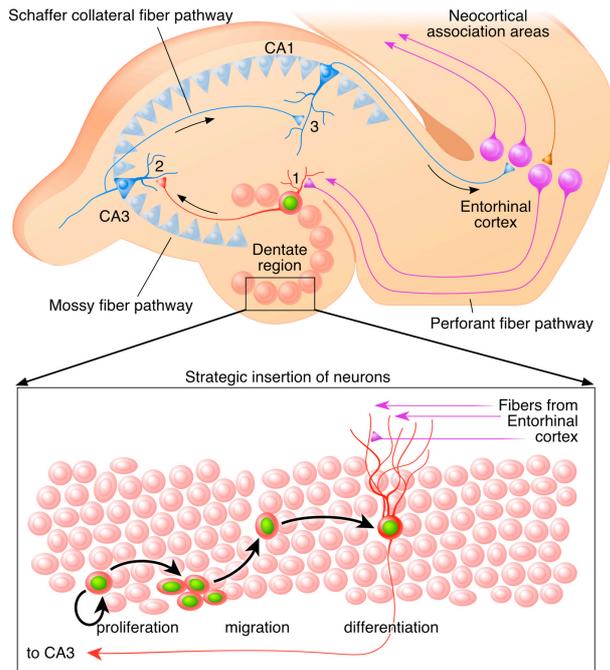
Bis in die 80er Jahre des vergangenen Jahrhunderts wurde in Lehrbüchern für Neurologie und Neurowissenschaften das von dem spanischen Anatomen Santiago Felipe Ramon Y Cajal (1852-1934) aufgestellte Dogma gelehrt, dass im erwachsenen zentralen Nervensystem (ZNS) alles sterben, jedoch nichts regenerieren kann. Diese These wurde erstmalig 1965 von Altman und Mitarbeitern angezweifelt, die zeigen konnten, dass es im adulten Gehirn durchaus Zellneubildung gibt und diese Zellen sogar neuronalen Charakter haben (Altman and Das, 1965). Aufgrund methodischer Einwände geriet diese revolutionäre Arbeit jedoch zunächst in Vergessenheit. Erst zwanzig Jahre später wurde eine Methode gefunden, mit der Zellproliferation im Gehirn *in vivo* detektiert werden konnte. Das Thymidinanalogon Bromodesoxyuridin (BrdU) ist bei geringer Dosierung (50mg/kg Körpergewicht) nebenwirkungsfrei und lagert sich nach systemischer Gabe während der S-Phase in die DNA jeder sich teilenden Zelle ein. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen BrdU kann dieses dann immunhistochemisch im Zellkern nachgewiesen und die Zelle damit als neu gebildet erkannt werden. Seit der Verwendung von BrdU als Proliferationsmarker konnte in der Tat in zahlreichen Studien glaubhaft gezeigt werden, dass das adulte Gehirn sehr wohl in der Lage ist, neue Zellen zu bilden. Die entstehenden Zellen lassen sich als neurale Vorläufer anhand typischer Antigenexpressionsmuster identifizieren. So exprimieren alle neuronalen Vorläuferzellen das Intermediärfilament Nestin (Lendahl et al, 1990). Diese (Nestin-positiven) Vorläuferzellen und die daraus entstehenden Gliazellen und Neurone lassen sich hinsichtlich ihrer proliferativen Eigenschaften, morphologisch, anhand des Antigen-Expressionsmusters und elektrophysiologisch weiter in Subpopulationen einteilen (Doetsch et al, 1999, Yamaguchi et al, 2000, Seri et al, 2001, Kronenberg et al, 2003, Filippov et al, 2003, Steiner et al, 2004, *Übersicht in* Kempermann et al, 2004). Das adulte Gehirn besitzt zwei solcher neurogenen Areale, in denen aus Vorläuferzellen über mehrere Intermediärstadien reife Nervenzellen gebildet werden, die sich funktionell in die vorhandenen Netzwerke integrieren können (van Praag et al, 2002, Jessberger und Kempermann, 2003). In der SVZ der Seitenventrikel entstehen neu gebildete Zellen, die über einen Migrationspfad zum Bulbus olfactorius wandern und im Verlauf dieses Prozesses weiter proliferieren und zu Neuronen differenzieren. Im Bulbus olfactorius lassen sich lebenslang neue reife Neurone nachweisen (Altman et al, 1969, Kornack and Rakic, 2001). Die funktionelle Rolle dieser Neurone ist bisher nicht eindeutig geklärt, es wird jedoch vermutet, dass sie bei Adaptationsprozessen an neue Umgebung, bzw. bei weiblichen Tieren (hier ist auch eine höhere Neurogenese im Vergleich zu männlichen Tieren nachweisbar) bei Erkennung und Schutz der Nachkommen eine Rolle spielen (Brennan and Keverne, 1997, Kendrick et al, 1997, Rochefort et al, 2002). Diese Hypothese wird weiter unterstützt durch Arbeiten, die zeigen, dass Gravidität und Laktation vermutlich über die Ausschüttung von Prolaktin einen signifikant neurogenen Effekt in der SVZ und Bulbus olfactorius haben (Shingo et al, 2003).

Die zweite neurogene Zone befindet sich in der Region unterhalb der Körnerzellschicht (subgranuläre Zone, SGZ) im Gyrus dentatus des Hippocampus. Hier entstehen lebenslang neue neurale Vorläuferzellen, die über einen mehrschrittigen Prozess zu reifen Neuronen und Gliazellen differenzieren (Kempermann et al, 2004, Abbildung 1). Die zunächst in Nagern beschriebene hippocampale Neurogenese wurde durch methodische Adaptierung inzwischen ebenfalls in Gehirnen von adulten Primaten beschrieben (Kuhn et al, 1996). Eriksson und Mitarbeitern gelang die *post*

*mortem* Darstellung neu gebildeter Zellen im humanen Gyrus dentatus (Eriksson et al, 1998). Mit Hilfe des Proliferationsmarkers BrdU, Immunfluoreszenzfärbungen und konfokaler Mikroskopie können seit Mitte der 90er Jahre des vergangenen Jahrhunderts neu gebildete neurale Zellen im adulten Gehirn quantifiziert und phänotypisiert werden.

Diese Zellen wandern innerhalb von wenigen Tagen bis Wochen in die Körnerzellschicht ein und sind sowohl morphologisch als auch physiologisch mit den residenten Neuronen vergleichbar und funktionell in die vorhandenen Netzwerke integriert (van Praag et al, 2002, Jessberger und Kempermann, 2003, Abbildung 2). Die meisten neu gebildeten Zellen im Gyrus dentatus differenzieren jedoch nicht weiter, sondern werden kurze Zeit nach ihrer Bildung apoptotisch (Biebl et al, 2000, Ekdahl et al, 2003, Dupret et al, 2007). Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass nur die funktionell benötigten und integrierbaren Zellen im Gyrus dentatus überleben. Allerdings konnten in letzter Zeit gezeigt werden, dass die neu gebildeten Vorläuferzellen ein hohes Plastizitätspotential besitzen und auch nach initialer phänotypischer Determinierung unter bestimmten Bedingungen gliale Zellen in neuronale Zellen und umgekehrt verändert werden können (Jessberger und Gage, 2009, Jablonska et al, 2010). Diese Studien zeigen erstmalig Hinweise auf mögliche therapeutische Anwendungen der Zellen nach Schädigung. Dennoch ist trotz intensiver Studien hinsichtlich der Integrierbarkeit und Plastizität adulter neuraler Vorläufer nach wie vor die funktionelle Rolle der Zellen nicht eindeutig geklärt. Es gibt zunehmend Hinweise auf Beteiligung dieser Zellen bei Lern-, Gedächtnis- und Adaptationsvorgängen; so zeigen Tiere mit erhöhter hippocampaler Neurogeneserate ein signifikant besseres Lernverhalten (Kempermann et al, 1997, van Praag et al, 1999, Shors et al, 2002, Ehninger und Kempermann, 2006). Die hier vorgelegten Arbeiten untermauern diese Hypothese und zeigen gleichzeitig zelluläre und molekulare Mechanismen (z. B. ein intaktes peripheres Immunsystem), die bei der Aufrechterhaltung adulter Neurogenese und damit bei intakter hippocampaler Funktion eine Schlüsselrolle spielen (Wolf et al, 2009a+b).

Die Neubildung und Differenzierung von Neuronen im adulten Gehirn ist aktivitätsabhängig regulierbar. So führen freiwillige körperliche Aktivität und das Leben in einer reizreichen Umgebung zu einer gesteigerten Neurogeneserate im Hippocampus und zu verbesserten kognitiven Leistungen der Experimentaltiere. Diese robusten physiologischen Stimuli bewirken in nicht-neurogenen Arealen ebenfalls die Steigerung der Zellproliferation und bewirken funktionelle, klinisch messbare Effekte, sie sind jedoch nicht suffizient, um potentielle neurale Vorläuferzellen zur neuronalen Differenzierung zu stimulieren. Die Suche nach Mechanismen, die den neurogenen Gyrus dentatus von den nicht-neurogenen, aber plastischen Regionen unterscheidet, stellt den Mittelpunkt unserer Arbeit und der vorgelegten Forschungsergebnisse dar.



**Abb. 2 Proliferation und Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen im adulten Gyrus dentatus** (nach Guo-Li Ming, Dept. of Neuroscience, John Hopkins School for Medicine, 2005)  
 In der SGZ des Gyrus dentatus entstehen kontinuierlich neue neuronale Vorläuferzellen, die in die Körnerzellschicht einwandern und zu reifen Neuronen differenzieren. Sie werden in die vorhandenen Netzwerke integriert und bilden synaptische Projektionen zur CA3 Region und damit in den entorhinal-hippocampalen Zyklus aus und erhalten selbst synaptische Verbindungen aus dem entorhinalen Kortex.

### 1.3 Endogene zelluläre Plastizität in nicht-neurogenen Zonen

In den letzten Jahren wurde deutlich, dass das adulte Gehirn nicht nur in den beiden exklusiven neurogenen Arealen SVZ und SGZ in der Lage ist, neurale Vorläuferzellen zu bilden. Stamm- und Vorläuferzellen können ebenfalls aus Cortex, Amygdala, Striatum und anderen Arealen des adulten Gehirns isoliert und *in vitro* in Neurone und Gliazellen differenziert werden (Reynolds and Weiss, 1992, Palmer 1999, Ehninger und Kempermann, 2003). Welche Rolle diese Zellen jedoch *in vivo* spielen und ob sie einen endogenen zellulären Pool für potentielle Regeneration und Zellersatz bieten, ist bisher nicht bekannt.

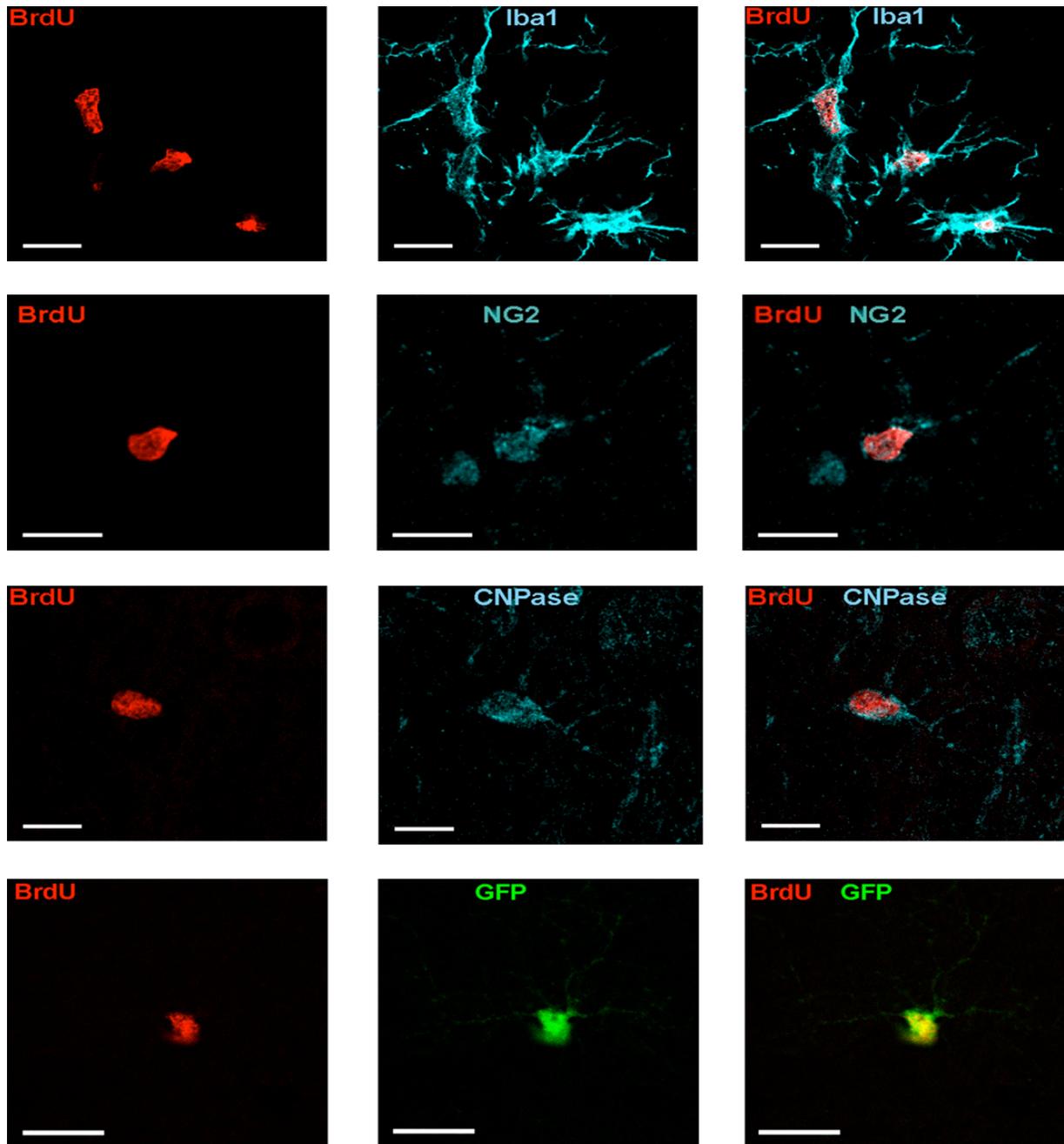
Zhao und Mitarbeiter postulierten 2003, dass die adulte Substantia nigra (SN), eine dopaminerge Zone im Mittelhirn, deren Schädigung zum klinischen Bild eines Parkinson-Syndroms (IPS) führt, ebenfalls neue Neurone bilden kann. Die Autoren zeigten im Mausmodell für IPS BrdU-positive dopaminerge Zellen in der SN als Hinweis auf endogene nigrale Neurogenese und als ersten Hinweis auf einen potentiellen endogenen Reparationsmechanismus bei Neurodegeneration (Zhao et al, 2003). Die Daten aus dieser Arbeit bleiben umstritten, da ein Jahr später von einer anderen Arbeitsgruppe gegenteilige Befunde publiziert wurden (Frielingsdorf et al, 2004). Frielingsdorf und Mitarbeiter untersuchten ebenfalls die Neubildung dopaminergener Neurone am selben Mausmodell und beschrieben die von Zhao et al erhobenen Befunde als methodisch bedingte Artefakte. Zwar konnten auch in dieser Arbeit BrdU-positive Zellen in der SN beschrieben werden, eine Differenzierung zu Neuronen fand nach Ansicht dieser Autoren jedoch nicht statt. Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es lediglich eine geringe Anzahl von Arbeiten, die neu gebildete nigrale Zellen untersuchen, so dass die

