

Vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

HABILITATIONSSCHRIFT

Glia und hämatopoetische Zellen im zentralen Nervensystem

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach
Experimentelle Neurologie

von

Herrn Dr. med. Josef Priller
geboren am 26.09.1970 in Augsburg

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. J.W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. H. Lassmann (Wien)

2. Prof. Dr. R. Handgretinger, MD PhD (Memphis)

eingereicht: 23.11.2001

Datum der Habilitation: 02.07.2002

**Meinen Eltern
in Dankbarkeit**

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	3
1 Zusammenfassung der Forschungsergebnisse.....	4
1.1 Einleitung	4
1.2 Molekulare Mechanismen der Gliazellaktivierung.....	7
1.3 Neue Aspekte in der Ontogenese von Glia.....	10
1.4 Rekrutierung von hämatopoetischen Zellen in das geschädigte ZNS	15
1.5 Neurogenese aus adulten Stammzellen des Knochenmarks	18
1.6 Schlussfolgerung und Ausblick	20
Literaturverzeichnis	21
Eigene Publikationen	30
Danksagung	33
Eidesstattliche Erklärung.....	34

2 Zusammenstellung wesentlicher Publikationen

- A) **Priller J**, Haas CA, Reddington M, Kreutzberg GW (1995) Calcitonin gene-related peptide and ATP induce immediate early gene expression in cultured rat microglial cells. *Glia* 15: 447-457.
- B) **Priller J**, Haas CA, Reddington M, Kreutzberg GW (1998) Cultured astrocytes express functional receptors for galanin. *Glia* 24: 323-328.
- A) **Priller J**, Reddington M, Haas CA, Kreutzberg GW (1998) Stimulation of P_{2Y}-purinoceptors on astrocytes results in immediate early gene expression and potentiation of neuropeptide action. *Neuroscience* 85: 521-525.
- B) **Priller J**, Scherzer CR, Faber PW, MacDonald ME, Young AB (1997) Frataxin gene of Friedreich's Ataxia is targeted to mitochondria. *Ann. Neurol.* 42: 265-269.
- C) Sittler A, Lurz R, Lueder G, **Priller J**, Hayer-Hartl MK, Hartl FU, Lehrach H, Wanker EE (2001) Geldanamycin activates a heat shock response and inhibits huntingtin aggregation in a cell culture model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 10: 1307-1315.

- D) **Priller J**, Flügel A, Wehner T, Boentert M, Haas CA, Prinz M, Fernández-Klett F, Prass K, Bechmann I, de Boer BA, Frotscher M, Kreutzberg GW, Persons DA, Dirnagl U (2001) Targeting of gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of the green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nature Med.* 7: 1356-1361.
- E) Bechmann I, **Priller J***, Kovac A, Böntert M, Wehner T, Fernandez Klett F, Bohsung J, Stuschke M, Dirnagl U, Nitsch R (2001) Immune surveillance of mouse brain perivascular spaces by blood-borne macrophages. *Eur. J. Neurosci.* 14 : 1651-1658. *gleichberechtigter Erstautor
- F) Dreier JP, Ebert N, **Priller J**, Megow D, Lindauer U, Klee R, Reuter U, Imai Y, Einhäupl KM, Victorov I, Dirnagl U (2000) Products of hemolysis in the subarachnoid space inducing spreading ischemia in the cortex and focal necrosis in rats: a model for delayed ischemic neurological deficits after subarachnoid hemorrhage? *J. Neurosurg.* 93: 658-666.
- G) **Priller J**, Persons DA, Klett FF, Kempermann G, Kreutzberg GW, Dirnagl U (2001) Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *J. Cell Biol.* 155: 733-738.

Abkürzungsverzeichnis

ADP β S	Adenosin-5'-O-(2-thio)diphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ATP _e	extrazelluläres ATP
CGRP	<i>calcitonin gene-related peptide</i>
ff-t	<i>fimbria-fornix transection</i> , Durchtrennung der Fimbria-Fornix
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> , saures Gliafaserprotein
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein
HSC	<i>hematopoietic stem cells</i> , hämatopoetische Stammzellen
MCAO	<i>middle cerebral artery occlusion</i> , Okklusion der A. cerebri media
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-Ribonukleinsäure
MSC	<i>mesenchymal stem cells</i> , mesenchymale Stammzellen
MSCV	<i>murine stem cell virus</i> , murines Stammzellvirus
RML	Rocky Mountain Laboratory Scrapie-Stamm
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Zusammenfassung der Forschungsergebnisse

1.1 Einleitung

Das zentrale Nervensystem (ZNS) zeichnet sich durch einen hohen Grad an Komplexität und vielleicht gerade deshalb durch mangelhafte Regeneration nach Schädigung aus. Während die Läsion eines peripheren Nerven erfolgreich ausheilen kann, führen Erkrankungen des ZNS wie zum Beispiel neurodegenerative Krankheiten (Morbus Alzheimer, Parkinson, Huntington), Schlaganfall oder Multiple Sklerose meist zu schweren Defektzuständen. In den letzten Jahren ist bekannt geworden, dass auch im erwachsenen Gehirn die genetische Information zur Regeneration erhalten ist (Richardson et al., 1980). In bestimmten Regionen des Gehirns werden sogar täglich neue Nervenzellen gebildet (Übersicht bei Gage, 2000). Dennoch misslingen fast alle Regenerationsversuche im adulten ZNS, was bereits Ramón y Cajal mit dem Begriff des „abortiven Aussprossens“ belegt hat (Ramón y Cajal, 1928).

Voraussetzung für eine erfolgreiche Therapie von ZNS-Erkrankungen ist deshalb zunächst ein besseres Verständnis der Regenerationsmechanismen des erwachsenen Gehirns. Besondere Aufmerksamkeit hat hier die Entdeckung von Molekülen erregt, die ein Auswachsen von Nervenzellfortsätzen im ZNS hemmen und deren gezielte Inaktivierung den Heilungsprozess beschleunigt (Schwab und Caroni, 1988; Rubin et al., 1994; Bregman et al., 1995). Grosse Hoffnungen werden jüngst auch in die Transplantation von Stammzellen gesetzt, die Nervenzellen ersetzen und damit den Funktionsverlust ausgleichen sollen (Donovan und Gearhart, 2001; Temple, 2001). Dieser Therapieansatz hat bereits erste klinische Erfolge gezeigt (Bachoud-Lévi et al., 2000), doch die Transplantation von humanen fetalen Stammzellen ist nicht frei von ethischen Bedenken und in ihren Langzeitfolgen noch nicht abschätzbar.

Eine besondere Schwierigkeit bei der Behandlung von ZNS-Erkrankungen ist der Zugang zum Gehirn. Die dichte Blut-Hirn-Schranke (Abb. 1), die vor allem durch Endothelzellen mit *tight junctions* gebildet wird (Reese und Karnovsky, 1967),

verhindert den Übertritt von Plasmamolekülen und Zellen in das Gehirnparenchym.

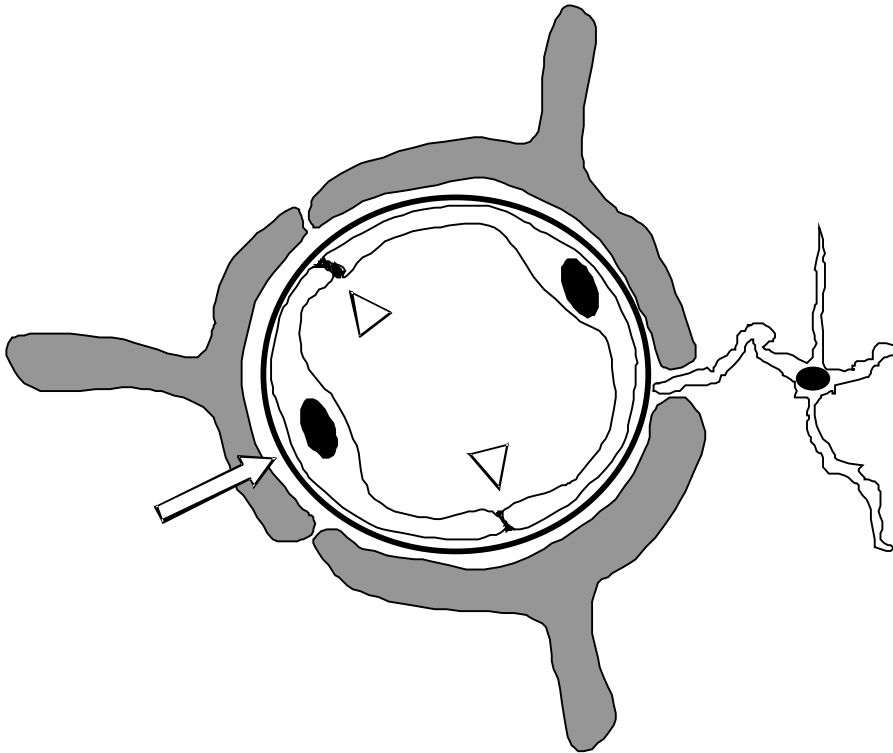


Abb. 1: Schematische Darstellung der Blut-Hirn-Schranke

Endothelzellen sind durch *tight junctions* (Pfeilspitzen) miteinander verbunden. Das Endothel ist von einer Basalmembran (Pfeil) und den Astrozytenfortsätzen der sogenannten Glia limitans (grau) umgeben. Mikroglia können mit Ausläufern bis an die Gefäße reichen.

