Aus dem Institut für Mikroskopische Anatomie und Neurobiologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Die Rolle von PSA-NCAM bei der Regeneration nach Läsion von hippocampalen Moosfasern

> Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

> > Vorgelegt von

Laura Isabel Hanke aus Marmaris (Türkei)

Mainz, 2021

Tag der Promotion: 07.12.2021

Inhaltsverzeichnis

InhaltsverzeichnisI				
AbkürzungsverzeichnisIII				
Abbildungsverzeichnis V				
Ta	abellenver	zeichnis VI		
1.	Einleitun	g1		
2.	Grundlag	en3		
	2.1 Das N	lervensystem3		
	2.2 Entwi	cklung von Neuronen und Polarisierung		
	2.3 Dendi	-iten4		
	2.4 Axone	95		
	2.5 Der H	ippocampus5		
	2.6 Axona	ales Auswachsen und Bildung von neuronalen Netzwerken .7		
	2.7 Astroz	zyten7		
	2.8 NCAN	1 / PSA-NCAM8		
	2.9 Läsioi	nen im ZNS und gliale Vernarbung9		
	2.10	Chondroitin Sulfat Proteoglykane10		
	2.11	Neu5Ac und Neu5Prop11		
	2.12	Neuro/Gliales Antigen 212		
	2.13	GFP-exprimierende Mauslinien13		
3.	Material u	und Methoden15		
	3.1 Mater	ial15		
	3.1.1	Verbrauchsmaterial15		
	3.1.2	Geräte und Hilfsmittel19		
	3.2 Metho	oden		
	3.2.1	Präparation der organotypischen hippocampalen Schnittkulturen	20	
	3.2.2	Zeitplan der unterschiedlichen Experimente		
	3.2.3	Moosfaserläsion und Behandlung mit ManNProp21		
	3.2.4	2-Photonen Mikroskopie21		
	3.2.5	Histologische Aufarbeitung24		
	3.2.6	Fluoreszenzfärbungen24		
	3.2.7	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie25		
	3.2.8	Bildauswertung25		
	3.2.9	Statistische Auswertung		
	3.2.10	Antegrades Biocytin Tracing27		
	3.2.11	In-Utero Elektroporation28		

3.2.12 Präparation genomisch 28	er DNA aus Biopsien von Mäuseschwänzen
3.2.13 Genotypisierung mittels	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)29
4. Ergebnisse	
4.1 Live Imaging von organotypise GFP exprimierenden transger	chen hippocampalen Schnittkulturen ausThy-1 nen Mäusen
4.2 Live Imaging von organotypise Utero elektroporierten Mäuser	chen hippocampalen Schnittkulturen aus In- n33
4.3 Die Rolle von PSA-NCAM bei 36	der Regeneration von Moosfasern nach Läsion
4.4 ManNProp als Einflussfaktor a	auf Plastizität nach Moosfaserläsion45
4.5 Einfluss von ManNProp auf di	e Aktivierung von NG2-positiven Zellen nach
Moosfaserläsion	
4.6 Einfluss von ManNProp auf da 54	as Auswachsen von Moosfasern nach Läsion
5. Diskussion	55
6. Zusammenfassung	63
7. Literaturverzeichnis	64
Danksagung	V
Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

®	Registered Trademark (eingetragenes Warenzeichen)
μm	Mikrometer
AL	Alexa
BME	Basal Medium Eagle
CA	Cornus ammonis
CS-GAG	Chondroitin Sulfat Glykosaminoglycan
CSPG	Chondroitin Sulfat Proteoglykan
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DG	Gyrus dentatus
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EC	entorhinaler Kortex
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GFP	green fluorescent protein
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IE	internationale Einheit
LAR	Leukozyten Antigen related
LIF	Leukämie-inhibierender Faktor
ManNProp	N-Propionyl-D-Mannosamine
MEM	Minimal Essential Medium
MERM	Modified Edi's Recording Medium
ml	Milliliter
mmol	Millimol
NCAM	neural cell adhesion molecule
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
Neu5Prop	N-Propionylneuraminsäure
NG2	Neuro-Gliales Antigen 2
NGS	Normales Ziegenserum
NHS	Normales Pferdeserum
PB	Phosphatpuffer
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd

PNS	Peripheres Nervensystem
PSA	Polysialinsäure
PSA-NCAM	polysialililiertes neural cell adhesion molecule
PSD	Postsynaptische Dichte
PTPRs / PTPσ	Protein Tyrosin Phosphatase Sigma
rb	rabbit (Hase)
ROI	region of interest
Sia	Sialinsäure
ТМ	trademark (Warenzeichen)
u	unit (Einheit)
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	6
Abbildung 2 Thy 1-17 und Thy 1-21 Schnittkulturen im Vergleich	13
Abbildung 3	23
Abbildung 42 Auswertung der Fluoreszenzfärbung	6
Abbildung 5 Ergebnisse der 2-Photonen Mikroskopie I	31
Abbildung 6 Ergebnisse der 2-Photonen Mikroskopie II	32
Abbildung 7 Ergebnisse der In-Utero Elektroporation	34 - 35
Abbildung 8 Ergebnisse der CSPG / GFAP Färbung	39 - 40
Abbildung 9 Ergebnisse der Fluoreszenzdichtemessung	42
Abbildung 10 Ergebnisse der CSPG / GFAP Färbung an NCAM k.o. Tie	43 - 44 eren
Abbildung 11 4 Ergebnisse der PSA-NCAM / GFAP Färbung	16 - 47
Abbildung 12 5 Ergebnisse der NG2 / CSPG Färbung	50 - 52
Abbildung 13	54 ing gestellt von

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 17		
Primäre Antikörper		
Tabelle 2	18	
Sekundäre Antikörper		
Tabelle 3 29		
Verwendet PCR-Primer für NCAM k.o.		
Tabelle 4		
Verwendeter PCR Ansatz		
Tabelle 5	29	
Verwendetes PCR Programm		

1. Einleitung

Läsionen im zentralen Nervensystem stellen für Betroffene und Behandelnde eine große Herausforderung mit langwierigen Verläufen und oft lebenslänglichen Folgen dar. Hierbei sind unterschiedliche Ursachen der Läsion denkbar. So kann es sich unter anderem um traumatische Läsionen handeln, um Durchblutungsstörungen im Sinne eines ischämischen Infarkts oder einer Blutung oder um Tumorfolgen. So beschreibt das Deutsche Ärzteblatt eine rohe Inzidenz von mittelschweren bis schweren Schädel-Hirn-Traumata von 10,1/100.000 Einwohner / Jahr (Maegele Marc 2019). Je nach Genese ist das Ausmaß der Läsion und entsprechend das Ausmaß der Symptomatik und der hiermit verbundenen Folgen unterschiedlich.

Bei einer Läsion im ZNS finden unterschiedliche Prozesse als physiologische Antwort statt (Fawcett and Asher 1999) . Der Zerfall der verletzten Zellen setzt ein Übermaß an Neurotransmittern frei, die angrenzende Zellen aktivieren oder inhibieren können. Hierbei kann es durch überschießende Erregung zu Schäden an den Zellen kommen, auch bekannt als Exzitotoxizität (Olney 1971). Neben Neurotransmittern, vorrangig Glutamat, werden auch andere zellschädigende Substanzen, wie zum Beispiel ATP, durch Zellzerfall freigesetzt (Belov Kirdajova, Kriska et al. 2020). Gegenstand multipler Studien ist der Schutz der nicht direkt lädierten Zellen vor diesen schädigenden Einflüssen. Die folgende Arbeit soll sich mit den Reaktionen der von der Läsion betroffenen und der umliegenden Zellen sowie den Vernarbungsprozessen am Ort der Läsion beschäftigen.

Die von Läsionen betroffenen Zellen zeigen Veränderungen im Bereich der Läsion, wie eine Retraktion der lädierten Neurite, aber auch nicht direkt betroffene Neurite derselben Zellen sind unterschiedlichen Veränderungen unterworfen. So verändern sich unter anderem die Anzahl und Stabilität von dendritischen Spines sowie die Ausbildung von Synpasen nach Läsion (Deller and Frotscher 1997).

Wie auch im restlichen Körper migrieren Zellen mit unterschiedlichen Funktionen, in die Läsion, zum einen um abgestorbenes Material zu entfernen zum anderen um Ersatzgewebe, im Sinne einer Narbe, zu bilden. Im ZNS übernehmen die Gliazellen diese Aufgabe und bilden am Ort des Geschehens eine Glianarbe, analog zum Vernarbungsprozess durch Fibroblasten (Bechmann and Nitsch 2000). Eine zentrale Rolle in der Glianarbe übernehmen Proteine der extrazellulären Matrix unter anderem Chondroitin Sulfat Proteoglykan (CSPG). Vorangegangene Studien haben einen

inhibitorischen Effekt von CSPG auf das Auswachsen von Neuriten nachgewiesen (Levine 1994, Silver and Silver 2014). Somit verhindert die Ausbildung der Glianarbe eine erneute Vernetzung im ZNS und kann hierdurch zu einem Funktionsverlust einzelner Systeme führen. Die Neurone des ZNS sind, wie bereits durch David und Aguayo beschrieben, also in der Lage neue Fortsätze zu bilden, jedoch ist das umliegende Gewebe nicht befähigt dieses Auswachsen zu unterstützen (David and Aguayo 1981). Gegenstand der hier beschriebenen Versuche sind die Darstellung von Veränderungen der Neurite nach Läsion sowie eine Modulation der Glianarbe und somit das Ermöglichen von neuem Auswachsen von Neuriten sowie Veränderungen von dendritischen Spines und Spinestabilität nach Läsion.

2. Grundlagen

2.1 Das Nervensystem

Das Nervensystem umfasst die Nervenzellen, oder Neurone, eines Organismus sowie deren Stützzellen, oder Glia, in ihrem gemeinsamen Zusammenhang. Das Nervensystem kann unterteilt werden in das zentrale Nervensystem (ZNS), bestehend aus Gehirn und Rückenmark, und das periphere Nervensystem (PNS) zu dem die Spinalnerven, die Hirnnerven sowie das intramurale Nervensystem gehören. Die Aufgabe des Nervensystems besteht in höheren Tieren darin, Reize in der Umgebung des Organismus über afferente Fasern aufzunehmen und eine Reaktion darauf zu veranlassen, die über efferente Fasern an das Erfolgsorgan weitergeleitet wird.

Ein Neuron ist eine Zelle, die auf Reizaufnahme, Erregungsweiterleitung und Reizverarbeitung spezialisiert ist. Es besteht aus einem Zellkörper (Perikaryon oder Soma) und mehreren Fortsätzen, die unterschiedliche Funktionen erfüllen. Die Dendriten sind kürzere, stark verästelte Fortsätze, die der Reizaufnahme dienen. Axone sind längere Fortsätze, die die Erregungsweiterleitung ermöglichen. Der Kontakt zwischen den Fortsätzen wird durch Synapsen etabliert.

Der Überbegriff Gliazellen umfasst verschiedene Zellen, die sich strukturell und funktionell von den Neuronen unterscheiden. Ihre Aufgabe besteht darin, die Neurone zu stützen, mit Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen, voneinander zu isolieren und Pathogene und abgestorbene Zellen abzutransportieren. Zu den Gliazellen des ZNS gehören unter anderem die Astrozyten, die Oligodendrozyten, die Radialglia und die Mikroglia. Bis auf die Mikroglia entspringen sie, wie die Neurone, dem ektodermalen Keimblatt, die Mikroglia hingegen entstammen dem Mesoderm (Kugler and Drenckhahn 2008).

2.2 Entwicklung von Neuronen und Polarisierung

In Zellkultur entwickeln Neurone sich in den folgenden fünf Stadien, wie Dotti et al. bereits 1988 gezeigt haben (Dotti, Sullivan et al. 1988).

Stadium 1: Ein bis zwei Stunden nach Anheftung der Zellen an ein geeignetes Substrat werden um den Zellkörper kleine, flache Lamellipodien gebildet. Diese verändern minütlich ihre Form und weisen vor allem Aktinfilamente auf. Sie besitzen nur wenige, unorientierte Mikrotubuli. Stadium 2: Aus einigen Lamellipodien werden kurze Fortsätze, in denen Mikrotubuli parallel zur Längsachse angeordnet sind. Diese Neurite sind über mehrere Tage stabil, sind hierbei jedoch ständigem Auswachsen und Retraktion unterworfen. Am Ende jedes Neuriten befindet sich ein Wachstumskegel. Die Zellen sind in diesem Stadium noch nicht polarisiert. Die Polarität von Neuronen beschreibt die Differenzierung von Axon und Dendriten und die hierdurch ermöglichte gerichtete Signalübertragung (Bartlett and Banker 1984).

Stadium 3: Einer der Neurite wird zum Axon, das einige Stunden nach Erscheinen der kurzen Neurite beginnt, mit erhöhter Geschwindigkeit auszuwachsen. Die Zelle ist nun polarisiert. Auf der Länge des Axons bilden sich mehrere Verästelungen, das Ende des Axons besitzt ebenfalls einen Wachstumskegel.

Stadium 4: Zwei bis drei Tage nach Ausbildung des Axons beginnen die restlichen Fortsätze zu wachsen und sich zu Dendriten zu differenzieren. Die Wachstumsgeschwindigkeit der Dendriten beträgt hierbei nur etwa 1/5 der Wachstumsgeschwindigkeit des Axons.

Stadium 5: Die Dendriten und das Axon reifen nun weiter aus und bilden weite Verzweigungen. An den Axonen bilden sich Endknöpfchen, auf den Dendriten bilden sich Dornen (englisch: Spines), zwischen denen Synapsen gebildet werden.

2.3 Dendriten

Das Auswachsen der Dendriten ist ein anhaltendes Zusammenspiel von Wachstum und Retraktion. Jeder neue Dendrit wächst aus einem Dendritenschaft seitlich als Filopodium aus (Dailey and Smith 1996, Scott and Luo 2001). Die meisten dieser Filopodien retrahieren, doch einige bilden stabile Strukturen, die zu einer weiteren Verzweigung führen (Dailey and Smith 1996). Die Struktur des Dendritenbaums bestimmt die Signaleingänge, sowohl in ihrer Art, als auch ihrem räumlichen Ausmaß (Cline 2001, Wong and Ghosh 2002). Die dendritischen Spines enthalten in den meisten exzitatorischen Synapsen die postsynaptische Dichte (PSD) (Scannevin and Huganir 2000, Hering and Sheng 2001). Dendritische Spines unterliegen einem ständigen strukturellen Wandel und kommen in unterschiedlichen Formen vor, wobei die Größe der Spines mit der Größe der Synapse korreliert (Harris 1999, Li and Sheng 2003). Dendriten sind nicht myelinisiert und enthalten Mikrotubuli als Zytoskelett (Bartlett and Banker 1984).

2.4 Axone

Ein Axon kann je nach Unterart der Nervenzelle wenige Mikrometer bis über einen Meter lang sein. Der Typ der Nervenzelle definiert des Weiteren den Grad der Isolation des Axons mit Myelin. Im ZNS wird die Myelinscheide durch Oligodendrozyten gebildet, im PNS durch Schwann Zellen, die sich um das Axon wickeln. Zwischen den einzelnen Gliazellen entstehen die Ranvier Schnürringe, zwischen denen die weiterzuleitenden Impulse springen (saltatorische Erregungsleitung) (Kugler and Drenckhahn 2008).

Während des Auswachsens des Axons befindet sich am Ende des Fortsatzes ein Wachstumskegel, der das Wachstum und dessen Richtung steuert (Mitchison and Kirschner 1988). Die Peripherie des Wachstumskegels ist reich an Aktinfilamenten und ständiger Veränderung unterworfen. Aktin-Monomere polymerisieren und verlängern somit die Filopodien des Wachstumskegels oder depolymerisieren und retrahieren die genannten Filopodien (Forscher and Smith 1988, Tanaka and Sabry 1995, Mitchison and Cramer 1996, Geraldo and Gordon-Weeks 2009).

2.5 Der Hippocampus

Der Hippocampus besteht aus dem Gyrus dentatus (engl. dentate gyrus, DG) und dem Ammonshornorn (Cornu ammonis, CA, auch Hippocampus proper) unterteilt in die Regionen CA 1 bis CA 3. Er weist einen allokortikalen, dreischichtigen Aufbau auf und gehört zusammen mit dem Subiculum zum Archikortex. Der angrenzende entorhinale Kortex (EC, Area entorhinalis) sowie das Pre- und Parasubiculum gehören zum Periarchikortex. Unter dem Begriff Hippocampusformation werden Hippocampus, Subiculum und entorhinaler Kortex zusammengefasst. Wie der Hippocampus und das Subiculum weist der entorhinale Kortex einen allokortikalen Aufbau auf, jedoch mit mindestens sechs bis sieben Schichten. Diese sind nicht vergleichbar mit den Schichten des Isokortex.

Die Hippocampus-Formation weist eine geschlossene neuronale Verschaltungskette auf, die lamellär, senkrecht zur Longitudinalachse angeordnet ist. So ist der entorhinale Kortex durch den Tractus perforans mit dem Gyrus dentatus verbunden, dessen Moosfasern auf die Körnerzellen von CA 3 projizieren. Von dort wird die

5

Verbindung zu CA 1 durch die Schaffer Kollateralen hergestellt. Von CA 1 und CA 3 entspringen Afferenzen zum Subiculum und von dort wieder zum entorhinalen Kortex. Die genannte intrinsische Verschaltungskette der Hippocampus-Formation ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt (Zeichnung nach (Nitsch 2004) und (Skutella and Nitsch 2001)). Dieser Umstand wird bereits seit Jahren genutzt, um ex vivo einen lebenden Neuronenverband mit Afferenz und Efferenz untersuchen zu können. Die Hippocampus-Formation empfängt zahlreiche weitere Afferenzen und entsendet weitere Efferenzen, auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll (Nitsch 2004).



Abbildung 1 der Hippocampus: intrinsische Verschaltungskette der Hippocampus-Formation.

In Blau: Körnerzellen des DG, die im Moosfasertrakt (MF) auf die Pyramidenzellen des CA 3 projizieren

In Gelb: Pyramidenzellen des CA 3, die in der Schaffer-Kollaterale (Sch) auf die Pyramidenzellen von CA 1 projizieren

In Grün: Pyramidenzellen des CA 1, die unter anderem auf die Sternzellen des EC projizieren.

In Violett: Sternzellen des EC, die im Tractus perforans (PP) auf die Körnerzellen des DG projizieren.

2.6 Axonales Auswachsen und Bildung von neuronalen Netzwerken

In der Entstehung von neuronalen Netzwerken ist das zielgerichtete Auswachsen von Axonen und somit die Verbindung zweier Nervenzellen in definierten Regionen kritisch (Skutella and Nitsch 2001). Hierbei spielen Leitmoleküle eine entscheidende Rolle, die das Axon auf seinem Weg zu einer Zielregion führen, jedoch von anderen Regionen abstoßen. Sowohl membrangebundene als auch diffusibele Moleküle sowie auch Moleküle der extrazellulären Matrix sind in diesen Prozess involviert (Nakamura, Kalb et al. 2000).