Neubildung neuer dopaminergener Neurone nach wie vor umstritten ist. Lie und Mitarbeiter konnten am Rattenmodell für IPS zeigen, dass die meisten neu gebildeten Zellen in der SN das neuro-gliale Antigen NG2 exprimieren und *in vitro* unter bestimmten Kulturbedingungen in der Lage sind, zu Neuronen zu differenzieren (Lie et al, 2002). *In vivo* konnten auch hier keine neu gebildeten Neurone nachgewiesen werden, wurden die potentiellen Vorläufer (NG2-positive Zellen) aus der SN jedoch in den adulten Hippocampus der Ratte transplantiert, zeigten sie dasselbe neuronale Differenzierungsmuster, wie die residenten hippocampalen Zellen. Diese Befunde unterstützen die Hypothese, dass die neurogenen Areale des ZNS ein exklusives Mikromillieu besitzen, das die Differenzierung neuraler Vorläufer ermöglicht. Es scheint in der Tat vor allem die zelluläre und molekulare Zusammensetzung dieses Mikromillieus und weniger die neurogene Potenz der neuralen Vorläuferzellen zu sein, die adulter funktionell relevanter Neurogenese unterliegt. Allerdings zeigen adulter neurale Vorläuferzellen an sich eine hohe Plastizitätskapazität; d.h. unter bestimmten Bedingungen ist es gelungen, neuronale Zellen zu glialen Zellen und umgekehrt umzuwandeln (Jessberger und Gage, 2009, Jablonska et al, 2010). Dies ist jedoch bisher lediglich unter bestimmten Kultivierungsbedingungen für hippocampale Zellen gezeigt worden, ohne bisherige erfolgreiche Anwendung *in vivo* an Modellen für neuronale Schädigung. Die Erforschung der Unterschiede der hier zugrunde liegenden molekularen und zellulären Mechanismen in SN (und anderen nicht-neurogenen Arealen) und Hippocampus stellt daher den Schwerpunkt des derzeitigen wissenschaftlichen Interesses auf diesem Gebiet. Interessanterweise zeigt sich zunehmend, dass neurodegenerative Prozesse wie bei Morbus Parkinson durchaus reaktiv Proliferation neuraler Zellen (und neuronaler Vorläufer) als möglichen Reparationsmechanismus bewirken (Aponso et al, 2008).

Die größte methodische Schwierigkeit ist in diesem Zusammenhang die Detektion neuraler Stamm- bzw. Vorläuferzellen im adulten Gehirn *in vivo*. Dies liegt am ehesten einerseits daran, dass die bisher verfügbaren immunhistochemischen Nachweismethoden lediglich *in vitro* anwendbar sind, andererseits ist es jedoch auch denkbar, dass diese Zellen im adulten Gehirn *in vivo* andere Eigenschaften besitzen als im Rahmen von Kultivierungsprozessen. Möglicherweise sind die Stammzellmarker, die eine solche Zelle im adulten Gehirn nachweisen noch nicht bekannt oder die Zellen sind auch in den nicht-neurogenen Arealen bereits neural so weit vordifferenziert, dass charakteristische Eigenschaften einer Stammzelle fehlen. Eine elegante Methode neurale Vorläuferzellen dennoch *in vivo* darstellen zu können, ist der Einsatz von transgenen Mäusen, die das grün fluoreszierendes Protein (GFP) unter dem Promotor des Intermediärfilaments Nestin exprimieren (Yamaguchi et al, 2000). In diesen Tieren sind damit alle neuralen Vorläuferzellen in der Immunfluoreszenz darstellbar und lassen sich quantifizieren und mit glialen und neuronalen Antikörpern weiter differenzieren.

In unserer Arbeitsgruppe wird dieses Mausmodell seit langem verwendet, zunächst um die hippocampalen Vorläuferzellen zu beschreiben (zur Übersicht s. Kempermann et al, 2004).

Die Nestin-positiven neuralen Vorläuferzellen sind jedoch auch in der nicht-neurogenen SN nachweisbar (Klaissle et al, *in Revision*, Lesemann et al, 2012). Wir konnten zeigen, dass diese Zellen hinsichtlich ihrer Proliferationsaktivität und Beeinflussbarkeit durch physiologische Stimuli den hippocampalen Nestin-positiven Zellen ähneln, jedoch sowohl in der gesunden SN als auch im Parkinson-Modell zusätzliche gliale aber keine neuronale Eigenschaften besitzen (s. Abbildung 3).



**Abb.3 Neurale neu gebildete Zellen in der adulten Substantia nigra der Maus**

Zellen mit Eigenschaften von Microglia (Iba-1), Oligodendrozyten (NG2, CNPase) und neurale Nestin-exprimierende neurale Vorläuferzellen (GFP) in der SN der Maus inkorporieren den Proliferationsmarker BrdU als Hinweis für zelluläre Neubildung.

#### 1.4 Adulte Neurogenese und Plastizität bei neurodegenerativen Erkrankungen

Neu gebildete neurale Vorläuferzellen im adulten Gehirn sind bis heute hinsichtlich Morphologie, Antigeneigenschaften, proliferativer Aktivität und Differenzierung in Glia und Neurone ausführlich untersucht worden. Insbesondere in der SGZ und SVZ fokussierten sich die Studien auf die detaillierte Zuordnung und Beschreibung dieser Zellen. Obwohl bekannt ist, dass die neu gebildeten Zellen nach Differenzierung in Neurone die elektrophysiologischen Eigenschaften der umgebenden Nervenzellen

annehmen und sich funktionell in die vorhandenen Netzwerke integrieren, bleibt nach wie vor die Frage nach der funktionellen Rolle dieser Zellen offen (van Praag et al, 2002, Jessberger und Kempermann, 2003). Im Hippocampus gibt es Hinweise auf eine Beteiligung bei Lern- und Gedächtnisprozessen, da gezeigt wurde, dass Tiere mit einer höheren Anzahl neuer hippocampaler Neurone in Lern- und Gedächtnistests besser abschneiden als Kontrollen mit niedrigerer Zellzahl (Kempermann et al, 1997, van Praag et al, 1999). Auch in der SVZ und Bulbus olfactorius scheinen die neuen Neurone bei dem Erkennen neuer Gerüche und damit bei der Orientierung in neuen Situationen eine signifikante Rolle zu spielen (Shapiro et al, 2007, Veyrac et al, 2009). In einer Studie an Londoner Taxifahrern wurde gezeigt, dass mit zunehmenden Ansprüchen an das Orientierungsvermögen (Erlernen von komplizierten Stadtplänen) sich das Volumen des Hippocampus in kernspintomographischen Untersuchungen vergrößert (Maguire et al, 2000). Alle diese Befunde legen somit nahe, dass das *gesunde* Gehirn sich durch Plastizität (Zunahme der Zellzahl und/oder Volumen) an veränderte Anforderungen adaptiert (Kempermann 2002).

Diese Erkenntnis führte im nächsten Schritt zu der Frage nach endogenen Kompensationsfähigkeiten des adulten Gehirns bei pathologischen, akuten und chronischen neurodegenerativen Prozessen. Es ist denkbar, dass Neurogenese bzw. Neuroregeneration und neurodegenerative Prozesse zwei Seiten einer Medaille darstellen. Neurodegeneration wäre in diesem Zusammenhang eher als fehlende oder insuffiziente Neuroregeneration zu bewerten (Übersicht in Steiner et al, 2006). Zugrunde liegt hier die Überlegung, dass es im Gesunden zu einer Homöostase zwischen Degeneration und Regeneration im adulten ZNS kommt, in pathologischen Zuständen kommt es zu einer Störung dieses Gleichgewichts und damit zur Manifestation der Erkrankung. Es gibt bisher kaum Evidenz für diese Theorie, dennoch gewinnt die Vorstellung von einem zellulär-plastischen endogenen *pool* an neuronalen Vorläuferzellen, die durch noch zu beschreibenden Stimuli untergegangenes Gehirngewebe ersetzen könnten, im Rahmen der zunehmenden Suche nach regenerativen Therapien an wissenschaftlicher Relevanz. Veränderungen adulter hippocampaler Neurogenese werden zunehmend im physiologisch alternden Gehirn (Lugert et al, 2010) und in diversen neurodegenerativen Erkrankungen, bzw. deren Tiermodellen beschrieben (Grön et al, 2007, Rao et al, 2005, Choi et al, 2008, Kunimoto et al, 2010). Im Folgenden sind die bisherigen relevanten Studien zu adulter Neurogenese und Vorläufer-basierter Plastizität an beispielhaften Modellen für neurodegenerative Erkrankungen zusammengefasst (Steiner et al, 2006).

#### *1.4.1 Morbus Alzheimer*

Aufgrund der typischen histopathologischen Veränderungen im Hippocampus von Patienten mit Morbus Alzheimer (AD), der Häufung von Beta-Amyloidplaques und neurofibrillären Ablagerungen in Neuronen, die klinisch mit rascher Demenz und schweren kognitiven Einbußen vor allem in Lern- und Gedächtnisfunktionen einhergehen, ist die adulte hippocampale Neurogenese und ihre Veränderung im Verlauf der Erkrankung Gegenstand intensiver Untersuchungen. Die Möglichkeit eines therapeutischen Ersatzes der untergegangenen hippocampalen Neurone durch endogene Zellneubildung wird zurzeit extensiv untersucht. Die hippocampalen pathologischen Veränderungen im Gehirn von Alzheimer-Patienten und in Tiermodellen für Morbus Alzheimer legen nahe, dass es durch die Bildung von Plaques und eine reaktive inflammatorische Reaktion zu einer Veränderung der

Neurogeneserate kommt, die möglicherweise zu den ausgeprägten Störungen der Lern- und Gedächtnisfunktion durch eine herabgesetzte Adaptationsfähigkeit an neue und neu zu erlernende Prozesse beiträgt. In mehreren tierexperimentellen Studien und an humanen neuronalen Vorläuferzellen aus dem adulten Gehirn zeigten *in vitro* Untersuchungen, dass Beta-Amyloid die Proliferation und Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen negativ beeinflussen kann (Haughey et al, 2002a+b). *In vivo* fand sich in dem Presenilin-1-transgenen Mausmodell für AD eine deutlich erniedrigte Neurogeneserate in allen bekannten neurogenen Zonen, Hippocampus, SVZ und Riechhirn (Wen et al, 2004, Wang et al, 2004, Chevallier et al, 2005). In einem anderen Modell für AD, einer transgenen Maus, in deren ZNS das Amyloid-precursor protein (APP) überexprimiert wird, wurde gezeigt, dass die Häufung der Amyloid-Plaques im Hippocampus zu einer gesteigerten Neurogeneserate führt (Jin et al, 2004). Diese Daten stützen die therapeutisch relevante Hypothese, dass es im Hippocampus nach Schädigung und im Verlauf chronischer neurodegenerativer Prozesse zu einer reaktiven endogenen Zellneubildung kommen kann, diese jedoch abortiv verläuft und nicht suffizient das untergegangene Gewebe ersetzen kann (Übersicht in Schaeffer et al, 2009). An dieser Stelle setzen im Hinblick auf regenerative Therapieoptionen die Untersuchungen möglicher positiver Stimulatoren der Zellneubildung an. Es ist bekannt, dass die Lebensführung (Ernährung, Bewegung, kognitive Aktivität) das Risiko an Alzheimer-Demenz zu erkranken signifikant reduzieren (Katzman et al, 1993, Ceria et al, 2001, Friedland et al, 2001, Eng et al, 2002), d.h. dieselben Faktoren die bekanntlich hippocampale Neurogenese signifikant steigern und Lern- und Gedächtnisprozesse positiv beeinflussen können (Kempermann et al, 1998, Kempermann et al, 2002). Im Tiermodell für AD gibt es erste Hinweise auf positive Effekte von Bewegung und reizreicher Umgebung auf kognitive (hippocampale) Funktionen, die einhergingen mit der Erhöhung neurotropher Faktoren im Hippocampus und der Neubildung neuronaler Zellen (Arendash et al, 2004). Insbesondere konnte eine reizreiche Umgebung langfristig und abhängig vom Alter der Experimentaltiere die Bildung neuer neuronaler Vorläuferzellen bewirken und somit die Anzahl der potentiell bei Bedarf zu rekrutierenden neuen Neurone im adulten Gyrus dentatus unabhängig von der Plaquemenge steigern (Mirochnic et al, 2009). Diese Befunde konnten allerdings in Studien an anderen transgenen AD-Mausmodellen nicht bestätigt werden (Cotel et al, 2010, Veeraraghavalu et al, 2010). In wieweit diese Befunde im kausalem Zusammenhang mit der Entstehung und Progression der Erkrankung beim Menschen sind, ist bisher nicht eindeutig geklärt. Hong et al postulierten eine Schlüsselrolle der intakten Phosphoryllierung des Tau-Proteins für die adulte hippocampale Neurogenese, bzw. eine abortive/verringerte Neurogenese in transgenen Tau-defizienten Mäusen (Hong et al, 2009). Eine kürzlich publizierte Studie zeigte hingegen eine Tau-unabhängige Regulierung adulter Neurogenese bei AD-Mäusen, so dass die kausalen zugrunde liegenden Mechanismen weiterhin weitestgehend ungeklärt sind (Blanchard et al, 2010). Es ist weiterhin gezeigt worden, dass das N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor-Antagonisten und andere neurotrophe Peptide, die antidementiv wirken und teilweise bereits therapeutisch bei AD eingesetzt werden, die Proliferation hippocampaler Vorläuferzellen steigern können (Namba et al, 2009, Li et al, 2010). Dies unterstützt die Hypothese von einem kausalem Zusammenhang zwischen hippocampaler Neurogenese und AD-assoziierten dementiellen Symptomen.

