

Aus dem Bereich Anatomie  
Theoretische Medizin und Biowissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

***Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin***

**der Medizinischen Fakultät**

**der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

**2011**

**Überleben kortikospinaler Neurone *in vitro*  
in organotypischen Slice-Kulturen**

vorgelegt von:

**Philipp Erdmann**

geb. am: 11.07.1974 in Göttingen

# INHALTSVERZEICHNIS

1.	ZUSAMMENFASSUNG	S. 1
	SUMMARY	S. 2
2.	EINLEITUNG	S. 4
2.1.	Allgemeine Regenerationsforschung	S. 4
2.1.1.	Klinische Bedeutung von Regeneration und Überlebensregulation	S. 4
2.1.2.	Das kortikospinale System	S. 5
2.1.3.	Reaktion kortikospinaler Neurone auf Axotomie	S. 6
2.1.4.	Regeneration von Neuronen des Zentralnervensystems und deren Hindernisse	S. 7
2.2.	Trophische Abhängigkeiten kortikospinaler Neurone <i>in vivo</i>	S. 9
2.2.1.	Bekannte Neurotrophine, ihre Funktionen und Rezeptoren	S. 9
2.2.2.	Einfluss von Neurotrophinen auf die Überlebensregulation kortikospinaler Neurone	S. 12
2.2.3.	Einfluss neuronaler Projektionen und Zuflüsse	S. 13
2.3.	Zellkulturverfahren für Nervengewebe	S. 14
2.3.1.	Allgemeine Grundlagen	S. 14
2.3.2.	Dissoziierte Zellkulturen	S. 14
2.3.3.	Organotypische Zellkulturen	S. 15
2.3.4.	Vergleich der Zellkulturverfahren	S. 15
2.3.5.	Spezielle Anforderungen an das Zellkulturverfahren	S. 16
2.4.	Fragestellung	S. 17
2.5.	Ziele der Studie	S. 18
3.	MATERIAL UND METHODEN	S. 19
3.1.	Zellkultursysteme	S. 19
3.1.1.	Versuchstiere	S. 19
3.1.2.	Gewebeentnahme	S. 19

3.1.3.	Kultursystem nach Stoppini	S. 20
3.1.4.	Vorversuche	S. 21
3.1.5.	Modifizierung des Kultursystems nach Stoppini	S. 21
3.2.	Experimenteller Aufbau der Studie	S. 22
3.3.	Histologische Charakterisierung und Färbemethoden	S. 23
3.4.	Analyse neuronalen Überlebens in den Kulturen	S. 26
3.4.1.	Identifizierung und Markierung von kortikospinalen Neuronen	S. 26
3.4.2.	Identifizierung und Markierung von Schicht II-Neuronen	S. 27
3.4.3.	Quantifizierung von Schicht II-Neuronen	S. 27
3.4.4.	Quantifizierung von kortikospinalen Neuronen	S. 28
3.4.5.	Statistik der Survivalanalysen	S. 28
3.5.	Homogenisate	S. 29
3.5.1.	Herstellung der Homogenisate	S. 29
3.5.2.	Statistik der Homogenisat-Experimente	S. 29
4.	ERGEBNISSE	S. 30
4.1.	Etablierung des Systems	S. 30
4.1.1.	Histologische Charakterisierung	S. 30
4.1.2.	Überlebenskinetiken verschiedener Zellpopulationen	S. 31
4.2.	Untersuchung trophischer Einflüsse auf das Überleben kortikospinaler Neurone im Slice Kultur Modell	S. 33
4.2.1.	Entzug trophischer Faktoren	S. 33
4.2.2.	Einfluss verschiedener Hirnareale auf das Überleben kortikospinaler Neurone	S. 34
5.	DISKUSSION	S. 36
5.1.	Slice-Kulturverfahren	S. 36
5.2.	Methodik für die Survivalanalyse	S. 37
5.3.	Überlebenskinetiken	S. 39
5.4.	Ausblick	S. 41
6.	LITERATURVERZEICHNIS	S. 43
7.	DANKSAGUNG	S. 53

## 1. ZUSAMMENFASSUNG

Die meisten Prozeduren für organotypische Slice-Kulturen basieren auf Gähwilers (Gähwiler et al., 1981) und Stoppinis Protokollen (Stoppini et al., 1991). Üblicherweise werden diese Kulturen von embryonalen oder früh postnatalen Geweben angelegt. Nach bisherigen Protokollen liegt der späteste mögliche Zeitpunkt zur Gewebeentnahme in der dritten postnatalen Woche. In der folgenden Studie zielten wir darauf ab, Kulturen sexuell reifer Ratten, das heißt nach Tag 54 *post partum*, zu etablieren, um das Überleben adulter Säugetierzellen in einem organotypischen Kulturansatz zu untersuchen.

Wir gingen von Stoppinis Methode aus, da nach dieser die spätesten kultivierbaren Entnahmezeitpunkte berichtet wurden. Ab postnatalem Gewebeentnahmetag 20 (P20) zeigten kultivierte Slices ungenügende Adhärenz und gingen innerhalb des ersten Tages *in vitro* (DIV1) zugrunde. Wir präsentieren nun eine Modifikation der Methode nach Stoppini, die Oberflächenspannung benutzt, um einen leichten Sog über die semipermeable Kulturmembran zu erzeugen, der die Slices an die Membran ansaugt und so stabilisiert.

