

Stammzellforschung

Bayerischer Forschungsverbund: Adulte Neuronale Stammzellen

ROSI LEDERER

FORNEUROCELL, PHYSIOLOGISCHES INSTITUT, LMU MÜNCHEN

■ Lange Zeit nahm man an, dass im erwachsenen Gehirn keine neuen Nervenzellen entstehen könnten und somit Nervenzellen nicht ersetzt werden. Damit wäre eine funktionelle Restitution, wie in anderen Geweben, nicht möglich. Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben aber gezeigt, dass auch im erwachsenen Gehirn Stammzellen existieren, die proliferieren und sich in Nervenzellen und Gliazellen differenzieren können. An diese multipotenten neuralen Stammzellen knüpft sich die große Hoffnung, ihr Potenzial für therapeutische Strategien nutzbar zu machen.

Eine auf adulten Stammzellen basierte regenerative Zellersatztherapie für akute und chronische Erkrankungen des Nervensystems ist das langfristige Ziel des Bayerischen Forschungsverbund ForNeuroCell, der im Juli 2006 seine Arbeit aufgenommen hat. Dieser Verbund besteht aus acht Projektgruppen der Universitäten Regensburg, Erlangen, der TU und LMU München sowie des Helmholtz Zentrums München. Konzeptionell verfolgt der Verbund zwei Strategien für die Zellersatztherapie: die Erhaltung, Rekrutierung und Mobilisierung endogener Stammzellen und die Transplantation von *ex vivo* expandierten und differenzierten Stammzellen.

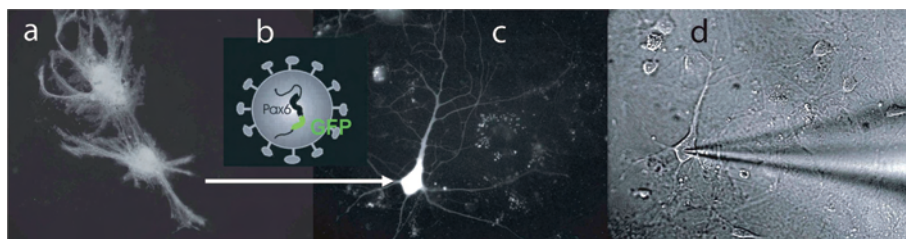
Die Forschung der letzten Jahre hat gezeigt, dass während der Entwicklung des zerebralen Kortex radiale Gliazellen als Vorläufer für Nervenzellen fungieren. Diese radialen Gliazellen sind in ihren zellulären und molekularen Eigenschaften den neurogenen Vorläuferzellen in den Stammzellnischen des erwachsenen Gehirns aber auch den Astrozyten sehr ähnlich. Die AG von Magdalena Götz und Benedikt Berninger hat bereits gezeigt, dass für die neuronale Differenzierung der adulten Vorläuferzellen in den Stammzellnischen die Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren notwendig ist. Zur Untersuchung der Frage, ob auch postnatale Astrozyten, die normalerweise keine Neurone generieren, durch die Expression von neu-

rogenen Transkriptionsfaktoren dahin umprogrammiert werden können, funktionelle Neurone zu bilden, wurden in Astrozyten von jungen Mäusen mittels retroviraler Vektoren die Gene für diese Transkriptionsfaktoren eingeschleust (**Abb. 1**). Mehr als 70 Prozent der transduzierten astrozytären Zellen generierten Tochterzellen mit neuronalen Eigenschaften. Die Progression der transduzierten astroglialen Zelle zum Neuron konnte dabei mittels Zeitraffer-Video-Mikroskopie verfolgt werden. Neben den morphologischen und immunzytochemischen Charakteristika zeigen diese von reprogrammierten Astrozyten stammenden Nervenzellen auch elektrophysiologische Eigenschaften von Neuronen, d. h. sie besitzen funktionelle spannungabhängige Ionenkanäle und bilden Aktionspotenziale. Wenn sie zusammen mit embryonalen Neuronen kultiviert werden, werden sie darüber hinaus von diesen als postsynaptische Ziele erkannt und erfolgreich innervert^[1]. Damit ist eine Grundvoraussetzung für den therapeutischen Einsatz mit dem Ziel einer funktionellen Wiederherstellung erfüllt. Ein wesentliches Ziel ist nun die Übertragung der Ergebnisse auf humane Astrozyten.