#### 1.4.2 Morbus Parkinson

Der kontinuierliche Untergang dopaminergener Neurone in der SN führt zu einem konsekutiven Dopaminmangel in den nigrostriatalen Projektionen zu den Basalganglien. Die Ätiologie der Erkrankung ist nach wie vor unbekannt. Die Pathologie umfasst neben der dopaminergen Degeneration die Bildung von alpha-Synuklein Einschlusskörperchen (Lewy-Körperchen), sowie Veränderungen im cholinergen und serotoninergen System im ZNS. Die Kardinalsymptome betreffen v.a. reduzierte motorische Fähigkeiten (Bradykinese, Rigor, Tremor, posturale Instabilität), umfassen jedoch auch neuro-psychiatrische (Depression) und vegetative Symptome, die in unterschiedlichem Maße die Erkrankung dominieren und zu einer ausgeprägten Minderung der Lebensqualität der Betroffenen und ihrer Angehörigen führen. Derzeitige Therapien beschränken sich auf die Substitution von Dopamin und die Stimulation dopaminergener Gehirnareale und die Behandlung der motorischen Defizite, vergangene Zellersatzversuche durch Transplantation von embryonalen oder fetalen Stammzellen führten bisher nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen und stellen zurzeit keine Therapieoption dar (Olanow et al, 2003). Erste tierexperimentelle Studien zu Neurogenese im adulten Gehirn am 6-OHDA- Rattenmodell und 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) - Mausmodell für IPS konnten zeigen, dass Dopaminmangel zu einer signifikant erniedrigten Neurogeneserate in den neurogenen Zonen SGZ und SVZ führt (Höglinger et al, 2004, Winner et al, 2009). Da die meisten Patienten mit IPS im Verlauf der Erkrankung kognitive Defizite und depressive Symptomatik entwickeln, ist ein möglicher pathogenetischer Zusammenhang mit veränderter hippocampaler Neurogenese denkbar. Aktuelle Studien verstärken diese Hypothese und zeigen eine erniedrigte Neurogeneserate im Gyrus dentatus von 6-OHDA lädierten Ratten. Durch die pharmakologische Behandlung mit dem Antidepressivum Fluoxetin aus der Gruppe der Serotonin-Wiederaufnahmehemmern stieg die hippocampale Neurogeneserate in den lädierten Ratten erneut auf Ausgangsniveau an (Suzuki et al, 2010). Diese Studien untermauern weiter die Hypothese der Dopamin-abhängigen Neurogenese einerseits und den damit im Zusammenhang stehenden kognitiven und depressiven klinischen Symptomen andererseits. In humanen Hippocampus-Präparaten von Parkinson-Patienten konnte allerdings kein quantitativer Unterschied in Neuronenzahlen zwischen Erkrankten und Kontrollen festgestellt werden (Joelving et al, 2006). In dieser Studie wurden jedoch alle residenten neuronalen und glialen Zellen im Hippocampus gezählt, eine möglicherweise vorhandene Veränderung im Hinblick auf den Anteil der neu gebildeten Zellen, v.a. der neuralen Vorläufer, die mit herkömmlichen Markern für Neurone und Glia nicht vollständig identifiziert werden können, wurde nicht berücksichtigt. Im Tiermodell für Morbus Parkinson konnte hingegen nach Läsion eine reaktive Proliferation neuraler Zellen gezeigt werden (Aponso et al, 2008). Die durch den Dopaminmangel bedingte Verminderung der Neurogeneserate in SVZ und Bulbus olfactorius erklärt möglicherweise zum Teil die Parkinson-assoziierte Hyposmie als ein typisches Frühsymptom der Erkrankung. Diese Daten legen nahe, dass eine Veränderung im dopaminergen System zu einer Veränderung der molekularen Homöostase als Voraussetzung für Neuropermissivität führt. Es ist gezeigt worden, dass neuronale Vorläuferzellen in SGZ und SVZ Dopaminrezeptoren exprimieren, so dass auch ein direkter Einfluss des Dopaminmangels auf veränderte neuronale Zellbildung bei IPS und im Tiermodell wahrscheinlich ist (O’Keeffe et al, 2009). Veränderungen im dopaminergen System beeinflussen jedoch auch Zellneubildung in nicht-neurogenen Arealen des Gehirns. In der SN werden im Rattenmodell für IPS deutlich weniger neurale Zellen mit neuronalem

Vorläufercharakter gebildet, als in der gesunden SN. Nach Stimulation durch reizreiche Umgebung und Bewegungstraining als Modelle für Veränderungen der Lebensführung, kommt es einerseits zum signifikanten Anstieg neu gebildeter neuraler Zellen in der SN, andererseits zu einem signifikant verbesserten Verhalten in motorischen Tests (Steiner et al, 2006). Abhängig von der Dauer der Erkrankung zeigt sich im Tiermodell eine signifikante reaktive Proliferation neuraler Vorläuferzellen in der SN als Zeichen für einen endogenen Reparatursmechanismus, dessen Untersuchung im Hinblick auf Stimulierbarkeit und funktionellen Zellersatz zurzeit durchgeführt werden (Lesemann et al, 2012, Klaissle et al, *in Revision*). Es konnten erste Daten zu exogener Steigerung der neuronalen Vorläuferproliferation und Neurogenese im Gehirn von 6-OHDA lädierten Ratten durch zytotrophe Faktoren und Neurotrophine gezeigt werden. So wurde die Zellproliferation und Migration im Gehirn dieser Tiere durch die intracerebrale Zufuhr des *liver growth factor* signifikant erhöht (Gonzalo-Gobernado et al, 2009), neurotrophe Faktoren wie der *platelet derived growth factor* und BDNF führten ebenfalls zur Erhöhung striataler Neurogenese (Mohapel et al, 2005).

### 1.4.3 Chorea Huntington

Die bei der Huntingtonschen Erkrankung (Huntington's disease, HD) autosomal-dominant vererbte Degeneration GABAerger Neurone im Nucleus caudatus und anderer Neuronenpopulationen im Striatum ist bedingt durch die Expression einer mutierten Form des Huntingtin Proteins. Den massiven kognitiven und motorischen Einbußen und einer in allen Fällen frühen Sterblichkeit der Patienten liegt ein Einzelgendeffekt zugrunde. Dennoch ist die damit verbundene Degeneration von Neuronen vergleichbar mit neurodegenerativen Prozessen bei Morbus Alzheimer oder der Parkinsonschen Erkrankung. Der irreversible Zellverlust ist mit den bisherigen, lediglich symptomatischen, medikamentösen Therapien nicht aufzuhalten. Erste Untersuchungen an Tiermodellen für HD zeigten, dass das intakte Huntingtin eine Rolle in der Proliferation neuer Neurone, sowie Synaptogenese und axonalem Wachstum im adulten Gehirn spielt und Huntingtin die Sekretion des neurotrophen Faktors BDNF stimuliert (White et al, 1997, Rigamonti et al, 2000). Im Tiermodell für HD konnte gezeigt werden, dass sowohl die Sekretion von BDNF als auch die Neubildung von neuronalen Zellen im Gyrus dentatus reduziert waren, als Hinweise für eine funktionelle Rolle von Huntingtin bei BDNF-vermittelter adulter Neurogenese (Zuccato et al, 2001, Lazic et al, 2004, Gil et al, 2005). Es ist bisher nicht gezeigt worden, ob eine veränderte Neurogenese im Gehirn von HD-Tieren eine funktionelle Relevanz hinsichtlich der Krankheitssymptomatik spielt, es gibt jedoch erste Hinweise für die Rolle zellulärer Plastizität als mögliche Therapieoption. So fanden sich im humanen Gehirn reaktiv proliferierende neurale Zellen am lädierten Nucleus caudatus als möglichen Hinweis auf regeneratives Potential (Tattersfield et al, 2004, Curtis et al, 2005). Auch zeigten physiologische neurogene Stimuli wie das Leben in reizreicher Umgebung positive Effekte auf Motorik und BDNF Expression im Gehirn von HD-erkrankten Tieren (Spires et al, 2004). Physiologische neurogene Stimuli wie freiwillige körperliche Aktivität konnten allerdings im Gyrus dentatus von Huntingtin-Mäusen nicht reversibel die durch die Erkrankung verminderte adulte Neurogenese steigern (Kohl et al, 2007), so dass hier möglicherweise physiologische Stimuli allein nicht ausreichend therapeutisch wirksam sind. Exogene Stimulation durch bisher nicht im Detail beschriebene am ehesten als Neurotrophine wirksame Faktoren konnte

jedoch eine signifikante Steigerung striataler Neurogenese am Tiermodell für HD als erster Hinweis auf ein mögliches endogenes Reparationspotential gezeigt werden (Snyder et al, 2010).

#### *1.4.4 Multiple Sklerose*

Die Multiple Sklerose ist eine autoimmune neuroinflammatorische Erkrankung, die mit irreversiblen Verlust der neuronalen Myelinscheiden und gleichzeitig dem Untergang von Axonen im ZNS einhergeht. Der neuronale Verlust ist bereits zu Beginn der Erkrankung nachweisbar und stellt vermutlich neben der Zerstörung der Myelinscheiden einen weiteren kausalen Pathomechanismus dar. Aufgrund der disseminierten Lokalisation dieser demyelinisierenden Läsionen sind die resultierenden Symptome vielfältig und reichen von Visusstörungen, über motorische Einbußen bis hin zu teilweise schweren kognitiven Veränderungen. Störungen der Lern- und Gedächtnisfunktionen werden zunehmend mit inflammatorischen neuronalen Veränderungen im Hippocampus in Verbindung gebracht (Übersicht in Chiaravallotti und DeLuca, 2008). Veränderungen im Hippocampus konnten sowohl radiologisch in der MRT nachgewiesen werden (Sicotte et al, 2008, Roosendaal et al, 2010), als auch neuropathologisch in Hippocampus-Präparaten (Geurts et al, 2007). Der irreparable Verlust von Nervenzellen und das Fehlen einer regenerativen Therapiemöglichkeit führten zu der Suche nach endogenem Reparationspotential des ZNS bei MS. Es konnte in tierexperimentellen Studien an der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), einem gängigen Tiermodell für MS gezeigt werden, dass die autoimmune Reaktion zu Veränderungen im Bildungs- und Differenzierungsprozess adulter hippocampaler Neurogenese führt (Ziv et al, 2004). Die Induktion der Erkrankung führte zu einer erhöhten Bildung neuraler Vorläuferzellen, eine antiinflammatorische Behandlung mit Glatirameracetat steigerte im Folgenden die Migration dieser neu gebildeten Zellen zum Ort der demyelinisierenden Läsion als Hinweis auf potentielle Regeneration des untergegangenen Gewebes (Aharoni et al, 2005). Kipnis et al. konnten zeigen, dass die Proliferation neuronaler Vorläufer im adulten Gehirn als möglicher Kompensationsmechanismus nach Schädigung mit einer Autoimmunantwort assoziiert ist (Kipnis et al, 2001). Weiterführende Untersuchungen auch aus unserer Arbeitsgruppe zeigten jedoch, dass diese neu gebildeten neuralen Vorläufer nicht langfristig überleben, sondern vermutlich zu glialen Zellen differenzieren, so dass eine funktionell relevante Neurogenese in diesem Modell nicht stattzufinden scheint. Auf Genebene zeigte sich eine Hochregulierung pro-glialer Faktoren wie Hes5 bei gleichzeitig verminderter Expression von Faktoren, die mit neuronaler Differenzierung adulter Vorläuferzellen assoziiert sind (Hühnchen et al, 2011). Unspezifische Inflammation führte ebenfalls zu einer reduzierten Neurogeneserate im Hippocampus, die jedoch nach antiinflammatorischer Behandlung reversibel war (Monje et al, 2002, Ekdahl et al, 2003). In den hier vorgelegten Arbeiten konnten wir ebenfalls einen Zusammenhang zwischen dem intakten adaptiven Immunsystem in der Peripherie und adulter Neurogenese sowie hippocampaler Fähigkeiten beschreiben, nach wie vor ist es jedoch nicht gelungen adulte Neurogenese im MS Modell dahingehend therapeutisch zu beeinflussen, dass funktionell relevante neurologische Symptome gebessert werden konnten (Wolf et al, 2009a, Wolf et al, 2009b).