Für die Kulturen wurden junge (P25) oder adulte (>P60) Sprague Dawley Ratten benutzt. Nach Entnahme des interessierenden Organes wurden Gewebeblöcke aseptisch präpariert, in 300 µm dicke Scheiben geschnitten und auf der semipermeablen Membran eines Kulturinserts auf einen 0,75 ml Tropfen Kulturmedium (Stoppini-Medium oder definiertes Medium) aufgebracht.

Die Kulturzeiten variierten zwischen 1 und 21 Tagen. Nach abgeschlossener Kultur wurden die Slices entweder fixiert, dehydriert und eingebettet oder fixiert, kryoprotectiert, gefroren, transversal oder tangential geschnitten und mit Kresylviolett oder Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Zellzählungen wurden entweder an mit Hoechst 33342-gefärbten kortikalen Neuronen oder an retrograd mit „Fast Blue“ markierten kortikospinalen Neuronen durchgeführt.

Da die absolute Anzahl kortikospinaler Neurone in anterior-posteriorer Richtung einen Peakförmigen Verlauf hat (Bonatz et al., 2000), war es notwendig, die Ausgangszahl kultivierter kortikospinaler Neurone über eine „Sandwich-Interpolation“ von nicht in Kultur genommenen Nachbarslices festzustellen. Nach der beabsichtigten Zeit in Kultur wurde die Anzahl

kortikospinaler Neurone in jedem Slice quantifiziert und ausgedrückt als „prozentuales Überleben“ ihrer zuvor festgelegten Ausgangszahl.

Mit der dargestellten Methode konnten Kulturen adulten Gewebes verschiedener Organe über mehr als eine Woche kultiviert werden. In den kortikalen Slices zeigte sich, dass intrinsische kortikale Neuronen deutlich niedrigere Absterberaten als die subkortikal projizierenden kortikospinalen Neurone haben. Dies wies darauf hin, dass kultivierte Slices Umgebungsfaktoren aufrechterhalten, die spezifisch intrinsische Neurone unterstützen.

Um Einflüsse des molekularen Ambientes entlang des kortikospinalen Projektionsweges auf das Überleben kortikospinaler Neurone zu bestimmen, wurden dem Kulturmedium Gewebhomogenisate verschiedener Hirnareale zugegeben. Für die Erzeugung dieser Homogenisate präparierten wir Gewebeblöcke von Thalamus, Hippocampus, Hirnstamm, Rückenmark, Kleinhirn und Kortex. Die Homogenisate wurden in einer Konzentration von 40 µg/ml Proteingehalt appliziert. Das Überleben kortikospinaler Neurone wurde von Homogenisaten ihrer Projektions- und Innervationsgebieten gefördert, wohingegen Hirnareale ohne konnektive Korrelation zum kortikospinalen System ohne Einfluss blieben. Dies zeigte, dass es möglich war in unserem Kulturparadigma differentielle Effekte verschiedener Substanzen auf Zellüberleben zu untersuchen.

## SUMMARY

Most procedures for organotypic slice culture are based on Gähwiler's (Gähwiler et al., 1981) and Stoppini's protocols (Stoppini et al., 1991). Usually these cultures are taken from embryonal or early postnatal rodents. Following known procedures, the latest time point for taking tissue in culture is the third postpartal week. In the present study we have been aiming at tissue cultures of sexually mature rodents, i.e. after P54, in order to assess survival of adult mammalian cells in an organotypical culture context.

We started off from Stoppini's methods, as those reported the latest time points for taking tissue in culture. After postpartal day 20 (P20), the cultured slices showed insufficient adherence and died off within the first day *in vitro* (DIV1). We now present a modification of Stoppini's method that employs physical surface tension to generate a slight suction across the semipermeable insert membrane to adhere and stabilize the slices. c

For the cultures, young (P25) or adult (>P60) Sprague-Dawley rats were used. After taking out the organ of interest, tissue blocks have been prepared aseptically, were cut into 300 µm thick slices, and were positioned on the semipermeable membrane of a culture insert on top of a 0.75 ml drop of culture medium (Stoppini-medium or defined medium).

The culture times varied from 1 to 21 days. After culture, the slices were either fixed, dehydrated, and embedded or fixed, cryoprotected, cut transversally or tangentially, and stained either with cresylviolett or hematoxylin eosin.

Cell counts have been either performed on HOECHST 33342-stained cortical neurons or on corticospinal neurons retrogradely labeled with "Fast Blue".

As the absolute number of corticospinal neurons displays a peak-like distribution along their frontal a-p-level (Bonatz et al., 2000), it was necessary to determine the initial number of corticospinal neurons by a "sandwich interpolation" of neighbouring slices not taken in cultures. After the respective times in culture, the number of corticospinal neurons in each slice has been quantified and was expressed as "percentage survival" of its calculated baseline survival before culture.

Using the method presented, adult rodent tissue of various organs could be kept in culture for more than a week. The cortical slices showed less die off of intrinsic cortical neurons than of subcortical projecting neurons. These findings suggested a trophic support by local environmental factors specific for the intrinsic neurons.

In order to determine influences of the molecular environment along the corticospinal tract on survival of corticospinal neurons, we added homogenates from different brain areas to the culture medium. For the generation of homogenates, we prepared tissue blocks from thalamus, hippocampus, brainstem, spinal cord, cerebellum and cortex. Homogenates were added to the culture medium to a final concentration of 40 µg/ml.

