



Die Kunst des Neuronenschmiedens: Direkte Reprogrammierung somatischer Zellen in induzierte neuronale Zellen

Marisa Karow und Benedikt Berninger

Zusammenfassung

Zelluläre Reprogrammierung hat zu völlig neuen Einsichten in die Plastizität von terminal differenzierten Zellen geführt und zeigt neuartige Wege für therapeutische Ansätze der Zelltherapie für neurologische Erkrankungen auf. Mit zunehmender Kenntnis der Programme, die der Bildung der unterschiedlichen neuronalen Zelltypen zugrunde liegen, insbesondere mit der Identifizierung dabei relevanter Transkriptionsfaktoren und microRNAs, ist es gelungen, somatische Zellen unterschiedlicher Couleur in induzierte neuronale Zellen (iNZ) beziehungsweise neurale Stammzellen (iNSZ) zu reprogrammieren. Beginnend mit dem generellen Konzept der Reprogrammierung diskutieren wir hier drei Paradigmen: die direkte Konversion 1) von ZNS-fremden Zellen wie Hautfibroblasten in iNZ und iNSZ; 2) von endogen im ZNS vorkommenden Zellen wie z.B. Astroglia und Perizyten in iNZ und 3) von einem Nerven-Zelltyp in einen anderen. Letztere Reprogrammierung konnte während der frühen Hirnentwicklung bereits erfolgreich *in vivo* vollzogen werden, was dem Unterfangen, direkte Reprogrammierung *in situ* herbeizuführen, einen kräftigen Impuls gibt.

Abstract

The art of forging neurons: direct reprogramming of somatic cells into induced neuronal cells.

Cellular reprogramming has shed new light on the plasticity of terminally differentiated cells and discloses novel strategies for cell-based therapies for neurological disorders. With accumulating knowledge of the programs underlying the genesis of the distinct neural cell types, especially with the identification of relevant transcription factors and microRNAs, reprogramming of somatic cells of different origins into induced neuronal cells or neural stem cells has been successfully achieved. Starting with the general concept of reprogramming we discuss here three different paradigms: 1) direct conversion of CNS-foreign cells such as skin fibroblasts into induced neuronal cells or neural stem cells; 2) transdifferentiation of CNS resident cells such as astrocytes and brain pericytes into induced neuronal cells; 3) reprogramming of one neuronal subtype into another. The latter has already been successfully achieved *in vivo* during early brain development, providing strong impulse for the attempt to succeed in direct reprogramming *in situ* for future brain repair.

Keywords: lineage reprogramming; transdifferentiation; cell-based therapy; astrocytes; pericytes

Einleitung

Die Idee mittels eines Zauberkritzes ein Wesen in ein anderes zu verwandeln, hat die Menschen seit Jahrtausenden fasziniert. So erzählt Homer von der Fähigkeit der Zauberin Kirke, Menschen in Schweine zu verhexen. Ähnlich versuchen Entwicklungsbiologen, die definierte Identität einer gegebenen Zelle gezielt zu verändern. Dabei basiert eine bestimmte zelluläre Identität auf

einem transkriptionellen regulatorischen Netzwerk, das sich durch positive Rückkopplungsschleifen aufrechterhält und ein bestimmtes Gen-Expressionsmuster induziert. Der sich dabei einstellende (meta-) stabile Zustand der Gen-Expression wird auch als das zelluläre Programm bezeichnet. Durch Manipulieren des Programms, z.B. durch Überexpression von regulatorischen Schlüsselkomponenten wie Transkriptionsfaktoren oder microRNAs, kann die Zelle in

einen instabilen Zustand überführt werden, der es ihr erlaubt, ein neues transkriptionelles regulatorisches Netzwerk zu etablieren (Abbildung 1), und damit eine neue Identität anzunehmen – ein Prozess, der als zelluläre Reprogrammierung Berühmtheit erlangt hat. In diesem Artikel werden wir aktuelle Ansätze und Entwicklungen bei der direkten Reprogrammierung somatischer Zellen in induzierte neuronale Zellen (iNZ) und induzierte neurale Stammzellen (iNSZ) diskutieren.

Rewinding the film: Wiedererlangung der Pluripotenz

Am besten verstanden (wenn auch immer noch lückenhaft) ist die Reprogrammierung somatischer Zellen wie z.B. von Fibroblasten in induzierte pluripotente Stammzellen (iPSZ), d.h. Zellen mit demselben breiten Entwicklungspotenzial wie embryonale Stammzellen (ES). Voraussetzung für die von Takahashi und Yamanaka 2006 entwickelte Strategie der Reprogrammierung mittels der vier Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc (Takahashi und Yamanaka 2006) war ein relativ gutes Verständnis der transkriptionellen Mechanismen, die dem Aufrechterhalten der Pluripotenz in ES-Zellen zugrunde liegen. Dabei werden zunächst Schlüsseltranskriptionsfaktoren exogen in die Ausgangszellen eingeschleust, was initial zur stochastischen Induktion einiger Zielgene führen kann. Verläuft diese Initialzündung erfolgreich, kommt es nun zur hierarchischen (Re-)Aktivierung der endogenen Faktoren, die das transkriptionelle Kern-Netzwerk der Pluripotenz-Regulation konstituieren und damit zur vollständigen Reprogrammierung der Zelle. Vermutlich hängt dabei die anfänglich stochastische Aktivierung von Pluripotenz-Genen ganz wesentlich von deren epigenetischen Status (DNA-Methylierung, Histonmodifikationen) ab. Deswegen spielen insbesondere während der Initialphase Enzyme eine wichtige Rolle, die helfen, bestehende epigenetische Signaturen zu beseitigen und neue zu etablieren.

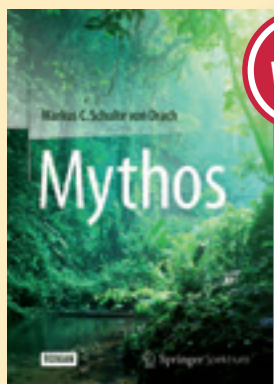
Ohne Umschweife zu einer neuen Identität: Direkte Reprogrammierung

Grundsätzlich ist es vorstellbar, dass jedem Zelltyp sein eigenes transkriptionelles Kern-Netzwerk zugrunde liegt, so auch neuronalen Stammzellen und ihren Nachkommen, d.h. Neuronen, Astroglia und Oligodendroglia. Allerdings sind diese Kern-Netzwerke, sofern sie existieren, bei Weitem nicht so gut verstanden wie in pluripotenten Stammzellen. Nichtsdestotrotz ist es Forschern

Spektrum Sachbücher

Bildungsfutter und Lesespaß in einem!