#### *1.4.5 Amyotrophe Lateralsklerose*

Der Focus detaillierter Untersuchungen adulter Neurogenese als möglichen therapeutischen Ansatz bei neurodegenerativen Erkrankungen liegt nach wie vor bei Erkrankungen des Gehirns. Jedoch kommt es bei Veränderungen im Bereich des Rückenmarks und peripherer Nerven zum Verlust von Nervenzellen. Bei der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS), einer neuromuskulären Erkrankung, kommt es zu einem unaufhaltsamen Untergang von Motoneuronen mit resultierenden rasch progredienten schweren motorischen Defiziten mit in den meisten Fällen letalem Ausgang. Es gibt erste Hinweise auf ein regeneratives Potential bei ALS, so konnte in G93A-SOD1 transgenen Mäusen eine reaktive Bildung von neuralen Vorläuferzellen und ihre Migration an der Läsionsstelle beschrieben werden (Chi et al, 2005). Auch in diesem Model konnten jedoch weder eine Regeneration untergegangener Neurone noch eine Remission der motorischen Symptome beobachtet werden. Lediglich fand sich eine verbesserte motorische Leistung nach der Gabe des Neurotrophins Insulin like growth factor 1 (IGF-1), das ebenfalls als neurogener Stimulator bekannt ist (Kaspar et al, 2003). Weiterführende Untersuchungen zu der Rolle dieses Faktors bei neuronaler Regeneration bei ALS stehen jedoch noch aus.

### *1.5 Endogene Reparationsmechanismen des adulten Gehirns*

Die Bildung neuer Neurone im adulten Hippocampus und SVZ und die Beschreibung neu gebildeter neuraler Vorläuferzellen mit neurogenem Potential in der SN und anderen Arealen des adulten ZNS wecken erneut Hoffnung auf potentielle endogene Reparationsmechanismen im adulten Gehirn nach akuten Schädigungen und chronisch-neurodegenerativen Prozessen.

Allerdings ist bisher die Frage, was eine neurogene Zone denn tatsächlich neurogen und exklusiv macht, bisher nicht beantwortet. Lie et al konnten in einem Transplantationsexperiment zeigen, dass das zelluläre und molekulare Millieu einer neurogenen Zone sich offenbar von dem einer nicht-neurogenen erheblich unterscheidet. In dieser Studie wurde gezeigt, dass Zellen mit neuronalem Vorläufercharakter in der Substantia nigra existieren, jedoch an ihrem Ursprungsort nicht in Neurone differenzieren können. Werden diese Zellen jedoch explantiert, differenzieren sie *in vitro* in Neurone. Transplantiert man diese nigralen Vorläuferzellen nun in eine neurogene Umgebung des Gyrus dentatus, differenzieren sie auch dort zu hippocampalen Neuronen (Lie et al, 2002).

Um also das neurogene Potential dieser Zellen bei neurodegenerativen Prozessen nutzen zu können, müssen die zellulären und molekularen Mechanismen bekannt sein, die ein neurogenes Mikromillieu ausmachen. Darüber hinaus ist es notwendig zu verstehen, wodurch adulte Neurogenese stimuliert bzw. supprimiert werden kann und welche dieser Stimuli physiologische Neubildung der Neurone induzieren, bzw. welche pathologischen Prozesse zu einer aberranten Neuro- und Gliogenese führen. In keiner der bisherigen Studien an Modellen für neurodegenerative Erkrankungen konnte ausreichend gezeigt werden, dass die Neubildung und Differenzierung von Neuronen im erwachsenen Gehirn als Ersatz des untergegangenen Gewebes fungieren kann. Die funktionelle Relevanz der reaktiven Zellneubildung bleibt nach wie vor nicht eindeutig erklärt. Um ein therapeutisches Nutzen aus der potentiellen Selbstregeneration des Gehirns zu ziehen, müssen noch folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Wie unterscheiden sich neu gebildete Zellen mit neuralem Vorläufercharakter in verschiedenen Arealen des adulten Gehirns hinsichtlich Antigenexpression und elektrophysiologischer Eigenschaften voneinander?
- 2) Welche regionalen Unterschiede hinsichtlich zellulärer und molekularer Strukturen des jeweiligen Mikromilieus bestehen zwischen neurogenen und nicht-neurogenen Zonen?
- 3) Wie unterscheiden sich die kontinuierlich neu gebildeten neuronalen Vorläuferzellen im gesunden adulten Gehirn von den reaktiv nach Neurodegeneration gebildeten neuronalen Zellen?
- 4) Welche funktionelle Rolle spielt der Zellersatz nach Neurodegeneration?
- 5) Welche physiologischen, pharmakologischen oder invasiv-interventionellen Zusatztherapien spielen eine Rolle bei der Unterstützung gehirneigener zellulärer Plastizität?

Die vorgelegten Arbeiten stellen einen Baustein in der Beantwortung dieser Fragen dar und bilden die Grundlage für zukünftige Projekte unserer Arbeitsgruppe.

## 2. EIGENE ARBEITEN

### 2.1. Meilensteine adulter Neurogenese im Hippocampus

#### Typ-2 Zellen als verbindendes Element der glialen und neuronalen Zelldifferenzierung im adulten Gyrus dentatus der Maus

Steiner B, Klempin R, Wang LP, Kott M, Kettenmann H, Kempermann G. 2006. Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *GLIA* 54 (8): 805-14.

Die adulte Neurogenese im Gyrus dentatus des Hippocampus umfasst einen mehrschrittigen Reifungsprozess der neu gebildeten Zellen. Residente Vorläuferzellen im Gyrus dentatus durchlaufen mehrere Stadien der Reifung, von der neural vordifferenzierten Zelle bis zum Neuron oder einer Gliazelle. Neurale Vorläufer sind im adulten Gehirn durch die Expression des Intermediärfilaments Nestin charakterisiert. Die Gesamtpopulation der Nestin-exprimierenden Zellen lässt sich anhand von morphologischen Kriterien, einem spezifischen Antigenexpressionsmuster und der elektrophysiologischen Eigenschaften dieser Zellen weiter unterteilen. In Vorarbeiten ist es uns bereits gelungen, diese Subpopulationen zu beschreiben (Kronenberg et al, 2003, Filippov et al, 2003, Steiner et al, 2004). Typ-1 Zellen sind gliale Zellen mit astrozytärer Morphologie und elektrophysiologischen Eigenschaften von Astroglia. Sie stellen eine langsam und selten proliferierende Population dar, die gliale Marker exprimiert und den größten Teil der Nestin-positiven Zellen im Gyrus dentatus darstellt. Typ-2 Zellen exprimieren frühe neuronale Marker (Doublecortin, DCX, Calretinin, NeuroD1) und stellen die am stärksten proliferative Subpopulation dar. In Vorarbeiten stellten wir bereits die Hypothese auf, dass Typ-1 Zellen einen residenten *pool* an Vorläuferzellen darstellen, die durch möglicherweise asymmetrische Zellteilung zur Neubildung von neuronalen Typ-2 Zellen führen, die dann stark proliferieren und zu reifen Neuronen ausdifferenzieren (Steiner et al, 2004, Kempermann et al, 2004).

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir den Differenzierungsschritt von einer frühen Typ-2 Zelle, die Nestin exprimiert, jedoch nicht weiter neuronal differenziert zu sein scheint, zum nächsten Reifungsstadium, der Typ-2 Zelle mit dem frühesten neuronalen Antigenexpressionsmuster. Ziel der Untersuchung war es zu zeigen, dass gliale Zellen tatsächlich zu frühen Neuronen differenzieren können und der von uns hypothetisierte Reifungsprozess Nestin-positiver Vorläuferzellen *in vivo* nachweisbar ist. Hierzu wurde adulten transgenen Mäusen, die das grün fluoreszierende Protein (GFP) unter dem Promotor von Nestin exprimieren, intravenös der Proliferationsmarker BrdU verabreicht. Desweiteren wurden transgene Tiere untersucht, die GFP unter dem Astrozytenmarker *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) exprimieren. Der Einsatz der transgenen Tiere erlaubt die direkte Visualisierung der Nestin- bzw. GFAP-positiven Zellen *in vivo*. Die Tiere wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach BrdU getötet und die Gehirne histologisch untersucht. Ein Teil der Gehirne wurde für elektrophysiologische Ableitungen aufgearbeitet. Wir konnten zeigen, dass Zellen mit glialen Vorläufereigenschaften (Expression von Sox-2 und dem *brain lipid binding protein*, BLBP) im Laufe der Zeit kaum an Gesamtzahl zunehmen, hingegen die Zahl der Zellen in einem Intermediärstadium zwischen Glia und Neuron (gleichzeitige Expression von GFAP und DCX in einem kurzen Zeitfenster) über die Zeit deutlich anstieg. Im weiteren Verlauf nahm die Anzahl der Zellen in diesem

Intermediärstadium ab, bis ausschließlich Typ-2 Zellen mit rein früh-neuronalem Phänotyp nachweisbar waren. Diese Daten bestätigten somit unsere Hypothese von einer heterogenen Typ-2-Zellpopulation, die aus frühen glial-neuronalen Zellen und weiter differenzierten neuronalen Vorläufern besteht. Die morphologische und immunhistochemische Einteilung der Typ-2 Zellen in gliale Zellen und früh neuronale Zellen ließ sich in elektrophysiologischen Untersuchungen bestätigen.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16958090>



















## **2.2. Beeinflussbarkeit adulter neuraler Vorläuferzellen durch exogene Stimuli**

### **Physiologische und pathologische Stimuli neuronaler Vorläuferzellen im adulten Gyrus dentatus der Maus**

Steiner B, Zurborg S, Hörster H, Fabel K, Kempermann G. 2008. Differential 24 h responsiveness of Prox1-expressing precursor cells in adult hippocampal neurogenesis to physical activity, environmental enrichment, and kainic acid-induced seizures. *Neuroscience* 154(2): 521-9.

Es ist seit langem bekannt, dass freiwillige körperliche Aktivität, das Leben in einer reizreichen Umgebung, aber auch pathologische Stimuli, wie epileptische Aktivität, die Anzahl neu gebildeter Neurone im Hippocampus steigern (van Praag et al, 1997, Kempermann et al, 1999, Brandt et al, 2003, Jessberger und Kempermann, 2003). Wir konnten bereits zeigen, dass diese Stimuli der Neurogenese ebenfalls auf die Neubildung von hippocampalen Astrozyten wirken (Steiner et al, 2004). Wir beschrieben bereits die verschiedenen Differenzierungsstufen neuraler Vorläuferzellen im Gyrus dentatus und die Einteilung dieser Zellen in reifungsabhängige Subpopulationen (Typ-1, Typ-2a, Typ-2b, Typ-3 Zellen, Kronenberg et al, 2003, Filippov et al, 2003, Steiner et al, 2006). Physiologische Stimuli und pathologische Prozesse wirken in unterschiedlicher Weise auf Proliferation Nestin-positiver Zellen abhängig vom Reifestadium. In den bisherigen Studien unserer Arbeitsgruppe und Anderen wurden physiologische und pathologische Stimuli meist längerfristig (Behandlungsdauer von einigen Tagen bis Wochen) eingesetzt.

In der vorliegenden Arbeit stellten wir die Frage, ob bereits ein akuter Stimulus durch kurzzeitige körperliche Aktivität, Veränderung der Umgebung und akute epileptische Aktivität einen Einfluss auf Proliferation und Differenzierung neuraler Vorläufer abhängig vom Reifegrad ausübt. Transgene, Nestin-GFP exprimierende Tiere erhielten eine einmalige systemische Injektion von BrdU und wurden für 24 Stunden in Käfigen mit freiwilligem Zugang zum Laufrad, bzw. in reizreicher Umgebung gehalten, eine dritte Gruppe erhielt einmalige Injektionen des epileptogenen Wirkstoffs Kainat. Die Tiere wurden 24 Stunden, bzw. 4 Wochen nach dieser akuten Stimulation getötet und die Gehirne histologisch ausgewertet. Als frühesten Marker für neuronal differenzierte Zellen wurde der Transkriptionsfaktor prospero-related homeobox-1 (Prox1), der bereits 1 Stunde nach Neubildung der Zellen in neuronal determinierten Zellen nachweisbar ist, gewählt. Wir konnten beobachten, dass Kainat als stärkster neurogener Stimulus die Proliferation glialer Typ-1 Zellen akut erhöhen konnte und dass es unter dem Einfluss von Kainat zu einer signifikanten Reduktion von undifferenzierten Nestin-positiven Vorläufern (Typ-2a) zugunsten differenzierter Prox1-positiver Nervenzellen kam. Kurzzeitige freiwillige körperliche Aktivität wirkte sich im Gegensatz zu Kainat positiv auf die Neubildung eben dieser undifferenzierter Vorläufer (Typ-2a Zellen) aus. Der kurzzeitige Einfluss reizreicher Umgebung und die Gabe von Kainat spiegelten sich in der Proliferation bereits differenzierter Zellen (Typ-2b und Typ-3) wieder. Der kurzzeitige Einfluss von Kainat reichte sogar aus, um das langfristige Überleben der neu gebildeten Neurone über einen Zeitraum von 4 Wochen zu steigern.

Diese Daten zeigen, dass physiologische und pathologische Stimuli der Neurogenese ein differenziertes Muster an Veränderungen der Zellneubildung im adulten Hippocampus aufweisen. Neuronale Vorläuferzellen und neue neuronale bzw. gliale Zellen werden abhängig von ihrem

Reifestadium unterschiedlich stark reguliert. Die Frage nach der funktionellen Integrität der neu gebildeten Zellen abhängig vom Stimulus muss noch beantwortet werden.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18502050>

















### **2.3. Auswirkungen endogener Veränderungen des Immunsystems auf adulte hippocampale Neurogenese**

#### **Zelluläre und molekulare Faktoren des peripheren Immunsystems als Schlüsselmechanismen adulter hippocampaler Neurogenese**

Wolf SA\*, Steiner B\*, Akipmarli A, Kammertoens T, Nassenstein C, Braun A, Blankenstein T, Kempermann G. 2009. CD4-positive T lymphocytes provide a neuroimmunological link in the control of adult hippocampal neurogenesis. *J Immunol* 182(7): 3979-84.