Survival of corticospinal neurons was promoted by homogenates from their target and input areas whereas homogenates from areas without connective correlation to the corticospinal system did not have an effect. This showed that it was possible to analyse differential effects of different substances for cellular survival in our culture paradigm.

## **2. EINLEITUNG**

### **2.1. Allgemeine Regenerationsforschung**

Ziel der regenerativen Medizin ist die Entwicklung neuer Therapien, um verloren gegangene Funktionen abgestorbener, verletzter oder alternder Zellen im menschlichen Körper zu kompensieren und im Idealfall wieder herzustellen. Dieses Ziel soll erreicht werden, indem Zusammenhänge von Ontogenese menschlicher und tierischer Individuen, Stammzellbiologie, Genetik, Materialwissenschaft, Biotechnik sowie Gewebezüchtung erforscht werden. Momentan fokussiert sich dieses Feld hauptsächlich auf existierende Reparaturmechanismen und das latent vorhandene Regenerationspotential von Geweben (Gurtner et al., 2007).

#### **2.1.1. Klinische Bedeutung von Regeneration und Überlebensregulation**

Unsere Arbeitsgruppe stellt in diesem Kontext die Überlebensregulation des kortikospinalen Systems in den Mittelpunkt ihres Forschungsinteresses. Dieses motorische System hat in der Neurologie und Neurochirurgie große Bedeutung für den Behinderungsgrad erkrankter Menschen. Akute Schädigungen von kortikospinalen Neuronen bilden ein häufiges klinisches Symptom und hieraus resultierende Defizite bleiben nicht selten irreversibel. Unabhängig davon, ob ein akuter oder chronischer Schädigungsmechanismus des motorischen Systems vorliegt, ist es für den betroffenen Organismus oft unmöglich eine *restitutio ad integrum* zu erreichen. Es können lediglich in begrenztem Umfang Kompensationsmechanismen wirksam werden (Kennedy et al., 1990; Aguayo et al., 1991; Schwab et al., 1993).

Eine Verletzung des motorischen Systems kann im Zusammenhang mit häufig auftretenden Akuterkrankungen wie hämorrhagischen und ischämischen Insulten, Rückenmarksverletzungen, aber auch Schädelhirn- und Rückenmarkstraumata auftreten. Eine Wiederherstellung der betroffenen Bahnsysteme nach Läsion im adulten Säuger ist bisher nicht möglich (Schwab et al., 1993; Tetzlaff et al., 1994).

Als Beispiel für eine chronische Erkrankung des motorischen Systems ist modellhaft die amyotrophe Lateralsklerose zu nennen. Die Ausfälle bei der amyotrophen Lateralsklerose beruhen auf einer Neurodegeneration kortikospinaler Neurone und spinaler Motoneurone

(Chou et al., 1995; Swash and Schwartz, 1995). Die Patienten haben eine durchschnittliche Lebenserwartung von zwei bis fünf Jahren nach Diagnosestellung (Swash and Schwartz, 1995) und versterben meist aufgrund der zunehmenden Atemlähmung. Eine kausale relevant stabilisierende oder gar kurative Therapie ist bislang nicht bekannt (Swash and Schwartz, 1995).

Neurodegenerative Erkrankungen motorischer Systeme, wie der Morbus Parkinson oder die amyotrophe Lateralsklerose, bei denen sowohl die Axone als auch die Zellkörper der betroffenen Neurone degenerieren, zeigen besonders deutlich, welche Probleme die Tatsache aufwirft, dass Neurone des Zentralnervensystems nicht regenerieren. Es steht für den Krankheitsverlauf dieser Erkrankungen letztendlich der Zelltod der betroffenen Neuronenpopulationen im Vordergrund, ohne dass eine Rekompensation einmal verloren gegangener Funktion erfolgen kann.

Die Entwicklung neuer Therapiestrategien für neurodegenerative Krankheiten konzentriert sich momentan primär auf die Entwicklung von Substanzen, die das Absterben von Neuronen verhindern sollen (Yan and Miller, 1993; Hefti et al., 1994; Walsh et al., 1995). Sollte dies für neurodegenerative Krankheiten gelingen, wäre dennoch keine suffiziente Regeneration der Neuronen zu erwarten, die schon axonale Degeneration zeigen. Meist regenerieren nämlich zerstörte Projektionssysteme im zentralen Nervensystem (ZNS) nicht. Daher ist ein weiteres wesentliches Ziel der Regenerationsforschung die Entwicklung neuer Therapiestrategien zur Stimulation axonalen Wachstums im ZNS.

### **2.1.2. Das kortikospinale System**

Anatomisch besteht das kortikospinale System aus den kortikospinalen Neuronen und dem kortikospinalen Trakt, der die Projektion ins Rückenmark fortleitet (Porter et al., 1985; Nudo and Masterton, 1988/1990). Die Zellkörper der kortikospinalen Neurone sind in Schicht V des somatomotorischen Kortex der Großhirnhemisphären lokalisiert (Porter et al., 1985; Nudo and Masterton, 1988/1990). Der kortikospinale Trakt verläuft auf dem Weg ins Rückenmark durch die innere Kapsel, die Crura cerebri, die Fasciculi longitudinales pontis, die Pyramidenbahn und schließlich über die spinalen kortikospinalen Tractus im Rückenmark zu den spinalen Motoneuronen. Diese werden entweder direkt oder über Interneurone innerviert (Porter et al., 1985; Nudo and Masterton, 1988/1990; Liang et al., 1991). Der kortikospinale