► Indiana Jones meets Richard Dawkins



NEU

2013, VI, 570 S. Geb.
ISBN 978-3-642-34774-0
► € (D) 29,95 | € (A) 30,79 | *sFr 37,50

Markus C. Schulte von Drach

Mythos

Der neue Roman von SZ-Redakteur Markus C. Schulte von Drach bildet eine abenteuerliche Auseinandersetzung mit der Religion und der Evolution. Hochspannung mit Tiefgang ...

„Eine abenteuerliche Melange aus Dawkins' Gotteswahn, Indiana Jones und Jurassic Park. Schulte von Drach gelingt, was Dan Brown nie schaffte: den Leser zu fesseln, ohne seinen Verstand zu lähmen. Absolut empfehlenswert!“

Michael Schmidt-Salomon, Philosoph und Schriftsteller, Vorstandssprecher der Giordano-Bruno-Stiftung.

„Wie viel Menschenwerk steckt in der Religion? Im Unterschied zum ätzenden Stil neoatheistischer Gotteswahn-Polemik setzt dieses Buch auf eine Strategie à la Umberto Eco: Der Reigen religionskritischer Überlegungen ist eingepackt in eine Rahmenhandlung, deren Spannung – Science-Fiction und Thriller im besten Sinn – den Leser mitnimmt zu den Etappen der intellektuellen Auseinandersetzung.“

Christian Kummer, Biologe, Philosoph und Jesuit, Professor an der Hochschule für Philosophie in München.



NEU

1. Aufl. 2013, 208 S., 15 Abb., geb.
ISBN 978-3-642-33007-0
► € (D) 19,95 | € (A) 20,50 | *sFr 25,00

Mark Vernon

Die großen Fragen – Gott

- Kann man Gott rational beweisen?
- Warum sind Menschen noch gläubig?
- Ist Religion ein Irrweg der Evolution?
- Gibt es Spiritualität ohne Religion?
- Was macht den Fundamentalisten aus?
- Kann man auch ohne Gott gut sein?
- u. v. m.



NEU

1. Aufl. 2013, 208 S., 15 Abb., geb.
ISBN 978-3-642-33005-6
► € (D) 19,95 | € (A) 20,50 | *sFr 25,00

Francisco J. Ayala

Die großen Fragen – Evolution

- Hatte Darwin recht?
- Ist Evolution ein ungerichteter Prozess?
- Wie entstehen aus Genen Körper?
- Was ist molekulare Evolution?
- Was ist das Missing Link?
- Was ist der Stammbaum des Lebens?
- Kann ich mich klonen?
- Woher kommt die Moral?
- u. v. m.

Kommt nach der Genom-Revolution die Konnektom-Revolution?



NEU

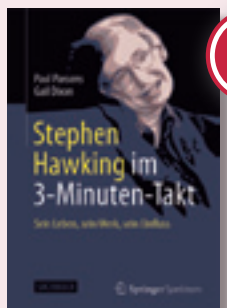
2013, Etwa 305 S. 53 Abb. Geb.
ISBN 978-3-642-34294-3
► € (D) 24,99 | € (A) 25,69 | *sFr 31,50

Sebastian Seung

Das Konnektom – Erklärt der Schaltplan des Gehirns unser Ich?

Stehen wir am Beginn einer wissenschaftlichen Revolution? Wird es den Hirnforschern in absehbarer Zeit gelingen, die Gesamtheit aller Verschaltungen in unserem Denkgorgan zu entschlüsseln? Und werden sie damit das Geheimnis unseres Denkens und Fühlens lüften, unser Ich und unser Bewusstsein erklären können? Sebastian Seung beschreibt in diesem Buch die erstaunlichen technischen Fortschritte, die uns bald helfen werden, unser Gehirn zu kartieren und damit den Schaltplan des Geistes sichtbar zu machen. Er geht auch der Frage nach, ob diese Karten uns eines Tages erlauben könnten, unser Gehirn in einem Computer „hochzuladen“ und damit eine Art von Unsterblichkeit zu erlangen. Willkommen in der Zukunft der Neurowissenschaften!

► Stephen Hawking – kompakte Einführung in sein Leben und Werk



NEU

2013, 160 S. 160 Abb. in Farbe. Geb.
ISBN 978-3-642-33003-2
► € (D) 14,99 | € (A) 15,41 | *sFr 19,00

P. Parsons / G. Dixon

Stephen Hawking im 3-Minuten-Takt

Stephen Hawking im 3-Minuten-Takt bietet eine kompakte Einführung in Leben und Werk dieses beeindruckenden Wissenschaftlers.

- Das Buch gliedert sich in drei Teile: Hawking's Leben, seine Theorien, sein Einfluss. Jeder Teil bietet faszinierenden Lesestoff für eine Stunde.
- So sind Sie nach nur drei Stunden Lektüre quasi schon Experte für Stephen Hawking und wissen Bescheid über sein Leben und die Höhepunkte seiner Karriere.