Einen entscheidenden Mechanismus stellt hierbei die Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration dar, die durch eine Aktivierung unterschiedlicher Rezeptoren zustande kommen kann (Gomez and Spitzer 2000). Es wurde gezeigt, dass die Wachstumsgeschwindigkeit von Axonen in Abhängigkeit der intrazellulären Calciumkonzentration verlangsamt oder beschleunigt wird (Kater and Mills 1991). Weitere intrazelluläre Mechanismen mit Einfluss auf das axonale Auswachsen stellen die Rho-GTPasen, als Regulatoren des Aktinzytoskeletts, und der Phosphoinositol-3 Kinase/Akt-Signalweg, dar (Hall 1994, Tapon and Hall 1997, Atwal, Massie et al. 2000, Kuruvilla, Ye et al. 2000, Markus, Zhong et al. 2002, Sanna, Cammalleri et al. 2002). Die Aktivierung dieser Mechanismen kann zum einen durch Lysophosphatsäure erfolgen, zum anderen aber auch durch Leitmoleküle beeinflusst werden. Zu den bekannteren Leitmolekülen des axonalen Wachstums und der Etablierung von neuronalen Netzwerken gehören Netrine, das Slit-Robo System, Semaphorine und die Ephrin Familie.

2.7 Astrozyten

Astrozyten bilden einen Teil der Glia des zentralen Nervensystems und sind die häufigste Zellart im ZNS (Molofsky and Deneen 2015). Sie erhielten ihren Namen durch ihre sternartig verzweigten Fortsätze. Astrozyten entstehen aus Stammzellen der Ventrikulär- und Subventrikulärzone. Im Gegensatz zu aus der Subventrikulärzone auswandernden Proneurone sind die aus der Subventrikulärzone auswandernden Glioblasten mitoseaktiv. Auch im adulten ZNS können ausdifferenzierte Astrozyten sich unter bestimmten Bedingungen teilen, beispielsweise nach Verletzungen des ZNS (Kugler 2004). Die Aufgaben von Astrozyten sind vielfältig. So sind sie unter anderem beteiligt an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke und regulieren die Zusammensetzung

des Extrazellularraums, indem sie Neurotransmitter und Ionen aufnehmen (Molofsky and Deneen 2015). Sie versorgen Neurone mit Nährstoffen und sind sowohl der Glykogenspeicherung als auch der Glukoneogenese befähigt. Es wurde gezeigt, dass Astrozyten die Myelinisierung von Axonen mittels Oligodendrozyten durch das Zytokin Leukämie-inhibierender Faktor (LIF) regulieren (Ishibashi, Dakin et al. 2006). Sie unterscheiden sich in ihrem Aussehen je nach ihrer Lokalisation und entsprechend ihrer Aufgabe. So differenzieren sich Astrozyten in der weißen Substanz zu Faserastrozyten, auch Langstrahler genannt. Sie entwickeln lange Fortsätze, die wenig verzweigt sind. Astrozyten, die in der grauen Substanz angesiedelt sind, werden protoplasmatische Astrozyten oder Kurzstrahler genannt. Sie weisen kurze, stark verzweigte Fortsätze auf.

2.8 NCAM / PSA-NCAM

Das neural cell adhesion molecule (NCAM) gehört zur Immunglobulin Familie (Maness and Schachner 2007). Es besitzt fünf aufeinander folgende, extrazellulär gelegene, immunglobulinartige Module mit zwei darauffolgenden Fibronectin Typ 3 Untereinheiten. NCAM kann sowohl homophile als auch heterophile Bindungen eingehen und nimmt somit Einfluss auf unterschiedliche Signalwege, sowie die Zell-Zell-Adhäsion (Hinsby, Berezin et al. 2004).

Im Rahmen der posttranslationalen Modifikation erfolgt die Glykosylierung von NCAM mit Polysialinsäure (PSA) durch Polysialyltransferasen (Rutishauser and Landmesser 1996), vorrangig ST8SialI und ST8SiaIV (Tsuji, Datta et al. 1996). Unterschiedliche Studien haben gezeigt, dass das nicht glykosylierte NCAM homophile Bindungen bevorzugt und somit für Stabilität sorgt; PSA dagegen verhindert die homophilen Bindungen und gewährleistet somit Plastizität (Hinsby, Berezin et al. 2004). PSA-NCAM wird vorrangig im embryonalen Gehirn gefunden (Chuong and Edelman 1984), im adulten Gehirn kommt es vor allem in Bereichen erhöhter Plastizität vor, wie im Hippocampus und dem Bulbus olfactorius, sowie mehreren Regionen, die direkt oder indirekt der Verarbeitung von sensorischen Reizen dienen (unter anderem Hypothalamus, mehrere Kerne der Medulla oblongata, Hinterhorn des Rückenmarks) (Seki and Arai 1993). Des Weiteren wird PSA-NCAM nach Verletzungen und während der Regeneration exprimiert (Hildebrandt, Muhlenhoff et al. 2007). In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass die Konzentration von PSA-NCAM zu

8

unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten relevant für das korrekte Auswachsen von Neuriten und die Entwicklung der korrekten Verschaltungskette im Hippocampus ist (Vogt, Glumm et al. 2012).

2.9 Läsionen im ZNS und gliale Vernarbung

Läsionen im zentralen Nervensystem entwickeln in ihrem Heilungsprozess eine Narbe. Wie auch im restlichen Körper zeichnet diese Narbe sich durch eine veränderte extrazelluläre Matrix und ein Einwandern von unterschiedlichen Zellen aus (Fawcett and Asher 1999, Deller, Del Turco et al. 2007). Je nach Ort der Läsion kann dies Astrozyten, Mikroglia, Makrophagen, Fibroblasten, Schwann Zellen, leptomeningeale Zellen und Oligodendrozyten Progenitorzellen in unterschiedlichem Ausmaß betreffen (Dawson, Levine et al. 2000, Bu, Akhtar et al. 2001). Auch das Ausmaß der Läsion spielt hierbei eine Rolle, so kann diese Reaktion von einer milden Astrogliose bis zu einer festen Glianarbe reichen (Sofroniew 2009). Die aktivierten Astrozyten werden als hypertroph beschrieben, zeigen kurze, kondensierte Fortsätze und bilden einen Wall in der Läsion, der das umgebende Gewebe schützen soll (Panickar and Norenberg 2005, Tran, Warren et al. 2018). Des Weiteren wurde gezeigt, dass unterschiedliche Astrozytenpopulationen unterschiedlich auf Läsionen reagieren und nicht nur morphologische, sondern auch funktionelle Veränderungen auftreten (Sofroniew 2009). Die Glianarbe wurde in der Vergangenheit häufig als feste Barriere beschrieben, die das Auswachsen von Neuriten verhindert. So bilden abgetrennte Axone einen dystrophen Endkegel in der Glianarbe, der anfänglich als steril und dem Auswachsen nicht mehr befähigt angesehen wurde. Im Verlauf ergaben sich Hinweise, dass unter den richtigen Bedingungen ein erneutes Auswachsen dieser Axone durchaus möglich sein kann (David and Aguayo 1981). Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Glianarbe kein statisches Konstrukt ist, sondern Abstufungen in ihrer Ausprägung und der Aktivierung der Astrozyten unterliegt, sodass die Vermutung, dass der Einfluss auf unterschiedliche Neurite je nach Graduierung der Glianarbe variiert, naheliegt (Sofroniew 2009).

Eine rein negative Wahrnehmung der Glianarbe wird dieser jedoch nicht gerecht. Es wurde gezeigt, dass die reaktive Astrogliose durch unterschiedliche Mechanismen, wie die Aufnahme von Flüssigkeit, Ionen und Neurotransmittern sowie die Wiederherstellung der Bluthirnschranke und das Verhindern einer überschießenden

9

Immunantwort, das umliegende Gewebe vor einer Kaskade an sich fortsetzenden Schäden durch die initiale Läsion schützt (Silver and Miller 2004, Sofroniew 2009).

Auch in der extrazellulären Matrix treten durch Verletzungen Veränderungen ein. Eine der wichtigen Proteinfamilien der extrazellulären Matrix, die an der Entstehung von Vernarbung im ZNS mitwirken, sind die Chondroitin Sulfat Proteoglykane (Levine 1994, Fitch and Silver 1997, Haas, Rauch et al. 1999, Lemons, Howland et al. 1999, McKeon, Jurynec et al. 1999). Sie sollen im nächsten Kapitel näher vorgestellt werden.

2.10 Chondroitin Sulfat Proteoglykane

Die Chondroitin Sulfat Proteoglykane (CSPG) bilden eine große Familie an Proteinen der extrazellulären Matrix, die im ganzen Körper zu finden sind. Alle Mitglieder der CSPG Familie teilen einen ähnlichen Aufbau: sie bestehen zum einen aus einem Proteinkern und zum anderen aus unterschiedlich glykosylierten Chondroitin Seitenketten. Sowohl der Proteinkern, als auch die Seitenketten unterscheiden sich zwischen den Familienmitgliedern, die unter anderem Versican, Brevican, Neurocan, Phosphacan und das Neuro-Gliale Antigen 2 (NG2) beinhalten (Jones, Yamaguchi et al. 2002).

Die CSPG des zentralen Nervensystems werden auch Lecticane genannt. Die Lecticane bestehen alle aus einem Proteinkern in einer Größe von 97 bis zu >262kD. An Anfang und Ende finden sich globuläre Domänen (N-terminal, G1 und C-terminal, G3). An der zentralen Domäne ist mindestens eine langkettige Chondroitin Sulfat Glykosaminoglycan Polysaccharid Seitenkette (CS-GAG) verankert (Silver and Silver 2014).

Die CSPG Expression ist vor allem im embryonalen ZNS hoch. Im adulten ZNS ist eine erneute Hochregulation von CSPGs nach Verletzungen des ZNS vielfach beschrieben worden (Fitch and Silver 1997, Lemons, Howland et al. 1999, Stichel, Niermann et al. 1999, Plant, Bates et al. 2001). Zunächst wurde ihnen vor allem eine inhibitorische Funktion zugeschrieben, basierend zum einen auf der Präsentation negativer Ladungen, zum anderen durch Substratokklusion (McKeon, Jurynec et al. 1999). Im Verlauf wurden mehrere Rezeptoren von sowohl freien. als auch membrangebundenen CSPGs und somit Signaltransduktionswege identifiziert. Der erste Rezeptor, der hier identifiziert wurde, ist Protein Tyrosin Phosphatase Sigma (PTPRs oder PTPσ). Der Ligand für PTPRs ist die CS-GAG Seitenkette des CSPG, bei Aktivierung überträgt er ein wachstumshemmendes Signal (Shen, Tenney et al. 2009). Im Verlauf wurden weitere Rezeptoren mit ähnlicher Funktion und großer Homologie zu PTPRs identifiziert, unter anderem die Leukozyten Antigen related (LAR) Familie, sowie die Nogo Rezeptoren NgR1, NgR2 und NgR3 (Dickendesher, Baldwin et al. 2012, Baumer, Kurz et al. 2014). Zwischen Liganden und Rezeptor entsteht im Fall von PTPRs und CS-GAG eine enge Verbindung, die einer Synapse ähnelt und viele Jahre bestehen kann. Der Wachstumskegel wird durch diesen Mechanismus festgehalten und hierdurch dystroph (Lang, Cregg et al. 2015). In PTPRs knock out Mäusen wurde nach ZNS Läsionen ein vermehrtes axonales Auswachsen beobachtet (Silver and Silver 2014).

Insgesamt lassen sich hier zwei CSPG-beeinflusste Wachstumsmuster voneinander unterscheiden. Zum einen finden sich zum Beispiel in der Retina, die eine CSPG-arme Umgebung darstellt, ein Abwenden der Wachstumskegel von CSPG-reicher Umgebung (Brittis, Canning et al. 1992). Dagegen wachsen die Neurone der subventrikulären Zone, einer CSPG-reichen Umgebung, entlang von CSPGs aus. Dies wird auch addiktives Wachstum genannt. Es wird vermutet, dass die Zuwendung oder Abwendung von CSPG vom Rezeptorprofil der Neurone abhängt. Dieses Rezeptorprofil wird durch die Moleküle beeinflusst, mit denen die Neurone in ihrem jeweiligen Substrat in Kontakt kommen, entsprechend wird eine größere Anzahl an Rezeptoren der LAR-Familie auf Zellen aus CSPG-reichem Substrat erwartet (Silver and Silver 2014).

2.11 Neu5Ac und Neu5Prop

N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), auch Sialinsäure (Sia) genannt, ist eine Zuckerkette, die terminal an einer großen Anzahl von Glykoproteinen und Glykolipiden exprimiert wird und eng in intermolekulare sowie interzelluläre Interaktionen eingebunden ist (Witzel, Reutter et al. 2015). Wie bereits unter 2.7 erwähnt, beeinflusst die Polysialylierung von NCAM unter anderem durch die Begünstigung von heterophilen Bindungen sowohl Zell-Zell-Adhäsion als auch Zell-Matrix-Adhäsion (Hinsby, Berezin et al. 2004, Hildebrandt and Dityatev 2015). NCAM ist hierbei eines der wichtigsten Proteine, die durch die Polysialylierung modifiziert werden (Hildebrandt and Dityatev 2015).

11

Die Silalylierung wird durch zwei Polysialyltransferasen vorgenommen, die bereits 1995 beschrieben wurden (Eckhardt, Muhlenhoff et al. 1995, Kojima, Yoshida et al. 1995, Nakayama, Fukuda et al. 1995, Scheidegger, Sternberg et al. 1995). Die Enzyme wurden entsprechend der Nomenklatur der Silalyltransferasen ST8SialI und ST8SiaIV genannt (Tsuji, Datta et al. 1996). In ST8SiaIV Knock-Out Mäusen wird die Funktion der ST8SiaIV weitestgehend durch ST8SiaII übernommen (Eckhardt, Bukalo et al. 2000). Im Gegensatz dazu kann die Funktion der ST8SiaII nicht vollständig übernommen werden, sodass durch Knock-Out oder Inhibition der ST8SiaII eine relevante Änderung der Polysialylierung entsteht (Galuska, Oltmann-Norden et al. 2006).

Der Prozess der Polysialylierung kann modifiziert werden, indem eine nichtphysiologische Sialinsäurevorstufe eingeführt wird. So wurde gezeigt, dass N-Propionyl-D-Mannosamine (ManNProp) und andere N-Acylmannosamine verstoffwechselt werden und somit eine neue Seitenkette entsteht, N-Propionylneuraminsäure (Neu5Prop) (Buttner, Kannicht et al. 2002). ManNProp hat eine höhere Substrataffinität zu ST8Siall, sodass eine funktionelle Inhibition entsteht, ohne, dass NCAM in seiner Struktur oder Quantität selbst beeinflusst wird.

Unterschiedliche Studien haben eine inkorrekte oder inkomplette Sialylieung mit strukturellen Hirnveränderungen sowie psychiatrischen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Angata, Long et al. 2004, Isomura, Kitajima et al. 2011).

2.12 Neuro/Gliales Antigen 2

Das Neuro/Gliale Antigen 2 (NG2) gehört zur Familie der CSPGs und wird in Glia Zellen exprimiert, die keine Antigene mit Astrozyten, Mikroglia oder reifen Oligodendrozyten teilen (Bu, Akhtar et al. 2001). Das Erscheinungsbild dieser Zellen ist von einem rundlichen Soma mit zarten, sternartigen Fortsätzen gekennzeichnet. Die NG2-positiven Zellen können sich in Oligodendrozyten und Astrozyten differenzieren (Nishiyama, Suzuki et al. 2014). Im adulten Gehirn haben NG2-positive Zellen in Ruhe eine ultrastrukturelle Funktion. Im Fall einer Verletzung werden sie in einen aktivierten Zustand versetzt, sie haben also eine reaktive Funktion. Die Aktivierung findet schnell statt und ist bereits in den ersten 24h als eine erhöhte Produktion von DNA nachweisbar. In und nahe Läsionen werden vermehrt NG2-positive Zellen angetroffen, die größer als inaktive Zellen sind und längere Fortsätze

haben. Die Veränderungen in Größe und Anzahl sind vorübergehend und zwei Monate nach Läsion nicht mehr nachweisbar (Levine 1994). NG2 positive Zellen sind also an der Bildung der Glianarbe beteiligt, hierbei ist NG2 ein Ligand für PTPRs mit stark inhibitorischer Wirkung (Silver and Silver 2014).

2.13 GFP-exprimierende Mauslinien

Um im Live-Imaging Zellen sichtbar zu machen, wurden GFP-exprimierende Mauslinien verwendet (Caroni 1997, Remington 2011). Die GFP Expression ist hierbei an den Thy 1.2 Promotor gekoppelt, der konstitutiv vor allem in Neuronen exprimiert wird. Die Expression beginnt zwischen dem sechsten und zehnten postnatalen Tag, das heißt es können ausgewachsene Zellen beobachtet werden, jedoch nicht die Zellmigration oder das Auswachsen von Neuriten im embryonalen Gehirn. Hierbei existieren Mauslinien, die GFP in vielen Zellen exprimieren, wie in Abbildung 2, A gezeigt. Andere Mauslinien exprimieren GFP in nur wenigen Zellen, wodurch die Zellen leichter voneinander und vor dem dunkleren Hintergrund abgrenzbar sind. In der vorliegenden Arbeit handelte es sich bei den Tieren mit einer hohen GFP Expression um Tiere der Linie Thy 1-17, bei den Tieren mit GFP Expression in wenigen Zellen um die Mauslinie Thy 1-21.