Trakt von Mensch und Ratte unterscheidet sich lediglich durch seinen Verlauf auf spinaler Ebene. Bei der Ratte verläuft dieser im Gegensatz zum Menschen im Hinterstrang der Medulla spinalis (Paxinos and Watson, 1982). Ungekreuzte kortikospinale Axone tragen maximal 5 % zur gesamten Projektion bei. Diese verlaufen wie beim Menschen im Vorderseitenstrang des Rückenmarks (Paxinos et al., 1985). Die spinalen Motoneurone erhalten ihre Impulse nicht nur vom kortikospinalen Trakt, sondern auch von mehreren anderen langen Projektionssystemen wie zum Beispiel dem rubrospinalen System. Zusätzlich besteht auch eine Innervation von lokalen Systemen, die sie an die quergestreifte Muskulatur weiterleiten (Porter et al., 1985; 1987; Liang et al., 1991). Aufgrund dieser unterschiedlichen Charakteristika werden diese Systeme differenziert in die kortikospinalen, so genannten „oberen“, und die spinalen, so genannten „unteren“, Motoneurone. Die kortikospinale Projektion bildet aufgrund ihres langstreckigen Verlaufes eine relativ vulnerable und gleichzeitig durch ihre integrative Funktion an der Schnittstelle kortikospinaler zu spinalen Motoneuronen funktionell extrem wichtige Struktur. Das System vermittelt in Säugern die Steuerung der Willkür- und der Feinmotorik (Porter, 1985/1987; Nudo and Masterton, 1988/1990; Whishaw et al., 1993).

Histologisch stellen sich kortikospinale Neuronen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 15-20 µm in einer pyramidalen Zellkontur dar. Da kortikospinale Neurone jedoch nur eine Subpopulation pyramidaler Neurone in Schicht V des Kortex repräsentieren, können sie allein aufgrund morphologischer Kriterien oder ihrer Lokalisation nicht identifiziert werden. Eine eindeutige Identifizierung kann nur durch eine Anfärbung mit neuronalen retrograden „Tracern“ über ihre Projektion ins Rückenmark erfolgen.

### **2.1.3. Reaktion kortikospinaler Neurone auf Axotomie**

Lange Zeit wurde die Meinung vertreten, dass kortikospinale Neurone der adulten Ratte allein durch eine Axotomie nicht sterben (McBride et al., 1988; Merline and Kalil, 1990). Bei zellkörpernaher Axotomie auf Höhe der Capsula interna konnte jedoch später gezeigt werden, dass 46% der axotomierten Neurone sterben (Giehl and Tetzlaff, 1996). Beginnend an Tag 3 bis zum Tag 5 nach der Axotomie ist dieser progressive Zelltod nachzuweisen. Danach ergibt sich keine weitere nennenswerte Abnahme der Zahl kortikospinaler Neurone. Dies wurde bis zum 42. Tag nach Axotomie verfolgt (Giehl and Tetzlaff, 1996; Giehl et al., 1997). Der Anteil

der langfristig die Axotomie überlebenden Neurone (mindestens 42 Tage), bleibt dennoch nicht unbeschadet, sondern atrophiert stark (Giehl and Tetzlaff, 1996).

Die Axotomie kortikospinaler Neurone der adulten Ratte weit distal des Perikaryons, zum Beispiel auf Höhe von Pyramide und Rückenmark, zeigte im Gegensatz dazu keine relevante auf die Läsion beziehbare Absterberate (McBride et al., 1988; Merline and Kalil, 1990). Daher wird diskutiert, dass die axotomierten kortikospinalen Neurone in diesen Läsionsmodellen über ihre relativ langen Axonstümpfe noch Konnektionen in Form von Axonkollateralen aufrecht erhalten können. Diese mögen in der Lage sein, Überlebensfaktoren aufzunehmen, so dass ein Absterben der kortikospinalen Neurone verhindert werden kann (Korsching et al., 1993; Giehl and Tetzlaff, 1996). Mit einem sehr kurzen Axonstumpf (ca. 2 mm) bei der Axotomie auf Höhe der Capsula interna wäre dies nicht mehr oder nur noch in sehr begrenzten Umfang möglich.

#### **2.1.4. Regeneration von Neuronen des Zentralnervensystems und deren Hindernisse**

Im Gegensatz zur Degeneration ist die Regeneration verletzter Neuronen des Nervensystems ein komplizierter Prozess mit speziellen Vorbedingungen.

Die Regeneration des peripheren Nervensystems ist simpler, als die des Zentralnervensystems. Dort können die jeweiligen Neurone ihre Axone nach Schädigung komplett regenerieren (Cajal et al., 1928/1991). Das Zielgebiet kann hierdurch vollständig reinnerviert werden. Auch nach einer kompletten Axotomie, also Durchtrennung des Axons, greift dieser Mechanismus. Der proximale Axonstumpf kann bei Erhalt oder Readaptation der Myelinscheide über diese Leitschiene die Axone wieder aussprossen lassen. So kann das Zielgebiet wieder erreicht werden. Der nach der Axotomie entstandene distale Axonabschnitt geht im Rahmen der Waller'schen Degeneration zugrunde. Bei Neuronen des Zentralnervensystems werden selbst diese einfachen regenerativen Vorgänge im Allgemeinen nicht erreicht (Cajal et al., 1928/1991).