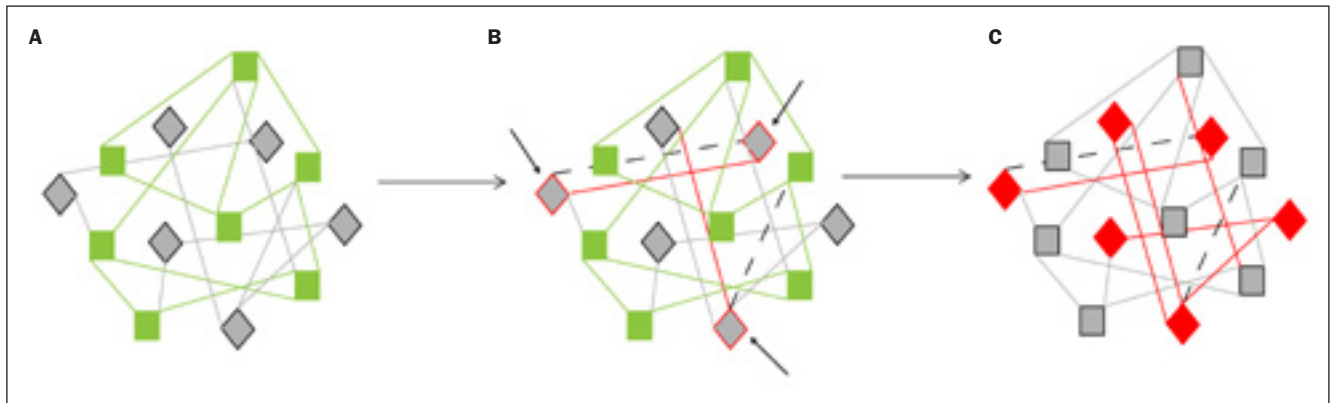


Abb. 1: Prinzip der Reprogrammierung. Dargestellt ist der Wechsel in der Aktivität zweier transkriptioneller regulatorischer Netzwerke infolge exogen zugeführter Transkriptionsfaktoren. **A)** Netzwerk 1 (grün) ist aktiv im Zelltyp 1. **B)** Aktivierung eines schlafenden Netzwerkes (grau) unter dem Einfluss exogener Transkriptionsfaktoren. Durchbrochene Linien zeigen die Unterbindung von Netzwerk-Interaktionen an, farbige Linien die Neuformierung von Netzwerk-Interaktionen. **C)** Netzwerk 2 (rot) ist aktiv im Zelltyp 2.

gelingen, über die forcierte Expression entwicklungsrelevanter Transkriptionsfaktoren, die höchstwahrscheinlich Bestandteil von solchen Kern-Netzwerken sind, somatischen Zellen unterschiedlicher Couleur eine neue, neurale Identität aufzuzwingen. Historisch gesehen erfolgte dies zuerst innerhalb der Abstammungslinie des Neuraletoderms, nämlich von Astrogliazellen zu iNZ (Heins et al. 2002), ist aber mittlerweile sogar über die Keimblatt-Barriere hinweg aus Zellen mesodermalen und endodermalen Ursprungs gelungen. Bei dieser Reprogrammierung durchlaufen die Zellen kein pluripotentes Stadium und das Annehmen der neuen Identität verläuft daher direkt, typischerweise sogar ohne Zellteilung.

Der Werkzeugkasten: Transkriptionsfaktoren und microRNAs

In der Studie, in der es erstmalig gelang, nicht-neuronale Zellen in iNZ zu transdifferenzieren, wurde der Transkriptionsfaktor Pax6 mittels retroviraler Partikel in Astrogliazellen aus dem zerebralen Kortex postnataler Mäuse eingeschleust (Heins et al. 2002). Diesem Experiment lag der Befund zugrunde, dass Pax6-Expression für das neurogene Potenzial der radialen Glia während der Neurogenese verantwortlich zeichnet und dass die nachfolgende Abnahme der Pax6-Expression das Ende der Neurogenese und den Beginn der Gliogenese während der Embryonalentwicklung demarkiert. Tatsächlich konnten Magdalena Götz und ihre Mitarbeiter – damals am Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried – zeigen, dass Astrogliazellen unter dem Einfluss von Pax6 eine neuronale Morphologie und Marker-Expression

annehmen, während die astroglialen Eigenschaften verloren gehen (Heins et al. 2002).

2010 gelang der Arbeitsgruppe um Marius Wernig an der Stanford University das Kunststück, Zellen mesodermalen Ursprungs, nämlich Fibroblasten, durch forcierte Expression dreier Transkriptionsfaktoren in funktionelle iNZ zu reprogrammieren (Vierbuchen et al. 2010). Dabei gingen sie zunächst von einem größeren Pool an Kandidaten-Faktoren aus und eliminierten auf empirischer Basis einen um den anderen Faktor bis sie schließlich den effizientesten Mix (Ascl1, Brn2, Myt1l) an Transkriptionsfaktoren identifizierten. Kurioserweise wiesen viele der so generierten iNZ Eigenschaften glutamaterger Neurone auf.

Diese Studie löste nahezu einen Hype aus: Dem gleichen Prinzip folgend, gelang es mehreren Laboratorien, aus Fibroblasten auch dopaminerge iNZ zu generieren. Dabei orientierte sich logischerweise die Rezeptur des Transkriptionsfaktor-Cocktails daran, welche Transkriptionsfaktoren bei der Bildung dopaminergischer Neurone während der Embryogenese im Mittelhirn eine wichtige Rolle spielen. Eine analoge Variation des Transkriptionsfaktor-Cocktails erlaubte auch die Bildung von spinalen Motoneuronen. Diese konnten sogar in das Rückenmark von Hühnchen-Embryonen transplantiert werden, von wo ihre Axone zur Skelettmuskulatur projizierten und dort synaptische Endplatten ausbildeten (Yang et al. 2011).

Die nächste Herausforderung bestand darin, diesen Ansatz auf Fibroblasten humanen Ursprungs zu übertragen. Auch hier gelang es der Arbeitsgruppe von Marius Wernig als ersten, humane funktionelle iNZ zu gewinnen, wobei das Arsenal an