Gentherapeutische Ansätze mussten deshalb auf invasive Verfahren wie die Applikation von kationischen Liposomen, Viren oder die direkte Transplantation von genetisch veränderten Zellen in das Gehirn zurückgreifen (Übersicht bei Suhr und Gage, 1993). Die Verletzung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke beeinflusst dabei ihrerseits die Reaktion des Gehirngewebes auf die Grunderkrankung. Dies ist auch in tierexperimentellen Modellen zu berücksichtigen, wenn diese sich primär mit der Reaktion ortsständiger Zellen auf eine Schädigung des ZNS beschäftigen.

In den im folgenden dargestellten Forschungsarbeiten der letzten Jahre haben wir versucht, drei für das Verständnis der endogenen Reparaturmechanismen des ZNS und für die Therapie von ZNS-Erkrankungen relevante Fragen zu beantworten:

1. Können Neurone eine Schädigung an umliegende Zellen (Glia) und sogar an Zellen ausserhalb des Nervensystems signalisieren?
2. Können genetisch veränderte Zellen gezielt und nicht-invasiv in das Gehirn geschleust werden?
3. Können Glia und Neurone des adulten ZNS aus peripheren Stammzellen entstehen?

Zur Beantwortung dieser Fragen haben wir Untersuchungen an primären Zellkulturen durchgeführt. Mit Hilfe molekularbiologischer und biochemischer Techniken haben wir Signaltransduktion und transkriptionelle Aktivierung in Gliazellen untersucht. Ferner haben wir Zellen genetisch so modifiziert, dass sie ein Markerprotein exprimieren, das uns die Identifikation der Zellen und ihrer Nachkommen in vitro und in vivo mit histologischen Methoden ermöglicht. Nach Knochenmarkstransplantation haben wir die Einwanderung und Differenzierung hämatogener Zellen im ZNS verfolgt. Schliesslich haben wir unterschiedliche Läsionsmodelle des ZNS (Axotomie, Ischämie, Subarachnoidalblutung, Prionenerkrankung) im Hinblick auf die Reaktion ortsständiger und einwandernder Zellen charakterisiert.

1.2 Molekulare Mechanismen der Gliazellaktivierung

Ein Modell, das sich in besonderer Weise zur Studie der De-/ Regeneration von ZNS-Neuronen und der Begleitreaktion von Glia eignet, ist die Fazialisaxotomie (Abb. 2; Übersicht bei Kreutzberg, 1996). Hierbei wird der Nervus facialis an seinem Austrittspunkt am Foramen stylomastoideum durchtrennt. Von besonderer Bedeutung ist bei diesem Modell, dass die Blut-Hirn-Schranke intakt bleibt, so dass störende Einflüsse aus der Peripherie ausgeschlossen werden können.

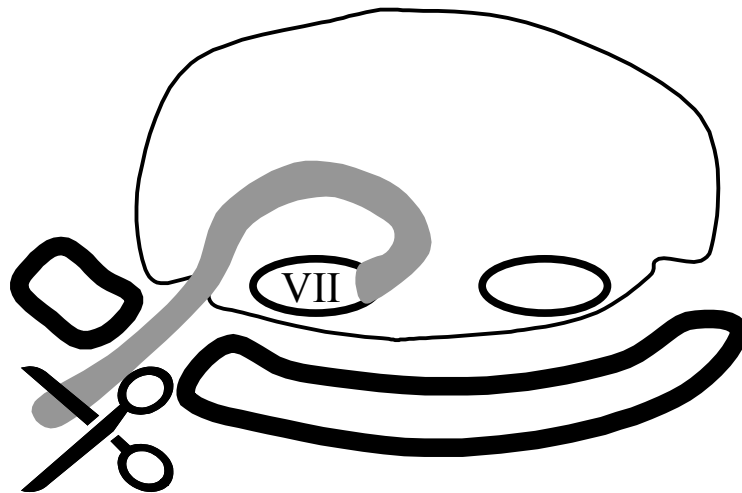


Abb. 2: Modell der Fazialisaxotomie

Am Schädelaustrittspunkt wird der Nervus facialis operativ durchtrennt (Axotomie). Die Blut-Hirn-Schranke bleibt dadurch unversehrt. Im Fazialiskern kann die Reaktion der axotomierten Motoneurone und der benachbarten Glia untersucht werden.

Nach der Fazialisaxotomie kommt es zu einer retrograden Reaktion der axotomierten Motoneurone im Fazialiskern und zu einer frühen und späten Mikroglia- und Astrozytenaktivierung (Übersicht bei Kreutzberg et al., 1989). Mikroglia deafferentieren die Nervenzellen in einem Prozess des *synaptic stripping*, um sie so möglicherweise vor weiterer Schädigung zu schützen (Blinzinger und Kreutzberg, 1968).

In den axotomierten Nervenzellen ändert sich die Proteinzusammensetzung kaum (Bisby, 1980), aber Neuropeptide wie *calcitonin gene-related peptide* (CGRP) und Galanin, die auch in der Entwicklung des Nervensystems eine Rolle spielen, werden neu synthetisiert (Streit et al., 1989a; Moore, 1989). Könnten diese Neuropeptide als Mediatoren für die Aktivierung von benachbarten Gliazellen dienen? Wir haben zur Klärung dieser Frage Mikroglia und Astrozyten der Ratte isoliert und *in vitro* auf ihre CGRP- und Galanin-Responsivität getestet (siehe 2 A-C). Dabei zeigte sich, dass sowohl Mikroglia als auch Astrozyten spezifische Rezeptoren für CGRP exprimieren, die an die Induktion der Adenylatzyklase gekoppelt sind (2 A Seite 452; 2 C Seiten 522 und 524). Im weiteren Verlauf kommt es zu einer transkriptionellen Aktivierung der Gliazellen, wobei die Boten-Ribonukleinsäuren (mRNAs) der *immediate early genes* *c-fos* und *junB* rasch und transient induziert werden (2 A Seiten 450-452 und 454; 2 C Seiten 522 und 524). Deren Genprodukte wiederum regulieren die Expression von nachgeschalteten Zielgenen (Übersicht bei Sheng und Greenberg, 1990), zum Beispiel über die AP-1-Bindungsstelle das bei der Astrozytenaktivierung induzierte saure Gliafaserprotein GFAP (Pennypacker et al., 1994). Die Spezifität der glialen Antwort auf CGRP konnte durch Zusatz eines CGRP-Rezeptorantagonisten, CGRP₈₋₃₇, belegt werden (2 B Seiten 325-326). Auch Galanin führte in Astrozyten zu einer transkriptionellen Aktivierung (2 B Seiten 324-325), allerdings war die Rezeptorbindung hier mit einem Abfall des intrazellulären Kalziumspiegels verbunden (2 B Seite 327). Eine andere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Galanin in Astrozyten zu einer Hyperpolarisation führt (Hösli et al., 1997). Das Muster der durch Galanin induzierten *immediate early genes* unterscheidet sich vom Induktionsprofil des CGRP (2 B Seiten 324-326), so dass von unterschiedlichen Rollen der Neuropeptide bei der Aktivierung von Astrozyten auszugehen ist. Galanin inhibierte bei gleichzeitiger Applikation mit CGRP sogar dessen Stimulation der Adenylatzyklase (2 B Seiten 325-326), was gut mit dem *in vivo* beschriebenen Antagonismus von CGRP und Galanin in Einklang zu bringen ist (Xu et al., 1990). Im Gegensatz zu Astrozyten, liessen sich auf Mikroglia keine Galanin-Rezeptoren nachweisen (2 A Seite 450).