Für Reparaturprozesse im adulten zentralen Nervensystem nach Verletzung müssen im allgemeinen ontogenetische Programme aktiviert werden, um verletzte axonale Verbindungen wieder zu regenerieren. Zusätzlich werden damit auch kollaterale Aussprossung und erhöhte

Plastizität induziert, die verloren gegangenen Verbindungen ersetzen, die nicht regenerierbar sind (Benowitz and Routtenberg, 1997; Cramer and Chopp, 2000; Raineteau and Schwab, 2001). Wahrscheinlich werden ontogenetische Programme auch dazu benutzt, um das Überleben verletzter Neurone zu regulieren (Shulga et. al, 2008 ).

Die Effektivität dieser Reaktivierung ontogenetischer embryonaler Programme wird durch natürliche Regenerationshindernisse herabgesetzt. Daher hat das Zentralnervensystem des Säugetieres verglichen mit niederen Vertebraten nur ein geringes regeneratives Potential. Nach der aktuell vorherrschenden Meinung beruhen diese Regenerationshindernisse hauptsächlich auf drei Besonderheiten des Zentralnervensystems im Vergleich zum peripheren Nervensystem (Miller et al., 1989; Tetzlaff et al., 1989; Bisby and Tetzlaff, 1992; Schwab et al., 1993; Tetzlaff et al., 1994):

Erstens besteht ein Wachstums-inhibierendes Milieu. Die auf Gliazellen lokalisierten inhibitorischen Moleküle führen vor Ort zu einem Wachstumsstopp und Kollaps der regenerierenden Axone (Raineteau and Schwab, 2001).

Zum zweiten werden die Gene, die für Plastizität und axonale Elongation in Säugetieren zuständig und im Wesentlichen Träger der embryonalen Regenerationsprogramme sind („regeneration associated genes“), im Allgemeinen nur ungenügend induziert (Tetzlaff et al., 1994; Udvadia et al., 2001; Wood et al., 2001). Oder diese genetischen Programme begünstigen eine Degeneration der Neurone erst. Das hieße, die Aktivierung embryonaler Überlebensprogramme anstelle von oder zusätzlich zu Wachstumsprogrammen könnte ein Missverhältnis von neuronalen Überlebensstrategien und Umgebungshemmung bewirken: Embryonal umstrukturierte Neuronen trafen auf eine adulte Gewebeumgebung, die einen Mangel an adäquaten Signalen für Überleben vermitteln würde. Unter anderem wären die teils ausgedehnten sekundären degenerativen Veränderungen in der Folge tiefgreifender traumatischer Läsionen dadurch erklärbar, die typischerweise im Zentralnervensystem des Säugetieres beobachtet werden (Tetzlaff et al., 1994).

Zuletzt findet sich neben dem Axotomie-induzierten Zelltod auch die bereits erwähnte Zellschrumpfung. Dieses Spektrum Axotomie-induzierter Zellschädigung ist abhängig von der Entfernung des Traumas vom Zellsoma umso schwerwiegender ausgeprägt, je näher das Trauma am Zellkörper stattfindet. Das heißt bei zellkörperfernen Axotomien im Zentralnervensystem dominiert eher die Atrophie, bei perikaryonahen Läsionen eher der

Zelltod (Villegaz-Perez et al., 1988/1993; Berkelaar et al., 1994; Dale et al., 1995; Giehl and Tetzlaff, 1996). Ursächlich für dieses Phänomen wird eine ungenügende Kompensation dendritischer oder axonaler Versorgungsrouten postuliert. Über diese werden physiologischerweise zum Überleben wichtige neurotrophische Faktoren an das Zellsoma befördert (Lewin und Barde, 1996).

Die Untersuchungen unserer Forschungsgruppe bemühen sich in diesem Zusammenhang um die Behebung der ungenügenden trophischen Versorgung nach neuronaler Verletzung als ersten Ansatzpunkt auf dem Weg zur Weiterentwicklung hin zu einer regenerativen Beeinflussung neuronaler Strukturen. Daher spielt in unseren Überlegungen die Reetablierung der Versorgung mit Neurotrophinen und anderen trophischen Substanzen zur Förderung neuronalen Überlebens die zentrale Rolle.

Sowohl Wachstumsprozess als auch neuronales Überleben werden von Neurotrophinen beeinflusst (Lewin und Barde, 1996; Tucker et al., 2001). Ebenfalls regulieren Neurotrophine selbst Entwicklungsveränderungen von Neuronen und unterliegen Entwicklungsveränderungen in ihren Funktionen (Davies et al., 1997). Diese Gruppe von Molekülen ist daher in Rahmen unserer Untersuchungen von besonderem Interesse.