Transkriptionsfaktoren erweitert werden musste, um ähnlich gute Reprogrammierungsergebnisse wie bei murinen Fibroblasten zu erzielen. Eine andere Strategie wurde im Labor von Gerald Crabtree, ebenfalls an der Stanford University, aufgegriffen. Crabtrees Labor interessiert sich für bestimmte Proteinkomplexe, die das *shuffling* der Nukleosomen steuern und damit die lokale Kompaktheit der Chromatinstruktur beeinflussen. Embryonale Stammzellen, neuronale Vorläuferzellen und postmitotische Neurone unterscheiden sich in der Zusammensetzung wichtiger Komponenten des sogenannten *brhma-associated factor* (BAF) Chromatin-Remodellierungskomplexes und verleihen damit den Komplexen ihre Spezifität bei der Regulation der Genexpression. Interessanterweise wird während der neuronalen Differenzierung die Untereinheit BAF53a des neuronalen Vorläuferzell-spezifischen BAF-Komplexes über die microRNAs miR-9/9* und miR124 reprimiert und durch die für postmitotische Neurone charakteristische Untereinheit BAF53b ersetzt. Crabtree machte sich nun diesen Mechanismus zunutze, um humane Fibroblasten in iNZ zu reprogrammieren (Yoo et al. 2011). Tatsächlich konnte sein Team zeigen, dass Expression dieser microRNAs in humanen Fibroblasten zur Induktion neuronaler Markergene führte. Allerdings war die Ausbeute sehr gering, führte aber in Kombination mit neurogenen Transkriptionsfaktoren (NeuroD2, Ascl1, Myt1l) zu einer erfolgreichen Konversion adulter humaner Hautfibroblasten in elektrophysiologisch funktionelle iNZ. Nicht nur die Zusammensetzung des BAF Chromatin-Remodellierungskomplexes wird über die Expression von miR124

reguliert, sondern darüber hinaus scheint diese microRNA auch in anderen Schaltkreisen, die für neuronale Differenzierung während der Entwicklung entscheidend sind, involviert zu sein. So inhibiert ein RNA-bindendes Protein namens PTB (*poly-pyrimidine-tract-binding*) neuronale Gen-Expression über die Regulation von microRNA-Bindung an ihre Ziel-RNAs. Im Laufe der Embryogenese wird PTB über miR124 reprimiert, was zur Induktion der Neurogenese führt. Unterdrückt man nun die Expression von PTB über *short hairpin*-RNAs, lassen sich Fibroblasten in iNZ mit funktionellen elektrophysiologischen Eigenschaften transdifferenzieren.

Die Feineinstellung der Stellschrauben: *Small molecule* Inhibitoren für eine gesteigerte Reprogrammierungseffizienz

Ungeachtet der bisherigen Erfolge bei der direkten Reprogrammierung von somatischen Zellen in iNZ, bleibt die Frage offen, ob die Donor-Zellsignatur vollständig gelöscht und durch diejenige der iNZ ersetzt wird. Tatsächlich scheint der Differenzierungsgrad der Ausgangszellpopulation eine Rolle zu spielen, da beispielsweise terminal differenzierte postmitotische Hepatozyten zwar in iNZ transdifferenziert werden können, aber eine nachweisbare epigenetische Signatur ihrer ursprünglichen Identität beibehalten. Ähnliches gilt auch für adulte Fibroblasten, wo es deutlich schwieriger ist, eine Umwandlung in funktionelle iNZ zu induzieren. Aus diesem Grund hat das Forscherteam um Oliver Brüstle an der Universität Bonn nach Wegen gesucht, die Effizienz der Reprogrammierung zu steigern und fand, dass der kombinierte Einsatz von GSK-3 β - (CHIR99021) und SMAD-(SB-431542) Inhibitoren zu einer deutlich gesteigerten Reprogrammierungseffizienz und Reinheit der so gewonnenen iNZ-Population führt (Ladewig et al. 2012). Interessanterweise kann durch die Inhibition des *transforming growth factor*- β (TGF- β)/SMAD-Signalweges sowohl die Effizienz der Reprogrammierung von Fibroblasten in iNZ als auch iPSZ gesteigert werden, was auf Parallelen in den beiden Reprogrammierungsprozessen hinweist.

Direkte Reprogrammierung von somatischen Zellen in induzierte neuronale Stammzellen

Ein genereller Nachteil der direkten Reprogrammierung von Fibroblasten in iNZ besteht darin, dass man pro Fibroblast nur

eine iNZ gewinnt. Um dieser Limitation zu entgehen, haben verschiedene Forscherteams versucht, Fibroblasten in induzierte neuronale Stammzellen (iNSZ) zu konvertieren (Lujan und Wernig 2012). Dies hätte den Vorteil, dass sich neuronale Stammzellen im Prinzip beliebig vermehren lassen und nicht nur in Neurone, sondern auch in Gliazellen, die zunehmend in den Fokus der klinischen Forschung geraten, differenzieren können. Interessanterweise haben verschiedene Forscherteams sehr unterschiedliche Strategien verfolgt, um iNSZ zu generieren. Das Wernig-Labor testete eine Batterie von Kandidaten-Transkriptionsfaktoren und fand, dass die Triade bestehend aus Brn2, Sox2 und FoxG1 tatsächlich tripotente neuronale Vorläuferzellen induzieren kann, die sich neben Vorderhirn-ähnlichen Neuronen auch in Astrozyten und Oligodendrozyten

differenzieren können. Letztere waren in der Lage, sich *in vivo* nach Transplantation in ein neonatales Gehirn zu integrieren und führten in *Shiverer*-Mäusen, die einen Myelinisierungsdefekt aufweisen, zu einer verbesserten Myelinbildung.

Einen etwas anderen Ansatz zur Gewinnung von iNZ wählte das Schöler-Labor vom Max-Planck-Institut für molekulare Biomedizin, Münster. Die Grundidee bestand darin, Oct4 des Yamanaka-Cocktails, der zur Reprogrammierung in pluripotente iPSZ führt, durch eine anderen POU-Domäne enthaltenden Transkriptionsfaktor zu ersetzen, nämlich Brn4. Interessanterweise wiesen die so gewonnenen iNSZ eine ähnliche molekulare Signatur auf wie neuronale Stammzellen aus dem Hinterhirn bzw. Rückenmark, was darauf hindeutet, dass unterschiedliche Reprogrammierungsprotokolle zu