Abbildung 2 exemplarische Darstellung von Thy 1-17 und Thy 1-21 Schnittkulturen: A. 2-Photonen Mikroskopie Bild einer Schnittkultur einer Thy 1-17 Maus. Hier sind viele Neurone GFP-positiv, sodass es schwierig ist die einzelnen Neurone und ihre Fortsätze voneinander abzugrenzen. **B.** 2-Photonen Mikroskopie Bild einer Schnittkultur einer Thy 1-21 Maus. Nur

wenige Neurone sind GFP-positiv, daher sind die einzelnen Zellen und ihre Fortsätze gut vor dem dunkleren Hintergrund abgrenzbar.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verbrauchsmaterial

3.1.1.1 Chemikalien:

Produktname		Hersteller, Artikel Nr.
Basal Medium Eagle (BME)		Invitrogen, Gibco 41010
Biocytin Kristalle		Sigma Aldrich, B4261
Ethanol		Herbeta Arzneimittel, MEK
Glucoselösung 20%		B. Braun, 7306C12
HEPES		Sigma, H6147
Histoacryl		B. Braun, 1050052
L-Glutamin (GlutaMAX™-I Supplement)		Invitrogen, Gibco 35050
ManNProp Antia Laboratories,		P00001-5G
Minimal Essential Medium (MEN	Invitrogen, Gibco 11012	
Natriumhydroxid		VWR, 28245.298
Normales Pferdeserum (NHS)		Invitrogen, Gibco 26050-088
Normales Ziegenserum (NGS)		Vector Laboratories, S-1000
Paraformaldehyd (PFA)		Merck, 104004.0800
Triton X-100		Sigma-Aldrich, X100
Trolox		Millipore, CAS 53188-07-1

3.1.1.2 Medien

Präparationsmedium 100ml

50ml Minimum Essential Medium steril, doppelt konzentriert 49ml Aqua pro injectione steril 1ml Glutamin Mit Hilfe von NaOH auf pH 7,35 einstellen Steril filtrieren 0,2µm

Kulturmedium 100ml

25ml Minimum Essential Medium steril, doppelt konzentriert 20,9ml Aqua pro injectione steril 25ml Basal Medium Eagle ohne Glutamin steril 25ml Horse Serum hitzeinaktiviert steril 1ml Glutamin 200mM steril 3,125ml Glukoselösung 20% steril Mit Hilfe von NaOH auf 7,2 einstellen Steril filtrieren 0,2µm

Kulturmedium mit 8mM ManNProp 100ml

Minimum Essential Medium steril, doppelt konzentriert 20,9ml Aqua pro injectione steril 25ml Basal Medium Eagle ohne Glutamin steril 25ml Horse Serum hitzeinaktiviert steril 1ml Glutamin 200mM steril 2,87ml Glukoselösung 20% steril Pro 98,4ml Medium 1,6ml ManNProp 500mM Mit Hilfe von NaOH auf pH 7,2 einstellen Steril filtrieren 0,2µm

Modified Edi's Recording Medium (MERM) Ansatz 10x

75,4g NaCl 3g KCl 2g MgCl₂ 2,9g CaCl₂ Auf 1L Aqua pro injectione steril

Trolox Ansatz

2,5g Trolox auf 1L Aqua pro injectione steril

Imaging Medium 50ml MERM Ansatz 10x 5ml HEPES 840µl Glukose 40% 5ml Penicillin / Streptomycin 5ml Trolox Ansatz Auf 500ml auffüllen mit Aqua pro injectione steril pH mit NaOH auf 7,4 einstellen Osmolarität mit Saccharose auf 365mOsm/kg einstellen Steril filtrieren 0,2µm

Phosphatpuffer (PB) 0,1M

Lösung A: 35,61g Na₂HPO₄*2H₂O in 1000ml Aqua bidest lösen Lösung B: 31,21g NaH₂PO₄*2H₂O in 1000ml Aqua bidest lösen 810ml Lösung A und 190ml Lösung B und 1000ml Aqua bidest mischen

Paraformaldehyd (PFA) 4% Lösung

40g Paraformaldehyd in 1000ml PB unter Rühren auf 60% erhitzen Auf Eis abkühlen lassen Filtrieren

3.1.1.3 Antikörper

Tabelle 1: primäre Antikörper

Bezeichnung		Wirt	Konzentration	Hersteller
Monoclonal	Anti-	Maus	1:200	Sigma, C8035
Chondroitin S	ulfate			
Anti-NG2 Sulfate Proteo	Chondroitin glycan	Kaninchen	1:200	Millipore, Cat.# AB5320
GFAP		Kaninchen	1:750	Fisher Scientific, 12602787
PSA-NCAM		Maus	1:500	Fisher Scientific, 15527586
DAPI			1:10.000	Sigma, D9542

Tabelle 2: sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Wirt	Konzentration	Hersteller
Anti-rabbit Alexa 568	Ziege	1:1000	Fisher Scientific, A- 11004
Anti-mouse Alexa 488	Ziege	1:1000	Fisher Scientific, A- 32723

3.1.1.4 Versuchstiere

C57BL/6, NCAM heterozygote C757BL/6, Thy1-17 und Thy1-21 der Zentralen Versuchstiereinrichtung der Universitätsmedizin Mainz.

3.1.1.5 Sonstiges:

Produkt	Hersteller
Deckgläser eckig	Menzel-Gläser, 24 x 50 mm, BB024050A1
Objektträger	R. Langenbrinck, 76 x 26 mm, Mattrand
Präparierbesteck	Fine Science Tools
Rasierklingen (Läsion)	Wick Pharma / P&G GmbH, Rotbart
extra dünn 8626928	
Rasierklingen (Chopper)	Gilette
Skalpellklingen abgerundet	Feather, 02.010.00.015
Skalpellklingen spitz	Feather, 02.010.00.011
Spritzen 50ml	B. Braun
Sterilfilter	Sartorius, 17597
Vacuum Filtersystem	Corning, 430767
Zellkultureinsätze	Millipore, Millicell 0,4 µm PICMORG50
Zellkulturplatten, 6 well	Falcon, 353046

3.1.2 Geräte und Hilfsmittel

3.1.2.1 Geräte

Binder: Inkubatoren (Zellkultur) Leica: konfokale Mikroskope (SP2 und SP 8) Leica: Laser: Argon 488, Helium-Neon 543, Helium-Neon 633 HCX PL APO CS 10x/0,40 dry HC PL APO CS2 20x/0,75 dry HC PL APO CS2 63x/1,40 oil McIlwain Tissue Chopper Microm HM 650 V: Vibratom Milli-Q Synthesis A 10: Millipore Wasser Olympus: Fluoreszenzmikroskope BX 50, IX 70, IX 81 WLD Tec: Gasbrenner Zeiss KL: 1500 Binocular LaVision TriMScope 2-Photonen Mikroskop Setup Olympus BX 51 2-Photonen Mikroskop SpectraPhysics Mai Tai Laser Olympus XLUMPlanFl 20x/0,95W LUMFL N 60x/1.10 W

3.1.2.2 Software

Endnote X7, Clarivate Analytics, Philadelphia, USA Image J Fiji, Open Source LASAF-Lite, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland Microsoft office 2016, Microsoft Corporation, Redmond, USA IBM SPSS Statistics 23, Ehningen, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Präparation der organotypischen hippocampalen Schnittkulturen

Die organotypischen hippocampalen Schnittkulturen wurden nach dem Vorbild von Stoppini et al. (Stoppini, Buchs et al. 1991) und Gogolla et al. (Gogolla, Galimberti et al. 2006) präpariert. Hierzu wurden die Tiere dekapitiert und das Hirn im Ganzen entfernt. Anschließend wurden der Kortex von den subkortikalen Strukturen (Basalganglien) abgetrennt und die Meningen entfernt. Der Hippocampus wurde gemeinsam mit dem entorhinalen Kortex von den Hemisphären abgetrennt. Nun wurde der Hippocampus mit zwei Spateln längs auf den McIlwain Tissue Chopper gelegt und geschnitten, sodass coronare Schnitte entstanden. Die fertigen Schnitte wurden mit Hilfe zweier Spatel zur Selektionierung in eine Petrischale mit Präparationsmedium verbracht. Die besten Schnitte wurden ausgewählt und dann mit Spateln flach auf die membranbespannten Zellkultureinsätze (Membrane Inserts) gelegt. Das Kulturmedium wurde einen Tag nach der Präparation gewechselt, indem unter der Abzugshaube die Membrane Inserts mit einer Pinzette angehoben wurden und das alte Medium abgesaugt wurde. Danach wurden erneut 1,2ml Medium vorgelegt und die Inserts wiedereingesetzt. Um ein Austrocknen zu vermeiden wurde zügig gearbeitet. Dieser Prozess wurde alle zwei Tage wiederholt.

3.2.2 Zeitplan der unterschiedlichen Experimente

Für die einzelnen Experimente wurden unterschiedliche Zeitpläne entwickelt, die für jeden Versuchsablauf Stück für Stück angepasst wurden.

Für die Live-Imaging Experimente am 2-Photonen Mikroskop wurden organotypische hippocampale Schnittkulturen von Mäusen am ersten postnatalen Tag präpariert. Die Schnittkulturen wurden für vier Wochen kultiviert, um ein stabiles System zu gewährleisten und die Veränderungen von dendritischen Spines von Körnerzellen des Gyrus dentatus nach Moosfaserläsion zu untersuchen. Nach vier Wochen wurde das Live-Imaging begonnen und alle zwei Tage durchgeführt. Im Anschluss an jedes Imaging wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

Für die Live-Imaging Experimente an In-Utero elektroporierten Mäusen erfolgte die Elektroporation am embryonalen Entwicklungstag 14. Am Tag der Geburt oder am ersten postnatalen Tag wurden die Schnittkulturen angefertigt. Nach zwei Tagen in Kultur wurde das Live-Imaging begonnen. Der veränderte Zeitplan diente der Beobachtung der auswachsenden Neurite im Gegensatz zu den stabilen Neuriten im zuvor genannten Versuchsaufbau.

Für die histologisch aufgearbeiteten Schnittkulturen wurden Schnittkulturen von Mäusen am Tag der Geburt bis zum zweiten postnatalen Tag angefertigt und für sieben Tage kultiviert. Am siebten Tag erfolgte die Moosfaserläsion wie unter 3.2.3 beschrieben. 21 Tage nach Läsion wurden die Schnittkulturen fixiert und wie unter 3.2.5 beschrieben histologisch aufgearbeitet.

3.2.3 Moosfaserläsion und Behandlung mit ManNProp

Für die Moosfaserläsion wurden Schnittkulturen präpariert und sechs Tage kultiviert, um ein optimales Anwachsen zu gewährleisten. Am siebten Tag wurde die Moosfaserläsion durchgeführt. Hierzu wurden die Kulturen unter der offenen Abzugshaube unter dem Präparationsmikroskop mit Hilfe einer Rasierklinge lädiert. Nach der Läsion wurde unter der geschlossenen Abzugshaube ein normaler Mediumwechsel durchgeführt und hierbei entweder 1,2ml Kulturmedium als Kontrolle oder 1,2ml Kulturmedium mit 8mM ManNProp als Behandlung vorgelegt. Dem entsprechend wurde in zwei Gruppen, "unbehandelt" und "behandelt", unterschieden. Im Fall der NG2 Färbung wurde eine zusätzliche Gruppe, "unlädiert" eingeführt. Entsprechend wurde in "unlädiert", "unbehandelt" und "behandelt" unterschieden.

3.2.4 2-Photonen Mikroskopie

Für die Live-Imaging Experimente am 2-Photonen Mikroskop musste zunächst ein Versuchsaufbau entwickelt werden. In der 2-Photonen Mikroskopie werden Farbstoffe mit zwei Photonen niedrigerer Energie angeregt und somit ein Elektron auf ein höheres Energieniveau angehoben. Wenn das Elektron zurück auf sein Ausgangsenergieniveau abfällt, gibt es ein anderes Photon ab. Durch das niedrigere Energieniveau der einzelnen anregenden Photonen handelt es sich zum einen um ein gewebeschonenderes Verfahren, zum anderen kann eine höhere Eindringtiefe durch die höhere Wellenlänge erreicht werden. Auf dem Niveau der Eindringtiefe wird also ein sehr klares Bild produziert (So, Dong et al. 2000). Da es sich bei Zellen jedoch um dreidimensionale Strukturen handelt, müssen Datensätze in Form von Bildstapeln produziert werden. Ein solcher Datensatz kann durch das Mikroskop automatisch in einem festgelegten Bereich in unterschiedlicher Schichtdicke hergestellt werden. Bei Live-Imaging von Schnittkulturen in Medium entsteht jedoch ein gewisser Bewegungsspielraum durch Bewegung des Membran-Inserts in der Kulturschale und des Plastikrings. der Membran innerhalb Nach ausgiebigen Tests mit unterschiedlichen Materialien fand sich schließlich ein Platindrahtring als Auflage und ein Plastikplättchen als Unterlage als ausreichende Stabilisierung. Zur besseren Sterilisierbarkeit und Materialhaltbarkeit wurde ein Titanring anstatt des Drahts angefertigt. Hierbei musste ein abgeschrägter Rand eingeführt werden, um zum einen eine ausreichende Materialdicke zu gewährleisten und Materialbruch zu verhindern und zum anderen genug Platz für das 60x Objektiv zu lassen.

Zu Beginn der Experimente mussten die Objektive jeweils einzeln in den Mikroskopaufbau eingeschraubt werden. Das Wechseln der Objektive war so nur durch Entfernen der Kulturschale möglich, was ein Wiederfinden der gleichen Zelle in hoher Vergrößerung nahezu unmöglich machte. Hierzu wurde ein spezieller Schlitten mit Halterungen für beide Objektive maßgefertigt. Die Objektive konnten so problemlos und schnell eingeschraubt und ihre Position zügig gewechselt werden. Um die ideale Höhe des Versuchsaufbaus zur gewährleisten wurde der beheizte Tisch des Mikroskops um eine Petrischale zur Erhöhung ergänzt. Die Heißluftbeheizung war während der Versuche ausgeschaltet, um Bewegungen des Mediums zu minimieren. Der beheizte Tisch war eingeschaltet, um ideale Bedingungen für die Schnittkulturen zu gewährleisten.

Während des Live-Imaging wurden die Schnittkulturen in speziellem Imaging-Medium verwahrt, das keine Farbstoffe enthielt, sodass möglichst wenig unspezifisches Signal entstehen konnte. Um die gleiche Osmolarität zum Kulturmedium zu erreichen wurde unter Messung mit einem Osmometer die Osmolarität mit Saccharose ausgeglichen. Des Weiteren wurde dem Imaging Medium Trolox hinzugefügt. Hierbei handelt es sich um ein wasserlösliches Vitamin-E-Derivat, das sich durch sein hohes antioxidatives Potential gut als Radikalfänger eignet.

Das Live-Imaging wurde so zügig wie möglich durchgeführt, um den Kulturen möglichst wenig Stress zuzufügen. Hierzu wurde zunächst mit dem 20x Objektiv (nummerische Apertur 0,95) eine Zelle ausgesucht und dann ein Fortsatz zweiter bis dritter Ordnung als Vergrößerung für die Untersuchung der Dendriten und der

dendritischen Spines ausgewählt. Hiernach wurde auf das 60x Objektiv (nummerische Apertur 1,10) gewechselt und ein Bildstapel mit einer Schichtdicke von 0,5µm angefertigt. Hierzu wurde eine Wellenlänge von 860nm und eine Laserstärke von 18% mit einem Zoom von 1 und einem Line Average von 2 (kein Frame Average) genutzt (SpectraPhysics Mai Tai Laser). Nach Abschluss der Bildgebung wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Schnittkulturen wieder in den Inkubator verbracht. Das Imaging wurde jeweils montags, mittwochs und freitags durchgeführt, um den Kulturen ausreichende Ruhephasen zu ermöglichen.



Abbildung 3 Details des 2-Photonenmikroskopaufbaus: A. Detailaufnahme des maßgefertigten Titanrings, der zum Beschweren der Membran Inserts benutzt wurde. Besonders wichtig ist der abgeschrägte innere Rand, um genug Platz für die Objektive zu haben. B. Aufnahme des maßgefertigten Schlittens für die Objektive. Die Objektive werden in den Schlitten eingeschraubt und können schnell und einfach entfernt werden. C. Aufnahme des Schlittens in Aktion, hier die Nutzungsposition für das 20x Objektiv darstellt und Abbildung D. Aufnahme des Schlittens in Aktion, hier die Nutzungsposition für das 60x Objektiv. Die Objektivposition kann problemlos und ohne Änderungen am Versuchsaufbau gewechselt werden. Um die korrekte Arbeitshöhe zu erreichen wurde eine Petrischale temporär auf der Wärmeplatte fixiert, die ebenfalls in den Abbildungen C und D zu sehen ist.

3.2.5 Histologische Aufarbeitung

Nach der gewünschten Inkubationszeit wurden die Schnittkulturen histologisch aufgearbeitet. Die Aufarbeitung und Färbung erfolgte gemäß der Methode nach Vogt et al. (Vogt, Glumm et al. 2012). Zunächst wurde hierbei das Medium abgesaugt und die Wells wurden mit etwa 4ml PFA gefüllt, sodass die Membrane Inserts von oben und unten mit PFA umspült wurden. Nach 15 Minuten Fixierungszeit wurde das PFA mit einer Pipette abgesaugt. Dieser Vorgang wurde noch zwei Mal mit frischem PFA wiederholt, um jegliches denaturiertes Protein abzuwaschen. Die fixierten Slices wurden auf Blöcke aus low melting Agarose mittels Fibrinkleber geklebt und die fertigen Blöcke ebenfalls mittels Fibrinkleber auf den Schlitten des Vibratoms (Microm HM 650 V) geklebt. Die Slices wurden bei einer Geschwindigkeit von 9 in 50µm dicke Schnitte geschnitten. Mit einem Pinsel wurden die fertigen Schnitte in mit Phosphatpuffer gefüllte Six-well-Platten überführt.

3.2.6 Fluoreszenzfärbungen

Die Blockierung unspezifischer Bindungen erfolgte mit 10% Normal Goat Serum in 0,1M Phosphatpuffer, zur Permeabilisierung der Zellmembran wurde 0,1% Triton hinzugefügt und für eine Stunde inkubiert. Die Inkubation mit dem ersten primären Antikörper erfolgte abgedunkelt auf der Rüttelplatte bei 4°C für 48h, mit einer Ausnahme von rb anti GFAP, der für 24h inkubiert wurde. Die Schnitte wurden fünf Mal für zehn Minuten mit frischem 0,1M PB gewaschen. Für eine Doppelfärbung wurden primäre Antikörper aus verschiedenen Wirtsspezies benutzt. Daran schloss sich die Inkubation mit dem gewünschten sekundären Antikörper abgedunkelt auf der Rüttelplatte bei Raumtemperatur für zwei Stunden an. Zwischen den Inkubationen der sekundären Antikörper wurden die Schnitte drei Mal für zehn Minuten mit frischem 0,1M PB gewaschen. Nach abgeschlossener Färbung wurden die Schnitte fünf Mal für zehn Minuten mit frischem 0,1M PB gewaschen. Die gefärbten Schnitte wurden mit einem Pinsel auf gelatinierte Objektträger glatt aufgezogen und 30 Minuten trocknen gelassen. Die Objektträger wurden mithilfe von Prolong Gold und eckigen Deckgläsern versiegelt und die Ränder mit Klarlack verschlossen. Die Schnitte wurden bei -20°C aufbewahrt.

3.2.7 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Zur Auswertung der Färbungen wurden Aufnahmen der fluoreszenzgefärbten Schnitte an den Leica Mikroskopen SP2 und SP8 angefertigt. Für eine bessere Übersicht wurden Bilder mit dem 10x Objektiv (nummerische Apertur 0,4) angefertigt. Um die Fluoreszenzdichte in einem ausgewählten Bereich zu bestimmen wurde ein 10µm dicker Stapel mit einer Dicke der Einzelbilder von 0,5µm mit dem 20x Objektiv (numerische Apertur 0,75) angefertigt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Lasereinstellungen des Leica Argon Laser mit einer Wellenlänge von 488nm für CSPG (AL 488) stets 14% mit einem Gain von 2 gehalten, es wurde ein Zoom von 1, ein Line Average von 1 und ein Frame Average von 3 gewählt. Die Einstellungen für DAPI und GFAP (AL 568) wurden, wenn nötig, an die Helligkeit der Färbung angepasst um ein unnötiges Bleichen und eine Beschädigung des Sensors zur vermeiden. Zur Darstellung von Kolokalisationen wurden Bilder mit dem 63x Objektiv (nummerische Apertur 1,4) aufgenommen. Die Lasereinstellungen wurden für die CSPG Färbung auf 21% des Leica Argon Lasers mit der Wellenlänge 488nm gesetzt, es wurden ein Zoom von 1, ein Live Average von 4 und ein Frame Average von 4 gewählt. Aus diesen Bildern wurden die gesuchten Zellen mit einer weiter vergrößerten Aufnahme mit einem maximalen Zoom von 4x und wenn nötig in einem Bildstapel herausgearbeitet. Die Auswertung erfolgte mit der Software Image J (Fiji).

3.2.8 Bildauswertung

Die Auswertung der Konfokalen Bilder erfolgte mit fiji, die Fluoreszenzdichtemessung erfolgte nach der Beschreibung von Martin Fitzpatrick in The Open Lab Book (Fitzpatrick 2014).

Die 10µm Stapel wurden in einer Maximalprojektion ausgewertet. Die Fluoreszenzdichte wurde proximal der Moosfaserläsion im Gyrus dentatus bestimmt. Die Zielregion (sogenannte Region of Intererst oder ROI) wurde einmal definiert (auf 400µm x 350µm) und in alle weiteren auszuwertenden Bilder kopiert, um eine konstante Größe zu gewährleisten. Minimale Größenabweichung entstand durch unterschiedliche Rotation der ROI. Die Erfassung der Ergebnisse und graphische Aufarbeitung erfolgten mit Excel und SPSS Statistics 23.