Neuronale Schädigung könnte auch durch Adenosintriphosphat (ATP) an benachbarte Gliazellen signalisiert werden. Dieser intrazelluläre Energieträger wurde bereits als schneller exzitatorischer Neurotransmitter im ZNS identifiziert (Evans et al., 1992). Bei Nervenverletzung kann ATP über Exozytose, Transporterproteine oder die beschädigte Plasmamembran die Zelle verlassen (Übersicht bei Dubyak und El-Moatassim, 1993). Aufgrund der hohen intrazellulären Konzentration von 3-5 mM kann sich ATP akut im Extrazellularraum anreichern (ATP_e). ATP_e bindet an sogenannte P₂-purinerge

Rezeptoren, welche auch auf Gliazellen beschrieben wurden (Pearce et al., 1989; Walz et al., 1993; Ferrari et al., 1996; King et al., 1996). Wir konnten zeigen, dass kultivierte Mikroglia und Astrozyten durch Stimulation von P_{2Y}-purinergen Rezeptoren transkriptionell aktiviert werden (siehe 2 A und C). Dabei konnten wir ausschliessen, dass der Effekt durch Abbauprodukte des ATP, wie zum Beispiel Adenosin, vermittelt wird (2 A Seiten 452-453). ATP_e und dessen Hydrolyse-resistentes Derivat ADPβS führten zu einem Calciumeinstrom in kultivierten Mikroglia (2 A Seite 456) und Astrozyten (Pearce et al., 1989; eigene Beobachtungen). Nachfolgend kam es zur Induktion der *immediate early gene* mRNAs c-fos, junB, c-jun und Tis11 (2 A Seiten 452-454; 2 C Seiten 522-523). Eine besonders interessante Beobachtung in diesem Zusammenhang war die Wechselwirkung der Signaltransduktionskaskaden von CGRP und ATP_e in Astrozyten, was als *signal transduction cross-talk* bezeichnet wird. Die gleichzeitige Applikation von ADPβS und CGRP potenzierte die Aktivität der Adenylatzyklase und führte zu einer Superinduktion von c-fos mRNA (2 C Seiten 522 und 524). Da Fos/Jun-Dimere zu den stärksten transkriptionalen Aktivatoren zählen (Übersicht bei Hughes und Dragunow, 1995), könnten Neuropeptide wie CGRP und extrazelluläres ATP synergistische Rollen bei der funktionellen Aktivierung von Gliazellen nach Schädigung von ZNS-Neuronen haben.

1.3 Neue Aspekte in der Ontogenese von Glia

Aus dem vorausgegangenen Kapitel wird ersichtlich, dass „Glia“ mehr als nur der von Virchow beschriebene „Kitt“ des Nervensystems sind (Virchow, 1871). Sie sind eine Population von hochreaktiven Zellen, die an der Signalübermittlung zwischen Neuronen teilnehmen, eine Schädigung von Nervenzellen rasch erkennen und auch trophische Faktoren für deren Überleben ausschütten können (Nedergaard, 1994; Schwartz und Nishiyama, 1994; Kreutzberg, 1996; Kang et al., 1998). In ihrer Zahl überschreiten sie im ZNS Nervenzellen um das 10- bis 50-fache, wobei Mikroglia, Astrozyten und Oligodendrozyten unterschieden werden. Während Astro- und Oligodendroglia neuroepithelialen Ursprungs sind und aus multipotenten, glial-ingeschränkten und oligodendroglialen sowie O-2A und Astrozyten- Vorläuferzellen entstehen (Übersicht bei Lee et al., 2000), bleibt der Ursprung der Mikroglia seit ihrer Entdeckung durch del Rio-Hortega umstritten (Del Rio-Hortega, 1932). Die immunkompetenten Mikroglia des ZNS ähneln Makrophagen in Funktion und Epitopexpression, wie zum Beispiel CD11b (Übersicht bei Flaris et al., 1993). Es gibt jedoch auch Hinweise auf eine neuroektodermale Genese (Fedoroff et al., 1997).

Eine für Makrophagen ungewöhnliche Eigenschaft ist die bisher beobachtete Konstanz der Mikrogliapopulation im ZNS (Hickey und Kimura, 1988; Hickey et al., 1992; Lassmann et al., 1993). Selbst nach schwersten Entzündungszuständen des Gehirns fand sich keine signifikante Rekrutierung von Mikroglia aus zirkulierenden Monozyten oder Knochenmarkszellen (Lassmann et al., 1993). Da es keinen spezifischen Marker gibt, der Mikroglia von Monozyten/Makrophagen unterscheidet, wurden sogenannte „Knochenmarkschimären“ generiert. Dabei wurde Knochenmark aus adulten DA Ratten des *major histocompatibility complex* (MHC)-Typs RT-1^a × Lewis in durch Bestrahlung myeloablatierte adulte Lewis Ratten des MHC-Typs RT-1^l transplantiert (Hickey und Kimura, 1988; Hickey et al., 1992; Lassmann et al., 1993). Die Donorzellen liessen sich so mit einem spezifischen Antikörper detektieren und von Zellen des Empfängertieres unterscheiden. Das Ergebnis der eleganten Untersuchungen belegte, dass leptomeningeale und perivaskuläre Makrophagen, die ausserhalb der Blut-Hirn-Schranke gelegen sind, im adulten Tier neu generiert werden, während Mikroglia eine stabile Zellpopulation darstellten und kein Donor-MHC exprimierten. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in Mäusen unter Verwendung von CD45Haplotyp-differentiellem, transgenem oder retroviral markiertem Knochenmark erzielt werden (Krall et al., 1994;

Kennedy und Abkowitz, 1997; Schlüter et al., 2001). Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass in all diesen Versuchen Enzymreaktionen und/oder immunhistochemische Techniken zur Identifikation der Donorzellen erforderlich waren. Dies beeinträchtigt möglicherweise die Sensitivität, da viele Antigene im ZNS kaum oder nicht detektierbar sind; ruhende Mikroglia exprimieren zum Beispiel kein MHC (Flaris et al., 1993).

Für eigene Untersuchungen haben wir deshalb nach einem Marker gesucht, der direkt visualisierbar ist, stabil exprimiert wird und die Funktion der markierten Zellen nicht beeinträchtigt. Das grün fluoreszierende Protein (GFP) ist ein 238 Aminosäuren-langes Polypeptid, dessen Gen aus der Qualle *Aequorea victoria* kloniert wurde (Übersicht bei Chalfie et al., 1994). GFP benötigt keinen Zusatz von Substrat, Kofaktoren oder anderen Genprodukten für seine Fluoreszenzeigenschaften und kann deshalb direkt fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden (Übersicht bei Tsien, 1998). Um GFP in vitro zu testen, haben wir humane Fusionsproteine mit dem mitochondrialen Enzym Succinatdehydrogenase und den bei Morbus Huntington und der Friedreich Ataxie mutierten Proteinen Huntingtin (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993) und Frataxin (Campuzano et al., 1996) generiert (siehe 2 D und E). Wir haben diese Fusionsproteine unter der Kontrolle des Cytomegalievirus-Promoters in COS-Zellen exprimiert und dabei keine toxischen Effekte beobachtet (2 D Seiten 266-268). Das Succinatdehydrogenase-GFP-Fusionsprotein wurde korrekt in die Mitochondrien lokalisiert, während das N-terminale Fragment von Huntingtin auch nach Fusion mit GFP im Zytosol blieb (2 D Seite 267). Wurde GFP allerdings mit einem mutierten Huntingtinfragment eines Patienten (EGFPHD72Q) fusioniert, zeigten sich in COS-Zellen intrazelluläre unlösliche Proteinaggregate (2 E Seiten 1308-1310; Zusammenarbeit mit Dr. A. Sittler und Prof. E. Wanker, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin), wie sie für die Pathogenese des Morbus Huntington verantwortlich gemacht werden und auch im Gehirn der Patienten nachweisbar sind (Davies et al., 1997; DiFiglia et al., 1997). Überraschenderweise fand sich Frataxin-GFP in Mitochondrien (2 D Seiten 266-268), womit es zum ersten Mal gelungen war, eine Trinukleotiderkrankung direkt mit Mitochondrien zu assoziieren. Zeitgleich konnten zwei andere Arbeitsgruppen eine Funktion des Hefehomologs von Frataxin, *yfh 1*, in der mitochondrialen Eisenhomöostase ausmachen (Babcock et al, 1997; Wilson und Roof, 1997).

Zur Markierung von Knochenmarkszellen, die hämatopoetische (HSC) und mesenchymale (MSC) Stammzellen enthalten, haben wir ein murines Stammzellvirus (MSCV) verwendet (siehe 2 F). Im MGirL22Y-retroviralen Vektor wird GFP (Fluoreszenz-optimiert als *enhanced GFP*) und ein Dihydrofolatreductase-Selektionsgen unter der Kontrolle des MSCV-Promoters exprimiert (2 F Seiten 1356-1357). MGirL22Y-transduzierte adulte Knochenmarkszellen wurden in letal bestrahlte adulte Wildtyp-Mäuse transplantiert, um so das Blutbild der Empfängertiere mit GFP-markierten Blutzellen zu rekonstituieren (Abb. 3). Alternativ wurden Knochenmarkszellen aus transgenen Mäusen, die GFP unter der Kontrolle des β -Actin-Promoters exprimieren (Okabe et al., 1997), in myeloablatierte Wildtyp-Mäuse transplantiert (Abb. 3).