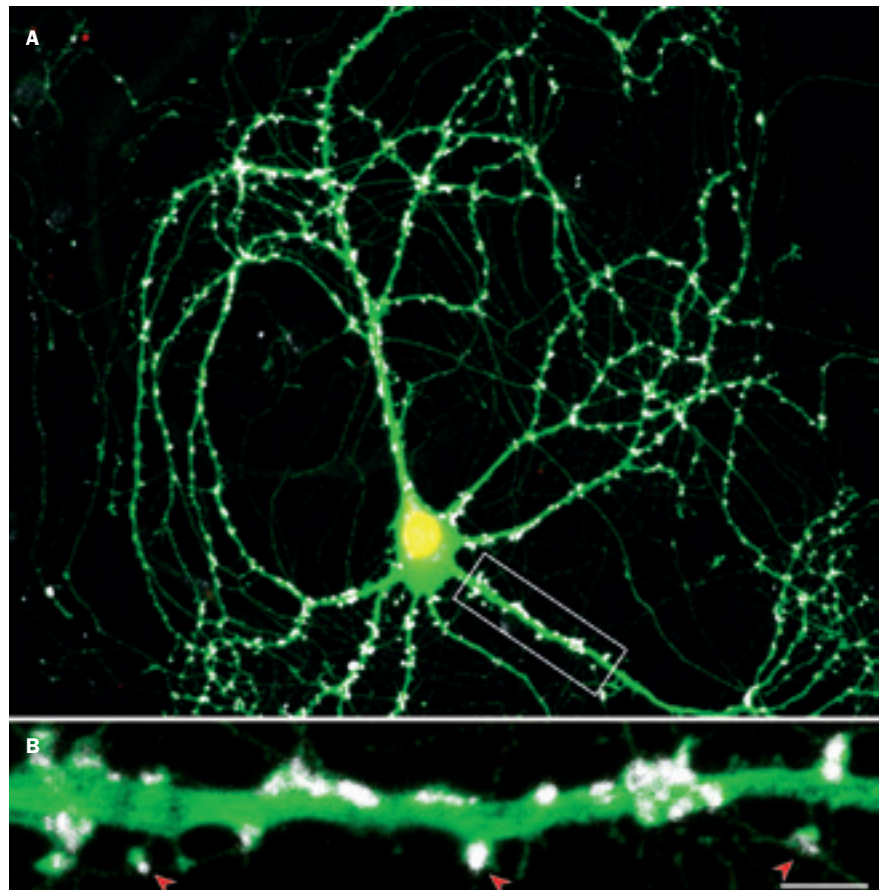


Abb. 2: Glutamaterges Neuron nach direkter Reprogrammierung einer postnatalen Astrogliazelle mittels retroviraler Expression von Neurog2 (pCAG-Neurog2-IRES-DsRed). **A)** Das Immunfluoreszenzbild zeigt Expression der Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Kinase IIa (grün) sowie Cluster von vesikulären Glutamat-Transportern (weiß) auf den dendritischen Fortsätzen der transduzierten Zelle (DsRed). **B)** Vergrößerung des Ausschnitts in (A). Rote Pfeilspitzen markieren präsynaptische Kontaktstellen mit spine-Köpfen. Skalierung 5 μ m. Adaptiert von Heinrich et al. 2010 (*PLoS Biol.* 2010 May 18;8(5):e1000373. doi: 10.1371/journal.pbio.1000373).



einer anderen Regionalisierung der iNSZ führen.

Wieder ein anderer Gedankengang, wie aus Fibroblasten iNSZ zu gewinnen sein könnten, wurde von dem Labor von Frank Edenhofer an der Universität Bonn verfolgt. Hier wurde von der Annahme ausgegangen, dass während der initialen Phase der Reprogrammierung in Richtung Pluripotenz partiell reprogrammierte Zellen ein instabiles Stadium durchlaufen, in dem spontan Zellen mit neuronalen Stammzeleigenschaften gebildet werden könnten. In der Tat konnte gezeigt werden, dass durch Unterbrechung der Reprogrammierung durch zeitlich limitiertes Darreichen von Oct4 (mithilfe von transienter Proteintransduktion), Fibroblasten zur Bildung von iNSZ angeregt werden.

Direkte Reprogrammierung endogen im Gehirn vorkommender Zellen

Aus der Reprogrammierung von Fibroblasten in iNZ oder iNSZ lassen sich wichtige Erkenntnisse gewinnen über die Barrieren, die einer Transdifferenzierung im Wege stehen, bzw. über Lösungsansätze, wie diese überwunden werden können. Denkbar ist auch, dass über direkte Reprogrammierung generierte iNZ oder iNSZ für die Modellierung humaner neurodegenerativer Erkrankungen oder sogar zur Transplantation und damit für die Zelltherapie zur Verfügung stehen. Allerdings wird zu klären sein, ob sich auf diesem Wege tatsächlich klinisch relevante Neuronentypen wie z.B. dopaminerge Neurone der *Substantia nigra* generieren lassen, und ob diese den aus iPSZ differenzierten Neuronen ebenbürtig oder sogar überlegen wären.

Ein besonderer Vorteil der direkten Reprogrammierung besteht allerdings in der Möglichkeit, diese *in situ* im gewünschten

Gewebe zu vollziehen. Das bisher eindrucksvollste Beispiel für eine direkte *in vivo* Reprogrammierung lieferte das Labor von Deepak Srivastava vom Gladstone Institute of Cardiovascular Disease in San Francisco. Über retrovirale Expression der Transkriptionsfaktoren Gata4, Mef2c und Tbx5 konnten Kardiomyozyten in funktionelle Kardiomyozyten direkt im geschädigten Herzwertgewebe konvertiert werden (Qian et al. 2012).

Will man diesen Ansatz auf das Zentralnervensystem übertragen, gilt es, geeignete Ziel-Zellpopulationen zu identifizieren, die sich in Neurone umprogrammieren ließen. Generell umfassen Kandidatenpopulationen die verschiedenen Typen von Makroglia, insbesondere Astrozyten und oligodendrogliale Vorläuferzellen, Mikroglia, und wie unsere eigenen Arbeiten belegen auch Gefäß-assoziierte Perizyten.

Wie oben bereits erwähnt, leistete das Labor von Magdalena Götz Pionierarbeit mit der Beobachtung, dass Astroglia aus dem zerebralen Kortex junger Mäuse mittels forcierter Expression von Pax6 zur Neurogenese angeregt werden können. Astrogliazellen repräsentieren schon deshalb eine interessante Ziel-Zellpopulation, da sie viele Ähnlichkeiten mit neuronalen Stammzellen während der Entwicklung (radiale Glia) und in den adulten neurogenen Zonen (Stammzell-Astroglia) aufweisen und sich nach Verletzung de-differenzieren können. Diese Reaktivierung der Astroglia resultiert je nach Schwere der Gewebsverletzung in dem vorübergehenden Wiedereintritt in den Zellzyklus, was mit einer erhöhten zellulären Plastizität verbunden ist. In der Tat konnte vor Kurzem gezeigt werden, dass reaktivierte Astrogliazellen *in vitro* sogenannte Neurosphären bilden können. Die ist ein Hinweis darauf, dass reaktive

Astroglia Stammzell-ähnliche Eigenschaften annehmen können.