Des Weiteren wurden einzelne Astrozyten nach demselben Protokoll analysiert. Hierzu wurden die Astrozyten in der GFAP Färbung mit dem freien Selektionswerkzeug ausgewählt und dann die Auswahl in die CSPG Färbung kopiert. Die erhobenen Daten wurden in Excel und SPSS Statistics 23 weiter ausgewertet.



Abbildung 4 Auswertung der Fluoreszenzfärbungen: A. Auswertung der Fluoreszenzdichte. Die Moosfaserläsion ist in blau eingezeichnet. Das schwarze Quadrat stellt den mit dem 20x Objektiv mikroskopierten Bereich dar. Das grüne Rechteck stellt die zur Fluoreszenzdichtemessung ausgewertete Region dar, deren Kantenlänge 400µm x 350µm betrug. Diese Auswahl wurde stets kopiert und in das nächste auszuwertende Bild eingefügt, um eine konstante Fläche zu erreichen. Die Region of Interest wurde kopiert und im Bereich der Moosfaserläsion und nach proximal der Läsion in Richtung Gyrus dentatus platziert, da hier die höchste CSPG-Expression zu finden war.

B. Auswertung einzelner Astrozyten. Die Moosfaserläsion ist ebenfalls in blau eingezeichnet, das schwarze Quadrat stellt den mit dem 63x Objektiv mikroskopierten Bereich dar. Die

einzelnen Astrozyten wurden mit dem freien Selektionswerkzeug ausgewählt und dann ausgewertet.

C. Exemplarische Darstellung der Auswertung einer 63fachen Vergrößerung einer hippocampalen Schnittkultur in fiji, links CSPG-Färbung, rechts GFAP-Färbung. Die Auswahl des Astrozyten erfolgt mit dem freien Auswahlwerkzeug in der GFAP Färbung. Danach wird diese Auswahl in die Abbildung der CSPG Färbung kopiert und ausgemessen.

3.2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit IBM SPSS Statistics 23. Zur Auswertung wurde ein zweiseitiger t-Test für unverbundene Stichproben angewendet.

3.2.10 Antegrades Biocytin Tracing

Für das Biocytin Tracing wurden mit Hilfe einer fein ausgezogenen Glaskapillare Biocytin Kristalle (B4261, Sigma Aldrich) auf dem Gyrus Dentatus platziert. Nach einer Stunde wurden die Slices vorsichtig von oben und unten mit Medium gespült, um überschüssiges Biocytin zu entfernen. Am nächsten Tag fand ein normaler Mediumwechsel statt. Nach 48 Stunden Inkubationszeit wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Slices wurden mit dem Fixativ (4% PFA in 0,1M PB) bedeckt. Nach 15 Minuten auf der Rüttelplatte wurde das Fixativ abpipettiert und der Vorgang noch zwei Mal wiederholt. Die Slices wurden, wie bereits unter 3.2.3 beschrieben, vorbereitet und am Vibratom (Microm HM 650 V) bei einer Geschwindigkeit von 9 in 5µm dicke Schnitte geschnitten. Zur Visualisierung des Biocytin Tracings wurden die Schnitte zunächst mit 0,1% Triton für 45 Minuten inkubiert. Danach wurde Triton abgesaugt und PB zugefügt, dieser Ansatz wurde für 10 Minuten auf der Rüttelplatte bei Raumtemperatur inkubiert, der Vorgang wurde einmal wiederholt. Es wurden 500µl der ABC-Lösung in jeden Well gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur lichtgeschützt auf der Rüttelplatte inkubiert. Am nächsten Tag wurde die ABC-Lösung abpipettiert und die Schnitte drei Mal mit jeweils frischem PB für zehn Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt auf der Rüttelplatte inkubiert. Es wurde 1 ml DAB Lösung in jeden Well pipettiert und dann 3,3µl H₂O₂ (1:1000) hinzu gegeben. Nach 30 Sekunden bis einer Minute Entwicklungszeit wurde die Reaktion mit PB abgebrochen, sobald ein Signal sichtbar wurde. Die DAB-Lösung wurde abgesaugt und drei Mal für zehn Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur auf der Rüttelplatte mit jeweils frischem PB inkubiert. Die fertig gefärbten Schnitte wurden mit Hilfe eines feinen Pinsels auf gelatinierte Objekträger glatt aufgezogen. Die Objekträger wurden zunächst für drei Minuten in 70% Ethanol und danach für eine Minute in Aqua bidest gegeben. Danach wurden sie für zwei bis drei Minuten in Cresyl-Violett Lösung gefärbt, wobei stets auf den Fortschritt der Färbung geachtet wurde. Im nächsten Schritt wurde überschüssige Cresyl-Violett Lösung von den Objektträgern für 30 Sekunden unter Rütteln in Aqua bidest gewaschen. Dieser Schritt wurde in der nächsten Küvette wiederholt. Als nächstes wurden die Schnitte mehrfach in 70% Ethanol mit ein bis zwei Tropfen Essigsäure differenziert. Dazu wurden sie über 30 bis 60 Sekunden mehrmals in die Küvette getaucht und der Fortschritt der Färbung dabei stets beobachtet. Dann wurde die Färbung in einer in 10% Schritten aufsteigenden Alkoholreihe, beginnend mit 70% und endend bei 100%, für jeweils drei Minuten fixiert. Zuletzt wurden die Objektträger für 30 Sekunden in Xylene gegeben und dann mit Histokitt und passenden Deckgläsern eingedeckt.

3.2.11 In-Utero Elektroporation

Die In-Utero Elektroporation wurde nach dem Vorbild von Saito und Baumgart durchgeführt (Saito 2006, Baumgart and Grebe 2015). Die Elektroporation erfolgte am embryonalen Entwicklungstag 14.

3.2.12 Präparation genomischer DNA aus Biopsien von Mäuseschwänzen

Um NCAM k.o. Tiere zu erhalten wurden heterozygote Elterntiere verpaart. Hierzu wurden von den verwendeten Tieren Schwanzbiopsien entnommen. Die Präparation genomischer DNA für die PCR erfolgte, indem die Biopsien mit je 200µl Lysepuffer (Direct PCR-Tail der Firma peqlab, 31-102-T) mit 3µl Proteinase K der Firma peqlab (04-1076, 20mg/ml) bei 55°C über Nacht auf dem Thermocycler bei ca. 900rpm inkubiert wurden. Anschließend wurde die Proteinase für 45 Minuten auf 85°C erhitzt zur Deaktivierung der Proteinase. Zuletzt wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand wurde anschließend für die PCR zur Genotypisierung verwendet.
3.2.13 Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die für diese Arbeit verwendeten NCAM k.o. Tiere mussten mittels PCR auf ihren Genotyp getestet werden. Die Primer wurden in einer Konzentration von 10pmol/µl verwendet. Die verwendete GoTaqG2 Polymerase wurde von Promega (M7845) bezogen.

Tabelle 3: Verwendet PCR-Primer für NCAM k.o.

Nr.	Primer 5' – 3'	Sequenz	Tm
1	NCAM 1 fw	CTG CCT CAG ATA GTG ACC CAG TGC	69°C
2	NCAM 2 fw	CGG AGA ACC TGC GTG CAA TCC ATC	69°C
3	NCAM 3 rev	TTG GAG GCA GGG AGC TGA CCA CAT	69°C

Tabelle 4: Verwendeter PCR Ansatz

Komponente	Menge in µl
Millipore Wasser	12,75
5x Go Taq-PCR-Puffer	5
dNTPs (2,5mM)	2
Primer 5' KO	1
Primer 5' WT	1
Primer 3'	2
Go Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0,25
DNA-Template	1
Σ	25

Tabelle 5: Verwendetes PCR Programm

Temperatur		Zeit in Minuten	-
Denaturierung	95°C	3	
Denaturierung	95°C	1	
Primeranlagerung	64°C	1	→ 32 x
Polymerisation	72°C	2	
	72°C	7	

4. Ergebnisse

4.1 Live Imaging von organotypischen hippocampalen Schnittkulturen ausThy-1 GFP exprimierenden transgenen Mäusen

Das Ziel der Live-Imaging Experimente war denselben Dendriten mehrfach darzustellen, um die Veränderungen der dendritischen Spines nach Läsion beobachten zu können. Nach ausführlicher Optimierung der Begleitumstände wie im Methodenteil unter 3.2.4 beschrieben, konnte das Ziel, dieselbe Zelle und denselben Dendriten wiederholt darzustellen, erreicht werden. In den anfänglichen Versuchen wurden sowohl Pyramidenzellen der CA 1- und der CA 2-Region als auch Körnerzellen des Gyrus Dentatus mikroskopiert. Die Pyramidenzellen zeigten hierbei eine deutlich weniger stabile GFP Expression, welche meist nach einem Mal Imaging ausgeblichen war und somit nicht erneut dargestellt werden konnte.

Die Körnerzellen erwiesen sich als deutlich stabiler und eigneten sich dadurch besser für das Imaging Protokoll mit mehreren aufeinander folgenden Versuchen. Es wurde eine Zelle mit hohem Wiedererkennungspotential und klar aufgezweigten Dendriten ohne Überlappung mit anderen größeren Dendriten ausgewählt, um optimale Bedingungen für die Mikroskopie zu schaffen. Hierdurch konnte sowohl dieselbe Zelle als auch dieselbe Aufzweigung desselben Dendriten zuverlässig und zügig wiederholt identifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass ein wiederholtes Live-Imaging von Dendriten von Körnerzellen auch über lange Zeit möglich ist und auch einzelne Spines wiederzufinden sind. Dieses Modell eignet sich demnach zur Beobachtung von Veränderungen dendritischer Spines und Spinestabilität. Dadurch dass der Thy-1 Promotor erst spät in der Entwicklung aktiviert wird, können nur adulte Zellen beobachtet werden. Für die Beobachtung von dendritischem Auswachsen ist der Versuch entsprechend nicht geeignet.

Während der Experimente zeigte sich eine unterschiedlich stark ausgeprägte GFP-Expression der unterschiedlichen Thy 1-21 Tiere. Dies war am ehesten durch wechselnd starke Expression des Thy-1 GFP Konstruktes zu erklären. Im weiteren Verlauf ergab sich dann eine deutliche zunehmende GFP-Expression, wie in Abbildung 6 J und K gezeigt, sodass keine einzelnen Zellen mehr voneinander abgrenzbar waren. Dies betraf alle Mäuse der Thy 1-21 Linie in domo, sodass das Experiment verlassen wurde.



Abbildung 5 Übersichtsbilder der 2-Photonenmikroskopie: A. 20fache Übersicht mehrere Pyramidenzellen. B. 20fache Übersichtsaufnahme einer Körnerzelle des DG. b. 60fache Vergrößerung der in B mit dem roten Quadrat angezeigten Region. C. 20fache Übersichtsaufnahme einer Körnerzelle des DG. c. 60fache Vergrößerung der in C mit dem roten Quadrat angezeigten Region.



Abbildung 6 Ergebnisse der 2-Photonen Mikroskopie von Thy 1-21 transgenen Mäusen: Bilder A bis I zeigen denselben Fortsatz, der innerhalb von 24 Tagen neun Mal mikroskopiert

wurde. **A.** Erster Imaging Zeitpunkt (Tag 1), welcher am 32. Tag (DIV 32) in Kultur stattfand. **I.** letzter Imaging Zeitpunkt (Tag 24, DIV 56). **J.** Übersichtsaufnahme, die die erhöhte GFP-Expression der Schnittkulturen zeigt, die am ehesten durch eine ungleichmäßige Expression des Thy1 GFP Konstrukts zustande kam. **K.** Detailaufnahme aus J. Es ist eine flächige GFP-Expression sichtbar, einzelne Zellen sind nicht voneinander abgrenzbar.

4.2 Live Imaging von organotypischen hippocampalen Schnittkulturen aus In-Utero elektroporierten Mäusen

Das Live-Imaging am 2-Photonen Mikroskop von organotypischen hippocampalen Schnittkulturen von In-Utero elektroporierten Mäusen ergab ein anderes Bild als das der Schnittkulturen von GFP-exprimierenden Mäusen. Im Gegensatz zu den GFPexprimierenden Tieren, in denen der Thy-1 Promotor erst später in der Entwicklung eingeschaltet wird, konnten durch die In-Utero Elektroporation positive Zellen in ihrer Entwicklung untersucht werden und so das Auswachsen von Neuriten beobachtet werden. Hierbei ist zu beachten, dass der Zeitpunkt der In-Utero Elektroporation von großer Wichtigkeit ist, da zu unterschiedlichen Zeitpunkten unterschiedliche Zellpopulationen vermehrt transfiziert werden. Zur Transfektion der Körnerzellen wurde der embryonale Entwicklungstag 14 gewählt, um zu gewährleisten, dass diese elektroporierten Zellen zum Zeitpunkt der Präparation bereits weiter in ihrer Entwicklung fortgeschritten sind. Nicht nur der Zeitpunkt der Intervention, sondern auch die genaue Positionierung von Kathode und Anode haben einen Einfluss auf die genaue Lokalisation der transfizierten Zellen, sodass bereits geringfügige Veränderungen zu einem anderen Ergebnis führen können.

Die mittels In-Utero Elektroporation transfizierten Zellen zeigten ein klares GFP Signal. Die Anzahl der transfizierten Zellen war jedoch von Intervention zu Intervention sehr unterschiedlich, sodass nicht nach jeder Intervention verwertbare Kulturen entstanden. Diese Problematik ist in Abbildung 7D und E gezeigt. Anstatt des Gyrus Dentatus sind vor allen die CA3 und CA1 Region betroffen. Es sind so viele Zellen GFP-positiv, dass einzelne Zellen oder einzelne Neurite nicht voneinander abgegrenzt werden können.

Eine weitere Schwierigkeit ergab sich dadurch, dass der gleiche Bildausschnitt in den Kulturen von Bildgebung zu Bildgebung nicht immer wieder aufzufinden war. Dies beruhte am ehesten auf der fortschreitenden Maturation der Kulturen, wodurch sich das Aussehen der Körnerzellen veränderte. Da in den mittels In-Utero Elektroporation transfizierten Zellen bereits immature Zellen GFP-positiv sind und diese Zellen noch größeren Veränderungen unterworfen sind, war dies nicht erstaunlich. Dennoch gestaltete sich das Imaging schwieriger dadurch, dass keine festen Landmarken bestanden. Während in den Thy 1 exprimierenden Kulturen durch ihre adulten, voll entwickelten Neurone stets dieselben Regionen aufgesucht werden konnten, stellten sich die Schnittkulturen von In-Utero elektroporierten Tieren aufgrund weiter fortschreitender Veränderungen und Entwicklungen stark unterschiedlich dar, sodass der zuvor gewählte Bildausschnitt am nächsten Imaging Zeitpunkt unter Umständen aufgrund des veränderten Erscheinungsbildes nicht wieder aufzufinden war.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass ein langzeitiges Live-Imaging am 2-Photonen Mikroskop von organotypischen Schnittkulturen von In-Utero elektroporierten Mäusen möglich ist. Insbesondere zur Beobachtung der Entwicklung einzelner Fortsätze handelt es sich hier um eine vielversprechende Technik. Die Technik sollte hierzu weiter verfeinert werden.





Abbildung 7 Ergebnisse der 2-Photonen Mikroskopie von In-Utero elektroporierten
Mäusen: A. 2-Photonen Mikroskopie Bilder einer Schnittkultur einer In-Utero elektroporierten
Maus. Mittels der gestrichelten Linie wird der Verlauf des Gyrus dentatus angezeigt. Hier ist die erste Bildgebung gezeigt, welche zwei Tage nach Präparation (DIV 2) angefertigt wurde.
B. Zweiter Imaging Zeitpunkt, hier befinden sich die Schnitte seit fünf Tagen in Kultur (DIV 5).
C. Dritter Imaging Zeitpunkt, hier befinden sich die Schnitte seit 9 Tagen in Kultur (DIV 9).
Auffällig ist, dass einzelne Zellen gut in ihrer Entwicklung begleitet werden könne, andere sind zum nächsten Imaging Zeitpunkt nicht mehr identifizierbar.

D. Übersichtsaufnahme einer Schnittkultur mit höherer GFP-Expression, die sich nicht wie geplant im Gyrus dentatus befindet, sondern am Übergang von CA1 zu CA 3. Die gestrichelte Linie zeigt den Verlauf der CA1 und CA3 Region an. **E.** Detailaufnahme aus D. Einzelne Zellen sind hier nur mit Mühe abgrenzbar, das wiederholte Imaging eines Neuriten ist hier nicht möglich.

4.3 Die Rolle von PSA-NCAM bei der Regeneration von Moosfasern nach Läsion

Zur weiteren Untersuchung organotypischen der Schnittkulturen nach Moosfaserläsion und der Regenerationsfähigkeit von Neuriten sowie Spineveränderungen wurde das Live Imaging am 2-Photonen Mikroskop verlassen, die Schnittkulturen wurden stattdessen nach oben genannter Methode fixiert und aufgearbeitet und mittels konfokaler Mikroskopie ausgewertet. Insbesondere wurde in diesem Experiment Wert auf die Rolle von PSA-NCAM auf die Regeneration nach Moosfaserläsion gelegt. Die Schnittkulturen wurden nach erfolgter Moosfaserläsion mit ManNProp behandelt. Als Kontrolle wurden unbehandelte Schnittkulturen verwendet. ManNProp diente hierbei der Modifikation der Polysialilierung von NCAM und somit als Einflussfaktor auf die gliale Vernarbung. In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass MaNProp sowohl in Zellkulturen von cerebellären Körnerzellen als auch in organotypischen hippocampalen Kokulturen nach Läsion des Tractus perforans einen positiven Einfluss auf das Auswachsen von Neuriten hatte (Buttner, Kannicht et al. 2002). In Kenntnis dieser Ergebnisse wurde ein positiver Einfluss von ManNProp auf Moosfasertrakt nach Läsion angenommen. Hierzu wurden zunächst den Immunfluoreszenzfärbungen gegen GFAP als Marker für Astrozyten und CSPG als Protein der extrazellulären Matrix mit inhibitorischer Funktion in der Glianarbe angefertigt. Von der Arbeitsgruppe um Jerry Silver wurde gezeigt, dass CSPG durch unterschiedliche Mechanismen Einfluss auf das Auswachsen von Neuriten nimmt (Silver and Silver 2014). So wurde sowohl das Abwenden des Wachstumskegels von CSPG-reicher Matrix als auch das Festhalten (entrapment) des Wachstumskegels beschrieben.

Die Versuche wurden an organotypischen hippocampalen Schnittkulturen von Wildtyp Tieren und NCAM^{-/-} Tieren durchgeführt. Dies geschah unter der Annahme, dass ohne das Vorhandensein von NCAM eine durch ManNProp veränderte Konzentration von PSA-NCAM, keinen Unterschied in der CSPG Hochregulation ergeben sollte. Gemäß vorangegangener Studien erfolgt die Biosynthese von Neu5AC teilweise im Zytosol, teilweise im Nucleus und teilweise im Golgi-Apparat (Buttner, Kannicht et al. 2002). Hierbei ist anhand von PC12 Zellen gezeigt worden, dass Vorstufen von Sialinsäure einen Einfluss auf die Transkription verschiedener Gene haben (Kontou, Bauer et al. 2008). Es erscheint daher möglich, dass ein solcher Einfluss von Sialinsäurevorstufen auch auf die Transkription von CSPG existiert. Im Folgenden werden die Ergebnisse der CSPG und GFAP Färbung gemeinsam mit DAPI vorgestellt.