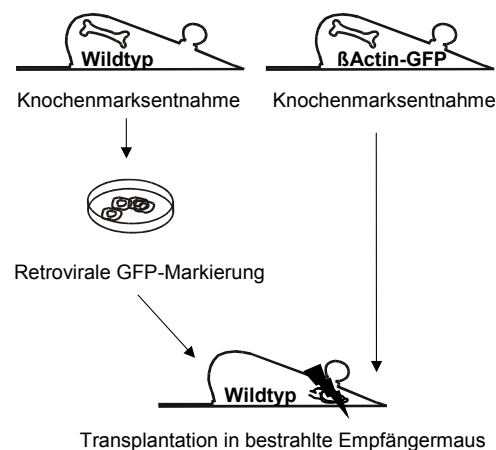


Abb. 3: Herstellung von Knochenmarkschimären

Aus den langen Röhrenknochen von adulten Wildtyp-Mäusen wird das Knochenmark gewonnen und anschliessend durch Kokultur mit einer Virus-produzierenden Zelllinie GFP-markiert. Alternativ werden GFP-positive Knochenmarkszellen direkt aus transgenen Mäusen gewonnen, die GFP unter der Kontrolle des β -Actin-Promoters exprimieren. Die Knochenmarkszellen werden in letal bestrahlte adulte Wildtyp-Mäuse transplantiert und rekonstituieren dort das Blutbild mit GFP-positiven Blutzellen.

In den GFP-Knochenmarkschimären waren durchschnittlich 60-75% der Leukozyten des Blutes GFP-positiv (2 F Seiten 1356-1357). Auffälligkeiten der Hämatopoese fanden sich nicht, weshalb toxische Effekte des GFP auf hämatopoetische Stammzellen und deren Nachkommen ausgeschlossen werden können. Schon zwei Wochen nach der Transplantation waren im Gehirn der Chimären GFP-markierte perivaskuläre Makrophagen nachweisbar (siehe 2 G; Zusammenarbeit mit Dr. I. Bechmann und Prof. R. Nitsch, Institut für Anatomie, Charité, Berlin). Durch zusätzliche Phagozytose-abhängige Markierung der perivaskulären Zellen mit dem intraventrikulär applizierten und Rhodamin-konjugierten Dextranamin Mini Ruby liess sich zeigen, dass die Zahl der eingewanderten perivaskulären Makrophagen ständig zunahm (2 G Seiten 1653-1657). Nach 14 Wochen entstammten fast alle perivaskulären Makrophagen dem Transplantat (2G Seiten 1656-1657), womit erstmals eine Migrationskinetik dieser Zellpopulation etabliert werden konnte. Aufgrund ihrer Lage an der Schnittstelle zwischen Blut und Gehirn und ihrer Expression von MHC II (Streit et al., 1989b) und B7 (Bechmann et al., 2001) sind perivaskuläre Zellen vermutlich an der Immunüberwachung der perivaskulären Räume des ZNS beteiligt.

Bereits vier Wochen nach der Knochenmarkstransplantation fanden sich im Hirnparenchym GFP-positive ramifizierte Zellen, die Mikroglia-/Makrophagen-spezifische Antigene wie F4/80 und Iba1 exprimierten (2 F Seiten 1357-1358). Diese Zellen waren überwiegend negativ für MHC I und II und zeigten ultrastrukturelle Charakteristika von Mikroglia (2 F Seiten 1357-1358). Eine Phagozytose-bedingte GFP-Markierung konnte in der Immunelektronenmikroskopie bei Nachweis einer zytoplasmatischen GFP-Lokalisation ausgeschlossen werden (2 F Seiten 1357-1358). GFP-markierte Mikroglia fanden sich zunächst im Bulbus olfactorius; nach einigen Monaten waren sie aber auch im Striatum, Cortex, Hippocampus und vor allem im Cerebellum nachweisbar (2 F Seiten 1357-1358). Dort machten sie nach 15 Wochen bis zu 26% der gesamten Mikrogliapopulation aus und waren selbst nach 12 Monaten noch in hoher Zahl vorhanden (2 F Seiten 1357-1358; 2 I Seiten 734 und 736). Im Bulbus olfactorius nahm die Zahl der Donor-Mikroglia hingegen schon nach vier Monaten ab, was mit einer hohen Apoptoserate in dieser Region assoziiert war (2 F Seiten 1357-1358). Aus den Befunden geht hervor, dass Mikroglia entgegen bisheriger Beobachtungen durchaus keine stabile Zellpopulation sind, sondern kontinuierlich aus dem Knochenmark in das ZNS rekrutiert werden können. Ähnliche Befunde wurden unter Verwendung von GFP-Knochenmarkschimären kürzlich auch durch andere Arbeitsgruppen erhoben (Brazelton

et al., 2000; Nakano et al., 2001). Die Daten widersprechen der Hypothese eines neuroektodermalen Ursprungs von Mikroglia (Übersicht bei Fedoroff et al., 1997). Sie stellen ausserdem in Frage, ob das sogenannte „Immunprivileg“ des ZNS, d.h. die reduzierte Aktivierbarkeit des Immunsystems (Übersicht bei Streilein, 1995), auf den Ausschluss peripherer immunkompetenter Zellen vom Hirnparenchym durch die Blut-Hirn-Schranke zurückzuführen ist. Dass T-Zellen das ZNS kontinuierlich im Sinne einer Immunüberwachung patrouillieren, wurde bereits vor einigen Jahren gezeigt (Übersicht bei Wekerle et al., 1986). Nach unseren Befunden scheinen auch Antigen-präsentierende Zellen wie Mikroglia zwischen Peripherie und ZNS ausgetauscht zu werden.

Ursprung und Funktion der grössten Gliapopulation im ZNS, der Astroglia, wurden in den letzten Jahren ebenfalls zum Gegenstand der Diskussion. Zwar ging man bislang davon aus, dass Astroglia aus neuroepithelialen Vorläuferzellen hervorgehen (siehe oben), doch jüngste Forschungsergebnisse suggerieren, dass Astrozyten in der Subventrikularzone und in der Subgranularzone des Hippocampus selbst adulte Stammzellen des Nervensystems darstellen (Doetsch et al., 1999; Seri et al., 2001). In Knochenmarkschimären fand man darüber hinaus, dass etwa 0,5% aller Astrozyten aus dem Donor-Knochenmark entstammten (Eglitis und Mezey, 1997; Eglitis et al., 1999). Auch mesenchymale Stammzellen differenzierten in vivo und in vitro zu Astrozyten (Kopen et al., 1999; Sanchez-Ramos et al., 2000; Nakano et al., 2001). In GFP-Knochenmarkschimären fanden wir jedoch keine GFP-markierten Astroglia (siehe 2 I, Seite 734). Dieser Befund steht in Einklang mit den kürzlich publizierten Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die GFP-Chimären verwenden (Brazelton et al., 2000; Nakano et al., 2001). Wir haben ferner transgene Knochenmarkszellen, die *enhanced* GFP unter der Kontrolle des humanen astrozytären GFAP-Promoters exprimieren (Nolte et al., 2001; Zusammenarbeit mit Dr. F. Kirchhoff und Prof. H. Kettenmann), in adulte Wildtyp-Mäuse transplantiert (Wehner, Böntert et al., in Revision). Auch in diesen Chimären waren keine GFP-exprimierenden Zellen nachweisbar, so dass wir keinen Anhalt für eine Genese von Astrozyten aus Stammzellen des Knochenmarks fanden. Schliesslich haben wir Knochenmarkszellen nach retroviraler Transduktion mit GFP und transgene Knochenmarkszellen, die GFP unter der Kontrolle des β -Actin-Promoters oder des humanen GFAP-Promoters exprimieren, mit Astrozyten kokultiviert (Wehner, Böntert et al., in Revision). Dabei zeigte sich, dass zwar Mikrogliazellen, aber keine Astrozyten aus den Knochenmarkszellen entstehen können. Unsere Ergebnisse werden durch gleichlautende Befunde zweier weiterer Arbeitsgruppen gestützt (Sievers et al., 1994; Woodbury et al., 2000).

1.4 Rekrutierung von hämatopoetischen Zellen in das geschädigte ZNS

Das Regenerationspotential von Knochenmarkszellen wurde erst in den letzten Jahren erkannt. Besonderes Aufsehen hat der Ersatz von murinen Herzmuskelzellen nach Myokardinfarkt durch intramuskulär injizierte Stammzellen des Knochenmarks erregt (Orlic et al., 2001). HSC vermochten nach intravenöser Injektion, Lebergewebe im Mausmodell der fatalen Tyrosinämie Typ I zu regenerieren (Lagasse et al., 2000). Schliesslich konnte durch intravenöse Gabe von MSC eine klinische Verbesserung nach zerebraler Ischämie in der Ratte erzielt werden (Chen et al., 2001). In diesem Modell konnte sogar ein Ersatz von Glia und Neuronen beobachtet werden.

Inwieweit allerdings endogene Mechanismen zur Mobilisation von hämatopoetischen Zellen nach einer Schädigung des ZNS existieren, sollte mit Hilfe der GFP-Knochenmarkschimäre beantwortet werden.