Trotz intensiver Studien zu adulter Neurogenese sind bisher nur wenige intrinsische zelluläre und molekulare Faktoren bekannt, die bei der Neubildung von Neuronen eine Rolle spielen. Nach wie vor bleibt die Frage ungeklärt, warum das adulte Gehirn in einigen exklusiven Arealen in der Lage ist, bis ins hohe Alter neue Nervenzellen aus Vorläufern zu bilden, während andere Teile des Gehirns diese Fähigkeit nicht besitzen. Um die neuen Neurone als potentiellen Ersatz in neurodegenerativen Prozessen nutzen zu können, ist es unabdingbar, Mechanismen, die adulter Neurogenese zugrunde liegen detailliert zu beschreiben. Es gibt Hinweise darauf, dass neuroimmunologische Faktoren einen Schlüsselmechanismus bei hippocampaler Neurogenese darstellen (Ziv et al, 2004, Aharoni et al, 2005). Es wird vermutet, dass immunogene Faktoren in endogene Regulationsprozesse neurogener Homöostase im Hippocampus eingreifen können. In der vorliegenden Studie sollte gezeigt werden, welche Rolle immunkompetente Zellen aus dem peripheren Immunsystem bei der Aufrechterhaltung der Homöostase im Gyrus dentatus spielen. Es ist seit langem bekannt, dass Lymphozyten trotz intakter Blut-Hirn-Schranke permanent, jedoch in geringer Anzahl in das gesunde Gehirn invadieren (Wekerle und Fierz, 1985, Cserr und Knopf, 1992). In der vorliegenden Studie wurde daher untersucht, welche Lymphozyten-Populationen die Neurogenese beeinflussen und welche weiteren Faktoren an diesem Phänomen beteiligt sind. In adulte Mäusen ohne pathologischen neuronalen Phänotyp wurden periphere CD4-positive und CD8-positive T-Lymphozyten und B-Lymphozyten aus der Peripherie unspezifisch systemisch aktiviert. Aktivierte CD4-positive T-Lymphozyten waren als einzige Population in der Lage, die Anzahl neu gebildeter Neurone im Hippocampus zu erhöhen. Umgekehrt führte die systemische pharmakologische Blockade von CD4-positiven (aber nicht die von CD8-positiven oder B-) Lymphozyten zu einer signifikanten Reduktion hippocampaler Neurogenese und zu einer signifikant schlechteren Lern- und Gedächtnisleistung der Experimentaltiere in kognitiven Verhaltenstests (Morris Water Maze). Als möglichen Mechanismus, der diesen Effekten zugrunde liegt, konnten wir die CD4-abhängige Freisetzung des *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) beschreiben. Zur Bestätigung dieser Daten untersuchten wir verschiedene transgene Mausstämme desselben genetischen Hintergrunds, die eine defiziente CD4-, CD8-, - bzw. B-Zellexpression aufwiesen. Auch in diesem Telexperiment konnten wir bestätigen, dass das Vorhandensein intakter CD4-positiver Zellen in der Peripherie für die Aufrechterhaltung eines neurogenen Milieus im Hippocampus essentiell ist. Im letzten Schritt konnten wir zeigen, dass die Repopulation von Mäusen ohne CD4-positive T-Lymphozyten und gleichzeitig reduzierter hippocampaler Neurogenese mit eben diesen fehlenden CD4-positiven Zellen, zu einem signifikanten Anstieg der Neurogenese geführt hat. Da die Anzahl dieser Zellen im gesunden Gehirn gering ist, gehen wir am ehesten von parakrinen

Effekten aus. Die vorliegende Studie zeigt, dass ein intaktes peripheres Immunsystem für Adaptationsprozesse des adulten Gehirns eine Schlüsselrolle spielt.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19299695>











## 2.4. Plastizität adulter neuraler Vorläuferzellen außerhalb des Hippocampus

### Physiologische Stimuli neuraler Vorläuferzellproliferation in der adulten Substantia nigra der Ratte am 6-OHDA Läsionsmodell für Morbus Parkinson

Steiner B, Winter C, Hosman K, Siebert E, Kempermann G, Petrus DS, Kupsch A. 2006. Enriched environment induces cellular in the adult substantia nigra and improves motor behavior function in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurology* 199(2): 291-300.

Adulte Neurogenese wurde bisher lediglich in zwei exklusiven Arealen des Gehirns beschrieben, es ist jedoch bekannt, dass neurale Stamm- und Vorläuferzellen auch aus anderen Regionen des ZNS isoliert werden können. Diese Zellen besitzen dann *in vitro* unter bestimmten Kulturbedingungen ebenfalls die Fähigkeit, in Neurone zu differenzieren (Reynolds und Weiss, 1992, Palmer et al 1999). Die Frage nach der Rolle dieser Zellen als potentieller Zellersatz bei neurodegenerativen Prozessen im Gehirn rückte daher zunehmend in den Vordergrund. In der adulten Substantia nigra kommt es im Rahmen des Morbus Parkinson zum kontinuierlichen Verlust dopaminergener Neurone. Ein endogener funktioneller zellulärer Ersatz dieser Neurone würde eine optimale Therapie darstellen. Es ist in der Tat im Tiermodell gezeigt worden, dass es nach Läsion, die die Parkinsonsche dopaminerge Degeneration simuliert, zu einer verstärkten Bildung BrdU-positiver Zellen in der SN kommt. Es gibt Hinweise darauf dass aus diesen Zellen tatsächlich Neurone entstehen (Zhao et al, 2003), diese Daten sind jedoch nach wie vor methodisch umstritten (Frielingsdorf et al, 2004). Es ist jedoch eindeutig nachgewiesen, dass die adulte SN potentielle neurale Vorläuferzellen bildet, die *in vitro* zu dopaminergen Neuronen differenzieren (Lie et al, 2002). In der vorliegenden Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, ob sich die Bildung dieser neuen potentiellen Vorläuferzellen mit physiologischen Stimuli hippocampaler Neurogenese steigern oder hinsichtlich der Differenzierung dieser Zellen zu Neuronen beeinflussen lässt. Es wurden Ratten im pharmakologischen 6-OHDA Modell für IPS mit einer einmaligen BrdU-Injektion behandelt und dann für 4 bzw. 7 Wochen in reizreicher Umgebung gehalten und körperlich trainiert. Wir konnten zeigen, dass körperliche Aktivität und eine reizreiche Umgebung einen stimulierenden, proliferativen Effekt auf neu gebildete Zellen in der Substantia nigra hat, wie aus dem Hippocampus bekannt. Bei den neu gebildeten Zellen handelt es sich zum größten Teil um NG2-positive neuro-gliale Zellen, die *in vitro* als neuronale Vorläufer beschrieben wurden (Belachew et al, 2003). Wir konnten *in vivo* keine neu gebildeten dopaminergen Neurone beschreiben, so dass es offenbar eines zusätzlichen Stimulus bzw. eines veränderten Mikromillieus in der SN bedarf, um aus den neu gebildeten Zellen funktionell relevante Neurone zu bilden. Wir untersuchten neben histologischer Veränderungen jedoch auch das klinische Verhalten der Experimentaltiere. Die motorisch eingeschränkten lädierten Tiere (Parallele zum klinischen Bild des IPS) profitierten signifikant vom körperlichen Training und dem Leben in der reizreichen Umgebung im Vergleich zu Kontrolltieren in Standardkäfigen. Zusammenfassend scheinen also physiologische Stimuli das Mikromillieu in der SN nach Läsion so zu verändern, dass es zur Neubildung neuraler Vorläufer und gleichzeitig zu einer klinischen Verbesserung der motorischen Fähigkeiten kommt. Welche Faktoren notwendig sind, die eine Differenzierung der Vorläuferzellen zu funktionell integrierten dopaminergen Neuronen bewirken, wird derzeit in Folgestudien untersucht.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16360152>



















## **2.5. Exogene Manipulation neuronaler Vorläuferzellen in der Substantia nigra stimuliert potentielle Reparationsmechanismen nach Neurodegeneration**

Unilaterale Läsion des Nucleus subthalamicus provoziert die Neubildung neuronaler Vorläuferzellen in der Substantia nigra der Ratte.

Steiner B, Kupsch A, Siebert E, Hosmann K, Klempin F, Morgenstern R, Winter C. 2008. Unilateral lesion of the subthalamic nucleus transiently provokes bilateral subacute glial cell proliferation in the adult rat substantia nigra. *Neurosci Lett* 430(2): 103-8.

Modulationen des adulten Nucleus subthalamicus (STN) durch ablativ oder funktionelle Läsionen führen zu signifikanten Verbesserungen motorischer Defizite und anderer dopaminabhängiger neuropsychiatrischer Symptome bei Patienten mit Morbus Parkinson. Es ist bisher nicht beschrieben worden, welche neurobiologischen Grundlagen diesem Phänomen zugrunde liegen. Es ist in der Vergangenheit von uns und anderen Arbeitsgruppen gezeigt worden, dass die adulte Substantia nigra in der Lage ist, neue neuronale Vorläuferzellen zu bilden, die *in vitro* zu Nervenzellen differenzieren können (Lie et al, 2002, Steiner et al, 2006). Es ist daher durchaus denkbar, dass eine STN-Modulation zu einer reaktiven Neubildung neuronaler Vorläuferzellen führt. Diese Zellen würden eine endogene reaktive Reparationsoption bieten, sollte gezeigt werden können, dass sie zu dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra differenzieren können und das degenerierte Gewebe ersetzen, bzw. über parakrine Effekte neuroprotektiv auf das Gehirn (Substantia nigra, andere Areale) wirken können. Wie bereits dargestellt, ist die Bildung neuronaler Vorläufer in der Substantia nigra beeinflussbar durch pathologische Prozesse (dopaminerge Degeneration im 6-OHDA Modell) und physiologische Stimuli (Bewegung, reizreiche Umgebung, Steiner et al, 2006). In der vorliegenden Studie untersuchten wir akute und chronische Effekte unilateraler STN-Läsion auf die Bildung und Differenzierung neuer glialer und neuronaler Zellen in der Substantia nigra der Ratte. Der Fokus dieser Studie lag auf der Untersuchung dieser Effekte zunächst im Gesunden Gewebe. Gesunde adulte Ratten wurden in drei Gruppen (STN-Läsion, Scheinoperation, nicht lädierte Kontrolle) eingeteilt. Alle Tiere erhielten eine intraperitoneale Injektion BrdU zur Markierung proliferierender Zellen. Stereotaktische Infusion von Ibotensäure führte in der Läsionsgruppe zu unilateraler Schädigung des STN. Die Tiere wurden nach 14 Tagen bzw. 8 Wochen transcardial perfundiert und die Gehirne histologisch untersucht. Die Gabe von Ibotensäure führte in allen lädierten Tieren zu einer mindestens 75% igen Neurodegeneration im STN. In der Substantia nigra konnten wir zeigen, dass die STN Läsion zu einer Steigerung der Zellproliferation der ipsi- und auch der kontralateralen Seite führte. Nach 14d stieg die Anzahl neu gebildeter NG2-positiver Zellen an, diese Population stellte den größten Anteil aller neu gebildeten Zellen dar. Nach 8 Wochen fiel die Zahl auf das Ausgangsniveau, es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen lädierten Tieren und Kontrollen nachgewiesen werden. Neu gebildete Neurone konnten zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden.

Diese Daten zeigen erneut, dass die adulte Substantia nigra in der Lage ist nach exogener Stimulation, neue gliale Zellen mit neuronalem Vorläufercharakter zu bilden. Auch in dieser Arbeit ist es jedoch nicht gelungen, nigrale Neurogenese zu zeigen (Lie et al, 2002, Frielingsdorf et al, 2004, Steiner et al, 2006). Die Bildung neuronaler Vorläuferzellen scheint auch hier abortiv zu verlaufen, so dass in Folgestudien der Fokus auf die Untersuchung der Mechanismen liegen soll, die in neurogenen

Zonen im Unterschied zu nicht-neurogenen Zonen zur Differenzierung von Vorläuferzellen in funktionell integrierte Neurone führen. Das Ziel ist die Manipulierbarkeit neuraler Vorläuferzellen in nicht-neurogenen Zonen im Hinblick auf ihren Einsatz als potentieller Zellersatz bei Neurodegeneration.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18055115>











### 3. DISKUSSION

Die vorliegenden Arbeiten untersuchten die Kapazität des erwachsenen Gehirns, kontinuierlich lebenslang und reaktiv nach Schädigung und bei Adaptationsprozessen neue neuronale Zellen zu bilden. Sie stehen damit im Widerspruch zu der 1928 formulierten und in den letzten beiden Jahrzehnten zunehmend widerlegten Hypothese von Ramon Y Cajal, dass das adulte Gehirn zwar degenerieren, aber niemals regenerieren kann. Inzwischen ist eine mögliche Behandlung neuropsychiatrischer Erkrankungen durch endogenen Zellersatz im Gehirn zunehmend im Focus der Suche nach (endogenen) regenerativen Therapien.