## **2.2. Trophische Abhängigkeiten kortikospinaler Neurone *in vivo***

### **2.2.1. Bekannte Neurotrophine, ihre Funktionen und Rezeptoren**

Aktuell sind sechs Moleküle der Proteinfamilie bekannt, die als Neurotrophine bezeichnet werden: nerve growth factor (NGF), brain derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3), neurotrophin-4/5 (NT-4/5) neurotrophin-6 (NT-6) und neurotrophin-7 (NT-7). Nur die ersten vier dieser Neurotrophine kommen im Säugetier vor. Diese Proteine werden so genannt, da ihre Effekte primär an Neuronen entdeckt und beschrieben wurden (Lewin and Barde, 1996). Ihre wichtigste bekannte Rolle spielen sie während der neuronalen Entwicklung. Während der Embryonalphase sind sie maßgeblich an der Steuerung des programmierten Zelltodes, der Differenzierung und des axonalen Wachstums beteiligt (Lewin and Barde, 1996). Im adulten Zentralnervensystem gibt es Hinweise für die Beteiligung von Neurotrophinen an inflammatorischen Reaktionen, neuronaler Plastizität, neuronaler

Transmission und der Regeneration des peripheren Nervensystems (Lewin and Barde, 1996). Das im Rahmen unserer Forschungsarbeiten interessanteste Phänomen sind positive Effekte auf neuronales Überleben. Dieses Phänomen ist in einer Reihe neuronaler Populationen des adulten Zentralnervensystems und des peripheren Nervensystems gesichert (Conover and Yancopoulos, 1997). Aber auch die Pro-Neurotrophine als Vorstufen der Neurotrophine entfalten biologische Aktivität (Lee et al., 2001).

Neurotrophine vermitteln ihre Effekte über Neurotrophinrezeptoren. Es existieren zwei unterschiedliche Arten von Rezeptoren, zum einen aus der so genannten Trk-Familie (Tropomyosinkinase-Familie), zum anderen der allgemeine p75-Neurotrophinrezeptor p75<sup>NTR</sup> (Barbacid et al., 1995).

Die Familie der Trk-Rezeptoren gliedert sich nach bisherigen Erkenntnissen in drei Unterformen. Dies sind TrkA, TrkB und TrkC. Diese Unterformen binden jeweils spezifische Neurotrophine hochaffin. TrkA bindet hochaffin NGF, TrkB hochaffin BDNF und NT-4/5 sowie TrkC hochaffin NT-3 (Barbacid, 1994). NT-3 kann unter bestimmten Umständen niedrig affin auch an TrkA und TrkB binden. Die weitere Signaltransduktion führt zu einer ligandeninduzierten Dimerisierung (Jing et al., 1992) mit einer konsekutiven Autophosphorylierung und damit Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne der Rezeptoren. Über diese Domäne werden Tyrosin-, Serin- und Threoninreste intrazellulärer Proteine phosphoryliert, so dass weitere intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert werden, wie zum Beispiel der MAP-Kinase Weg (Kaplan and Stephens, 1994). Über diese intrazellulär aktivierten Signalwege werden Überlebens- und Differenzierungsgene aktiviert und Einfluss auf Transkription und synaptische Plastizität genommen (Reichardt et al., 2006). Es existieren aber auch so genannte trunkierte Trk-Rezeptoren, die nur eine kurze oder ganz fehlende intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne aufweisen (Barbacid et al., 1994). Diese finden sich sowohl auf Neuronen als auch nicht neuronalen Zellen (Altar et al., 1994). Lange Zeit wurde geglaubt, diese trunkierten Rezeptoren würden keine direkten Signalwege aktivieren, sondern funktionieren, indem sie die Diffusion vorhandener Neurotrophine steuern und möglicherweise die Präsentation an Signal-vermittelnde Rezeptoren erleichtern. In den letzten Jahren konnten Arbeiten jedoch zeigen, dass auch durch diese verschiedene intrazelluläre Signalwege aktiviert werden können (Rose et al., 2003; Esteban et al., 2006).

Der p75-Neurotrophin-Rezeptor p75<sup>NTR</sup> ist ein Mitglied der tumor necrosis factor-Rezeptor-Superfamilie (Reichardt et al., 2006) und wurde ursprünglich als Rezeptor für NGF

beschrieben (Johnson et al., 1986; Radeke et al., 1987). Schlussendlich konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Bindung aller bekannten Neurotrophine an diesen Rezeptor mit einer niedrigen Affinität stattfindet (Ip et Yancopoulos, 1996; Lewin and Barde, 1996). Die intrazelluläre Signalfortleitung des p75<sup>NTR</sup>-Rezeptors erfolgt nicht über Kinasenaktivierung, sondern unter anderem G-Protein gesteuert. Dadurch werden zum einen über den Jun-Kinase Weg p53-vermittelt pro-apoptotische Gene aktiviert. Andererseits können auch NF- $\kappa$ B-abhängig überlebensfördernde Gene (Hamanoue et al., 1999; Middleton et al., 2000) oder RhoA-vermittelte GTPase Aktivität zur Hemmung des Neuritenwachstums kontrolliert werden (Yamashita et al., 1999).

Die Pro-Neurotrophine zeigen ein besonderes Bindungsverhalten. Sie können nicht an die Trk-Rezeptoren binden, aktivieren jedoch hochaffin den p75-Neurotrophinrezeptor p75<sup>NTR</sup>. Über eine Modulation der Proteasenaktivität, die die Pro-Neurotrophine in ihre biologisch reife Form überführt, kann somit posttranskriptionell noch Einfluss auf die differentielle Rezeptorenaktivierung genommen werden (Lee et al., 2001).

Aus diesem Bindungsverhalten der unterschiedlichen Rezeptorenfamilien gegenüber den einzelnen Neurotrophinen lässt sich ableiten, dass die Rezeptoren der Trk-Familien aufgrund ihrer hoch affinen Bindung wohl die spezifischen biologischen Effekte der Neurotrophine vermitteln. Darüber entfalten sie ihre spezielle Wirkung auf neuronales Überleben und axonale Elongation (Barbacid et al., 1994; Snider et al., 1994).