Die CSPG/GFAP Färbung wurde zum einen auf Kolokalisation von CSPG und GFAP in der Fluoreszenzfärbung mittels konfokaler Mikroskopie und zum anderen mittels digitaler Bildauswertung auf Fluoreszenzdichte der CSPG Färbung untersucht. Zur Darstellung und Auswertung der Astrozytenmorphologie wurde eine GFAP Färbung durchgeführt.

Abbildung 8 zeigt sowohl die Kolokalisation von CSPG und GFAP als auch die Astrozytenmorphologie. In den unbehandelten Kulturen war eine deutliche Kolokalisation von CSPG und GFAP zu detektieren. Die Astrozyten waren zahlreich in der Läsion und zeigten morphologisch eine kondensierte Form mit kurzen Fortsätzen. Diese Form weist auf reaktive Astrozyten hin und ist ein typischer Befund, wie er nach einer Läsion gefunden wird (Pekny, Pekna et al. 2016). Die Kolokalisation von CSPG und GFAP zeigte sich vor allem im Bereich der Fortsätze. Die Somata wurden durch eine DAPI-Färbung des Zellkerns markiert.

Neben den Astrozyten in der Läsion wurde eine ähnliche Kolokalisation fernab der Läsion im Bereich des Subiculums beobachtet. Die Astrozyten wiesen hier längere, verzweigte Fortsätze, also eine höhere Ramifikation auf und zeigten ebenfalls eine starke Kolokalisation von CSPG und GFAP vor allem in den Fortsätzen. Dieser Befund deutet darauf hin, dass diese Astrozyten, die fernab der Läsion liegen zwar durch die Läsion nicht gemäß morphologischer Kriterien aktiviert wurden, jedoch trotzdem in ihrer Expression verändert wurden.

In der behandelten Gruppe war die CSPG-Expression deutlich verändert. Zum einen war die CSPG Färbung diffuser und wirkte deutlich reduzierter. Zum anderen konnte keine Kolokalisation von CSPG und GFAP und somit keine CSPG-Expression in Astrozyten nachgewiesen werden. Die CSPG Anreicherung entlang der Astrozytenfortsätze konnte hier nicht beobachtet werden. Die Astrozyten erschienen weniger kondensiert, die Fortsätze waren länger und wiesen eine höhere Ramifikation auf, was auf eine geringer ausgeprägte Aktivierung hinweist.

In der Auswertung der Fluoreszenzdichte wurden in der unbehandelten Gruppe elf 10 μ m dicke Stapel ausgewertet (n = 11), in der behandelten Gruppe 14 jeweils 10 μ m dicke Stapel (n = 14) untersucht. Das auszuwertende Areal wurde hierbei einmal in seiner Größe (400 μ m x 350 μ m) festgelegt und danach jeweils in die nächsten

auszuwertenden Bilder übertragen. Ausgewertet wurde stets der Bereich der Moosfaserläsion sowie proximal der Läsion im Gyrus dentatus, da sich hier die höchste CSPG Expression fand (siehe Abb. 4, Seiten 24 – 25). Die Fluoreszenzdichte in der unbehandelten Gruppe war zwar höher als in der behandelten Gruppe, es wurde jedoch kein signifikanter Unterschied beobachtet. Dies kann auf unterschiedliche Umstände zurückgeführt werden. Zum einen ist CSPG als Protein der extrazellulären Matrix immer im Gehirn konstitutiv vorhanden, hierdurch entsteht ein Hintergrundsignal. Zum anderen ist eine Reduktion der CSPG Expression ohne ein Ausbleiben selbiger durch die Behandlung mit ManNProp denkbar.

Die Auswertung eines so großen Areals zieht sowohl das zellgebundene CSPG als auch das sezernierte CSPG in Betracht. Da eine deutliche Anreicherung von CSPG in den Astrozyten gefunden wurde, wurde die Fluoreszenzdichte einzelner Astrozyten ausgewertet. Hierzu wurden 63fache Vergrößerungen aus dem Läsionsbereich genutzt. Es wurden insgesamt 33 Zellen in der unbehandelten Gruppe (n = 33) und 31 Zellen in der behandelten Gruppe (n= 31) ausgewertet. Hierbei wurde darauf geachtet, Zellen mit möglichst geringer Überlappung zu wählen. Der Unterschied der mittleren Fluoreszenz in den Astrozyten war signifikant (p < 0,001). Zu beachten ist, dass hierbei die mittlere Fluoreszenz ausgewertet wurde, da die mittlere Fluoreszenzdichte sich auf die Fluoreszenz pro Areal bezieht. Bei wie oben beschrieben unterschiedlicher Astrozytenmorphologie wäre hier von einem Einflussfaktor auf die Ergebnisse auszugehen.

Zum Vergleich wurde dasselbe Experiment an NCAM knock-out Tieren durchgeführt. Hier zeigte sich ein insgesamt geringer ausgeprägtes CSPG-Signal. Eine Kolokalisation von CSPG und GFAP und somit eine Expression von CSPG in Astrozyten wurde in organotypischen Kulturen aus NCAM knock-out Tieren nicht beobachtet. Es war weiterhin eine Migration von Astrozyten in die Läsion in beiden Gruppen zu sehen, jedoch waren die Fortsätze länger und verzweigter als in den unbehandelten Wildtyp Kulturen. Dies weist auf eine geringer ausgeprägte Astrozytenaktivierung nach Läsion in NCAM knock-out Tieren hin.





Abbildung 8 Die Rolle von PSA-NCAM bei der Regeneration von Moosfasern nach Läsion dargestellt anhand der CSPG/GFAP Färbung: Es handelt sich um organotypische hippocampale Schnittkulturen, die nach Moosfaserläsion mit ManNProp behandelt wurden oder Kulturen die als Kontrolle lädiert wurden und keine Behandlung erhielten. Nach oben beschriebener histologischer Aufarbeitung wurden die Schnitte mittels dem konfokalen Mikroskop ausgewertet. Die Moosfaserläsion ist jeweils als weiße gestrichelte Line markiert.

A. Hippocampale Schnittkulturen weisen 21 Tage nach Moosfaserläsion (21 DAL) eine Ansammlung von Astrozyten im Bereich der Läsion (weiß gestrichelte Linie), der Maßstab unten rechts entspricht 100µm. Die Astrozyten haben in der Immunfluoreszenzfärbung gegen GFAP kurze kondensierte Fortsätze und sind zahlreich in der Läsion vorhanden. **B.** Konfokale Immunfluoreszenzfärbung gegen CSPG in der gleichen Kultur zeigt eine Erhöhung des repulsiven Moleküls CSPG um den Bereich der Läsion. **C.** Zusammenlegung der Bilder aus A und B zeigt, dass die periläsionär gelegene Region mit der höchsten Astrozytendichte mit dem Bereich der höchsten CSPG-Expression übereinstimmt. **D.** Vergrößerung aus dem periläsionären Bereich zeigt hypertrophe und verkürzte Astrozytenfortsätze. Der Maßstab unten rechts hier entsprechend 10µm **E.** Die CSPG-Färbung zeigt verkürzte, grobe Zellfortsätze, die Form der Astrozyten ist bereits in der CSPG-Färbung abgrenzbar. **F.** Zusammenlegung der Bilder aus C und D zeigt, dass aktivierte Astrozyten eine starke CSPG-Expression aufweisen (gelbe Pfeile). Die Astrozytenfortsätze sind kurz und wenig verzweigt, es zeigt sich eine starke zelluläre CSPG Expression.

G. Die Bilder G bis I sind weit entfernt der Läsion im Bereich des Subiculums entstanden, daher ist die Moosfaserläsion nicht sichtbar, der Maßstab unten rechts entsprechend 10µm. Im Vergleich zu den Vorbildern haben die Astrozyten längere verzweigtere Fortsätze, was auf einen geringer ausgeprägten Aktivierungszustand hinweist. **H.** Die Astrozyten sind deutlich in der CSPG Färbung abgrenzbar. **I.** Die Zusammenlegung der Bilder G und H zeigen die Kolokalisation von CSPG und GFAP deutlich durch eine Gelbfärbung. Es ist eine starke zelluläre CSPG Anreicherung sichtbar.

J. Hippocampale Schnittkulturen 21 Tage nach Läsion (DAL 21) nach Behandlung mit ManNProp, der Maßstab unten rechts entsprechend 100µm. Die Astrozyten sind in der Immunfluoreszenzfärbung gegen GFAP zahlreich in der Läsion vorhanden, entsprechend wurde die Astrozytenmigration durch die Behandlung mit CSPG nicht verändert. K. Immunfluoreszenzfärbung gegen CSPG. CSPG ist auch in den mit ManNProp behandelten Schnittkulturen im Bereich der Moosfaserläsion und des DG zu finden. L. Die Zusammenlegung der Bilder J und K zeigte keine Kolokalisation von GFAP und CSPG.

M. Die Vergrößerung aus dem periläsionären Bereich zeigt Astrozyten mit langen verzweigten Fortsätzen, Maßstab unten rechts entspricht 10µm. **N.** In der CSPG Färbung sind keine zellulären Strukturen abgrenzbar. **O.** In der Zusammenlegung von M und N findet sich keine Kolokalisation.

P. Auswertung der Fluoreszenz einzelner Astrozyten in fiji. Unbehandelte Schnittkultur 21 Tage nach Moosfaserläsion (DAL 21), rechts Auswahl des Astrozyten (gelbe Linie), links

Auswahl in der CSPG-Färbung. Die Astrozyten sind bereits deutlich in der CSPG Färbung abgrenzbar. Korrespondierende Zellen sind mit gleichfarbigen Pfeilen markiert.

Q. Auswertung der Fluoreszenz einzelner Astrozyten in fiji. Mit ManNProp behandelte Schnittkultur 21 Tage nach Moosfaserläsion (DAL 21), rechts Auswahl des Astrozyten (gelbe Linie), links Auswahl in der CSPG-Färbung. Es lassen sich keine zellulären Strukturen in der CSPG-Färbung abgrenzen.



Abbildung 9 statistische Auswertung der CSPG Färbung in organotypischen Schnittkulturen nach Moosfaserläsion

A. Die statistische Auswertung der mittleren Fluoreszenzdichte der CSPG Färbung ist anhand von Maximalprojektionen von jeweils 10µm dicken Bildstapeln dargestellt. In der unbehandelten Gruppe wurden 11 Kulturen analysiert (n = 11), in der behandelten Gruppe wurden 14 Kulturen untersucht (n = 14). Die jeweils untersuchten Bilder hatten die gleiche Schnittdicke. Die Größe der Region of Intererst wurde am Anfang festgelegt (Maße siehe Material und Methoden Seiten 24 - 25) und stets proximal der Läsion im Gyrus dentatus positioniert. Die Auswertung der CSPG Immunfluoreszenzfärbung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten Kulturen.

B. Statistische Auswertung der mittleren Fluoreszenz der einzeln ausgewerteten Astrozyten. Im Gegensatz zur mittleren Fluoreszenzdichte handelt es sich hierbei nicht um die Fluoreszenz in Abhängigkeit der ausgewerteten Fläche, da die unterschiedliche Astrozytenmorphologie zwischen den Gruppen hier einen Einfluss auf die Auswertung hätte. Die unbehandelte Gruppe umfasste 33 Zellen (n = 33), die behandelte Gruppe 30 Zellen (n = 30). Der Unterschied der mittleren Fluoreszenz zwischen den Gruppen wurde mit einem zweiseiteigen t-Test für unverbundene Stichproben ausgewertet. Hier ergab sich ein signifikanter Unterschied (p < 0,001).





Abbildung 10 Ergebnisse der CSPG/ GFAP Färbung in NCAM^{-/-} Tieren: In der oben gezeigten Abbildung befinden sich die GFAP Färbungen jeweils links, Die CSPG Färbungen in der Mitte und eine Überlagerung gemeinsam mit DAPI rechts. Die Moosfaserläsion ist jeweils mit einer gestrichelten weißen Linie eingezeichnet.

A. 10fach Übersichtsaufnahme der GFAP-Färbung einer hippocampalen Schnittkultur von NCAM knockout Tieren nach Moosfaserläsion, 21 Tage nach Läsion (DAL 21) ohne Behandlung, die Moosfaserläsion ist mit einer weißen gestrichelten Linie gekennzeichnet. Astrozyten sind in der gesamten Kultur zahlreich, es ist eine Astrozytenansammlung periläsionär zu finden. B. CSPG Färbung, der Maßstab unten rechts entsprechend 100µm. C. Überlagerung der Bilder A und B gemeinsam mit DAPI. D. 20fache Vergrößerung derselben Kultur in der GFAP Färbung. Die Astrozyten zeigen lange Fortsätze. E. CSPG-Färbung, der Maßstab unten rechts entsprechend 100µm. Es ist keine zelluläre CSPG Anreicherung oder periläsionäre Anreicherung zu finden. F. Überlagerung aus D. Die Astrozyten zeigen lange verzweigte Fortsätze in der GFAP Färbung. H. Auch in der höheren Vergrößerung ist keine zelluläre CSPG Anreicherung erkennbar, der Maßstab unten rechts entsprechend 10µm. I. Zusammenlegung der Bilder G und H. Es findet sich keine Kolokalisation in NCAM knockout Schnittkulturen nach Moosfaserläsion ohne Behandlung.

J. 20fache Übersichtsaufnahme der GFAP Färbung einer hippocampalen Schnittkultur von NCAM knockout Tieren 21 Tage nach Moosfaserläsion (DAL 21) mit Behandlung mit ManNProp. Die Astrozyten sind in der gesamten Kultur zahlreich und zahlreich in der Läsion zu finden. K. In der CSPG-Färbung findet sich kein eindeutiges zelluläres oder periläsionäres Signal. Der Maßstab unten rechts entspricht 100µm. L. Überlagerung der Bilder J und K gemeinsam mit DAPI M. Vergrößerung der GFAP Färbung, die Astrozyten weisen lange, verzweigte Fortsätze auf. N. Auch in der Vergrößerung der CSPG-Färbung ist kein eindeutiges zelluläres oder periläsionäres Signal nachweisbar. Der Maßstab unten rechts entsprechend 100µm. O. Zusammenlegung der Bilder M und N. Eine Kolokalisation kommt nicht zur Darstellung. P. 63fache Vergrößerung lange, verzweigte Fortsätze. Q. In der CSPG-Färbung kommt auch in hoher Vergrößerung kein eindeutiges zelluläres Signal zur Darstellung. Der Maßstab unten rechts entspricht 10µm. R. Zusammenlegung der Bilder P und Q. Es lässt sich keine Kolokalisation von CSPG und GFAP nach Behandlung mit ManNProp in NCAM knockout Schnittkulturen nachweisen.

4.4 ManNProp als Einflussfaktor auf Plastizität nach Moosfaserläsion

Als nächstes wurden die Schnittkulturen, die nach demselben Schema behandelt wurden, mittels PSA-NCAM und GFAP als Astrozytenmarker gefärbt, PSA-NCAM ist mit Plastizität nach Läsion assoziiert (Hildebrandt, Muhlenhoff et al. 2010). In den hier dargestellten Ergebnissen wurde die Kolokalisation von PSA-NCAM mit GFAP untersucht. Des Weiteren wurde die Astrozytenmorphologie beobachtet. Die Astrozytensomata wurden mit DAPI im Zellkern markiert.

In der Kontrollgruppe erschien die PSA-NCAM Färbung granulär und nicht fest an einzelne Strukturen gebunden. Außerhalb der eigentlichen Läsion stellte sich die PSA-NCAM Färbung schwach dar, innerhalb der Läsion und proximal im Gyrus dentatus zeigte sich jedoch ein starkes Signal. Die GFAP-gefärbten Astrozyten zeigten eine deutliche Akkumulation in der Läsion und hatten eine kondensierte Form mit kurzen, wenig verzweigten Fortsätzen. Eine Kolokalisation von GFAP und PSA-NCAM war punktförmig an einzelnen Stellen im Bereich der Zellmembran nachweisbar.

In der behandelten Gruppe zeigte die PSA-NCAM Färbung eine deutliche Anreicherung entlang der Astrozytenfortsätze. Proximal der Läsion im Gyrus dentatus war eine starke PSA-NCAM Färbung nachweisbar. Außerhalb der Läsion und des Gyrus dentatus fand sich nur wenig PSA-NCAM. Die Astrozyten waren, wie in der unbehandelten Gruppe, zahlreich in der Läsion zu finden, hatten jedoch längere und verzweigtere Fortsätze. Es fand sich eine Kolokalisation von GFAP und PSA-NCAM vor allem in den Fortsätzen der Astrozyten. Proximal der Läsion im Bereich des Gyrus dentatus war diese Kolokalisation stärker ausgeprägt.

Eine Kolokalisation von GFAP und PSA-NCAM ist in Läsionsversuchen als Marker für reaktive Astrozyten vorbeschrieben (Nomura, Yabe et al. 2000). In beiden Gruppen ist diese Kolokalisation, die mit Plastizität assoziiert wird, zu finden. In diesem Versuch fiel auf, dass die Expression von CSPG in lädierten Kulturen unter Kontrollbedingungen zwar vorhanden, jedoch nicht stark ausgeprägt war. Nach Behandlung mit ManNProp kam es jedoch zu einer ausgeprägten starken Expression von PSA-NCAM in astrozytären Strukturen. Dies kann als Hinweis auf eine Begünstigung der Plastizität nach Behandlung mit ManNProp gewertet werden.





Abbildung 11 ManNProp als Einflussfaktor auf Plastizität nach Moosfaserläsion dargestellt anhand von der PSA-NCAM/GFAP Färbung: In der Abbildung befinden sich die GFAP Färbungen jeweils links (A, D, G, J und M), die PSA-NCAM Färbungen in der Mitte (B, E, H, K und N) und die Überlagerung beider Färbungen gemeinsam mit DAPI rechts (C, F, I, L und O). Die Moosfaserläsion ist jeweils als weiße gestrichelte Linie eingezeichnet.

A. Es ist eine 20fache Vergrößerung einer organotypischen hippocampalen Schnittkultur 21 Tage nach Moosfaserläsion (DAL 21) ohne Behandlung gezeigt. In der Färbung gegen GFAP zeigen sich die Astrozyten zahlreich und im Läsionsbereich kondensiert. Sie weisen kurze Fortsätze auf. Der Maßstab unten rechts entspricht 100µm. **B.** In der Färbung gegen PSA-NCAM zeigt sich eine deutliche Färbung innerhalb der Läsion und im Gyurs dentatus. Innerhalb der Läsion mutet die Färbung granulär an (Markierung mit blauen Pfeilen). **C.** Zusammenlegung der Bilder A und B gemeinsam mit DAPI. **D.** Vergrößerung aus A im Bereich des Gyrus dentatus. Die Astrozyten sind zahlreich und weisen kurze Fortsätze auf. Der Maßstab unten rechts entsprechend 10µm. **E.** In der PSA-NCAM Färbung findet sich in diesem Bereich ein starkes Signal, das nicht sicher einzelnen Strukturen zugeordnet werden kann. **F.** Zusammenlegung der Bilder D und E gemeinsam mit DAPI. Es findet sich eine punktförmige Kolokalisation an einzelnen Astrozyten. **G.** 63fache Vergrößerung von Astrozyten aus dem periläsionären Bereich. In der GFAP-Färbung zeigen sich kurze wenig verzweigte Fortsätze. Der Maßstab unten rechts entspricht 10µm. **H.** In der Färbung gegen PSA-NCAM zeigt sich ein granulär anmutendes Signal im Bereich der Läsion. Es sind keine zellulären Strukturen sicher abgrenzbar. **I.** Zusammenlegung der Bilder G und H. Es findet sich eine punktförmige Kolokalisation von CSPG und GFAP (Markierung mit gelben Pfeilen). Die Kolokalisation ist nur in einzelnen Zellen zu finden.