Die intensive und in den letzten Jahren hinsichtlich ihrer Anzahl immens gestiegene Untersuchung gehirneigener zellulärer Plastizität und Neurogenese ist einerseits zunehmend möglich durch die technische Weiterentwicklung, wie den Einsatz von Proliferationsmarkern (BrdU u.a.) oder transgenen Tieren, die eine Visualisierung neuraler Vorläuferzellen und ihre Differenzierung *in vivo* ermöglichen (z.B. transgene Nestin-GFP-Maus, Yamaguchi et al, 2000). Beide Methoden wurden in den hier vorgelegten Arbeiten parallel und ergänzend angewendet. Mit diesen Methoden ist es gelungen, die Neubildung und den Differenzierungsprozess neuraler Stamm- und Vorläuferzellen im adulten Gehirn nachzuweisen und detailliert zu beschreiben. Es wurden neurogene Zonen definiert, d.h. Areale, in denen neu gebildete Stamm- bzw. Vorläuferzellen über mehrere Zwischenstufen zu reifen Nervenzellen differenzieren und von plastischen, jedoch nicht-neurogenen Regionen morphologisch abgegrenzt, in den ebenfalls kontinuierlich neue Zellen gebildet werden, die jedoch keinen neuronalen Phänotyp aufweisen. Es wird jedoch zunehmend auch in den vorgelegten Arbeiten deutlich, dass diese initiale Einteilung in neurogene und nicht-neurogene Areale nicht starr ist und möglicherweise im adulten Gehirn Übergänge oder Veränderungen abhängig von äußeren Einflüssen möglich sind. In den vorliegenden Arbeiten und in Studien anderer Arbeitsgruppen wird beispielsweise die adulte Substantia nigra als eine plastische Region im Gehirn beschrieben, die zwar neurale Vorläuferzellen enthält, diese jedoch *in situ* nicht in Neurone differenzieren (Lie et al, 2002, Frielingsdorf et al, 2004, Steiner et al, 2006, Steiner et al, 2008). Die Arbeit von Zhao et al zeigt jedoch genau solche neu gebildete Tyrosinhydroxylase-positive dopaminerge Neurone in der SN im Krankheitsmodell, nämlich dem MPTP-Mausmodell für Morbus Parkinson. Die Autoren argumentieren mit der in den übrigen Studien nicht suffizient angewandten BrdU-Markierung der neu gebildeten Zellen und schlagen methodisch eine Optimierung durch intracerebrale (intraventrikuläre) BrdU-Injektionen, die zu einer höheren Konzentration von BrdU im Gehirn, und auf diese Weise zu einer größeren Anzahl von markierten neu gebildeten Zellen in der SN führt (Zhao et al, 2003). Obwohl methodisch nach wie vor umstritten, zeigt diese Arbeit jedoch, dass unsere bisherigen Kenntnisse (und methodischen Möglichkeiten) über die Kapazität des adulten Gehirns neue Neurone zu bilden nicht ausreichend sind, um tatsächlich endgültig potentiell regenerationsfähige Areale zu bestimmen, bzw. andersherum die möglichen endogenen neuroregenerativen Kapazitäten bestimmter Gehirnareale nach Schädigung optimal ggf. auch therapeutisch zu nutzen. Eine vergleichbare Diskussion findet zurzeit in der Literatur zu neuraler Plastizität im Hypothalamus – einer bisher als nicht neurogen bezeichneten Zone- statt. Es gibt erste Hinweise auf adulte Neurogenese von funktionell relevanten Neuronenpopulationen im Hypothalamus, die eine Rolle im Energiehaushalt und bei der Nahrungsaufnahme spielen sollen

(Kokoeva et al, 2005). Es ist jedoch bisher umstritten, ob die neu gebildeten Neurone im Hypothalamus selbst entstehen oder bei Änderungen des Energiehaushalts dorthin migrieren, bzw. ob und in welcher Weise sie nicht nur morphologisch den residenten Neuronenpopulationen ähneln, sondern auch funktionell integriert und relevant sind (Pierce et al, 2010). Diese ersten Daten aus dem Hypothalamus bestärken jedoch ein weiteres Mal die Hypothese der endogenen Neurogenesekapazität des Gehirns als möglicher Mechanismus der Adaptation an veränderte und pathologische Prozesse.

Aus Untersuchungen am Hippocampus ist bekannt, dass neurale Vorläuferzellen hinsichtlich ihrer phänotypischen Determinierung und im Verlauf Differenzierung plastisch sind. Mechanismen, die einer solchen Determinierung zugrunde liegen werden derzeit intensiv untersucht (Jessberger und Gage, 2009, Jablonska et al, 2010). Unsere eigenen Daten zeigen, dass es unter bestimmten pathologischen Bedingungen auf Genebene zu Verschiebungen der Expression von pro- und anti-neuralen, bzw. pro- und anti-glialen Genexpressionsmustern kommt (Hühnchen et al, 2011). Die Möglichkeit, eine phänotypische sowie funktionelle Determinierung neuraler Stamm- bzw. Vorläuferzellen beeinflussen zu können, würde einen weiteren Schritt zur therapeutischen Nutzung dieser Zellen bedeuten. Welche intrinsischen und extrinsischen Faktoren hier eine Rolle spielen könnten, steht derzeit im Mittelpunkt der Arbeiten unsere Forschungsgruppe. Einschränkend muss erwähnt werden, dass es durch die bisherigen Methoden nicht gelungen ist zu zeigen, dass neu gebildete Neurone im adulten Gehirn, obwohl elektrophysiologisch funktionell in vorhandene Netzwerke integriert, in der Tat auch eine funktionelle Rolle spielen. Bisher gibt es zwar in zunehmender Anzahl, korrelative Ergebnisse, die veränderte Funktion mit veränderter zellulärer Plastizität und Neurogenese zeigen, ein direkter kausaler Zusammenhang ist jedoch nicht eindeutig nachgewiesen worden. Es ist bekannt, dass Mäuse mit einer höheren Anzahl neu gebildeter hippocampaler Neurone in Lern- und Gedächtnistests besser abschneiden als Kontrollen, dass Ratten mit einer erhöhten Zahl an NG2-positiven neuralen Vorläufern in der SN bessere motorische Leistungen aufweisen und dass erhöhte Anforderungen an Lern- und Gedächtnisfunktionen bei Menschen zu einem veränderten hippocampalen Volumen führen, es fehlt jedoch nach wie vor der eindeutige Nachweis der Rolle der neu gebildeten Zellen bei der Bildung, bzw. Optimierung bestimmter Gehirnleistungen (Kempermann et al, 1997, van Praag et al, 1998, Maguire et al, 2000, Steiner et al, 2006). Mit dem derzeitigen Wissensstand ist die adulte Neurogenese somit zunächst als ein Modell für die vorhandene zelluläre Plastizität im Gehirn zu betrachten. Mit Hilfe der bekannten positiven und negativen physiologischen und pathologischen Stimuli ist adulte Neurogenese in verschiedenen Arealen des Gehirns gut steuerbar und als Modell für plastische Veränderungen des adulten Gehirns untersuchbar. Die bisherigen Daten hinsichtlich der Proliferation, Migration und Differenzierung adulter neuraler Vorläuferzellen im Gesunden und in Modellen für neuropsychiatrische Erkrankungen werden in bereits laufenden Studien für potentielle therapeutische Ansätze durch Zellreparation oder -ersatz genutzt. Im Zentrum dieser Untersuchungen steht vor allem die Frage nach dem Zusammenspiel einer neuropermissiven Umgebung und der Neurogenität der Vorläuferzellen selbst.

In den vorliegenden Arbeiten wurden neurale Vorläuferzellen und ihre Differenzierung im Hippocampus und in der SN am gesunden Gehirn im Rattenmodell für Morbus Parkinson beschrieben

(Steiner et al, 2006a+b, Steiner et al, 2008). Aktuelle Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen morphologische und funktionelle Veränderungen adulter hippocampaler Neurogenese im Mausmodell für Multiple Sklerose und Morbus Parkinson (Hühnchen et al, 2011, Lesemann et al, 2012). Diese Daten bieten die anatomisch-morphologische Grundlage für die Untersuchung der funktionellen Rolle dieser Zellen und ihren möglichen Einsatz in regenerativen Therapien. Weiterhin liegen hier erste Daten zu der Rolle des peripheren Immunsystems und seiner zellulären und molekularen Faktoren bei adulter Neurogenese vor (Wolf et al, 2009a+b). Diese Ergebnisse zeigen zum ersten Mal die funktionelle Interkonnektivität des peripheren Immunsystems und des Gehirns im Hinblick auf die Aufrechterhaltung eines neuropermissiven Milieus im adulten Hippocampus. Um das gehirneigene Potential neue Vorläuferzellen zu bilden therapeutisch nutzen zu können, ist es unumgänglich, an Tiermodellen für neuropsychiatrische Erkrankungen die Veränderungen im Neurogeneseprozess zu beschreiben. Die hier dargestellten Beispiele für solche Erkrankungen in eigenen Arbeiten und Studien anderer Arbeitsgruppen zeigen, dass es abhängig von der Pathogenese zu unterschiedlichen quantitativen und qualitativen Veränderungen kommt. Es scheint so zu sein, dass es im Tiermodell für Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer oder die Multiplen Sklerose zu einer quantitativen Verminderung neu gebildeten Neuronenzahlen kommt, darüber hinaus jedoch auch vor allem auch zu phänotypischen ( und damit möglicherweise auch funktionellen) Verschiebung im Verlauf des Reifungsprozesses neuraler Vorläuferzellen. Es kommt in beiden Fällen zu abortiver Neurogenese, die dann zum vermutlich apoptotischen Zelluntergang neuraler Vorläufer oder ihrer Differenzierung in gliale Zellen führt (Tatebayashi et al, 2003, Donovan et al, 2006, Hühnchen et al, 2011, Lesemann et al, 2012). Der Hippocampus ist bei Morbus Alzheimer eine der wichtigsten neurodegenerativen Prädispositionsstellen, bei der Multiplen Sklerose sowie bei Morbus Parkinson und einer damit assoziierten dementiellen Entwicklung wurde ebenfalls eine häufige Affektion des Hippocampus mit resultierenden kognitiven Störungen beschrieben (Geurts et al, 2007). Es ist daher denkbar, dass den klinischen Befunden bei diesen Erkrankungen eine gestörte Neurogenese zugrunde liegt. Einige neurodegenerative Erkrankungen könnten dieser Hypothese folgend somit als „neuronale Stammzellerkrankungen“ klassifiziert werden, die Beeinflussung der gehirneigenen Kapazität die untergegangenen Neurone selbst wieder zu bilden, könnte dann eine *kausale* regenerative Therapieoption bieten.

Diese theoretischen Überlegungen zeigen, dass adulte hippocampale Neurogenese und zelluläre Plastizität in anderen Hirnregionen zunehmend im Zusammenhang mit der Ätiologie neuropsychiatrischer Erkrankungen gesehen werden.

In sogenannten nicht-neurogenen Regionen konnte gezeigt werden, dass es zu einer kontinuierlichen Proliferation neuraler Vorläuferzellen kommt, die unter bestimmten Kultivierungsbedingungen oder nach Transplantation in neurogene Areale zu Nervenzellen ausdifferenzieren können (Lie et al, 2002). Das regenerative Potential, das in diesen Zellen ruht, könnte zukünftig in therapeutischen Ansätzen für neurodegenerativen Erkrankungen liegen, deren neurodegenerative Veränderungen nicht unbedingt in den neurogenen Arealen des Gehirns lokalisiert sind. In den vorliegenden und laufenden Arbeiten der Arbeitsgruppe werden erste Hinweise auf die zelluläre Plastizität in der nicht-neurogenen SN präsentiert, die von der Pathologie abhängig pharmakologisch oder physiologisch beeinflussbar

ist. So zeigt sich, dass es im Tiermodell für Morbus Parkinson zu einer signifikanten Steigerung der Neubildung potentieller neuraler Vorläufer durch freiwillige körperliche Aktivität kommt (Steiner et al, 2006). Eine Kombination von körperlicher Aktivität mit der pharmakologischen Substitution des fehlenden Dopamins führt darüber hinaus zu einer Veränderung des neuralen Vorläuferphänotyps (Klaissle et al, *in Revision*, Lesemann et al, 2012). Da jedoch auch die Neurogenese in den neurogenen Arealen Hippocampus und SVZ durch den Dopaminmangel bei Morbus Parkinson gestört ist, ist die Suche nach zellulären und molekularen Faktoren, die den dopaminergen Einfluss auf die Bildung neuraler (und neuronaler) Zellen bewirken, essentiell (Höglinger et al, Winner et al, 2009). Dies könnte insofern therapeutisch relevant werden, als gezeigt wurde, dass der Dopaminmangel in Tiermodellen für Morbus Parkinson zunächst zu einer Steigerung der neuralen Zellproliferationsrate und somit zu einem potentiellen endogenen Reparatursmechanismus führt (Aponso et al, 2008). Exogene Manipulationen der Basalganglien führen reaktiv ebenfalls zu einer erhöhten Vorläuferzellbildung in der SN (Steiner et al, 2008). Ansätze zu einem Zellersatz bei neurologischen Erkrankungen sind nach wie vor hypothetisch, da nicht bekannt ist, inwieweit das erkrankte Gehirn den zellulären Ersatz der zugrunde gegangenen Neuronen überhaupt nutzen kann. Die funktionelle Rolle der neu gebildeten Neurone ist im gesunden Gehirn lediglich korrelativ, im erkrankten ZNS bisher noch gar nicht beschrieben worden. Gonzalo-Gobernado et al konnten zeigen, dass die exogene Zufuhr von zytotrophen Faktoren einen positiven Effekt auf adulte Neurogenese bei Morbus Parkinson bzw. seinen Tiermodellen sowohl in neurogenen Arealen, als auch im Striatum und den Basalganglien zeigt (Gonzalo-Gobernado et al, 2009), es ist ebenfalls bekannt, dass neurotrophe Faktoren die striatale Neurogenese signifikant erhöhen (Mohapel et al, 2005). Dies zeigt jedoch lediglich, dass das Forschungsgebiet der endogenen Reparaturskapazität des Gehirns noch in den Anfängen steckt und sich nach wie vor umfassende Untersuchungen zu den zugrunde liegenden Mechanismen anschließen müssen. Die vorliegenden Arbeiten zeigen, dass das Reparaturspotential nach Neurodegeneration durchaus vorhanden ist und bereits durch leichte, nicht invasive physiologische Stimuli beeinflussbar ist. Es ist eindeutig, dass das Gehirn in allen bisher untersuchten Arealen neue neurale Vorläuferzellen bilden kann, die vor Ort nach lokaler Schädigung, bzw. durch Autotransplantation in geschädigte Areale therapeutisch genutzt werden können. Im Hinblick auf eine mögliche therapeutische Anwendbarkeit endogener neuraler Vorläuferzellen und Neurone ist zur ausreichender Beantwortung der eingangs gestellten Fragen die Fortführung intensiver Grundlagenforschung unverzichtbar. Die zunehmend höhere Anzahl von Publikationen zu diesem Thema steigert die Hoffnung auf zukünftige Beantwortung der noch offenen Fragen und unterstützt die Weiterentwicklung und Anwendbarkeit der hier vorgelegten Ergebnisse unserer Arbeiten. Das Ziel ist die Nutzbarkeit, Effektivität und sichere Anwendung endogener regenerativer Fähigkeiten des Gehirns als zellbasierte Therapie für akute und chronische neurodegenerative Erkrankungen beim Menschen.