In den Chimären wurde vier Wochen nach der Transplantation GFP-markierter Knochenmarkszellen eine transiente zerebrale Ischämie (Schlaganfall) induziert (siehe 2 F; Zusammenarbeit mit Dr. K. Prass, Neurologische Klinik, Charité, Berlin). Nach Okklusion der A. cerebri media (MCAO) für 60 Minuten und anschliessender Reperfusion für 24 Stunden bis 14 Tage wurde die Einwanderung GFP-positiver Zellen in das Infarktareal verfolgt. Vor Beginn der Ischämie liessen sich im Versorgungsgebiet der A. cerebri media keine parenchymatösen GFP-markierten Zellen nachweisen (2 F Seite 1357). Bereits 24 Stunden nach der MCAO war in der ischämischen Hemisphäre aber ein GFP-positives Rundzellinfiltrat vorhanden (2 F Seite 1358). Ferner war eine deutliche Aktivierung ortsständiger Mikroglia zu beobachten (2 F Seite 1358). Diese frühe Mikrogliaaktivierung nach Ischämie ist in der Literatur beschrieben (Übersicht bei Stoll et al., 1998) und konnte auch in einem Modell der Subarachnoidalblutung beobachtet werden (siehe 2 H; Zusammenarbeit mit Dr. J. Dreier, Neurologische Klinik, Charité, Berlin). Dabei kam es durch Hämoglobin und eine erhöhte Kaliumkonzentration im Subarachnoidalraum zur *cortical spreading ischemia*, die innerhalb von 48 Stunden zur Mikrogliaaktivierung führte (2 H Seiten 661-662). Vierzehn Tage nach der MCAO fand sich in der ischämischen Hemisphäre eine ausgeprägte Entzündungsreaktion mit ortsständigen Phagozyten, aber auch GFP-markierten Zellen (2 F Seite 1358). Fast 30% dieser GFP-positiven Zellen waren zu Mikroglia differenziert, während in der kontralateralen, nicht-ischämischen Hemisphäre praktisch keine GFP-markierten

Mikroglia nachweisbar waren (2 F Seiten 1356 und 1358). Die Befunde belegen eine gezielte Einwanderung und Differenzierung von Blutzellen im ZNS nach Ischämie. Die unmittelbaren Vorläufer der Mikroglia sind vermutlich Monozyten (Kennedy und Abkowitz, 1998). Eine Entstehung von Astrozyten aus transgenen Knochenmarkszellen, die GFP unter der Kontrolle des humanen GFAP-Promoters exprimieren, konnten wir auch nach zerebraler Ischämie nicht beobachten (Wehner, Böntert et al, in Revision). Unter diesen Bedingungen soll eine astrozytäre Differenzierung von Knochenmarkszellen erleichtert sein (Eglitis et al, 1999).

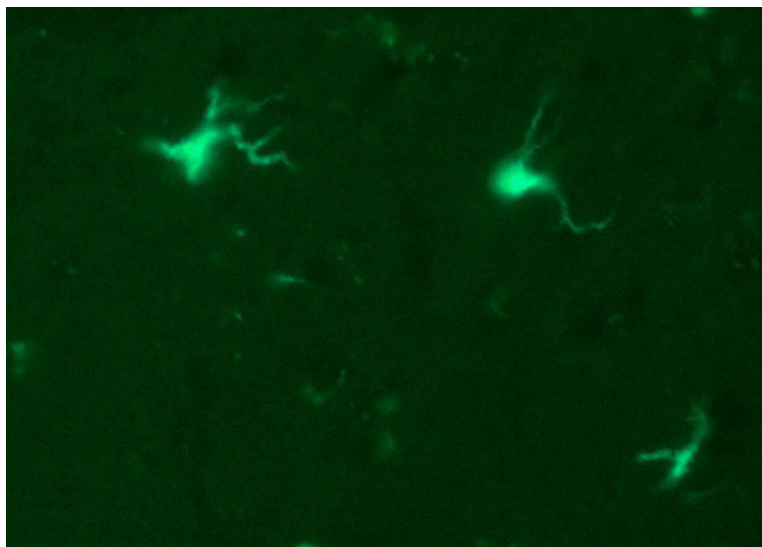
In nachfolgenden Experimenten wählten wir selektivere Schädigungsmodelle des ZNS. Nach operativer Durchtrennung der Fimbria-Fornix (ff-t) kommt es zu retrograden Veränderungen septo-hippocampaler Projektionsneurone des medialen Septums und zu anterograder Degeneration cholinergischer hippocampo-septaler Fasern im lateralen Septum (Übersicht bei Cassel et al., 1997). Es ist bereits bekannt, dass die Durchtrennung der Fimbria-Fornix in der Ratte innerhalb von 12 Stunden zu einer transienten Aktivierung ortsständiger Mikroglia im medialen Septum führt (Hollerbach et al., 1998). Nach 48 Stunden geht die ff-t mit einer massiven Mikrogliareaktion im lateralen Septum einher. In GFP-Chimären konnten wir erstmals zeigen, dass Zellen des peripheren Blutes drei Tage nach der ff-t den septalen Komplex infiltrieren (2 F Seiten 1358-1359; Zusammenarbeit mit Dr. C.A. Haas, Institut für Anatomie, Universität Freiburg). Nach 12 Tagen waren GFP-markierte Zellen im geschädigten lateralen Septum zu Mikroglia differenziert (2 F Seiten 1356 und 1358-1359) und dort in hoher Zahl auch noch nach drei Wochen nachweisbar.

Schliesslich untersuchten wir die Rekrutierung von genetisch markierten Zellen aus dem Knochenmark in den Fazialiskern nach peripherer Fazialisaxotomie (vgl. Kapitel 1.1; Zusammenarbeit mit Dr. A. Flügel und Prof. G.W. Kreutzberg, Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried). Zu unserer Überraschung fanden wir, dass die geschädigten ZNS-Motoneurone nach 14 Tagen von Fortsätzen GFP-markierter Mikroglia umgeben waren (2 F Seiten 1356 und 1358-1359). Im kontralateralen, nicht-operierten Fazialiskern fanden sich dagegen keine GFP-positiven Mikroglia (2 F Seiten 1356 und 1358-1359). Da die Blut-Hirn-Schranke im Modell der Fazialisaxotomie intakt bleibt, muss es molekulare Mediatoren geben, mit denen ZNS-Neurone ihre Schädigung an Zellen ausserhalb des Nervensystems signalisieren können. Ein solcher Mediator könnte beispielsweise *monocyte chemoattractant protein-1* sein, das in Motoneuronen nach Fazialisaxotomie synthetisiert wird (Flügel et al., 2001). Der Befund ist von potentieller klinischer Relevanz,

da er auf die Möglichkeit eines nicht-invasiven Einschleusens von genetisch modifizierten hämatopoetischen Zellen in das ZNS hinweist.

In einem Projekt von Dr. M. Prinz und Prof. A. Aguzzi (Institut für Neuropathologie, Universitätsspital Zürich, Schweiz) wurden schliesslich Knochenmarkschimären verwendet, um den Beitrag von Makrophagen für die periphere Prionpathogenese zu definieren. Es zeigte sich, dass in Abwesenheit von follikulär dendritischen Zellen hämatopoetische und stromale Kompartimente für die lymphoretikuläre Prionvermehrung und Neuroinvasion erforderlich sind. Gegenwärtig untersuchen wir in GFP-Knochenmarkschimären, ob Scrapie zu einer Rekrutierung von hämatopoetischen Zellen in das ZNS führt. Erste Ergebnisse belegen, dass GFP-markierte Mikroglia in grossem Umfang im Gehirn von Mäusen nach peripherer Prionproteininokulation nachweisbar sind (Abb. 4).

Abb. 4: GFP-positive Mikroglia im Hippocampus einer Chimäre 146 Tage nach i.p.RML-Inokulation



1.5 Neurogenese aus adulten Stammzellen des Knochenmarks

Die wissenschaftliche Diskussion um den Begriff der „Stammzelle“ (multipotent und selbsterneuernd) wurde durch Beobachtungen belebt, die eine neue funktionelle Definition der Stammzelle erlauben. So konnten aus einer singulären adulten hämatopoetischen Stammzelle in vivo Epithelien von Leber, Haut, Lunge und Gastrointestinaltrakt generiert werden (Krause et al., 2001). Knochenmarkszellen differenzierten auch zu Skelettmuskel (Ferrari et al., 1998) und Herzmuskel (Orlic et al., 2001). Umgekehrt konnten aus adulten Stammzellen der Muskulatur (Jackson et al., 1999) und des Gehirns (Bjornson et al., 1999) in vivo Blutzellen gewonnen werden. Diese Überschreitung der embryonalen Entwicklungsgrenzen lässt sich durch eine „Transdifferenzierung“ von Stammzellen erklären. Alternativ besitzen adulte Stammzellen Pluripotenz.