J. Es ist eine 20fache Vergrößerung einer hippocampalen Schnittkultur 21 Tage nach Moosfaserläsion (DAL 21) nach Behandlung mit ManNProp gezeigt. Der Maßstab unten rechts entsprechend 100µm. In der Färbung gegen GFAP zeigt sich eine Akkumulation von Astrozyten in der Läsion. K. In der PSA-NCAM Färbung sind bereits in der Übersicht zelluläre Strukturen abgrenzbar. L. In der Zusammenlegung der Bilder J und K ist eine deutliche Kolokalisation von GFAP und PSA-NCAM nachweisbar. M. 63fache Vergrößerung von Astrozyten im Bereich der Läsion. Der Maßstab unten rechts entspricht 10µm. N. In der PSA-NCAM Färbung ist bereits eine zelluläre Anreicherung abgrenzbar. O. In der Zusammenlegung der Bilder M und N ist eine deutliche Kolokalisation von GFAP und PSA-NCAM vor allem im Bereich der Astrozytenfortsätze nachweisbar (Markierung mit gelben Pfeilen).

4.5 Einfluss von ManNProp auf die Aktivierung von NG2-positiven Zellen nach Moosfaserläsion

Nun schloss sich eine Untersuchung der Färbung von NG2 und CSPG an. Bei NG2 handelt es sich um ein Mitglied der CSPG-Familie. Bei NG2 handelt es sich um einen Liganden von PTPR σ mit inhibitorischer Wirkung (Silver and Silver 2014), somit hat NG2 eine inhibitorische Wirkung innerhalb der Glianarbe und hat eine repulsive Wirkung auf einwachsende Axone. NG2-positive Zellen sind Gliazellen, die sich in Oligodendrozyten oder Astrozyten weiter ausdifferenzieren können (Nishiyama, Suzuki et al. 2014). Sie teilen keine Antigene mit reifen Astrozyten, Oligodendrozyten

oder Mikroglia (Bu, Akhtar et al. 2001). In der Auswertung der NG2/CSPG Färbung wurden drei Gruppen auf Zellmorphologie und Zellverteilung begutachtet. Die Kulturen der ersten Gruppe dienten als Kontrolle, sie wurden nicht lädiert und nicht behandelt. Die Kulturen der zweiten Gruppe dagegen wurden wie oben beschrieben lädiert, erhielten jedoch keine Behandlung. Die Kulturen der dritten Gruppe wurden ebenfalls der Moosfaserläsion unterzogen und erhielten die Behandlung mit ManNProp. In allen drei Gruppen konnte eine schwache Kolokalisation von NG2 und CSPG nachgewiesen werden. Jedoch waren im umliegenden Gewebe Zellen auszumachen, die eine stärkere CSPG-Färbung aufwiesen, hier wurden demnach Zellen reich an anderen CSPGs nachgewiesen. Die Kolokalisation unterschied sich nicht zwischen den Gruppen. Vielmehr unterschieden sich die Gruppen morphologisch.

In den unlädierten Kulturen war die NG2 Färbung schwach ausgeprägt und um den Zellkern konzentriert. Zellfortsätze waren kurz und wenig ausgeprägt. Die Zellen befanden sich in Gruppen vor allem im äußeren Gyrus Dentatus, insbesondere in der hippocampalen Fissur.

In den lädierten und unbehandelten Kulturen war die NG2 Färbung in den positiven Zellen deutlich stärker ausgeprägt. Die NG2-positiven Zellen waren vereinzelter und deutlich größer. Die Färbung brachte weitläufige, vielfach verzweigte Fortsätze zur Darstellung. Die NG2-positiven Zellen hatten ihre Lokalisation in der hippocampalen Fissur verlassen und befanden sich in der unbehandelten Gruppe im gesamten Gyrus Dentatus und auch in der Läsion. Hier wurde eine sogenannte Aktivierungsreaktion der NG2 Zellen nach Läsion beobachtet.

In den lädierten und behandelten Kulturen war die Färbung vergleichbar zu den unbehandelten Kulturen. Die NG2-positiven Zellen erschienen größer und verzweigter als in der unlädierten Gruppe. Die Fortsätze, die in der Färbung zur Darstellung kamen, erschienen kürzer, kondensierter und deutlich weniger verzweigt als in der unbehandelten Gruppe. Die Zellen fanden sich vereinzelt in der Läsion und im Gyrus Dentatus. Diese Ergebnisse weisen auf eine weiterhin vorhandene Aktivierung der Zellen hin, da die Zellen in die Läsion migrierten und lange verzweigte Fortsätze ausbildeten. Die geringere Anzahl an NG2-positiven Zellen in der Läsion sowie die im Vergleich zu den unbehandelten Kulturen kürzeren Fortsätze, deuten auf eine weniger stark ausgeprägte Aktivierung der NG2-positiven Zellen nach Behandlung mit ManNProp hin.







Abbildung 12 Einfluss von ManNProp auf die Aktivierung von NG2-positiven Zellen nach Moosfaserläsion anhand der NG2/CSPG Färbung: In der Abbildung befindet sich die NG2 Färbung jeweils links, die CSPG Färbung in der Mitte und die Überlagerung beider Färbungen gemeinsam mit DAPI zur Markierung der Zellkerne rechts. Die Moosfaserläsion wurde, wo sichtbar, mittels einer gestrichelten weißen Linie dargestellt.

A. 10fache Übersichtsaufnahme einer organotypischen hippocampalen Schnittkultur ohne Läsion und ohne Behandlung, die sich insgesamt 28 Tage in Kultur befand (DIV 28). Der Maßstab unten rechts entspricht 10µm. In der Färbung gegen NG2 lassen sich vor allem im Bereich der hippocampalen Fissur rundliche Zellen abgrenzen, die dicht beieinander liegen. In der restlichen Kultur sind vereinzelt NG2-positive Zellen zu finden. B. In der CSPG-Färbung ohne Läsion zeigt sich eine gleichmäßige CSPG-Expression, mit einer leichten Signalanhebung im Bereich des Gyrus dentatus. C. Zusammenlegung der Bilder A und B. D. 63fache Vergrößerung aus dem Bereich der hippocampalen Fissur. Der Maßstab unten rechts entspricht 10µm. Die NG2-positiven Zellen weisen ein rundliches Soma mit feinen kurzen Fortsätzen auf. E. In der CSPG Färbung ist kein klares zelluläres Signal nachweisbar. F. In der Zusammenlegung der Bilder D und E findet sich keine Kolokalisation von NG2 und CSPG.
G. Detailvergrößerung aus D. Der Maßstab unten rechts entspricht 10µm. Die NG2-positiven Zellen sind rundlich mit zarten Fortsätzen. H. In der CSPG-Färbung zeigt sich ein gleichmäßiges, schwaches Signal ohne eindeutige zelluläre Anreicherung. I. In der Überlagerung von G und H lässt sich keine Kolokalisation von NG2 und CSPG nachweisen.

J. 20-fache Übersichtsaufnahme einer organotypischen hippocampalen Schnittkultur 21 Tage nach Moosfaserläsion (DAL 21) ohne Behandlung. Der Maßstab unten rechts entspricht 100µm, die Moosfaserläsion ist mittels gestrichelter weißer Linie eingezeichnet. In der Färbung gegen NG2 zeigen sich große Zellen mit vielfach verzweigten Fortsätzen, die im periläsionären Bereich und im Gyrus dentatus verteilt liegen. Sie scheinen sich keiner einzelnen Zellschicht zuzuordnen. K. In der CSPG-Färbung ist eine deutliche Signalanhebung im Gyrus dentatus erkennbar. L. Zusammenlegung der Bilder J und K. M. 63fache Vergrößerung von NG2positiven Zellen nach Moosfaserläsion ohne Behandlung. Die Zellen sind groß und haben vielfach verzweigte Fortsätze. Der Maßstab unten rechts entspricht 10µm. N. In der CSPG Färbung zeigen sich einzelne Zellen mit einer Mehranreicherung. O. Zusammenlegung der Bilder M und N. P. Detailvergrößerung von NG2 positiven Zellen nach Moosfaserläsion ohne Behandlung. Der Maßstab unten rechts entspricht 10µm. Q. Die CSPG Färbung zeigt Mehranreicherungen die zum Teil Zellen zugeordnet werden können (Markierung mit weißen Pfeilen). R. Überlagerung der Bilder P und Q gemeinsam mit DAPI. Hier zeigt sich eine Kolokalisation von NG2 und CSPG (gelbe Pfeile). Es scheinen auch andere Zellen CSPG zu exprimieren, die nicht NG2-positiv sind.

S. 20fache Übersichtsaufnahme einer organotypischen hippocampalen Schnittkultur 21 Tag nach Moosfaserläsion (DAL21), die mit ManNProp behandelt wurde. Der Maßstab unten rechts entspricht 100µm. Es zeigen sich NG2-positive Zellen innerhalb der Moosfaserläsion und periläsionär sowie im Gyrus dentatus. T. In der Färbung gegen CSPG ist eine leichte Signalanhebung im Bereich der Läsion und im Gyrus dentatus zu sehen. U. Zusammenlegung der Bilder S und T gemeinsam mit DAPI. V. 63fache Vergrößerung von NG2-positiven Zellen nach Moosfaserläsion mit Behandlung mit ManNProp, der Maßstab unten rechts entspricht 10µm. Die Zellen sind groß und haben verzweigte Fortsätze, erscheinen jedoch kleiner als die Zellen der lädierten, unbehandelten Gruppe (siehe Abbildung M). W. In der Färbung gegen CSPG lassen sich dezente Mehranreicherungen abgrenzen (weiße Pfeile). X. In der Zusammenlegung der Bilder V und W lässt sich eine schwache Kolokalisation von CSPG und NG2 nachweisen (gelbe Pfeile). Y. Detailvergrößerung von NG2-positven Zellen nach Moosfaserläsion und Behandlung mit ManNProp. Der Maßstab unten rechts entsprechend 10µm. Z. Färbung gegen CSPG mit einzelner Mehranreicherung am unteren linken Bildrand (weißer Pfeil). Z[•]. Zusammenlegung der Bilder Y und Z gemeinsam mit DAPI. Im Bereich der CSPG-Mehranreicherung ist eine Kolokalisation NG2 und CSPG deutlich nachweisbar.

4.6 Einfluss von ManNProp auf das Auswachsen von Moosfasern nach Läsion

Das Auswachsen der Neurite nach Moosfaserläsion mit und ohne Behandlung mit ManNProp wurde mittels antegradem Biocytin Tracing dargestellt. Dier hier gezeigten Daten wurden freundlicherweise von Prof. Dr. med. Johannes Vogt zur Verfügung gestellt. Im Sinne des Tierschutzes wurde auf eine Versuchswiederholung und den Verbrauch einer großen Anzahl an Versuchstieren verzichtet.

Es zeigte sich ein vermehrtes Auswachsen von Neuriten über die Läsion hinaus nach Behandlung mit ManNProp. Das vermehrte Auswachsen von Neuriten über die Läsion hinaus ist ein Hinweis auf eine weniger stark ausgeprägte Glianarbe nach der Behandlung mit ManNProp.



Abbildung 13 Einfluss von ManNProp auf das Auswachsen von Moosfasern nach Läsion dargestellt mittels antegradem Biocytin Tracing: Die oben gezeigten Abbildungen zeigen die Ergebnisse des antegraden Biocytin Tracings (überlassen von Prof. Dr. med. Johannes Vogt). In a ist die Kontrollgruppe dargestellt, hier wird die Läsion kaum überschritten. In b ist die mit ManNProp behandelte Gruppe abgebildet. Die mit Biocytin markierten Fortsätze überschreiten die Läsion deutlich sichtbar. In der statistischen Auswertung in c wird eine signifikant höhere Moosfaserdichte in der behandelten Gruppe dargestellt.

5. Diskussion

Organotypische hippocampale Schnittkulturen eignen sich durch ihren einfachen Aufbau gut, um Neurone und Glia und ihr Zusammenspiel zu untersuchen. In der Schnittkultur bleibt die charakteristische Schichtung des Hippocampus weitgehend erhalten und hiermit auch die neuronalen Netzwerke innerhalb des Hippocampus. Erregung und Erregungsweiterleitung sind als integraler Bestandteil des zentralen Nervensystems weiterhin gegeben. Somit kommen organotypische hippocampale Schnittkulturen der in-vivo-Situation sehr nahe (Gahwiler 1981, Gahwiler 1984).

In der hier dargestellten Arbeit wurden unterschiedliche Versuche an Schnittkulturen durchgeführt. Zunächst wurde ein 2-Photonen Live Imaging Set-Up etabliert mit dem Ziel, Veränderungen der dendritischen Spines von Körnerzellen nach Moosfaserläsion und Läsion des entorhinalen Tractus perforans (perforant path) zu untersuchen. Hierbei konnte die Durchführbarkeit des wiederholten Imaging derselben Neurite derselben Zelle bewiesen werden. Essenziell für diese Versuche sind Tiere, die in nur wenigen Zellen GFP exprimieren, sodass einzelne Zellen voneinander und vor einem dunklen Hintergrund abgrenzbar sind. Bei den Tieren der hiesigen Einrichtung kam es zu einer flächigen GFP Expression, die am ehesten auf eine inkonstante Expression des Thy 1 Promotors zurückzuführen war, sodass die Versuchsreihe verlassen wurde. 2-Photonen Live Imaging an organotypischen hippocampalen Schnittkulturen sind an akuten Schnittkulturen beschrieben (Axmacher, Winterer et al. 2004), also an frisch präparierten Schnitten, die zu einem Zeitpunkt mikroskopiert werden. Des Weiteren existieren Versuche mit organotypischen hippocampalen Schnittkulturen, die über längere Zeit kultiviert wurden und dann an einem einzelnen Zeitpunkt mikroskopiert wurden (Rose, Schoenenberger et al. 2013). Das hier dargestellte Experiment grenzt sich durch die wiederholten Bildgebungen von den Vordaten ab. Ähnliche Experimente mit wiederholter Bildgebung an organotypischen hippocampalen Schnittkulturen sind in der Vergangenheit von Müller und Vlachos vorgestellt worden (Müller, Vlachos et al. 2010). In diesem Fall wurde den Schnittkulturen eine enthorhinale Kortex Läsion zugefügt und im Verlauf an zwei Zeitpunkten Bildgebungen durchgeführt. In einem weiteren Experiment stellte die Arbeitsgruppe ein Experiment mit wiederholten Bildgebungen an viral transfizierten Zellen vor (Radic, Jungenitz et al. 2017).

Um eine adäquate Alternative für Langzeit Live Imaging Experimente zu finden, wurden In-Utero Elektroporationen von Körnerzellen durchgeführt. Die Elektroporation

von Körnerzellen stellte sich als besonders herausfordernd dar, da diese früher entstehen und so eine sehr frühe Elektroporation der hippocampalen Anlage am embryonalen Entwicklungstag 14 notwendig war. Hierdurch war die Anzahl erfolgreicher Elektroporationen deutlich eingeschränkt.

Ein weiterer Aspekt, der als Unterschied zwischen den GFP-exprimierenden Tieren und den elektroporierten Tieren zu bemerken ist, waren die großen Veränderungen an den sichtbaren Zellen. In den Schnittkulturen von GFP-exprimierenden Tieren wurden dieselben Zellen bei jedem Imaging dargestellt, die Zellfortsätze waren lang und weit verzweigt, das Auswachsen diese Fortsätze wurde nicht beobachtet. Dies wird durch das relativ späte Einschalten des Thy 1 Promotors bewirkt, hierdurch können nur adulte Zellen mit einem fertig ausgebildeten Dendritenbaum dargestellt werden. Diese Zellen haben einen hohen Wiedererkennungswert und eine einmal ausgewählte Region kann hierdurch immer wieder aufgesucht werden. Im Gegensatz dazu zeigten sich große Veränderungen von Imaging zu Imaging in den Schnittkulturen von In-Utero elektroporierten Tieren. Die transfizierten Zellen exprimieren GFP in allen Entwicklungsstadien und sind in ihrer Entwicklung großen Veränderungen unterworfen. Hierdurch kann das Auswachsen von Neuriten beobachtet werden, jedoch änderte sich das Erscheinungsbild der Kulturen durch fortschreitende Maturation innerhalb weniger Tage. Ein weiterer erschwerender Faktor besteht darin, dass maturierende Zellen häufig apoptotisch werden und absterben. Die Orientierung in der Schnittkultur wird dadurch zusätzlich erschwert. Durch die großen Veränderungen, die diese Zellen unterliefen, gestaltete es sich schwierig, eine Zelle für das wiederholte Imaging auszuwählen, da keine Vorhersage über das Aussehen der Schnittkulturen zum nächsten Imaging Zeitpunkt getroffen werden konnte. In Zusammenschau dieser technischen Schwierigkeiten mit der sehr anspruchsvollen Technik der In-Utero Elektroporation, wurde dieses Experiment wegen seiner geringen Ausbeute verwertbarer Zellen verlassen. Gemäß der durchgeführten Literaturrecherche gibt es hierzu keine Vordaten. Zur erfolgreichen Implementierung in einen Versuchsaufbau sollten Maßnahmen zur Optimierung der Ausbeute erwogen werden. Insgesamt erscheint der Versuchsaufbau vorstellbar zur Beobachtung von Auswachsen von Neuriten in der organotypischen hippocampalen Schnittkultur.

Parallel zu der Etablierung des Langzeit Live Imaging am 2-Photonen Mikroskop wurde die organotypische hippocampale Schnittkultur zur Untersuchung der Glianarbe und der Modulation von PSA-NCAM genutzt. Hierzu wurde ebenfalls die

Moosfaserläsion als gut reproduzierbare Läsion gewählt. Im Gegensatz zu den Live Imaging Experimenten wurden diese Versuche an Wildtyp Tieren und NCAM knockout Tieren durchgeführt. Die Schnittkulturen wurden hierzu nach oben genanntem Protokoll fixiert und histologisch aufgearbeitet. So konnte die Glianarbe und ManNProp als Einflussfaktor auf diese untersucht werden.

Nach Läsion im zentralen Nervensystem kommt es zu einer glialen Vernarbung (Fawcett and Asher 1999) mit Einwandern unterschiedlicher Gliazellen in die Läsion. Nach Behandlung mit ManNProp konnten sowohl Astrozyten als auch NG2-positive Zellen in erhöhter Anzahl in der Läsion nachgewiesen werden. Demnach verhindert ManNProp die Zellmigration nicht oder nicht in einem Ausmaß, das mit diesem Versuchsaufbau nachweisbar ist. Die Zellmorphologie sowohl der Astrozyten als auch der NG2-positiven Zellen unterschied sich jedoch deutlich von den unbehandelten Kulturen. Während die Astrozyten in der unbehandelten Gruppe, wie bereits in der Vergangenheit vorbeschrieben (Panickar and Norenberg 2005), kondensiert erschienen und nur kurze wenig verzweigte Fortsätze aufwiesen, hatten die Astrozyten in der behandelten Gruppe längere und stärker verzweigte Fortsätze, wiesen also eine höhere Ramifikation auf. Dies ähnelte den Astrozyten, die nicht mit der Läsion assoziiert, also nicht aktiviert waren. In den unbehandelten Kulturen war der morphologische Unterschied zwischen Astrozyten in der Läsion, nahe der Läsion und fernab der Läsion immens und deutlich sichtbar. Im periläsionären Bereich wiesen die Astrozyten kurze, kondensierte Fortsätze auf, während sie weiter entfernt von der Läsion lange, verzweigte Fortsätze hatten. In den mit ManNProp behandelten Kulturen war dieser Unterschied weniger stark ausgeprägt. Hier zeigten auch die Astrozyten innerhalb der Läsion lange verzweigte Fortsätze. Dieser morphologische Unterschied spricht für eine geringer ausgeprägte Aktivierung der Astrozyten nach Behandlung mit ManNProp.