Bei dem Versuch, Astroglia zur Bildung unterschiedlicher neuronaler Subtypen anzuregen, testeten wir Transkriptionsfaktoren, die während der Vorderhirnentwicklung an der Genese glutamaterger und GABAerger Neurone wesentlich beteiligt sind. In der Tat konnten wir zeigen, dass retroviral forcierte Expression von Neurogenin-2 (Neurog2) Astrogliazellen in glutamaterge iNZ konvertiert (Heinrich et al. 2010). Diese Neurone wiesen nicht nur glutamaterge synaptische Transmission auf, sondern auch morphologische Kennzeichen glutamaterger Projektionsneurone wie die Ausbildung synaptischer *spines* (Abbildung 2).

Wurden in dieselben Astrogliazellen die Transkriptionsfaktoren Dlx2 oder Ascl1 eingeschleust, transdifferenzierten diese in iNZ mit Merkmalen GABAerger Neurone (Heinrich et al. 2010). Ein besonders spannender Befund war, dass die reprogrammierten Zellen ähnliche Typen von Aktionspotenzial-Entladungsmustern aufwiesen, wie man sie auch von GABAergen Neuronen kennt, die ihren Ursprung in der medialen ganglionischen Eminenz nehmen und als *fast-spiking* bzw. *low-threshold burst-spiking* Interneurone bezeichnet werden (Abbildung 3). Der nächste Schritt wird nun sein, zu testen, ob eine ähnliche direkte Reprogrammierung astroglialer Zellen in verschiedene neuronale Subtypen auch *in vivo* möglich ist.

Ein der Reaktivierung von Astrozyten sehr ähnliches Phänomen wurde auch für rückenmarksständige Perizyten beschrieben. So konnte das Forscherteam um Christian Göritz und Jonas Frisén am Karolinska Institut in Stockholm zeigen, dass eine Subpopulation von Perizyten, die sogenannten Typ A-Perizyten, nach

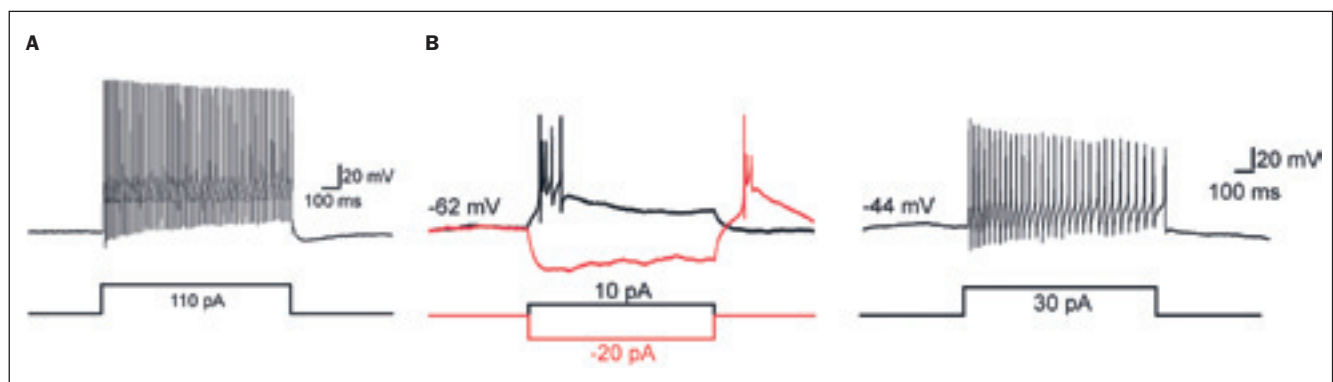


Abb. 3: Interneuronalen Entladungsmustern von Dlx2-reprogrammierten Astrogliazellen. A) Fast-spiking-Typ. B) Low-threshold burst-spiking-Typ. Links: Burst-Entladung nach Strominjektion bei hyperpolarisiertem Membranpotenzial. Rechts: Regular spiking derselben Zelle bei depolarisiertem Membranpotenzial. Adaptiert von Heinrich et al. 2010.



Abb. 4: Schematische Darstellung der direkten Reprogrammierung von Perizyten aus dem humanen adulten zerebralen Kortex in funktionelle iNZ (Karow et al. 2012).

Rückenmarksläsion aktiviert wird und beginnt zu proliferieren. In der Folge lösen die Perizyten ihren Kontakt zu den Endothelzellen auf und wandern in das läionierte Gewebe ein, wo sie in extrazelluläre Matrix bildende stromale Zellen differenzieren und so maßgeblich zur Narbenbildung und Heilung der Verletzung beitragen (Göritz et al. 2011). Ob eine ähnliche Reaktivierung der Perizyten und damit ein regenerativer Beitrag nach Verletzung von Perizyten auch im adulten Gehirn erfolgt, ist bis dato noch nicht beschrieben worden. Allerdings deuten die eben erwähnten sowie weitere Daten darauf hin, dass Perizyten generell auch im adulten Gewebe einen gewissen Grad an Plastizität aufweisen. Einen wichtigen Beitrag lieferte die Arbeitsgruppe von Giulio Cossu am Ospedale San Raffaele in Mailand mit dem Befund, dass Perizyten aus dem humanen adulten Skelettmuskel Eigenschaften von Muskel-Vorläuferzellen annehmen können. Wurden diese Zellen isoliert und in chronisch geschädigte Muskeln von Mäusen transplantiert, konnten sie mit Muskelfasern fusionieren und in einem Mausmodell der Muskeldystrophie *Duchenne* zur Regeneration des Muskels beitragen. Ferner untersuchte das Forschungsteam in einer weiteren Studie auch das Verhalten von endogenen Perizyten im Skelettmuskel adulter Mäuse und zeigte, dass ein bereits intrinsisch bestehendes myogenes Differenzierungspotenzial durch Verletzung noch gesteigert wird.