Aus Knochenmarkszellen konnten sowohl in vitro (Woodbury et al., 2000; Sanchez-Ramos et al., 2000) als auch in vivo (Kopen et al., 1999; Mezey et al., 2000; Brazelton et al., 2000, Nakano et al., 2001) neuronale Phänotypen generiert werden. Mindestens 0,2% aller NeuN-positiven Zellen im Gehirn entstammten vier Monate nach der Transplantation dem Donor-Knochenmark (Mezey et al., 2000; Brazelton et al., 2000). Diese Zellen zeigten jedoch abgesehen von der Expression neuronaler Antigene wie NeuN, Neurofilament und β -Tubulin III keine für Neuronen charakteristische Morphologie.

In GFP-Chimären fanden wir, dass zu einem frühen Zeitpunkt nach der Transplantation vereinzelt GFP-markierte Zellen NeuN exprimierten (siehe 2 I). Diese Zellen waren vor allem im Bulbus olfactorius lokalisiert (2 I Seiten 734-735). Interessanterweise handelt es sich bei dieser Region und beim Hippocampus um Zonen der aktiven Neurogenese im adulten Gehirn (Übersicht bei Gage, 2000). Mehrere Monate nach der Transplantation waren jedoch keine GFP/NeuN-positiven Zellen mehr nachweisbar, so dass die Entwicklung zu voll differenzierten Neuronen fehlgeschlagen sein könnte (2 I Seite 734). Eine andere Arbeitsgruppe fand in Gehirnen von Knochenmarkschimären nach sechs Monaten ebenfalls keine Expression von neuronalem Antigen in Donorzellen (Nakano et al., 2001).

Zehn bis 15 Monate nach der Transplantation zeigten sich im Cerebellum jedoch voll entwickelte Nervenzellen mit GFP-Markierung in Soma, Axon und Dendriten (2 | Seiten 734-737). Aufgrund der Morphologie und der Expression von Calbindin-D28K konnten diese Donorzellen als Purkinje-Zellen identifiziert werden (2 | Seiten 734-737). In der Immunelektronenmikroskopie bestätigte sich eine zytoplasmatische GFP-Expression (2 | Seiten 735-736). Die funktionelle Integration der Donorzellen, die maximal 0,1% aller Purkinje-Zellen des Cerebellums ausmachten, zeigte sich in synaptischen Kontakten und der Expression des Neurotransmitter-synthetisierenden Enzyms Glutamatdecarboxylase (2 | Seiten 735-737). Obgleich in den GFP-Chimären, die retroviral transduziertes Knochenmark erhielten, kein rekombinantes Retrovirus nachweisbar war, transplantierten wir zum Vergleich Knochenmark aus GFP-transgenen Tieren in Wildtypmäuse. Auch in diesen Chimären waren GFP-markierte Purkinje-Zellen im Cerebellum nachweisbar (2 | Seiten 735-737). Die Ergebnisse liefern den ersten Hinweis auf eine postnatale Entwicklung von Purkinje-Zellen. Möglicherweise ist das späte Auftreten der GFP-markierten Neurone als Regenerationsversuch im Zusammenhang mit dem altersbedingten Verlust von Purkinje-Zellen zu sehen (Sturrock, 1990). In jedem Fall belegen die Ergebnisse, dass periphere Stammzellen zu Neuronen differenzieren und in die komplexe Zytoarchitektur des adulten ZNS integriert werden können.

1.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Im zentralen Nervensystem sind Neurone von Gliazellen umgeben. Während der Embryonalentwicklung unterstützen radiale Glia die Migration der Nervenzellen (Rakic, 1972). Im adulten ZNS können aus Gliazellen Neurone entstehen (Doetsch et al., 1999; Seri et al., 2001). Die Beziehung zwischen Nervenzellen und Glia ist demnach reziprok.

Auch nach einer Schädigung des ZNS reagieren sowohl Neurone als auch die benachbarten Glia. In unseren Forschungsarbeiten haben wir versucht, beide Zellpopulationen näher zu charakterisieren, um so neue Strategien für die Therapie von ZNS-Erkrankungen zu entwickeln. In Beantwortung der drei eingangs gestellten Fragen stellen wir fest:

1. Neurone können eine Schädigung an benachbarte Gliazellen und an Zellen ausserhalb des ZNS signalisieren. Als Mediatoren der Neuron-Glia-Interaktion kommen Neuropeptide wie CGRP und Galanin sowie extrazelluläres ATP in Betracht.
2. Mikroglia entstammen dem Knochenmark. Sie besiedeln mit regional unterschiedlicher Kinetik das adulte Gehirn. Nach einer Schädigung des ZNS werden Zellen hämatopoetischen Ursprungs gezielt an den Läsionsort rekrutiert und differenzieren dort zu Mikroglia. Ungeachtet der Integrität der Blut-Hirn-Schranke können genetisch-modifizierte Knochenmarkszellen in das ZNS geschleust werden.
3. Aus Stammzellen des Knochenmarks können unter physiologischen Bedingungen Mikroglia, aber nicht Astrozyten hervorgehen. Wenige ZNS-Neurone lassen sich im adulten Gehirn auf einen Ursprung ausserhalb des Nervensystems zurückführen.

Die Ergebnisse liefern neue Ansätze für die gentherapeutische und restaurative Behandlung von ZNS-Erkrankungen. Wir untersuchen derzeit, ob trophische Faktoren über Mikroglia nicht-invasiv in das geschädigte ZNS transportiert werden können. Darüber hinaus versuchen wir, die neuronale Differenzierung adulter peripherer Stammzellen näher zu charakterisieren. Die Integration neuer Nervenzellen in den komplexen Verband eines adulten Gehirns lässt die Hoffnung aufkommen, dass Strategien für eine Regeneration des geschädigten ZNS entwickelt werden können.

Literaturverzeichnis

- (1) Babcock M, de Silva D, Oaks R, Davis-Kaplan S, Jiralerspong S, Montermini L, Pandolfo M, Kaplan J (1997) Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science* 276: 1709-1712.
- (2) Bachoud-Lévi AC, Rémy P, Nguyen JP, Brugières P, Lefaucheur JP, et al. (2000) Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation. *Lancet* 356:1975-1979.
- (3) Bechmann I, Peter S, Beyer M, Gimsa U, Nitsch R (2001) Presence of B-7.2 (CD86) and lack of B7-1 (CD80) on myelin-phagocytosing MHC-II positive rat microglia is associated with non-destructive immune response in vivo. *FASEB J.* 15: 1086-1088.
- (4) Bisby MA (1980) Changes in the composition of labeled protein transported in motor axons during their regeneration. *J. Neurobiol.* 11: 435-445.
- (5) Bjornson CRR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL (1999) Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283: 534-537.
- (6) Blinzinger K, Kreutzberg GW (1968) Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Zeitschr. Zellforsch.* 85: 145-157.
- (7) Brazelton TR, Rossi FMV, Keshet GI, Blau HM (2000) From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290: 1775-1779.
- (8) Bregman BS, Kunkel-Bagden E, Schnell L, Dai HN, Gao D, Schwab ME (1995) Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature* 378: 498-501.

- (9) Campuzano V, Montermini L, Moltò MD, Pianese L, Cossée M et al. (1996) Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 271: 1423-1427.
- (10) Cassel JC, Duconseille E, Jeltsch H, Will B (1997) The fimbria-fornix/cingular bundle pathways: a review of neurochemical and behavioural approaches using lesions and transplantation techniques. *Prog. Neurobiol.* 51: 663-716.
- (11) Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805.
- (12) Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, Chopp M (2001) Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* 32: 1005-1011.
- (13) Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarini L, Bates GP (1997) Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90: 537-548.
- (14) Del Rio-Hortega P (1932) Microglia. In: *Cytology and cellular pathology of the nervous system*. Vol. II, Hrsg. Penfield W, Hoeber, New York, S. 481-534.
- (15) DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, Aronin N (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277: 1990-1993.
- (16) Doetsch F, Caille I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97: 703-716.
- (17) Donovan PJ, Gearhart J (2001) The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* 414: 92-97.

- (18) Dubyak GR, El-Moatassim C (1993) Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am. J. Physiol.* 265: C577-606.
- (19) Eglitis MA, Dawson D, Park K-W, Mouradian MM (1999) Targeting of marrow-derived astrocytes to the ischemic brain. *NeuroReport* 10: 1289-1292.
- (20) Eglitis MA, Mezey É (1997) Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4080-4085.
- (21) Evans RJ, Derkach V, Surprenant A (1992) ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature* 357: 503-505.
- (22) Fedoroff S, Zhai R, Novak JP (1997) Microglia and astroglia have a common progenitor cell. *J. Neurosci. Res.* 50: 477-486.
- (23) Ferrari D, Villalba M, Chiozzi P, Falzoni S, Ricciardi-Castagnoli P, Di Virgilio F (1996) Mouse microglial cells express a plasma membrane pore gated by extracellular ATP. *J. Immunol.* 156: 1531-1539.
- (24) Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F (1998) Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279: 1528-1530.
- (25) Flaris NA, Densmore TL, Molleston MC, Hickey WF (1993) Characterization of microglia and macrophages in the central nervous system of rats: definition of the differential expression of molecules using standard and novel monoclonal antibodies in normal CNS and in four models of parenchymal reaction. *Glia* 7: 34-40.
- (26) Flügel A, Hager G, Horvat A, Spitzer C, Singer GMA, Graeber MB, Kreutzberg GW, Schwaiger F-W (2001) Neuronal MCP-1 expression in response to remote nerve injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21: 60-76.