Bei der Färbung von PSA-NCAM fiel in beiden Gruppen eine erhöhte Expression in der Läsion auf. Eine erhöhte Expression von PSA-NCAM ist mit Plastizität assoziiert und wird vor allem im embryonalen Gehirn und in Läsionen vorgefunden (Chuong and Edelman 1984, Hildebrandt and Dityatev 2015). In der behandelten Gruppe war die Expression von PSA-NCAM ausgeprägter und eher filamentär. Sie zeigte außerdem eine Kolokalisation mit den mittels GFAP gefärbten Astrozyten. Eine erhöhte PSA-NCAM Expression war in Vorstudien in Regionen erhöhter Plastizität zu finden

(Hildebrandt, Muhlenhoff et al. 2010). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Behandlung mit ManNProp Plastizität begünstigt.

Die NG2-positiven Zellen wurden im Gegensatz zu den Astrozyten auch im unlädierten Zustand untersucht. Die Entscheidung hierzu fiel aufgrund von vorangegangenen Untersuchungen, die sehr unterschiedliche Aktivierungsstadien dieser Zellen zeigten (Levine 1994). Es erfolgte also ein Vergleich sowohl zwischen den unlädierten Kulturen, den lädierten und unbehandelten Kulturen und den mit ManNProp behandelten Kulturen. In der unlädierten Gruppe waren die NG2-positiven Zellen vor allem im Gyrus dentatus und der hippocampalen Fissur zu finden. Die NG2 Expression war gering und die Zellen waren klein und rundlich und lagen dicht beieinander. Zellfortsätze kamen nur in Form zarter kleiner Filamente zur Darstellung. Dagegen zeigte sich ein deutlich anderes Bild in den lädierten Kulturen, die keine Behandlung erhielten. Hier fanden sich große NG2-positive Zellen in der Läsion und im Gyrus dentatus mit ausgedehnten, vielfach verzweigten Fortsätzen. Die NG2 Expression war sehr kräftig und die Zellen nahmen einen großen Raum in allen drei Dimensionen der Läsion ein. Dies ist vereinbar mit vorangegangenen Untersuchungen (Levine 1994, Levine and Reynolds 1999). Auch in der mit ManNProp behandelten Gruppe fanden sich NG2-positive Zellen in der Läsion, eine Migration wurde also nicht komplett verhindert, sie erschienen jedoch weniger zahlreich. Auffälliger waren die morphologischen Unterschiede. In den unlädierten und unbehandelten Kulturen wiesen die Zellen zarte, kurze Fortsätze auf. In den lädierten unbehandelten Kulturen zeigten sich lange, vielfach verzweigte Fortsätze, die sich über alle drei Dimensionen erstreckten. Die lädierten und behandelten Kulturen zeigten Fortsätze, jedoch waren diese im Vergleich zu den lädierten und unbehandelten Kulturen kürzer, plumber und weniger stark verzweigt. Diese Unterschiede können als Hinweis auf eine geringere Aktivierung der NG2-positiven Zellen gedeutet werden.

Neben der Zellmorphologie der Glia wurden CSPGs als Proteine der extrazellulären Matrix untersucht. Die Hochregulation von CSPGs ist sowohl in Läsionen des zentralen Nervensystems als auch im embryonalen Gehirn beschrieben (Silver and Silver 2014). Dem entsprechend beobachteten wir eine deutliche CSPG Färbung in den unbehandelten Kulturen. Auffällig war hier eine deutliche Kolokalisation mit GFAP also mit Astrozyten. Bereits die reine CSPG Färbung mutete filamentär an, in der Überlagerung beider Färbungen zeigte sich dann eine deutliche Kolokalisation, vor allem in den Fortsätzen der Astrozyten. Diese Kolokalisation lag nicht nur in der

Moosfaserläsion und ihrer direkten Umgebung vor, sondern war auch fernab der Läsion als Ferneffekt oder remote effect zu verzeichnen. Die weiter entfernt liegenden Zellen zeigten keine morphologischen Veränderungen, was auf eine weniger stark ausgeprägte Aktivierung bei gleichzeitig durch die Läsion veränderte Expression hinweist. Eine Sekretion von CSPG durch aktivierte Astrozyten ist in der Vergangenheit beschrieben worden, sodass sich die hier gezeigten Ergebnisse mit den Vorstudien einreihen (Wang, Katagiri et al. 2008). In der mit ManNProp behandelten Gruppe war diese Kolokalisation von CSPG und GFAP nicht zu beobachten, weder in oder nahe der Moosfaserläsion noch weiter entfernt. Da trotz allem CSPG vorzufinden war, scheinen die Astrozyten nicht die einzige CSPGproduzierende Zellpopulation zu sein. Die Interaktion weiterer Zellpopulationen und Signaltransduktionswege sollte zum Erreichen eines Gesamtverständnisses der Glianarbe weiter untersucht werden.

Als Proteine der extrazellulären Matrix waren die CSPGs nicht nur zellgebunden zu finden. Insgesamt erschien die CSPG Färbung in den unbehandelten Kulturen proximal der Läsion im Gyrus dentatus kräftiger. Eine Fluoreszenzdichtemessung bestätigte diesen visuellen Eindruck, was vereinbar mit der vorbeschriebenen CSPG Hochregulation in der Läsion ist (Silver and Silver 2014). Limitationen dieser Fluoreszenzdichtemessung bestehen darin, dass auch im Normalzustand CSPGs vorliegen, somit entsteht ein nicht zu vernachlässigendes Hintergrundrauschen, vor dem Unterschiede teilweise verschwimmen können. Ein signifikanter Unterschied konnte hierdurch nicht gezeigt werden. Des Weiteren ist die relativ kleine Fallzahl (Kontrolle n=11, behandelt n=14) zu beachten. Dies hat mehrere Gründe. Zum einen kann ein Schnitt nur einmal mit einem Konfokalen Mikroskop für eine solche Untersuchung fotografiert werden, da es hierdurch bereits zu erheblichem Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs kommt. Entsprechend können die Kolokalisation und die Fluoreszenzdichtemessung, die jeweils unterschiedliche Vergrößerungen benötigen, nicht am selben Schnitt durchgeführt werden. Zum anderen ist für die Fluoreszenzdichtemessung immanent wichtig, dass es sich um einen komplett intakten Slice handelt, da einzelne kleinere Ausschnitte, nicht, wie bei anderen Techniken, ausreichen. Es wurde explizit darauf geachtet, dass bei jeder Präparation Schnittkulturen in die Kontrollgruppe und in die behandelte Gruppe eingeführt wurden. Hierdurch wurde der Unterschied durch sich verändernde äußere Umstände minimiert. In Anbetracht der deutlichen CSPG Expression der Astrozyten der unbehandelten Kulturen erfolgte eine Messung der mittleren Fluoreszenz einzelner Astrozyten. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen behandelten und nicht behandelten Kulturen (p < 0,001). Das sezernierte CSPG wird in dieser Auswertung nicht mit betrachtet. Es ist zu beachten, dass es sich hier um die mittlere Fluoreszenz handelt, die im Gegensatz zur mittleren Fluoreszenzdichte nicht abhängig von der Fläche der Zellen ist. Bei der gezeigten unterschiedlichen Astrozytenmorphologie wäre die Fläche der gemessenen Zellen entsprechend ein Einflussfaktor auf die Auswertung, der hierdurch ausgeschlossen werden konnte. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen trotz der erwähnten Limitationen eine geringere CSPG Expression und insbesondere keine Kolokalisation in Astrozyten nach Behandlung mit ManNProp.

Zum Vergleich wurden dieselben Versuche an Schnittkulturen von NCAM k.o. Tieren durchgeführt. Hier zeigte sich eine insgesamt geringer ausgeprägte CSPG Expression, die sich zwischen Kontrollgruppe und behandelter Gruppe kaum unterschied. In den Schnittkulturen von WT Tieren war stets eine CSPG Hochregulation proximal der Läsion, also im Gyrus dentatus dargestellt worden. Diese war deutlich weniger ausgeprägt in der behandelten Gruppe als in den unbehandelten Kulturen. In den NCAM knock-out Tieren war keine CSPG Hochregulation darstellbar. Auch die Astrozytenmorphologie unterschied sich kaum zwischen den unbehandelten Kulturen und den behandelten Kulturen. In beiden Gruppen waren einige Astrozyten mit langen, verzweigten Fortsätzen in der Läsion zu finden. Diese Astrozyten wiesen keine CSPG-Hochregulation als auch die weniger ausgeprägte Astrozytenaktivierung auf eine geringer ausgeprägte Glianarbe in NCAM knock-out Tieren hin.

Die geringere CSPG Expression nach Behandlung mit ManNProp weist auf eine weniger stark ausgeprägte Vernarbung im Bereich der Läsion hin. In Kombination mit einer verminderten Aktivierung der Astrozyten und der NG2-positive Zellen spricht das für eine Inhibierung der glialen Vernarbung. Zusätzlich gibt die starke Kolokalisation von PSA-NCAM und GFAP einen Hinweis auf vermehrte Plastizität. Durch die Verminderung der inhibitorischen Eigenschaften der CSPGs kann somit ein Auswachsen von Neuriten gefördert werden. Eine Läsion im ZNS könnte demnach durch neues Auswachsen von Neuriten überbrückt werden. Als Limitation des Versuchsaufbaus ist zu erwähnen, dass es sich um einen Zellkulturversuch handelt, der der in-vivo Situation zwar nahekommt, jedoch bei weitem nicht die Komplexität des intakten ZNS widerspiegeln kann. So ist aktuell kein Verfahren etabliert, mit dem

ManNProp an eine konkrekte Stelle im ZNS transportiert wird. Durch stetige Weiterentwicklung im Bereich der Neurochirurgie und der interventionellen Neuroradiologie sind hier verschiedene Applikationswege denkbar (Amar, Larsen et al. 2005). In dem hier dargestellten Versuch wurde ManNProp durch den stetigen Mediumwechsel immer wieder neu zur Verfügung gestellt. Auch dieser Faktor ist in einer in vivo Anwendung zu berücksichtigen, da die Applikationsmethode, sei es chirurgisch oder interventionell, nicht stetig wiederholt werden kann. Entsprechend würde eine Depotapplikation für ManNProp benötigt.

In diesem Versuchsaufbau handelt es sich um eine sehr schmale Läsion. Läsionen im ZNS haben jedoch sehr unterschiedliche Ausmaße, sodass nicht vorherzusagen ist, ob die Behandlung mit ManNProp bei größeren, flächigeren Läsionen, wie sie zum Beispiel durch Ischämien entstehen, wirksam wäre. Auch ist aus der aktuellen Untersuchung nicht absehbar, was der zeitliche Rahmen ist, in dem die Behandlung mit ManNProp begonnen werden muss, um einen Effekt zu haben.

Der hier beschriebene Versuch beschäftigt sich mit der Seite des Liganden. Durch die Reduktion von CS-GAG in der Läsion sollte der inhibitorische Effekt der Verbindung von CS-GAG und PTPRs reduziert werden. Im speziellen wurde hier der Ansatz gewählt, die Produktion des Liganden CS-GAG zu reduzieren. Eine andere Herangehensweise an die gleiche Materie wurde von der Arbeitsgruppe um Jerry Silver gewählt. So erfolgte hier eine Modulation des Rezeptors, also von PTPRs und LAR (Lang, Cregg et al. 2015, Dyck, Kataria et al. 2018). Hierbei wurden zwei intrazelluläre Proteine entdeckt, das membran-permeable Intrazelluläre LAR Peptid (ILP) und das intrazelluläre Sigma Peptid (ISP), die LAR und PTPRs respektive von intrazellulär inhibieren. Axone konnten nach Hemmung der intrazellulären Signaltransduktion auch in einer CSPG-reichen extrazellulären Matrix auswachsen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch ISP die Protease Cathepsin B sezerniert wird, die CSPG in der extrazellulären Matrix abbaut (Tran, Sundar et al. 2018), somit also wieder einen Effekt auf den Liganden hat. Eine weitere Herangehensweise an das Thema der CSPG Hochregulation ist der Abbau des CSPG in der Läsion. Hierzu wurde in vielen Arbeiten zum einen das bakterielle Enzym Chondroitinase ABC zum anderen das Säugetierenzym Arylsulfatase B genutzt (McKeon, Höke et al. 1995, Yoo, Khaled et al. 2013). Durch die Reduktion von CSPG in der Läsion konnte ein Auswachsen von Neuriten in vitro und in vivo begünstigt werden (Wang, Katagiri et al. 2008, Yoo, Khaled et al. 2013).

Die positiven Ergebnisse dieser Studien mit gutem Neuritenauswachsen durch Inhibierung beziehungsweise Modulation der Interaktion von CS-GAG und PTPRs sowie der Reduktion der CSPG in der Läsion selbst lässt Rückschlüsse auf die hier präsentierten Ergebnisse zu. Es handelt sich um unterschiedliche Ansatzpunkte im selben Signaltransduktionsweg, somit kann angenommen werden, dass ähnliche Ergebnisse erzielt werden können. In der Vergangenheit wurde bereits angemerkt, dass eine Kombination der unterschiedlichen Ansatzpunkte als vielversprechend zur Entwicklung neuer Therapiekonzepte nach Verletzungen im ZNS zu sehen ist (Tran, Warren et al. 2018). Die hier gezeigten Ergebnisse der Therapie mit ManNProp könnten hierzu eine hilfreiche Ergänzung darstellen.

Zu beachten ist in der Diskussion um die Reduktion der Glianarbe deren physiologische Funktion. Sie bildet sowohl in der Akutphase der Läsion einen Schutz vor Exzitotoxizität und einer überschießenden Immunantwort als auch langfristig vor ungebremsten Neuritenauswachsen (Silver and Miller 2004, Sofroniew 2009). So kann ungehinderte Aussprossen von Neuriten nicht nur zu Funktionsverlust einer Verbindung, sondern auch zu fehlerhafter Vernetzung führen. Beispielhaft kann eine solche Fehlvernetzung bis zur posttraumatischen strukturellen Epilepsie führen (Ferguson, Smith et al. 2010). Es gilt also die positiven Aspekte der Glianarbe beizubehalten und die negativen so weit wie möglich zu reduzieren.

6. Zusammenfassung

Läsionen im ZNS können dramatische Ausmaße für die Betroffenen haben, sodass zahlreiche Studien sich mit diesem Thema beschäftigen. In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass die Glianarbe durch unterschiedliche Mechanismen einen inhibitorischen Effekt auf das erneute Auswachsen von Neuriten hat. In der hier präsentierten Untersuchung konnte gezeigt werden, dass ManNProp einen inhibitorischen Effekt auf die Ausbildung der glialen Narbe hat. Sowohl die morphologischen Unterschiede der Astrozyten und der NG2-positiven Zellen, als auch die reduzierte CSPG Hochregulation nach Behandlung mit ManNProp weisen auf eine weniger stark ausgeprägte Glianarbe hin. Es handelt sich dementsprechend um eine Inhibition der Inhibition, was auf begünstigtes Auswachsen von Neuriten hoffen lässt. Hinzu kommt eine erhöhte Expression von PSA-NCAM und sowie deutlich PSA-NCAM-positive

Zusammenfassend handelt es sich bei der Behandlung mit ManNProp um eine vielversprechende Möglichkeit, Läsionen im ZNS zu behandeln. Weitere Untersuchungen sollten durchgeführt werden, um die Anwendung in vivo mit den genannten Limitationen zu beleuchten.

7. Literaturverzeichnis

Amar, A. P., D. W. Larsen and G. P. Teitelbaum (2005). "Percutaneous spinal interventions." <u>Neurosurg Clin N Am</u> **16**(3): 561-568, vii.

Angata, K., J. M. Long, O. Bukalo, W. Lee, A. Dityatev, A. Wynshaw-Boris, M. Schachner, M. Fukuda and J. D. Marth (2004). "Sialyltransferase ST8Sia-II assembles a subset of polysialic acid that directs hippocampal axonal targeting and promotes fear behavior." J Biol Chem **279**(31): 32603-32613.

Atwal, J. K., B. Massie, F. D. Miller and D. R. Kaplan (2000). "The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and P13-kinase." <u>Neuron</u> **27**(2): 265-277.

Axmacher, N., J. Winterer, P. K. Stanton, A. Draguhn and W. Müller (2004). "Twophoton imaging of spontaneous vesicular release in acute brain slices and its modulation by presynaptic GABAA receptors." <u>Neuroimage</u> **22**(2): 1014-1021.

Bartlett, W. P. and G. A. Banker (1984). "An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. II. Synaptic relationships." <u>J Neurosci</u> **4**(8): 1954-1965.

Baumer, B. E., A. Kurz, S. C. Borrie, S. Sickinger, M. T. Dours-Zimmermann, D. R. Zimmermann and C. E. Bandtlow (2014). "Nogo receptor homolog NgR2 expressed in sensory DRG neurons controls epidermal innervation by interaction with Versican." J <u>Neurosci</u> **34**(5): 1633-1646.

Baumgart, J. and N. Grebe (2015). "C57BL/6-specific conditions for efficient in utero electroporation of the central nervous system." <u>J Neurosci Methods</u> **240**: 116-124.

Bechmann, I. and R. Nitsch (2000). "Involvement of non-neuronal cells in entorhinalhippocampal reorganization following lesions." <u>Ann N Y Acad Sci</u> **911**: 192-206.

Belov Kirdajova, D., J. Kriska, J. Tureckova and M. Anderova (2020). "Ischemia-Triggered Glutamate Excitotoxicity From the Perspective of Glial Cells." <u>Front Cell</u> <u>Neurosci</u> **14**: 51.

Brittis, P. A., D. R. Canning and J. Silver (1992). "Chondroitin sulfate as a regulator of neuronal patterning in the retina." <u>Science</u> **255**(5045): 733-736.

Bu, J., N. Akhtar and A. Nishiyama (2001). "Transient expression of the NG2 proteoglycan by a subpopulation of activated macrophages in an excitotoxic hippocampal lesion." <u>Glia</u> **34**(4): 296-310.

Buttner, B., C. Kannicht, C. Schmidt, K. Loster, W. Reutter, H. Y. Lee, S. Nohring and R. Horstkorte (2002). "Biochemical engineering of cell surface sialic acids stimulates axonal growth." <u>J Neurosci</u> **22**(20): 8869-8875.

Caroni, P. (1997). "Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice." <u>J Neurosci Methods</u> **71**(1): 3-9.

Chuong, C. M. and G. M. Edelman (1984). "Alterations in neural cell adhesion molecules during development of different regions of the nervous system." <u>J Neurosci</u> **4**(9): 2354-2368.