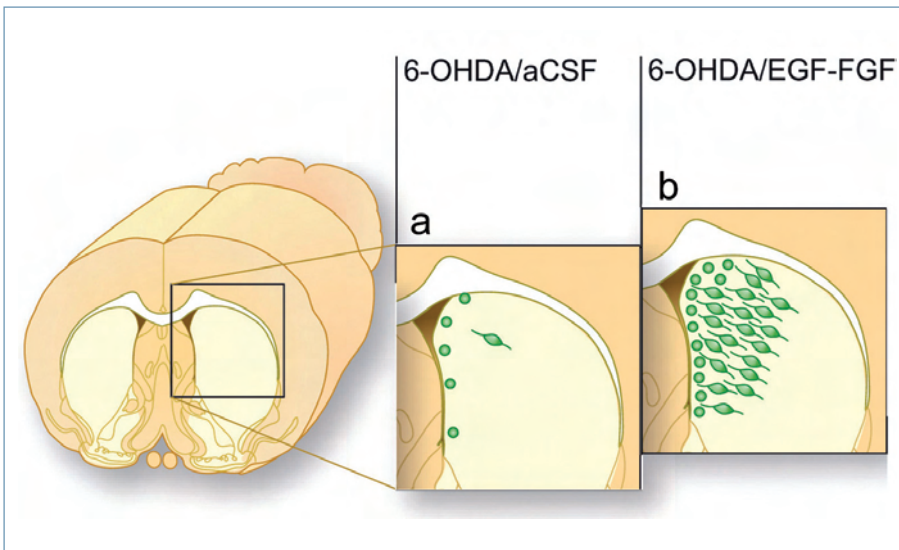
Große Hoffnungen auf eine regenerative Zellersatztherapie bestehen bei Morbus Parkinson. Für die motorischen Symptome bei der Parkinson-Krankheit ist das Absterben der Dopamin-produzierenden Neurone der Substantia nigra mit der Folge der Degene-

ration der nigrostriatalen Projektionen und einem Mangel an Dopamin im Striatum verantwortlich. Von einer Zellersatztherapie mit Dopamin-freisetzenden Zellen im Striatum erwartet man sich eine effektive Besserung der motorischen Symptome bei Parkinsonpatienten.

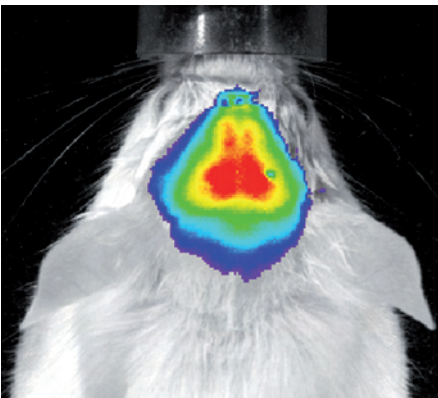
Die Regensburger AG um Jürgen Winkler und Beate Winner untersuchte die Wirkung von intrazerebraler Infusion der Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 an 6-OHDA-läsionierten Ratten an einem Tiermodell für Morbus Parkinson (**Abb. 2**). In der Subventrikulärzone der lateralen Wand des Seitenventrikel (SVZ) findet man im adulten Gehirn Stammzellen. Die dort gebildeten Vorläuferzellen wandern unter physiologischen Bedingungen im rostralen migratorischen Strom in den Bulbus olfactorius aus. In der Studie fand sich in der Gruppe der 6-OHDA-läsionierten Ratten nach Behandlung mit EGF/FGF-2 in der SVZ ein massiver Anstieg der Zellproliferation gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe. Insbesondere die Zahl der DCX-positiven Zellen zeigte bei den 6-OHDA-läsionierten Ratten einen 5fachen Anstieg unter EGF/FGF-2-Behandlung. DCX ist ein Markerprotein, das während der Differenzierung in neuronalen Vorläuferzellen und in unreifen Neuronen hochreguliert und in reifen Neuronen nicht mehr nachweisbar ist. Somit kann die Expression von DCX als ein Anhalt für die Neubildung von Nerven-



▲ **Abb. 1:** Experimenteller Ansatz der AG Götz/Berninger: In Astrozyten (a) werden mittels retroviraler Vektoren (b) Transkriptionsfaktoren eingeschleust. Dies führt bei Mausastrozyten zu einer Reprogrammierung zu Nervenzellen (c). Die Funktionalität dieser Nervenzellen wird elektrophysiologisch nachgewiesen (d) (Abb.: B. Berninger).



▲ **Abb. 2:** Darstellung der Wirkung von EGF/FGF-2 in 6-OHDA-läsionierten Ratten. In der mit EGF/FGF-2 behandelten Gruppe (b) finden bis 20fach mehr Doublecortin exprimierende unreife Neurone im Striatum als in der mit artifiziellem Liquor (aCSF) behandelten Gruppe (a). (Abb. modifiziert nach Winner *et al.* 2008)