- (27) Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287: 1433-1438.
- (28) Hickey WF, Kimura H (1988) Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 239: 290-292.
- (29) Hickey WF, Vass K, Lassmann H (1992) Bone marrow-derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 51: 246-256.
- (30) Hollerbach EH, Haas CA, Hildebrandt H, Frotscher M, Naumann T (1998) Region-specific activation of microglial cells in the rat septal complex following fimbria-fornix transection. *J. Comp. Neurol.* 390: 481-496.
- (31) Hösl E, Ledergerber M, Kofler A, Hösl L (1997) Evidence for the existence of galanin receptors on cultured astrocytes of rat CNS: colocalization with cholinergic receptors. *J. Chem. Neuroanat.* 13: 95-103.
- (32) Hughes P, Dragunow M (1995) Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacol. Rev.* 47: 133-178.
- (33) Jackson KA, Mi T, Goodell MA (1999) Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 14482-14486.
- (34) Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nature Neurosci.* 1:683-692.
- (35) Kennedy DW, Abkowitz JL (1997) Kinetics of central nervous system microglial and macrophage engraftment: analysis using a transgenic bone marrow transplantation model. *Blood* 90: 986-993.
- (36) Kennedy DW, Abkowitz JL (1998) Mature monocytic cells enter tissue and engraft. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 14944-14949.

- (37) King BF, Neary JT, Zhu Q, Wang S, Norenberg MD, Burnstock G (1996) P2 purinoceptors in rat cortical astrocytes: expression, calcium-imaging and signalling studies. *Neuroscience* 74:1187-1196.
- (38) Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG (1999) Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 10711-10716.
- (39) Krall WJ, Challita PM, Perlmutter LS, Skelton DC, Kohn DB (1994) Cells expressing the human galactocerebrosidase from a retroviral vector repopulate macrophages and central nervous system microglia after murine bone marrow transplantation. *Blood* 83: 2737-2748.
- (40) Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ (2001) Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105: 369-377.
- (41) Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19: 312-318.
- (42) Kreutzberg GW, Graeber MB, Streit WJ, Tetzlaff W (1989) Glial reactions accompanying the regenerating process in motoneurons. In: *Peripheral nerve development and regeneration: recent advances and clinical applications*. Hrsg. Scarpini E, Fiori MG, Pleasure D, Scarlato G, Liviana Press, Padova, S. 199-206.
- (43) Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M (2000) Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature Med.* 6: 1229-1234.
- (44) Lassmann H, Schmied M, Vass K, Hickey WF (1993) Bone marrow derived elements and resident microglia in brain inflammation. *Glia* 7: 19-24.
- (45) Lee JC, Mayer-Proschel M, Rao MS (2000) Gliogenesis in the central nervous system. *Glia* 30:105-121.

- (46) Mezey É, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR (2000) Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290: 1779-1782.
- (47) Moore RY (1989) Cranial motor neurons contain either galanin- or calcitonin gene-related peptidelike immunoreactivity. *J. Comp. Neurol.* 282: 512-522.
- (48) Nakano K, Migita M, Mochizuki H, Shimada T (2001) Differentiation of transplanted bone marrow cells in the adult mouse brain. *Transplantation* 71: 1735-1740.
- (49) Nedergaard M (1994) Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* 263: 1768-1771.
- (50) Nolte C, Matyash M, Pivneva T, Schipke CG, Ohlemeyer C, Hanisch U-K, Kirchhoff F, Kettenmann H (2001) GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia* 33: 72-86.
- (60) Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y (1997) Green mice as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* 407: 313-319.
- (61) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001) Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410: 701-705.
- (62) Pearce B, Murphy S, Jeremy J, Morrow C, Dandona P (1989) ATP-evoked Ca²⁺ mobilisation and prostanoid release from astrocytes: P₂-purinergic receptors linked to phosphoinositide hydrolysis. *J. Neurochem.* 52: 971-977.
- (63) Pennypacker KR, Thai L, Hong JS, McMillian MK (1994) Prolonged expression of AP-1 transcription factors in the rat hippocampus after systemic kainate treatment. *J. Neurosci.* 14: 3998-4006.

- (64) Rakic P (1972) Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.* 145: 61-83.
- (65) Ramón y Cajal S (1928) Degeneration and regeneration of the nervous system. Hafner, New York.
- (66) Reese TS, Karnovsky MJ (1967) Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.* 34: 207-217.
- (67) Richardson PM, McGuinness UM, Aguayo AJ (1980) Axons from CNS neurones regenerate into PNS grafts. *Nature* 284: 264-265.
- (68) Rubin BP, Dusart I, Schwab ME (1994) A monoclonal antibody (IN-1) which neutralizes neurite growth inhibitory proteins in the rat CNS recognizes antigens localized in CNS myelin. *J. Neurocytol.* 23: 209-217.
- (69) Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR (2000) Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp. Neurol.* 164: 247-256.
- (70) Schlüter D, Meyer T, Strack A, Reiter S, Kretschmar M, Wiestler OD, Hof H, Deckert M (2001) Regulation of microglia by CD4+ and CD8+ T cells: selective analysis in CD45-congenic normal and *Toxoplasma gondii*-infected bone marrow chimeras. *Brain Pathol.* 11: 44-55.
- (71) Schwab ME, Caroni P (1988) Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro. *J. Neurosci.* 8: 2381-2393.
- (72) Schwartz JP, Nishiyama N (1994) Neurotrophic factor gene expression in astrocytes during development and following injury. *Brain Res. Bull.* 35:403-407.

- (73) Seri B, García-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J. Neurosci.* 21: 7153-7160.
- (74) Sheng M, Greenberg ME (1990) The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4: 477-485.
- (75) Sievers J, Schmidtmer J, Parwaresch R (1994) Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells when cultured on astrocytes. *Ann. Anat.* 176: 45-51.
- (76) Stoll G, Jander S, Schroeter M (1998) Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog. Neurobiol.* 56: 149-171.
- (77) Streilein JW (1995) Unraveling immune privilege. *Science* 270: 1158-1159.
- (78) Streit WJ, Dumoulin FL, Raivich G, Kreutzberg GW (1989a) Calcitonin gene-related peptide increases in rat facial motoneurons after peripheral nerve transection. *Neurosci. Lett.* 101: 143-148.
- (79) Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW (1989b) Expression of Ia antigen on perivascular and microglial cells after sublethal and lethal motor neuron injury. *Exp. Neurol.* 105:115-126.
- (80) Sturrock RR (1990) A comparison of quantitative histological changes in different regions of the ageing mouse cerebellum. *J. Hirnforsch.* 31: 481-486.
- (81) Suhr ST, Gage FH (1993) Gene therapy for neurologic disease. *Arch. Neurol.* 50: 1252-1268.
- (82) Temple S (2001) The development of neural stem cells. *Nature* 414: 112-117.

- (83) The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72: 971-983.
- (84) Tsien RY (1998) The green fluorescent protein. *Ann. Rev. Biochem.* 67: 509-544.
- (85) Virchow R (1871) *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre*. Hirschwald, 4. Aufl., Berlin, S. 21.
- (86) Walz W, Ilschner S, Ohlemeyer C, Banati R, Kettenmann H (1993) Extracellular ATP activates a cation conductance and a K⁺ conductance in cultured microglial cells from mouse brain. *J. Neurosci.* 13: 4403-4411.
- (87) Wehner T, Böntert M, Eyüpoglu I, Prass K, Fernandez-Klett F, Heinze M, Bechmann I, Nitsch R, Kirchhoff F, Kettenmann H, Dirnagl U, Priller J. Bone marrow-derived cells expressing GFP under the control of the glial fibrillary acidic protein promoter do not differentiate into astrocytes in vitro and in vivo. *Glia*, in Revision.
- (88) Wekerle H, Linington C, Lassmann H, Meyermann R (1986) Cellular immune reactivity within the CNS. *Trends Neurosci.* 9:271-277.
- (89) Wilson RB, Roof DM (1997) Respiratory deficiency due to loss of mitochondrial DNA in yeast lacking the frataxin homologue. *Nature Genet.* 16: 352-357.
- (90) Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB (2000) Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* 61: 364-370.
- (91) Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z, Villar MJ, Fahrenkrug J, Hökfelt T (1990) On the role of galanin, substance P and other neuropeptides in primary sensory neurons of the rat: studies on spinal reflex excitability and peripheral axotomy. *Eur. J. Neurosci.* 2: 733-743.