#### 4. ZUSAMMENFASSUNG

Das adulte Gehirn ist bis ins hohe Alter in der Lage neue Zellen zu bilden, die aus neuronalen Vorläufern in reife und funktionell integrierte Neurone und Gliazellen differenzieren. Dieses Phänomen ist in den neurogenen Zonen robust nachweisbar und hinsichtlich Zellzahl und Differenzierung durch physiologische und pathologische Stimuli beeinflussbar. Die neu gebildeten Neurone scheinen eine funktionelle Rolle bei Lern-, Gedächtnis- und Adaptationsprozessen zu spielen und somit einen endogenen *Reservepool* darzustellen, der bei Bedarf in solchen Prozessen genutzt werden kann. Die Idee, diese neu gebildeten Neurone als endogenen Zellersatz bei neurodegenerativen Prozessen einsetzen zu können, gewinnt zunehmend an Attraktivität und führte zu intensiver Erforschung der zugrunde liegenden zellulären und molekularen Mechanismen adulter Neurogenese. Die bisherigen Erkenntnisse aus den vorliegenden Arbeiten unserer Arbeitsgruppe und aus den Daten in der Literatur zeigen, dass die Homöostase und das lokale Mikromillieu in den neurogenen Zonen für eine quantitativ effektive und funktionell intakte Neubildung von Nervenzellen von entscheidender Bedeutung sind. Die Stimulation residenter neurogener zellulärer und molekularer Faktoren durch physiologische Stimuli führt zur Steigerung der Neurogeneserate und zur funktionellen, klinisch relevanten Effekten. Pathologische Veränderungen dieses Gleichgewichts regulieren Proliferation und Funktion im negativen Sinne. Nach wie vor bleibt die Frage unbeantwortet, welche Faktoren eine solche Homöostase aufrechterhalten und so eine neurogene Zone zu einer solchen exklusiven Region machen. Die vorliegenden Arbeiten nähern sich dieser Frage am Tiermodell für neurodegenerative Erkrankungen und beschreiben die Gemeinsamkeiten und grundlegenden Unterschiede zwischen dem neurogenen Hippocampus und der plastischen, aber vermutlich nicht-neurogenen Substantia nigra. Hier stehen weiterführende Untersuchungen molekularer und zellulärer Mechanismen, die bei endogenen Reparationsvorgängen im Gehirn nach Läsion eingesetzt werden könnten noch aus. Die Grundlagenforschung steht hier noch am Anfang, eröffnet aber dennoch Möglichkeiten für anschließende präklinische Studien. Die Hoffnung auf einen potentiellen gezielten therapeutischen Einsatz endogener, neu gebildeter Neurone bei neuropsychiatrischen Erkrankungen wird durch die vorgelegten Arbeiten gestärkt und bildet die Grundlage für unsere Hypothese: *Im erwachsenen Gehirn ist zwar alles sterblich, jedoch mit gezielter Intervention ersetzbar.*

## 5. LITERATUR

### a) Eigene verwendete Literatur

Bechmann I, Lossau S, **Steiner B**, Mor G, Gimsa U, Nitsch R. 2000. Reactive astrocytes upregulate Fas (CD95) and Fas ligand (CD95L) expression but do not undergo programmed cell death during the course of anterograde degeneration. *Glia* 32(1): 25-41.

Bechmann I\*, **Steiner B\***, Gimsa U, Mor G, Wolf S, Beyer M, Nitsch R, Zipp F. 2002. Astrocyte-induced T cell elimination is CD95 ligand dependent. *J Neuroimmunol* 132(1-2):60-5.

Bick-Sander A, **Steiner B**, Babu H, Wolf S, Kempermann G. 2006. Running in pregnancy transiently increases postnatal hippocampal neurogenesis in the offspring. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(10): 3852-7.

Brandt MD, Jessberger S, **Steiner B**, Kronenberg G, Reuter K, Bick-Sander A, von der Behrens W, Kempermann G. 2003. Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci* 24(3): 603-13.

Garcia A, **Steiner B**, Kronenberg G, Bick-Sander A, Kempermann G. 2004. Age-dependent expression of glucocorticoid- and mineralocorticoid receptors on neural precursor cell populations in the adult murine hippocampus. *Aging Cell* 3(6): 363-71.

Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, **Steiner B**, Wang LP, Yamaguchi M, Kettenmann H, Kempermann G. 2003. Subpopulation of nestin- expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 23(3):373-82.

Hühnchen P, Prozorovski T, Klaisle P, Lesemann A, Ingwersen J, Wolf SA, Kupsch A, Aktas O, **Steiner B**. 2011. Modulation of adult hippocampal neurogenesis during myelin-directed autoimmune neuroinflammation. *GLIA* 59(1): 132-42.

Kovac AD, Grammig J, Mahlo J, **Steiner B**, Roth K, Nitsch R, Bechmann I. 2002. Comparison of neuronal density and subfield sizes in the hippocampus of CD95L-deficient (gld), CD95-deficient (lpr) and nondeficient mice. *Eur J Neurosci* 16(1): 159-63.

Kronenberg G, Reuter K, **Steiner B**, Brandt MD, Jessberger S, Yamaguchi M, Kempermann G. 2003. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol* 467(4):455-63.

Lesemann A, Reinl C, Hühnchen P, Pillhatsch M, Hellweg R, Klaisle P, Winter C, **Steiner B**. 2012. MPTP-induced hippocampal effects on serotonin, dopamine, neurotrophins, adult neurogenesis and depression-like behavior are partially influenced by fluoxetine in adult mice. *Brain Research im Druck*.

Petrus DS, Fabel K, Kronenberg G, Winter C, **Steiner B**, Kempermann G. 2008. NMDA and Benzodiazepine receptors have synergistic and antagonistic effects on precursor cells in adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 29(2): 244-52.

Plümpe T, Ehninger D, **Steiner B**, Klempin F, Jessberger S, Brandt M, Römer B, Rodriguez GR, Kronenberg G, Kempermann G. 2006. Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. *BMC Neurosci* 7:77.

**Steiner B**, Zurborg S, Hörster H, Fabel K, Kempermann G. 2008. Differential 24h responsiveness of Prox1-expressing precursor cells in adult hippocampal neurogenesis to physical activity, environmental enrichment, and kainic acid-induced seizures. *Neuroscience* 154(2): 521-9.

**Steiner B**, Winter C, Blumensath S, Paul G, Harnack D, Nikkhah G, Kupsch A. 2008. Survival and functional recovery of transplanted human dopaminergic neurons into hemiparkinsonian rats depend on the cannula size of the implantation instrument. *J Neurosci Meth* 169(1): 128-34.

**Steiner B**, Kupsch A, Siebert E, Hosman K, Klempin F, Morgenstern R, Winter C. 2008. Unilateral lesion of the subthalamic nucleus transiently provokes bilateral subacute glial cell proliferation in the adult rat substantia nigra. *Neurosci Letters* 430(2): 103-8.

**Steiner B\***, Klempin R\*, Wang LP, Kott M, Kettenmann H, Kempermann G. 2006. Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *GLIA* 54 (8): 805-14.

**Steiner B\***, Winter C\*, Hosman K, Siebert E, Kempermann G, Petrus DS, Kupsch A. 2006. 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 Neurology* 199(2): 291-300.

**Steiner B**, Kronenberg G, Jessberger S, Brandt MD, Reuter K, Kempermann G. 2004. Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia* 46(1): 41-52.

Wolf SA, Fisher J, Bechmann I, **Steiner B**, Kwizdzinski E, Nitsch R. 2002. Neuroprotection by T-cells depends on their subtype and activation state. *J Neuroimmunol* 133(1-2): 72-80.

Wolf SA\*, **Steiner B\***, Akipmarli A, Kammertoens T, Nassenstein C, Braun A, Blankenstein T, Kempermann G. 2009. CD4-positive T-lymphocytes provide a neuroimmunological link in the control of adult hippocampal neurogenesis. *J Immunol* 182(7): 3979-84.

Wolf SA, **Steiner B**, Wengner A, Lipp M, Kammertoens T, Kempermann G. 2009. Adaptive peripheral immune response increases proliferation of neural precursor cells in the adult hippocampus. *FASEB* 23(9): 3121-8.

## **b) sonstige Literatur**

Aharoni R, Arnon R, Eilam R. 2005. Neurogenesis and neuroprotection induced by peripheral immunomodulatory treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci* 25(36): 8217-28.

Arendash GW, Garcia MF, Costa DA, Cracchiolo JR, Wefes IM, Potter H. 2004. Environmental enrichment improves cognition in aged Alzheimer's transgenic mice despite stable  $\beta$ -amyloid deposition. *Neuroreport* 15(11): 1751-4.

Altman J, Das GD. 1964. Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature* 207: 953-56.

Aponso PM, Faull RL, Connor B. 2008. Increased progenitor cell proliferation and astrogenesis in the partial progressive 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 151(4): 1142-53.

Belachew S, Chittajallu R, Aguirre AA, Yuan X, Kirby M, Anderson S, Gallo V. 2003. Postnatal NG2 proteoglycan-expressing progenitor cells are intrinsically multipotent and generate functional neurons. *J Cell Biol* 161(1): 169-86.

Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG. 2000. Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult brain. *Neurosci Lett* 291(1): 17-20.

Blanchard J, Wanka L, Tung YC, Cárdenas-Aquavo MD, Laferla FM, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. 2010. Pharmacologic reversal of neurogenic and neuroplastic abnormalities and cognitive impairments without affecting Abeta and tau pathologies in 3xTg-AD mice. *Acta Neuropathol* Aug 10 (Epub ahead of print).

Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E. 1993. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neurosci* 56: 337-44.

Ceria CD, Masaki KH, Rodriguez BL, Chen R, Yano K, Curb JD. 2001. The relationship of psychosocial factors to total mortality among older Japanese-American men: the Honolulu Heart Program. *J Am Geriatr Soc* 49(6): 725-31.

Chevallier NL, Soriano S, Kang DE, Masliah E, Hu G, Koo EH. 2005. Perturbed neurogenesis in the adult hippocampus associated with presenilin-1 A246E mutation. *Am J Pathol* 167(1): 151-9.

Chiaravalotti ND, DeLuca J. 2008. Cognitive impairment in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 7(12): 1139-51.

Choi SH, Veeraraghavalu K, Lazarov O, Marler S, Ransohoff RM, Ramirez JM, Sisodia SS. 2008. Non-cell-autonomous effects of presenilin 1 variants on enrichment-mediated hippocampal progenitor cell proliferation and differentiation. *Neuron* 59(4): 568-80.

Cotel MC, Jawhar S, Christensen DZ, Bayer TA, Wirths O. 2010. Environmental enrichment fails to rescue working memory deficits, neuron loss, and neurogenesis in APP/PS1KI mice. *Neurobiol Aging* Mar 30 (Epub ahead of print).

Cserr HF, Knopf PM. 1992. Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view. *Immunol Today* 13(12): 507-12.

Curtis MA, Penney EB, Pearson J, Dragunow M, Connor B, Faull RL. 2005. The distribution of progenitor cells in the subependymal layer of the lateral ventricle in the normal and Huntington's disease brain. *Neuroscience* 132(3): 777-88.