Der p75-Neurotrophin-Rezeptor p75<sup>NTR</sup> wird auch als Modulator der Trk-Rezeptorfunktion verstanden. p75<sup>NTR</sup> moduliert an diesen zunächst die Ligandenbindung. Darüber hinaus wird der Zugang zu Neurotrophinen durch Förderung von axonaler Aussprossung und Zielinnervation beeinflusst. Nicht zuletzt fördert dieser die Endozytose und den retrograden axonalen Transport und damit die intrazelluläre Interaktion von Neurotrophinen mit den Trk-Rezeptoren (Reichardt et al., 2006).

Die Trk-Rezeptoren sind sehr vielfältig über das Nervengewebe verteilt. Diese Verteilung ändert sich während der Entwicklung, so dass darüber unterschiedliches Ansprechen verschiedener Neuronenpopulationen auf einzelne Neurotrophine zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten erklärt wird (Lewin and Barde, 1996).

## **2.2.2. Einfluss von Neurotrophinen auf die Überlebensregulation kortikospinaler Neurone**

Neurotrophine können sowohl im peripheren wie auch im zentralen Nervensystem das Überleben von Neuronen positiv beeinflussen. Im peripheren Nervensystem stellt sich die Situation häufig simpel dar, indem ein einzelnes Neurotrophin das Überleben einer bestimmten Neuronenpopulation fördert (Snider et al., 1994; Lindsay et al., 1996). Hingegen bietet sich im zentralen Nervensystem eine deutlich komplexere Situation. Dort können mehrere neurotrophische Faktoren gleichzeitig das Überleben von Neuronen beeinflussen (Barbacid et al., 1994; Snider et al., 1994; Lindsay et al., 1996).

Das Fehlen einzelner Neurotrophine, zum Beispiel in Knock-Out-Mäusen, ist in dieser komplexen Situation nur selten wichtig für das Überleben von Neuronen des Zentralnervensystems (Snider et al., 1994). Dieser Befund spiegelt eine relative Austauschbarkeit einzelner trophischer Substanzen wider. Einen zusätzlichen Kompensationsmechanismus bei einem trophischen Versorgungsengpass stellt die Vielfalt der Herkunft potentieller trophischer Faktoren dar. Die klassische Neurotrophin-Hypothese besagt, dass das neuronale Überleben abhängig ist von der Aufnahme eines speziellen neurotrophischen Faktors aus dem Innervationsgebiet, der retrograd im Axon zum Zellsoma transportiert wird (Barde et al., 1989). Mittlerweile weiß man jedoch, dass auch aus anderen Quellen Faktoren aufgenommen werden können, die zum Beispiel parakrin aus der unmittelbaren Umgebung des Perikaryons oder autokrin vom betroffenen Neuron selbst stammen können (Korsching et al., 1993).

Die Austauschbarkeit trophischen Supports im Zentralnervensystem spiegelt sich auch im kortikospinalen System der Ratte wider. Dort zeigen sich positive Effekte auf neuronales Überleben axotomierter kortikospinaler Neurone von verschiedenen exogen applizierten trophischen Faktoren wie brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Giehl and Tetzlaff, 1996), neurotrophin-3 (NT-3) (Giehl and Tetzlaff, 1996), ciliary neurotrophic factor (CNTF) (Dale et al., 1995) und glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) (Giehl et al., 1997). Offensichtlich beruhen dabei allerdings die positiven Effekte von exogen zugeführtem GDNF und NT-3 partiell oder komplett auf endogenem BDNF und es sind etwa zwei Drittel der axotomierten kortikospinalen Neurone von endogenem kortikalem BDNF abhängig (Giehl et al., 1998b).

In der Axotomie-Situation können exogen zugeführtes BDNF und GDNF den Axotomie-induzierten Zelltod langfristig komplett verhindern (Giehl and Tetzlaff, 1996; Giehl et al., 1997; Hammond et al., 1999). NT-3 kann diesen Effekt in unphysiologisch hohen Dosen ebenfalls bewirken. Mutmaßlich geschieht dies über eine niedrigaffine TrkB-Aktivierung. Allerdings hält dieser Effekt nur kurzzeitig für die erste Woche nach Axotomie an (Hammond et al., 1999). Physiologisch ist NT-3 an der Induktion der Apoptose verletzter kortikospinaler Neurone beteiligt. Dazu fördert endogenes NT-3 den Zelltod durch Etablierung der BDNF-Abhängigkeit axotomierter kortikospinaler Neurone über eine Aktivierung von TrkC. proNGF löst durch Aktivierung von p75 die Apoptose der kortikospinalen Neurone, die nicht mit BDNF versorgt sind, schlussendlich aus (Giehl et al., 2001; Harrington et al., 2004; Shulga et al., 2008).