Unsere eigenen Untersuchungen wiesen darauf hin, dass auch im adulten humanen Gehirn Perizyten residieren, die zur direkten Reprogrammierung in iNZ genutzt werden könnten (Karow et al. 2012). Es gelang uns, Perizyten-derivierte Zellen aus dem zerebralen Kortex erwachsener Patienten zu isolieren, *in vitro* anzureichern und zu charakterisieren. Nach Retrovirus-vermittelter forcierter Expression der Transkriptionsfaktoren Sox2 und Ascl1 transdifferenzierten diese Perizyten-derivierten Zellen in funktionelle iNZ (Abbildung 4).

Allerdings weisen diese Zellen elektrophysiologisch noch sehr unreife Eigenschaften auf, was mit der generell sehr langsamen Reifung humaner Neurone erklärbar ist, aber auch als Hinweis auf eine noch nicht vollständige Reprogrammierung gesehen werden könnte. Interessanterweise ergab die Analyse der so gewonnenen iNZ, dass ein neuronaler Subtyp entsteht, der sich durch GABA-Immunreaktivität sowie Parvalbumin-Expression auszeichnet. Evidenz dafür, dass diese Zellen einen GABAergen Phänotyp annehmen.

Das eigentliche Ziel dieser Versuche endogen im ZNS vorkommende Zellen in Neurone oder neurale Stammzellen zu reprogrammieren, ist es, dies letztendlich *in situ* zu verwirklichen, wie dies von der Arbeitsgruppe von Deepak Srivastava so erfolgreich am Herzen vorgemacht wurde. Eine Vorreiterin von direkter Reprogrammierung *in vivo* ist Paola Arlotta von der Harvard University, USA. Ausgehend von ihrer bahnbrechenden Beobachtung, dass der Transkriptionsfaktor Fezf2 notwendig ist für die Spezifizierung kortikaler Vorläuferzellen in kortikofugale Neurone, unternahm sie zusammen mit ihrer Mitarbeiterin Caroline Rouaux den Versuch, Vorläuferzellen aus dem ventralen Telenzephalon, die sich normalerweise in GABAerge striatale Projektionsneurone differenzieren unter dem Einfluss von Fezf2 in kortikofugale Neurone zu reprogrammieren. Tatsächlich gelang es ihnen zu zeigen, dass *in utero* Elektroporation von Fezf2 in das embryonale Striatum zur Genese glutamaterger Neurone führt, die nicht nur die Morphologie von Pyramidenzellen aus dem Kortex annahmen, sondern sogar subkortikale axonale Projektionen ausbildeten, die bis in das Rückenmark reichten. In einer weiteren Arbeit wollten die beiden Forscherinnen nun wissen, ob eine derartige Reprogrammierung noch gelingen kann, wenn Nervenzellen bereits postmitotisch geworden sind (Rouaux

und Arlotta 2013). In der Tat erwies es sich, dass bereits postmitotische Neurone der Schicht 2/3, die normalerweise kallosale Projektionen ausbilden, in kortikofugale Neurone umprogrammierbar sind. Allerdings war dies nur in der Frühphase ihres postmitotischen Lebens möglich. Diese Beobachtung hat zu dem Konzept eines „time window of nuclear plasticity“ geführt. Vermutlich wird eine Reprogrammierung zu einem späteren Zeitpunkt durch die Festzementierung der neuronalen Identität durch epigenetische Modifikationen verhindert. Arlotta und ihre Kollegen forschen nun daran, wie dieses Zeitfenster verlängert werden kann.

Abschließend lässt sich sagen, dass wir erst am Anfang stehen. Reprogrammierung erlaubt es zum ersten Mal, patienteneigene Nervenzellen genauer unter die Lupe zu nehmen, um Krankheitsmechanismen besser zu verstehen. Dies wird zweifelsohne zu einem erheblichen Erkenntniszuwachs führen und auch erlauben, die Wirkung von Medikamenten systematisch an humanen Nervenzellen zu testen. Darüber hinaus gibt es begründete Hoffnung, dass zelltherapeutische Ansätze durch die Weiterentwicklung indirekter und direkter Reprogrammierungsstrategien neue Impulse erfahren. In einer idealen Welt könnte es vielleicht gelingen, über Reprogrammierung nicht nur einzelne Nerven- oder Gliazellen zu ersetzen, sondern ganze neurale Keimzonen im geschädigten ZNS-Gewebe zu kreieren, die ähnlich wie die physiologisch aktiven Zonen der adulten Neurogenese in der Lage wären, über einen hohen Ausstoß junger Neurone, unserem Gehirn zusätzliche Plastizität zu verleihen oder es sogar zu regenerieren.

Literatur

- Göritz, C., Dias, D.O., Tomilin, N., Barbacid, M., Shupliakov, O. und Frisen, J. (2011): A pericyte origin of spinal cord scar tissue. *Science* 333: 238-242.



- Heinrich, C., Blum, R., Gascon, S., Masserdotti, G., Tripathi, P., Sanchez, R., Tiedt, S., Schroeder, T., Götz, M. und Berninger, B. (2010): Directing astroglia from the cerebral cortex into subtype specific functional neurons. *PLoS biology* 8: e1000373.
- Heins, N., Malatesta, P., Cecconi, F., Nakafuku, M., Tucker, K.L., Hack, M.A., Chapouton, P., Barde, Y.A. und Götz, M. (2002): Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nature neuroscience* 5: 308-315.
- Karow, M., Sanchez, R., Schichor, C., Masserdotti, G., Ortega, F., Heinrich, C., Gascon, S., Khan, M.A., Lie, D.C., Dellavalle, A. et al. (2012): Reprogramming of pericyte-derived cells of the adult human brain into induced neuronal cells. *Cell Stem Cell* 11: 471-476.
- Ladewig, J., Mertens, J., Kesavan, J., Doerr, J., Poppe, D., Glaue, F., Herms, S., Wernet, P., Kogler, G., Müller, F.J. et al. (2012): Small molecules enable highly efficient neuronal conversion of human fibroblasts. *Nat Methods* 9: 575-578.
- Lujan, E. und Wernig, M. (2012): The many roads to Rome: induction of neural precursor cells from fibroblasts. *Current opinion in genetics & development* 22: 517-522.
- Qian, L., Huang, Y., Spencer, C.I., Foley, A., Vedantham, V., Liu, L., Conway, S.J., Fu, J.D. und Srivastava, D. (2012): *In vivo* reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature* 485: 593-598.
- Rouaux, C. und Arlotta, P. (2013): Direct lineage reprogramming of post-mitotic cortical neurons into corticofugal neurons *in vivo*. *Nature cell biology* 15: 214-221.
- Takahashi, K. und Yamanaka, S. (2006): Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676.
- Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z.P., Kokubu, Y., Sudhof, T.C. und Wernig, M. (2010): Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463: 1035-1041.
- Yang, N., Ng, Y.H., Pang, Z.P., Sudhof, T.C. und Wernig, M. (2011): Induced neuronal cells: how to make and define a neuron. *Cell Stem Cell* 9: 517-525.
- Yoo, A.S., Sun, A.X., Li, L., Shcheglovitov, A., Portmann, T., Li, Y., Lee-Messer, C., Dolmetsch, R.E., Tsien, R.W. und Crabtree, G.R. (2011): MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature* 476: 228-231.