Cline, H. T. (2001). "Dendritic arbor development and synaptogenesis." <u>Curr Opin</u> <u>Neurobiol</u> **11**(1): 118-126.

Dailey, M. E. and S. J. Smith (1996). "The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices." <u>J Neurosci</u> **16**(9): 2983-2994.

David, S. and A. J. Aguayo (1981). "Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats." <u>Science</u> **214**(4523): 931-933.

Dawson, M. R., J. M. Levine and R. Reynolds (2000). "NG2-expressing cells in the central nervous system: are they oligodendroglial progenitors?" <u>J Neurosci Res</u> **61**(5): 471-479.
Deller, T., D. Del Turco, A. Rappert and I. Bechmann (2007). "Structural reorganization of the dentate gyrus following entorhinal denervation: species differences between rat and mouse." <u>Prog Brain Res</u> **163**: 501-528.

Deller, T. and M. Frotscher (1997). "Lesion-induced plasticity of central neurons: sprouting of single fibres in the rat hippocampus after unilateral entorhinal cortex lesion." <u>Prog Neurobiol</u> **53**(6): 687-727.

Dickendesher, T. L., K. T. Baldwin, Y. A. Mironova, Y. Koriyama, S. J. Raiker, K. L. Askew, A. Wood, C. G. Geoffroy, B. Zheng, C. D. Liepmann, Y. Katagiri, L. I. Benowitz, H. M. Geller and R. J. Giger (2012). "NgR1 and NgR3 are receptors for chondroitin sulfate proteoglycans." <u>Nat Neurosci</u> **15**(5): 703-712.

Dotti, C. G., C. A. Sullivan and G. A. Banker (1988). "The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture." <u>J Neurosci</u> **8**(4): 1454-1468.

Dyck, S., H. Kataria, A. Alizadeh, K. T. Santhosh, B. Lang, J. Silver and S. Karimi-Abdolrezaee (2018). "Perturbing chondroitin sulfate proteoglycan signaling through LAR and PTPo receptors promotes a beneficial inflammatory response following spinal cord injury." <u>J Neuroinflammation</u> **15**(1): 90.

Eckhardt, M., O. Bukalo, G. Chazal, L. Wang, C. Goridis, M. Schachner, R. Gerardy-Schahn, H. Cremer and A. Dityatev (2000). "Mice deficient in the polysialyltransferase ST8SiaIV/PST-1 allow discrimination of the roles of neural cell adhesion molecule protein and polysialic acid in neural development and synaptic plasticity." <u>J Neurosci</u> **20**(14): 5234-5244.

Eckhardt, M., M. Muhlenhoff, A. Bethe, J. Koopman, M. Frosch and R. Gerardy-Schahn (1995). "Molecular characterization of eukaryotic polysialyltransferase-1." <u>Nature</u> **373**(6516): 715-718.

Fawcett, J. W. and R. A. Asher (1999). "The glial scar and central nervous system repair." <u>Brain Res Bull</u> **49**(6): 377-391.

Ferguson, P. L., G. M. Smith, B. B. Wannamaker, D. J. Thurman, E. E. Pickelsimer and A. W. Selassie (2010). "A population-based study of risk of epilepsy after hospitalization for traumatic brain injury." <u>Epilepsia</u> **51**(5): 891-898.

Fitch, M. T. and J. Silver (1997). "Glial cell extracellular matrix: boundaries for axon growth in development and regeneration." <u>Cell Tissue Res</u> **290**(2): 379-384.

Fitzpatrick, M. (2014). "Measuring cell fluorescence using ImageJ." from https://theolb.readthedocs.io/en/latest/imaging/measuring-cell-fluorescence-using-imagei.html.

Forscher, P. and S. J. Smith (1988). "Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone." <u>J Cell Biol</u> **107**(4): 1505-1516.

Gahwiler, B. H. (1981). "Organotypic monolayer cultures of nervous tissue." <u>J Neurosci</u> <u>Methods</u> **4**(4): 329-342.

Gahwiler, B. H. (1984). "Development of the hippocampus in vitro: cell types, synapses and receptors." <u>Neuroscience</u> **11**(4): 751-760.

Galuska, S. P., I. Oltmann-Norden, H. Geyer, B. Weinhold, K. Kuchelmeister, H. Hildebrandt, R. Gerardy-Schahn, R. Geyer and M. Muhlenhoff (2006). "Polysialic acid profiles of mice expressing variant allelic combinations of the polysialyltransferases ST8SialI and ST8SiaIV." J Biol Chem **281**(42): 31605-31615.

Geraldo, S. and P. R. Gordon-Weeks (2009). "Cytoskeletal dynamics in growth-cone steering." <u>J Cell Sci</u> **122**(Pt 20): 3595-3604.

Gogolla, N., I. Galimberti, V. DePaola and P. Caroni (2006). "Preparation of organotypic hippocampal slice cultures for long-term live imaging." <u>Nat Protoc</u> **1**(3): 1165-1171.

Gomez, T. M. and N. C. Spitzer (2000). "Regulation of growth cone behavior by calcium: new dynamics to earlier perspectives." <u>J Neurobiol</u> **44**(2): 174-183.

Haas, C. A., U. Rauch, N. Thon, T. Merten and T. Deller (1999). "Entorhinal cortex lesion in adult rats induces the expression of the neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan in reactive astrocytes." <u>J Neurosci</u> **19**(22): 9953-9963.

Hall, A. (1994). "Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton." <u>Annu Rev Cell Biol</u> **10**: 31-54.

Harris, K. M. (1999). "Structure, development, and plasticity of dendritic spines." <u>Curr</u> <u>Opin Neurobiol</u> **9**(3): 343-348.

Hering, H. and M. Sheng (2001). "Dendritic spines: structure, dynamics and regulation." <u>Nat Rev Neurosci</u> **2**(12): 880-888.

Hildebrandt, H. and A. Dityatev (2015). "Polysialic Acid in Brain Development and Synaptic Plasticity." <u>Top Curr Chem</u> **366**: 55-96.

Hildebrandt, H., M. Muhlenhoff and R. Gerardy-Schahn (2010). "Polysialylation of NCAM." <u>Adv Exp Med Biol</u> 663: 95-109.

Hildebrandt, H., M. Muhlenhoff, B. Weinhold and R. Gerardy-Schahn (2007). "Dissecting polysialic acid and NCAM functions in brain development." <u>J Neurochem</u> **103 Suppl 1**: 56-64.

Hinsby, A. M., V. Berezin and E. Bock (2004). "Molecular mechanisms of NCAM function." <u>Front Biosci</u> **9**: 2227-2244.

Ishibashi, T., K. A. Dakin, B. Stevens, P. R. Lee, S. V. Kozlov, C. L. Stewart and R. D. Fields (2006). "Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses." <u>Neuron</u> **49**(6): 823-832.

Isomura, R., K. Kitajima and C. Sato (2011). "Structural and functional impairments of polysialic acid by a mutated polysialyltransferase found in schizophrenia." <u>J Biol Chem</u> **286**(24): 21535-21545.

Jones, L. L., Y. Yamaguchi, W. B. Stallcup and M. H. Tuszynski (2002). "NG2 is a major chondroitin sulfate proteoglycan produced after spinal cord injury and is expressed by macrophages and oligodendrocyte progenitors." <u>J Neurosci</u> **22**(7): 2792-2803.

Kater, S. B. and L. R. Mills (1991). "Regulation of growth cone behavior by calcium." <u>J</u> <u>Neurosci</u> **11**(4): 891-899.

Kojima, N., Y. Yoshida and S. Tsuji (1995). "A developmentally regulated member of the sialyltransferase family (ST8Sia II, STX) is a polysialic acid synthase." <u>FEBS Lett</u> **373**(2): 119-122.

Kontou, M., C. Bauer, W. Reutter and R. Horstkorte (2008). "Sialic acid metabolism is involved in the regulation of gene expression during neuronal differentiation of PC12 cells." <u>Glycoconj J</u> **25**(3): 237-244.

Kugler, P. (2004). Grundzüge der strukturellen Entwicklung. <u>Anatomie Band 2</u>. D. Benninghoff. München, Elsevier GmbH. **16:** 248-260.

Kugler, P. and D. Drenckhahn (2008). Nervengewebe. <u>Anatomie Band 1:</u> <u>Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie</u>. D. D. München, Urban & Fischer: 170-207.

Kuruvilla, R., H. Ye and D. D. Ginty (2000). "Spatially and functionally distinct roles of the PI3-K effector pathway during NGF signaling in sympathetic neurons." <u>Neuron</u> **27**(3): 499-512.

Lang, B. T., J. M. Cregg, M. A. DePaul, A. P. Tran, K. Xu, S. M. Dyck, K. M. Madalena, B. P. Brown, Y. L. Weng, S. Li, S. Karimi-Abdolrezaee, S. A. Busch, Y. Shen and J. Silver (2015). "Modulation of the proteoglycan receptor PTPσ promotes recovery after spinal cord injury." <u>Nature</u> **518**(7539): 404-408. Lemons, M. L., D. R. Howland and D. K. Anderson (1999). "Chondroitin sulfate proteoglycan immunoreactivity increases following spinal cord injury and transplantation." <u>Exp Neurol</u> **160**(1): 51-65.

Levine, J. M. (1994). "Increased expression of the NG2 chondroitin-sulfate proteoglycan after brain injury." <u>J Neurosci</u> **14**(8): 4716-4730.

Levine, J. M. and R. Reynolds (1999). "Activation and proliferation of endogenous oligodendrocyte precursor cells during ethidium bromide-induced demyelination." <u>Exp</u> <u>Neurol</u> **160**(2): 333-347.

Li, Z. and M. Sheng (2003). "Some assembly required: the development of neuronal synapses." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **4**(11): 833-841.

Maegele Marc, L. R., Sakowitz Oliver, Kopp Marcel, Schwab Jan, Steudel Wolf-Ingo, Unterberg Andreas, Hoffmann Reinhard, Uhl Eberhard, Marzi Ingo (2019). "Inzidenz und Versorgung des mittelschweren bis schweren Schädel-Hirn-Traumas." <u>Deutsches</u> <u>Ärzteblatt</u>(116): 167-173.

Maness, P. F. and M. Schachner (2007). "Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration." <u>Nat Neurosci</u> **10**(1): 19-26.

Markus, A., J. Zhong and W. D. Snider (2002). "Raf and akt mediate distinct aspects of sensory axon growth." <u>Neuron</u> **35**(1): 65-76.

McKeon, R. J., A. Höke and J. Silver (1995). "Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars." <u>Exp Neurol</u> **136**(1): 32-43.

McKeon, R. J., M. J. Jurynec and C. R. Buck (1999). "The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar." <u>J Neurosci</u> **19**(24): 10778-10788.

Mitchison, T. and M. Kirschner (1988). "Cytoskeletal dynamics and nerve growth." <u>Neuron</u> **1**(9): 761-772.

Mitchison, T. J. and L. P. Cramer (1996). "Actin-based cell motility and cell locomotion." Cell **84**(3): 371-379.

Molofsky, A. V. and B. Deneen (2015). "Astrocyte development: A Guide for the Perplexed." <u>Glia</u> **63**(8): 1320-1329.

Müller, C. M., A. Vlachos and T. Deller (2010). "Calcium homeostasis of acutely denervated and lesioned dentate gyrus in organotypic entorhino-hippocampal co-cultures." <u>Cell Calcium</u> **47**(3): 242-252.

Nakamura, F., R. G. Kalb and S. M. Strittmatter (2000). "Molecular basis of semaphorin-mediated axon guidance." <u>J Neurobiol</u> **44**(2): 219-229.

Nakayama, J., M. N. Fukuda, B. Fredette, B. Ranscht and M. Fukuda (1995). "Expression cloning of a human polysialyltransferase that forms the polysialylated neural cell adhesion molecule present in embryonic brain." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **92**(15): 7031-7035.

Nishiyama, A., R. Suzuki and X. Zhu (2014). "NG2 cells (polydendrocytes) in brain physiology and repair." <u>Front Neurosci</u> **8**: 133.

Nitsch, R. (2004). Archikortex. <u>Anatomie Band 2: Makroskopische Anatomie,</u> <u>Histologie, Embryologie, Zellbiologie</u>. D. Drenckhahn. München, Urban & Fischer: 502-511.

Nomura, T., T. Yabe, E. S. Rosenthal, M. Krzan and J. P. Schwartz (2000). "PSA-NCAM distinguishes reactive astrocytes in 6-OHDA-lesioned substantia nigra from those in the striatal terminal fields." <u>J Neurosci Res</u> **61**(6): 588-596.

Olney, J. W. (1971). "Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. An electron microscopic study." <u>J Neuropathol Exp Neurol</u> **30**(1): 75-90.

Panickar, K. S. and M. D. Norenberg (2005). "Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations." <u>Glia</u> **50**(4): 287-298.

Pekny, M., M. Pekna, A. Messing, C. Steinhäuser, J. M. Lee, V. Parpura, E. M. Hol, M. V. Sofroniew and A. Verkhratsky (2016). "Astrocytes: a central element in neurological diseases." <u>Acta Neuropathol</u> **131**(3): 323-345.

Plant, G. W., M. L. Bates and M. B. Bunge (2001). "Inhibitory proteoglycan immunoreactivity is higher at the caudal than the rostral Schwann cell graft-transected spinal cord interface." <u>Mol Cell Neurosci</u> **17**(3): 471-487.

Radic, T., T. Jungenitz, M. Singer, M. Beining, H. Cuntz, A. Vlachos, T. Deller and S. W. Schwarzacher (2017). "Time-lapse imaging reveals highly dynamic structural maturation of postnatally born dentate granule cells in organotypic entorhino-hippocampal slice cultures." <u>Sci Rep</u> **7**: 43724.

Remington, S. J. (2011). "Green fluorescent protein: a perspective." <u>Protein Sci</u> 20(9): 1509-1519.

Rose, T., P. Schoenenberger, K. Jezek and T. G. Oertner (2013). "Developmental refinement of vesicle cycling at Schaffer collateral synapses." <u>Neuron</u> **77**(6): 1109-1121.

Rutishauser, U. and L. Landmesser (1996). "Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions." <u>Trends Neurosci</u> **19**(10): 422-427.

Saito, T. (2006). "In vivo electroporation in the embryonic mouse central nervous system." <u>Nat Protoc</u> **1**(3): 1552-1558.

Sanna, P. P., M. Cammalleri, F. Berton, C. Simpson, R. Lutjens, F. E. Bloom and W. Francesconi (2002). "Phosphatidylinositol 3-kinase is required for the expression but not for the induction or the maintenance of long-term potentiation in the hippocampal CA1 region." J Neurosci **22**(9): 3359-3365.

Scannevin, R. H. and R. L. Huganir (2000). "Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses." <u>Nat Rev Neurosci</u> 1(2): 133-141.

Scheidegger, E. P., L. R. Sternberg, J. Roth and J. B. Lowe (1995). "A human STX cDNA confers polysialic acid expression in mammalian cells." <u>J Biol Chem</u> **270**(39): 22685-22688.

Scott, E. K. and L. Luo (2001). "How do dendrites take their shape?" <u>Nat Neurosci</u> **4**(4): 359-365.

Seki, T. and Y. Arai (1993). "Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system." <u>Neurosci Res</u> **17**(4): 265-290.

Shen, Y., A. P. Tenney, S. A. Busch, K. P. Horn, F. X. Cuascut, K. Liu, Z. He, J. Silver and J. G. Flanagan (2009). "PTPsigma is a receptor for chondroitin sulfate proteoglycan, an inhibitor of neural regeneration." <u>Science</u> **326**(5952): 592-596.

Silver, D. J. and J. Silver (2014). "Contributions of chondroitin sulfate proteoglycans to neurodevelopment, injury, and cancer." <u>Curr Opin Neurobiol</u> **27**: 171-178.

Silver, J. and J. H. Miller (2004). "Regeneration beyond the glial scar." <u>Nat Rev</u> <u>Neurosci</u> **5**(2): 146-156.

Skutella, T. and R. Nitsch (2001). "New molecules for hippocampal development." <u>Trends Neurosci</u> **24**(2): 107-113.

So, P. T., C. Y. Dong, B. R. Masters and K. M. Berland (2000). "Two-photon excitation fluorescence microscopy." <u>Annu Rev Biomed Eng</u> **2**: 399-429.

Sofroniew, M. V. (2009). "Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation." <u>Trends Neurosci</u> **32**(12): 638-647.

Stichel, C. C., H. Niermann, D. D'Urso, F. Lausberg, S. Hermanns and H. W. Muller (1999). "Basal membrane-depleted scar in lesioned CNS: characteristics and relationships with regenerating axons." <u>Neuroscience</u> **93**(1): 321-333.

Stoppini, L., P. A. Buchs and D. Muller (1991). "A simple method for organotypic cultures of nervous tissue." <u>J Neurosci Methods</u> **37**(2): 173-182.

Tanaka, E. and J. Sabry (1995). "Making the connection: cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance." <u>Cell</u> **83**(2): 171-176.

Tapon, N. and A. Hall (1997). "Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton." Curr Opin Cell Biol **9**(1): 86-92.

Tran, A. P., S. Sundar, M. Yu, B. T. Lang and J. Silver (2018). "Modulation of Receptor Protein Tyrosine Phosphatase Sigma Increases Chondroitin Sulfate Proteoglycan Degradation through Cathepsin B Secretion to Enhance Axon Outgrowth." <u>J Neurosci</u> **38**(23): 5399-5414.

Tran, A. P., P. M. Warren and J. Silver (2018). "The Biology of Regeneration Failure and Success After Spinal Cord Injury." <u>Physiol Rev</u> **98**(2): 881-917.

Tsuji, S., A. K. Datta and J. C. Paulson (1996). "Systematic nomenclature for sialyltransferases." <u>Glycobiology</u> **6**(7): v-vii.

Vogt, J., R. Glumm, L. Schlüter, D. Schmitz, B. R. Rost, N. Streu, B. Rister, B. Suman Bharathi, D. Gagiannis, H. Hildebrandt, B. Weinhold, M. Mühlenhoff, T. Naumann, N. E. Savaskan, A. U. Brauer, W. Reutter, B. Heimrich, R. Nitsch and R. Horstkorte (2012). "Homeostatic regulation of NCAM polysialylation is critical for correct synaptic targeting." <u>Cell Mol Life Sci</u> **69**(7): 1179-1191.

Wang, H., Y. Katagiri, T. E. McCann, E. Unsworth, P. Goldsmith, Z. X. Yu, F. Tan, L. Santiago, E. M. Mills, Y. Wang, A. J. Symes and H. M. Geller (2008). "Chondroitin-4-sulfation negatively regulates axonal guidance and growth." <u>J Cell Sci</u> **121**(Pt 18): 3083-3091.

Witzel, C., W. Reutter, G. B. Stark and G. Koulaxouzidis (2015). "N-Propionylmannosamine stimulates axonal elongation in a murine model of sciatic nerve injury." <u>Neural Regen Res</u> **10**(6): 976-981.

Wong, R. O. and A. Ghosh (2002). "Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning." <u>Nat Rev Neurosci</u> **3**(10): 803-812.

Yoo, M., M. Khaled, K. M. Gibbs, J. Kim, B. Kowalewski, T. Dierks and M. Schachner (2013). "Arylsulfatase B improves locomotor function after mouse spinal cord injury." <u>PLoS One</u> **8**(3): e57415.

Danksagung

Diese Doktorarbeit wurde unterstützt durch ein sechsmonatiges Dokotrandenstipendium des Forschungsschwerpunkts translationale Neurowissenschaften.