▲ **Abb. 3:** Analyse einer 3 Monate alten transgenen Maus, in der das Luciferase-Protein unter dem DCX-Promotor exprimiert wird. In diesem Mausmodell können neugebildete Neurone durch Biolumineszenz-Imaging sichtbar gemacht werden. Die Signalintensität ist farbocodiert: blau entspricht einer niedrigen, rot einer hohen Intensität. Das starke Signal entspricht der subventrikulären Region, einer der neurogenen Gehirnregionen des erwachsenen Gehirns. (Abb.: S. Couillard-Després)

zellen dienen. In den EGF/FGF-2-behandelten Gruppe fand sich außerdem eine erhöhte Zahl an DCX-exprimierenden Zellen im an die SVZ angrenzenden Striatum; es wurden in der 6-OHDA-läsionierten EGF/FGF-2-behandelten Gruppe bis 20-mal mehr Zellen im Striatum gezählt als in der nichtbehandelten Gruppe. Ein radialer Gradient der DCX-positiven Zellen mit der höchsten Dichte im medi-

alen, der SVZ direkt benachbarten Teil des Striatums, lassen eine Wanderung der unreifen Neurone aus der SVZ ins Striatum vermuten. Vier Wochen nach Behandlung mit EGF/FGF-2 fanden sich im Striatum nur neue Gliazellen jedoch keine Neurone^[2]. Diese Studie zeigt, dass die Bildung von neuronalen Vorläuferzellen und deren Wanderung in das Dopamin-verarmte Striatum durch die Zufuhr von Wachstumsfaktoren beeinflusst werden kann. Eine bis jetzt ungelöste Herausforderung ergibt sich mit dem Befund, dass die DCX-positiven Zellen im Striatum nicht in reife Neurone differenzieren. Welche Umgebungsfaktoren fehlen im Striatum von 6-OHDA-läsionierten Ratten für eine Differenzierung in Richtung dopaminerge Neurone, was ist das Schicksal der DCX-positiven Zellen im Striatum?

Für die Nachverfolgung neu entstandener Zellen und die Beantwortung der Frage nach deren weiteren Schicksal ist die Visualisierung von Zellproliferation, Differenzierung, Zellmigration und Integration im lebenden Organismus von großer Bedeutung. Die AG um Ludwig Aigner und Sebastian Couillard-Després an der Neurologischen Universitätsklinik Regensburg hat kürzlich ein transgenes Mausmodell generiert, das die Fluoreszenzproteine eGFP oder DsRed2 unter der Kontrolle eines DCX-Promotorfragments exprimiert. Mittels elektrophysiologischer und histologischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass dieses Promotorfragment es ermöglicht, Transgene spezifisch in

neuronalen Vorläuferzellen und jungen Neuronen zu exprimieren^[3]. Basierend auf diesen Arbeiten hat die AG Aigner nun ein weiteres transgenes Mausmodell entwickelt, in dem das biolumineszente Luciferase-Protein unter dem DCX-Promotor exprimiert wird, wodurch die direkte Beobachtung und Analyse von lebenden neuronalen Vorläuferzellen und jungen unreifen Neuronen am lebenden Tier ermöglicht werden soll (**Abb. 3**). In ersten Versuchen konnte die Arbeitsgruppe bereits die Bildung von Nervenzellen in der subventrikulären Zone erwachsener Mäuse bildgebend nachweisen^[4].

Das langfristige Ziel ist die Weiterentwicklung der bildgebenden Verfahren in Richtung einer Kernspintomographie-basierten Analyse der Neurogenese im lebenden Organismus für die klinische Anwendung.

Die ersten Ergebnisse der Verbundarbeit sind sehr ermutigend. Mit dem Forschungsverbund ForNeuroCell wurde durch die Vernetzung von grundlagenorientierten Neurowissenschaften mit klinischer Expertise und der Etablierung einer interdisziplinären Zusammenarbeit die notwendige Infrastruktur für eine erfolgreiche klinische Umsetzung einer auf adulten Stammzellen basierenden Therapie geschaffen. ■

Literatur

- [1] Berninger, B., Costa, M. R., Koch, U., Schroeder, T., Sutor, B., Grothe, B., Gotz, M. (2007): Functional properties of neurons derived from in vitro reprogrammed postnatal astroglia. *J. Neurosci.* 27 8654-8664.
- [2] Winner, B., Couillard-Despres, S., Geyer, M., Aigner, R., Bogdahn, U., Aigner, L., Kuhn, H. G., Winkler, J. (2008): Dopaminergic lesions enhances growth factor-induced striatal neuroblast migration. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 67: im Druck.
- [3] Couillard-Despres, S., Winner, B., Karl, C., Lindemann, G., Schmid, P., Aigner, R., Laemke, J., Bogdahn, U., Winkler, J., Bischofberger, J., Aigner, L. (2006): Targeted transgene expression in neuronal precursors: watching young neurons in the old brain. *Eur. J. Neurosci.* 24:1535-1545.
- [4] Couillard-Despres, S., Finkl, R., Winner, B., Ploetz, S., Wiedermann, D., Aigner, R., Bogdahn, U., Winkler, J., Hoehn, M., Aigner, L. (2008): *In vivo* optical imaging of neurogenesis - Watching new neurons in the intact brain. *Mol. Imaging*: im Druck.

Korrespondenzadresse:



Dr. Rosi Lederer
ForNeuroCell
Physiologisches Institut, LMU
München
Pettenkoferstraße 12
D-80336 München
Tel.: 089-2180 75258
Fax: 089-2180 75216
rosi.lederer@med.uni-
muenchen.de
www.abayfor.de/forneurocell