- Doetsch F, Caillé I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97(6):703-16.
- Donovan MH, Yazdani U, Norris RD, Games D, German DC, Eisch AJ. 2006. Decreased adult hippocampal neurogenesis in the PDAPP mouse model of Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* 495(1): 70-83.
- Dupret D, Fabre A, Döbrössy MD, Panatier A, Rodriguez JJ, Lamarque S, Lemair V, Oliet SH, Piazza PV, Abrous DN. 2007. Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS Biol* 5(8): e214.
- Ehninger D, Kempermann G. 2006. Paradoxical effects of learning the Morris water maze on adult hippocampal neurogenesis in mice may be explained by a combination of stress and physical activity. 2006. *Genes Brain Behav* 5(1): 29-39.
- Ekdahl CT, Claassen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O. 2003. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(23): 13632-37.
- Eng PM, Rimm EB, Fitzmaurice G, Kawachi I. 2002. Social ties and change in social ties in relation to subsequent total and cause-specific mortality and coronary heart disease in men. *Am J Epidemiol* 155(8): 700-9.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4(11): 1313-7.
- Friedland RP, Fritsch T, Smyth KA, Koss E, Lerner AJ, Chen CH, Petot GJ, Debanne SM. 2001. Patients with Alzheimer's disease have reduced activities in midlife compared with healthy control-group members. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(6): 3440-45.
- Frielingsdorf H, Schwarz K, Brundin P, Mohapel P. 2004. No evidence for new dopaminergic neurons in the adult mammalian substantia nigra. *PNAS* 101(27): 10177-82.
- Geurts JJ, Bö L, Roosendaal SD, Hazes T, Daniels R, Barkhof F, Witter MP, Huitinga I, van der Valk P. 2007. Extensive hippocampal demyelination in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 66(9): 819-27.
- Gil JM, Mohapel P, Araujo IM, Popovic N, Li JY, Brundin P, Petersen A. 2005. Reduced hippocampal neurogenesis in R6/2 transgenic Huntington's disease mice. *Neurobiol Dis* 20(3): 744-51.
- Gonzalo-Gobernado R, Reimers D, Herranz AS, Diaz-Gil JJ, Osuna C, Asensio MJ, Baena S, Rodriguez-Serrano M, Bazán E. 2009. Mobilization of neural stem cells and generation of new neurons in 6-OHDA-lesioned rats by intracerebroventricular infusion of liver growth factor. *J Histochem Cytochem* 57(5): 491-502.
- Grön G, Brandenburg I, Wunderlich AP, Riepe MW. 2006. Inhibition of hippocampal function in mild cognitive impairment: targeting the cholinergic hypothesis. *Neurobiol Aging* 27(1): 78-87.
- Haughey NJ, Liu D, Nath A, Borchard AC, Mattson MP. 2002a. Disruption of neurogenesis in the subventricular zone of adult mice, and in human cortical neuronal precursor cells in culture, by  $\beta$ -amyloid-peptide: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuromol Med* 1(2): 125-35.
- Haughey NJ, Math A, Chan SL, Borchard AC, Rao MS, Mattson MP. 2002b. Disruption of neurogenesis by amyloid- $\beta$ -peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 83(6): 1509-24.
- Höglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I, Hirsch EC. 2004. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci* 7:726-35.
- Hong XP, Peng CX, Wei W, Tian Q, Liu YH, Yao XQ, Zhang Y, Cao FY, Wang Q, Wang JZ. 2009. Essential role of tau phosphorylation in adult hippocampal neurogenesis. *Hippocampus* Oct8.
- Jablonska B, Aguirre A, Raymond M, Szabo G, Kitabatake Y, Sailor KA, Mng GL, Song H, Gallo V. 2010. Chordin-induced lineage plasticity of adult SVZ neuroblasts after demyelination. *Nat Neurosci* 13(5): 541-50.
- Jessberger S, Gage F.H. 2009. Fate plasticity of adult hippocampal progenitors: biological relevance and therapeutic use. *Trends in Pharmacol Sci* 30(2):61-6.
- Jessberger S, Kempermann G. 2003. Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *Eur J Neurosci* 18(10): 2707-12.
- Jin K, Galvan V, Xie L, Mao XO, Gorostiza OF, Bredesen DE, Greenberg DA. 2004. Enhanced neurogenesis in

- Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APPsw, Ind) mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(36): 13363-67.
- Joelsing FC, Billeskoy R, Christensen JR, West M, Pakkenberg B. 2006. Hippocampal neuron and glia cell numbers in Parkinson's disease – a stereological study. *Hippocampus* 16(10) : 826-33.
- Katzman R. 1993. Education and the prevalence of dementia and Alzheimer's disease. *Neurology* 43(1) : 13-20.
- Kempermann G, Gage FH. 1999. Experience-dependent regulation of adult hippocampal neurogenesis : effects of long-term stimulation and stimulus withdrawal. *Hippocampus* 9(3) : 321-32.
- Kempermann G, Gast D, Gage FH. 2002. Neuroplasticity in old age : sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann Neurol* 52(2) : 135-43.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386(6624): 493-5.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. 1998. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci* 18(9): 3206-12.
- Kipnis J, Yoles E, Schori H, Hauben E, Shaked I, Schwartz M. 2001. Neuronal survival after CNS insult is determined by a genetically encoded autoimmune response. *J Neurosci* 21(13): 4564-71.
- Kohl Z, Kandasamy M, Winner B, Aigner R, Gross C, Couillard-Despres S, Bogdahn U, Aigner L, Winkler J. 2007. Physical activity fails to rescue hippocampal neurogenesis deficits in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Brain Res* 1155:24-33.
- Kokoeva MV, Yin H, Flier JS. 2005. Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 310(5748): 679-83.
- Kunimoto S, Nakamura S, Wada K, Inoue T. 2010. Chronic stress-mutated presenilin 1 gene interaction perturbs neurogenesis and accelerates neurodegeneration. *Exp Neurol* 221(1): 175-85.
- Lazic SE, Grote H, Armstrong RJ, Blakemore C, Hannan AJ, van Dellen A, Barker RA. 2004. Decreased hippocampal cell proliferation in R6/1 Huntington's mice. *Neuroreport* 15(5): 811-13.
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. 1990. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60(4): 585-95.
- Li B, Wanka L, Blanchard J, Liu F, Chohan MO, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. 2010. Neurotrophic peptides incorporating adamantane improve learning and memory, promote neurogenesis and synaptic plasticity in mice. *FEBS Lett* 584(15): 3359-3365.
- Lie DC, Dzieczapolski G, Willhoite AR, Kaspar BK, Shults CW, Gage FH. 2002. The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *J Neurosci* 22(15): 6639-49.
- Lugert S, Basak O, Knuckles P, Haussler U, Fabel K, Götz M, Haas CA, Kempermann G, Taylor V, Giachino C. 2010. Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell* 6(5): 445-56.
- Maguire EA, Gadian DG, Johnsrude IS, Good CD, Ashburner J, Frackowiak RS, Frith CD. 2000. Navigation related structural change in the hippocampi of taxi drivers. *PNAS* 97(8): 4398-403.
- Mirochnic S, Wolf S, Staufienbiel M, Kempermann G. 2009. Age effects on the regulation of adult hippocampal neurogenesis by physical activity and environmental enrichment in the APP23 mouse model of Alzheimer disease. *Hippocampus* 19(10): 1008-18.
- Mohapel P, Frielingsdorf H, Häggblad J, Zachrisson O, Brundin P. 2005. Platelet-derived growth factor (PDGF-BB) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) induce striatal neurogenesis in adult rats with 6-hydroxydopamine lesions. *Neurosci* 132(3): 767-76.
- Monje ML, Mizumatsu S, Fike JR, Palmer TD. 2002. Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction. *Nature Med* 8(9): 955-62.
- Namba T, Maekawa M, Yuasa S, Kohsaka S, Uchino S. 2009. The Alzheimer's disease drug memantine increases the number of radial glia-like progenitor cells in the adult hippocampus. *Glia* 57(10): 1082-90.
- O'Keefe GC, Barker RA, Caldwell MA. 2009. Dopaminergic modulation of neurogenesis in the subventricular zone of the adult brain. *Cell Cycle* 8(18): 2888-94.

- Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, Stoessl AJ, Sossi V, Brin MF, Shannon KM, Nauert GM, Perl DP, Godbold J, Freeman TB. 2003. A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 54(3): 403-14.
- Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, Stoessl AJ, Sossi V, Brin MF, Shannon KM, Nauert GM, Perl DP, Godbold J, Freeman TB. 2006. Insights into autotransplantation: the unexpected discovery of specific induction systems in bone marrow stromal cells. *Cell Mol Life Sci* 63(23): 2764-72.
- Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH. 1999. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci* 19(19): 8487-97.
- Pierce AA, Xu AW. 2010. De novo neurogenesis in the adult hypothalamus as a compensatory mechanisms to regulate energy balance. *J Neurosci* 30(2): 723-30.
- Rao MS, Hattiangady B, Abdel-Rahman A, Stanley DP, Shetty AK. 2005. Newly born cells in the ageing dentate gyrus display normal migration, survival and neuronal fate choice but endure retarded early maturation. *Eur J Neurosci* 21(2): 464-76.
- Reynolds BA, Weiss S. 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255(5052): 1707-10.
- Rigamonti D, Bauer JH, De-Fraja C, Conti L, Sipione S, Sciorati C, Clementi E, Hackam A, Hayden MR, Li Y, Cooper JK, Ross CA, Govoni S, Vincenz C, Cattaneo E. 2000. Wild type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. *J Neurosci* 20(10): 3705-13.
- Roosendaal SD, Hulst HE, Vrenken H, Feenstra HE, Castelijns JA, Pouwels PJ, Barkhof F, Geurts JJ. 2010. Structural and functional hippocampal changes in multiple sclerosis patients with intact memory function. *Radiology* 255(2): 595-604.
- Schaeffer EL, Novaes BA, da Silva ER, Skaf HD, Mendes-Neto AG. 2009. Strategies to promote differentiation of newborn neurons into mature functional cells in Alzheimer brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych* 33(7): 1087-102.
- Shors TJ, Townsend DA, Zhao M, Kozorovitskiy Y, Gould E. 2002. Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus* 12(5): 578-84.
- Sicotte NL, Kern KC, Giesser BS, Arshanapalli A, Schultz A, Montag M, Wang H, Bookheimer SY. 2008. Regional hippocampal atrophy in multiple sclerosis. *Brain* 131(Pt 4):1134-41.
- Snyder BR, Chiu AM, Prockop DJ, Chan AW. 2010. Human multipotent stromal cells (MSCs) increase neurogenesis and decrease atrophy of the striatum in a transgenic mouse model for Huntington's disease. *PLoS One* 5(2): e9347.
- Spires TL, Grote HE, Varshney NK, Cordery PM, van Dellen A, Blakemore C, Hannan AJ. 2004. Environmental enrichment rescues protein deficits in a mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 24(9): 2270-2276.
- Suzuki K, Okada K, Wakuda T, Shinmura C, Kamenoy Y, Iwata K, Takahashi T, Suda S, Matsuzaki H, Iwata Y, Hashimoto K, Mori N. 2010. Destruction of dopaminergic neurons in the midbrain by 6-hydroxydopamine decreases hippocampal cell proliferation in rats: reversal by fluoxetine. *PLoS One* 5(2): e9260.
- Tatebayashi Y, Lee MH, Li L, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. 2003. The dentate gyrus neurogenesis: a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 105(3): 225-32.
- Tattersfield AS, Croon RJ, Liu YW, Kells AP, Faull RL, Connor B. 2004. Neurogenesis in the striatum of the quinolinic acid lesion model of Huntington's disease. *Neuroscience* 127(2): 319-332.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH. 1999. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2(3): 266-70.
- Van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. 2002. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415(6875): 1030-4.
- Veeraraghavalu K, Choi SH, Sisodia SS. 2010. Expression of familial Alzheimer's disease-linked human presenilin 1 variants impair enrichment-induced adult hippocampal neurogenesis. *Neurodegener Dis* 7(1-3): 46-9.
- Wang R, Dineley KT, Sweatt JD, Zheng H. 2004. Presenilin 1 familial Alzheimer's disease mutation leads to

defective associative learning and impaired adult neurogenesis. *Neurosci* 126(2): 305-12.

Wekerle H, Fierz W. 1985. T lymphocytes autoimmunity in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Concepts Immunopathol* 2: 102-27.

Wen PH, Hof PR, Chen X, Gluck K, Austin G, Younkin SG, Younkin LH, DeGasperi R, Gama-Sosa MA, Robakis NK, Haroutunian V, Elder GA. 2004. The presenilin-1 familial Alzheimer's disease mutant P117L impairs neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *Exp Neurol* 188(2): 224-37.

White JK, Auerbach W, Duyao MP, Vonsattel JP, Gusella JF, Joyner AL, Mac Donald ME. 1997. Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntingtin's disease CAG expansion. *Nature Genet* 17(4): 404-10.

Winner B, Desplats P, Hagl C, Klucken J, Aigner R, Ploetz S, Laemke J, Karl A, Aigner L, Masliah E, Buerger E, Winkler J. 2009. Dopamine receptor activation promotes adult neurogenesis in an acute Parkinson model. *Exp Neurol* 219(2): 543-52.

Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB, Brismar H, Supliakov O, Frisen J, Janson AM. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. 2003. *PNAS* 100(13): 7925-30.

Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, Cohen H, Kipnis J, Schwartz M. 2006. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci* 9(2): 268-75.

Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, Conti L, MacDonald ME, Friedlander RM, Silani V, Hayden MR, Timmusk T, Sipione S, Cattaneo E. 2001. Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntingtin's disease. *Science* 293(5529): 493-8.

## **DANKSAGUNG**

Mein Dank gilt in erster Linie meinen akademischen Lehrern Prof. Dr. med. Robert Nitsch, Prof. Dr. med. Ingo Bechmann und Prof. Dr. med. Gerd Kempermann, die mich für die Wissenschaft und die akademische Welt begeistert haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Karl Max Einhüpl und Herrn Prof. Dr. med. Matthias Endres als Leiter der Neurologischen Klinik der Charité für die Möglichkeit klinische Tätigkeit und wissenschaftliches Arbeiten so zu verbinden, dass genügend Zeit für die Forschung, und dennoch stets die Nähe zur Klinik ermöglicht werden.

Ganz herzlichen Dank meinem Mentor Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Dirnagl.

Mein besonderer Dank gilt den Kollegen und Doktoranden im Labor, die durch außergewöhnliches Engagement und wissenschaftliche Kompetenz einen großen Beitrag zu unseren Arbeiten geleistet haben. Hier sind vor allem Prof. Dr. med. Christine Winter, Dr. med. Daniel Harnack, Jürgen Berg, Elisabeth Hain, Petra Hühnchen, Deetje Iggena, Philipp Klaissle, Charlotte Klein, Anne Lesemann, Anne Schwerk, Jennifer Altschüler und Renate Winter zu erwähnen.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern und bei meiner Schwester für ihre Unterstützung und Motivation.

Ich danke meinen Kindern Lilith Rebekka und Samuel Ben für das Glück und die Liebe, die ich jeden Tag durch sie erlebe.

Vor allem danke ich Björn Ewalds, der durch seine bedingungslose Unterstützung meiner Arbeit und meiner Ziele einen ebenso großen Anteil an dem Vorgelegten hat, wie ich selbst.

## ERKLÄRUNG

§4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

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

.....  
Datum

.....  
Unterschrift