Eine vollständige Literaturliste kann bei den Autoren angefordert werden.

Kurzbiografien

Marisa Karow studierte Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München (1998-2003), wo sie 2008 auch promovierte. Anschließend ging sie für einen zweijährigen Forschungsaufenthalt an die Stanford University (CA, USA).

Dort arbeitete sie im Labor von Michele Calos an der Entwicklung von nicht-viralen Strategien der Reprogrammierung in induzierte pluripotente Stammzellen. Seit 2010 ist sie wissenschaftliche Mitarbeiterin am Physiologischen Institut der LMU München, wo sie zusammen mit Benedikt Berninger an der direkten Reprogrammierung von humanen Perizyten in induzierte Nervenzellen forscht. Für ihre Forschungsleistung wird sie demnächst mit dem 2013 Wissenschaftspreis „Medizinische Grundlagenforschung“ der GlaxoSmithKline-Stiftung ausgezeichnet.

Benedikt Berninger studierte Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München (1988-1992). Nach seiner Doktorarbeit im Labor von Hans Thoenen (1993-1996) am Max-Planck-Institut für Psychiatrie und Promotion an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU, schloss sich ein von der Human Frontier Science Program Organisation geförderter vierjähriger Auslandsaufenthalt an der University of California, (San Diego, USA) an, wo er im Labor von Mu-ming Poo an den synaptischen Effekten von Neurotrophinen forschte. Nach einem kurzen Aufenthalt am Karolinska Institut in Stockholm kehrte er 2001 als wissenschaftlicher Mitarbeiter an das Max-Planck-Institut für Neurobiologie zurück, wo er begann, sich mit den funktionellen Eigenschaften adulter neuraler Stammzellen zu beschäftigen. 2003 entschied er sich, in das Labor von Magdalena Götz (Physiologisches Institut der LMU München und Institut für Stammzellforschung am Helmholtz-Zentrum München) zu gehen, um gemeinsam an der Reprogrammierung von Gliazellen in Neurone zu forschen. 2011 habilitierte er sich im Fach Physiologie und erhielt kurz darauf einen Ruf als W2-Professor an die Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz. Dort leitet er seit 2012 im Rahmen des Forschungsschwerpunkts Translationale Neurowissenschaften die Arbeitsgruppe „Adulte Neurogenese und zelluläre Reprogrammierung“.

Korrespondenzadressen

Marisa Karow

*Abteilung Physiologische Genomik
Physiologisches Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München
Schillerstraße 46
80336 München
Tel.: +49 89 218075208
E-Mail: marisa.karow@med.uni-muenchen.de*

Benedikt Berninger

*Institut für Physiologische Chemie und
Forschungsschwerpunkt Translationale
Neurowissenschaften der Universitätsmedizin
Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
Hanns-Dieter-Husch-Weg 19
55128 Mainz
Tel.: +49 6131 3921334
E-Mail: berningb@uni-mainz.de*

© Springer-Verlag GmbH 2013

Neueintritte

Folgende Kolleginnen und Kollegen dürfen wir als Mitglieder der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft begrüßen:

Abdelrahman, Herr Rayan (Magdeburg)
Arabali, Danial (Göttingen)
Barthel, Lennart (Berlin)
Becker, Denise (Frankfurt)
Benecke, Dr. Heike (Göttingen)
Boehme, Marcus (Jena)
Ergül, Nursah Fatma (Mannheim)
Fandel, Daniel (Viersen)
Feldmann, Maria (Berlin)
Förster, Judith (Köln)
Gehrlach, Daniel (Berlin)
Goebels, Univ. Prof. Dr. med. Norbert (Düsseldorf)
Herrmann, Dr. J. Michael (Edinburgh, UK)
Kagan, Dr. Igor (Göttingen)
Kloosterboer, Ellen (Bochum)
Knauer, Beate (Bochum)
Kyereme, Jessica (Bochum)
Lefebvre, Frau Paule (Göttingen)
Lehmann, Ramona (Dortmund)
Moreira, Caio Margarido (Göttingen)
Oertner, Prof. Dr. Thomas (Hamburg)
Paasch, Georg-Friedrich (Frankfurt)
Peter, Alina (Frankfurt/Main)
Quass, Gunnar L. (Magdeburg)
Roser, Anna-Elisa (Göttingen)
Saal, Kim-Ann (Göttingen)
Salvamoser, Josephine D. (München)
Schiemann, Dr. Julia (Edinburgh, UK)
Schleimer, Jan-Hendrik (Berlin)
Schlueter, Annabelle (Mannheim)
Schneider, Jaqueline (Jena)
Sheng, Wei-An (Göttingen)
Shi, Herr Yuan (Berlin)
Sisnaiske, Julia (Dortmund)
Tsai, Dr. Tina (Melbourne, Australien)
Tundo, Federica (Düsseldorf)
Wellmann, Dr. Carmen (Köln)
Windler, Florian (Düsseldorf)
Wolff, Dr. Amy (Hamburg)

Der Mitgliedsstand zum 1. Mai 2013 beträgt 2.163 Mitglieder.