Eigene Publikationen

- (1) Reddington M, Priller J, Treichel J, Haas C, Kreutzberg GW (1995) Astrocytes and microglia as potential targets for calcitonin gene related peptide in the central nervous system. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73: 1047-1049.
- (2) Priller J, Briley EM, Mansouri J, Devane WA, Mackie K, Felder CC (1995) Mead ethanolamide, a novel eicosanoid, is an agonist for the central (CB1) and peripheral (CB2) cannabinoid receptors. *Mol. Pharmacol.* 48: 288-292.
- (3) Priller J, Haas CA, Reddington M, Kreutzberg GW (1995) Calcitonin gene-related peptide and ATP induce immediate early gene expression in cultured rat microglial cells. *Glia* 15: 447-457.
- (4) Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen DN, Richardson JM, Riggan RM, Koppel GA, Paul SM, Becker GW (1996) Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett.* 393: 231-235.
- (5) Priller J, Scherzer CR, Faber PW, MacDonald ME, Young AB (1997) Frataxin gene of Friedreich's ataxia is targeted to mitochondria. *Ann. Neurol.* 42: 265-269.
- (6) Priller J, Reddington M, Haas CA, Kreutzberg GW (1998) Stimulation of P2Y-purinoceptors on astrocytes results in immediate early gene expression and potentiation of neuropeptide action. *Neuroscience* 85: 521-525.
- (7) Priller J, Haas CA, Reddington M, Kreutzberg GW (1998) Cultured astrocytes express functional receptors for galanin. *Glia* 24: 323-328.

- (8) Dreier JP, Ebert N, Priller J, Megow D, Lindauer U, Klee R, Reuter U, Imai Y, Einhäupl KM, Victorov I, Dirnagl U (2000) Products of hemolysis in the subarachnoid space induce cortical spreading ischemia and focal necrosis in rats, a model for delayed ischemic neurological deficits after subarachnoid hemorrhage? *J. Neurosurg.* 93: 658-666.
- (9) Bechmann I, Kwidzinski E, Kovac AD, Simburger E, Horvath T, Gimsa U, Dirnagl U, Priller J, Nitsch R (2001) Turnover of rat brain perivascular cells. *Exp. Neurol.* 168: 242-249.
- (10) Sittler A, Lurz R, Lueder G, Priller J, Hayer-Hartl MK, Hartl FU, Lehrach H, Wanker EE (2001) Geldanamycin activates a heat shock response and inhibits huntingtin aggregation in a cell culture model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 10: 1307-1315.
- (11) Katchanov J, Harms C, Gertz K, Hauck L, Waeber C, Hirt L, Priller J, von Harsdorf R, Brück W, Hörtnagl H, Dirnagl U, Bhide PG, Endres M (2001) Mild cerebral ischemia induces loss of cyclin-dependent kinase inhibitors and activation of cell cycle machinery before delayed neuronal cell death. *J. Neurosci.* 21: 5045-5053.
- (12) Bechmann I, Priller J*, Kovac A, Böntert M, Wehner T, Klett FF, Bohsung J, Stuschke M, Dirnagl U, Nitsch R (2001) Immune surveillance of mouse brain perivascular spaces by blood-borne macrophages. *Eur. J. Neurosci.* 14: 1651-1658
*gleichberechtigter Erstautor
- (13) Priller J, Persons DA, Klett FF, Kempermann G, Kreutzberg GW, Dirnagl U (2001) Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *J. Cell. Biol.* 155: 733-738.

- (14) Priller J, Flügel A, Wehner T, Boentert M, Haas CA, Prinz M, Fernández-Klett F, Prass K, Bechmann I, de Boer BA, Frotscher M, Kreutzberg GW, Persons DA, Dirnagl U (2001) Targeting of gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of the green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nature Med.* 7: 1356-1361.
- (15) Prinz M, Montrasio F, Klein MA, Schwarz P, Priller J, Odermatt B, Pfeffer K, Aguzzi A (2002) Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 919-924.
- (16) Dreier JP, Kleeberg J, Petzold G, Priller J, Windmüller O, Orzechowski H-D, Lindauer U, Heinemann U, Einhüpl KM, Dirnagl U (2002) Endothelin-1 potently induces Leão's cortical spreading depression in vivo in the rat: A model for an endothelial trigger of migrainous aura? *Brain* 125: 102-112.
- (17) Prass K, Ruscher K, Karsch M, Isaev N, Megow D, Priller J, Scharff A, Dirnagl U, Meisel A (2002) Desferrioxamine induces delayed tolerance against cerebral ischemia in vivo and in vitro. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22: 520-525.
- (18) Trendelenburg G, Prass K, Priller J, Kapinya K, Polley A, Muselmann C, Ruscher K, Kannbley U, Schmitt AO, Castell S, Wiegand F, Meisel A, Rosenthal A, Dirnagl U (2002) Serial analysis of gene expression identifies metallothionein II as major neuroprotective gene in mouse focal cerebral ischemia. *J. Neurosci.*, im Druck.
- (19) Zabel C, Chamrad DC, Priller J, Woodman B, Meyer HE, Bates GP, Klose J (2002) Alterations in the mouse and human proteome caused by Huntington disease. *Mol. Cell. Proteomics*, im Druck.
- (20) Luttun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo-Scherrer A, Liao F, Nagy JA, Hooper A, Priller J, De Klerck B, Compennolle V, Daci E, Molinas CR, Koninckx P, Bohlen P, Dewerchin M, Herbert J-M, Fava R, Matthys P, Carmeliet G, Collen D, Dvorak HF, Hicklin DJ, Carmeliet P (2002) PlGF and its receptor Flt-1: targets to treat angiogenesis and inflammatory diseases. *Nature Med.*, im Druck.

Danksagung

Herrn Professor Ulrich Dirnagl und Herrn Professor Karl M. Einhäupl möchte ich für die grosszügige Förderung, die geduldige Unterstützung und das entgegengebrachte Verständnis herzlich danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt auch den ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Grün“ (wegen der Beschäftigung mit GFP): Den Doktoranden Matthias Heinze, Matthias Böntert, Tim Wehner, Leyli Ghaeni und Milan Milosevic; dem Postgraduierten Francisco Fernández Klett; der Postdoktorandin Tatyana Zenina. Vielen Dank für Euer Engagement.

Frau Professor Anne B. Young und Herrn Professor John B. Penney Jr., Herrn Professor Georg W. Kreutzberg und Herrn Dr. Christian C. Felder möchte ich sehr herzlich danken. Sie haben mein Interesse an der Wissenschaft geweckt und meine Arbeit immer mit wertvollen Ratschlägen und Hilfestellungen begleitet.

Herrn Dr. R. Zschenderlein möchte ich für seine stete Diskussionsbereitschaft und die gewährte Ermunterung ganz herzlich danken.

Frau Dr. Carola Haas, Frau Dr. Annie Sittler, Herrn Dr. Ingo Bechmann, Herrn Dr. Bauke A. de Boer, Herrn Dr. Jörg Bohsung, Herrn Dr. Jens Dreier, Herrn Dr. Alexander Flügel, Herrn Dr. Frank Kirchhoff, Herrn Professor Derek A. Persons, Herrn Dr. Konstantin Prass, Herrn Dr. Marco Prinz, Herrn Dr. Martin Reddington und Herrn Professor Erich Wanker sage ich Dank für die wissenschaftliche Zusammenarbeit.

Allen Mitarbeitern der Neurologischen Klinik der Charité und der Abteilung „Experimentelle Neurologie“ danke ich für die freundliche Aufnahme und das gute Betriebsklima.

Meiner Freundin Katharina danke ich für die aufgebrachte Geduld.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorgelegte Habilitationsschrift von mir selbstständig verfasst wurde. Sie beinhaltet sieben von mir als Erstautor oder gleichberechtigter Erstautor erstellte Arbeiten (Priller et al., 1995; Priller et al., 1997; Priller et al., 1998a; Priller et al., 1998b; Bechmann, Priller et al., 2001; Priller et al., 2001a; Priller et al., 2001b) und zwei in Zusammenarbeit mit Dr. Annie Sittler (Sittler et al., 2001) und Dr. Jens Dreier (Dreier et al., 2000) entstandene Arbeiten. Einige Daten aus unserer Arbeitsgruppe, die zur Zeit bei der Zeitschrift *Glia* in Revision sind, wurden ebenfalls dargestellt. Meine federführende Beteiligung an diesem Projekt wird durch die Letztautorschaft auf dem eingereichten Manuskript (Wehner, Böntert et al.) belegt. Daten, die in Zusammenarbeit mit Dr. Marco Prinz entstanden sind, wurden als solche im Text ausgewiesen.

Es handelt sich um meine erste Anmeldung eines Habilitationsverfahrens.

Die geltende Habilitationsordnung ist mir bekannt.

Staatsanwaltschaftliche Ermittlungsverfahren gegen mich sind nicht anhängig.

Berlin, den 23.11.01