### **2.2.3 Einfluss neuronaler Projektionen und Zuflüsse**

Diese komplexe Situation gilt es nun weiter aufzuschlüsseln, indem zunächst die Versorgungsrouten kortikospinaler Neurone mit BDNF und anderen trophischen Substanzen geklärt werden sollten. Es stellt sich die Frage, aus welchen Arealen die trophische Unterstützung für die überlebenden axotomierten Neurone stammt. Bekanntermaßen sind die Projektion der Axone und der Zufluss der Dendriten als wichtiger Faktor zur Überlebensregulation etabliert. Hierbei spielen zum einen axonale Transportmechanismen von Neurotrophinen eine Rolle. Andererseits ergeben sich aber auch lokale Effekte an der Zellmembran, durch die Signalkaskaden zum Zellkörper induziert werden (Barde et al., 1988; Korsching et al., 1993; Reichardt et al., 2006; Bronfman et al., 2007). Um diese Zuflüsse aufzuschlüsseln, wird es nötig, aus dem *in vivo*-Modell heraus zu gehen und ein Kulturmodell voneinander getrennter Hirnabschnitte zu etablieren. In diesem können schlussendlich über Co-Kulturen die getrennten Hirnareale später wieder zusammengefügt und bezüglich ihrer dezidierten Einflüsse auf neuronales Überleben untersucht werden. Die Etablierung eines derartigen *in vitro* Systems war Zielsetzung dieser Studie.

## **2.3. Zellkulturverfahren für Nervengewebe**

### **2.3.1. Allgemeine Grundlagen**

Verschiedene alternative Kulturmodelle zur Anlage von Primärkulturen, das heißt Kulturen direkt *ex vivo* entnommener, nicht immortalisierter Zellen, sind entwickelt worden. Zum einen besteht die Möglichkeit Zellkulturen dissoziierter Neuronen des Zentralnervensystemes anzulegen, zum anderen können *en-bloc*-Kulturen kompletter Gewebescheiben des Zentralnervensystemes kultiviert werden. Letztere erhalten die organotypische Zytoarchitektur in wesentlichen Zügen. Typischerweise werden derartige Kulturen aus embryonalen oder früh postnatalen Stadien entnommen. Gewebe des Zentralnervensystemes von Nagern kann mit diesen Methoden unter Umständen viele Wochen in Primärkultur erhalten werden. Die basalen Anforderungen sind überraschend einfach: Ein stabiler Nährboden, Kulturmedium, ausreichende Oxygenierung und Inkubation bei Temperaturen über 36°C. Unter diesen Bedingungen setzen Nervenzellen ihre Differenzierung fort und entwickeln eine Gewebeorganisation, die der *in situ* stark ähnelt (Gähwiler et al., 1997).

Neuronale Zellverbände, die auf diese Weise extensiv untersucht wurden und entsprechend kultiviert werden können, entstammen dem Hippocampus, dem Cerebellum (Gähwiler und Llano, 1989), dem Thalamus (Bolz et al., 1990) und dem Hypothalamus (Tominaga et al., 1994) ebenso wie dem Cortex (Gähwiler et al., 1985; Romijn et al., 1988; Bolz et al., 1990), dem Hirnstamm (Knöpfel et al., 1989), dem Rückenmark (Braschler et al., 1989), der Substantia nigra (Jäger et al., 1989), dem Striatum (Ostergaard et al., 1991) und der Retina (Chen et al., 1997).

### **2.3.2. Dissoziierte Zellkulturen**

In dissoziierten Zellkulturen können fetale bis früh postnatale (maximal bis etwa P7) Neurone kultiviert werden, indem sie nach Explantation mit Trypsin behandelt werden. Die einzelnen Zellen werden danach mechanisch voneinander separiert. Die Zellen werden entweder auf zum Beispiel mit Polylysin beschichtete Objektträger aufgebracht oder in oder auf einer Matrix aus Gliazellen gelagert. Auf diesen können sie mehr als zwei Wochen überleben, weiter ausreifen und am Ende sogar axonales Wachstum präsentieren (Bartlett and Banker 1984a). Dieses Modell erlaubt es, nicht nur die Formation axonaler Ausläufer und Dendriten

einzelner Zellen zu beobachten, sondern auch die Fähigkeit zur Ausbildung spezifischer Synapsen und ihrer biochemischen Zusammensetzung an deren Oberfläche *in vitro* zu beurteilen (Banker et al., 1977).

### **2.3.3. Organotypische Zellkulturen**

Die organotypischen Gewebekulturen des Zentralnervensystems konnten bereits in der Vergangenheit für ein breites Spektrum an Untersuchungen verwendet werden, die von elektrophysiologischen, morphologischen, pharmakologischen bis hin zu Entwicklungsstudien reichten. In vielen Fällen wurden dafür Zellen der Hippocampusformation verwendet. Die meisten Prozeduren für organotypische Gewebekulturen basieren auf Gähwilers oder Stoppinis Protokollen. Zum einen kann das Gewebe in Rollerkulturen kultiviert werden. Hierzu werden Gewebescheiben in einer Kollagenmatrix oder in einem Plasmagerinnsel auf einem Objektträger eingebettet und dann kontinuierlicher langsamer Rotation ausgesetzt. Dadurch wird die Oxygenierung durch einen ständigen Wechsel der Gas-Flüssigkeits-Oberfläche sichergestellt (Gähwiler et al., 1981). Zum anderen kann das Gewebe nach Explantation in Membrankulturen auf semipermeable Membranen an der Luft-Medium-Schnittstelle aufgebracht werden. Eine Rotation ist dabei während der Kulturphase nicht notwendig. Das Gewebe wird in diesem Setting von oben oxygeniert und wird von unten durch Nährmedium versorgt (Stoppini et al., 1991).

### **2.3.4. Vergleich der Zellkulturverfahren**

Dissoziierte Zellkulturen können unter Verwendung fetaler Zellen hervorragend das axonale oder dendritische Wachstum und die Entwicklungsstadien der einzelnen Zelle darstellen. Auch für elektrophysiologische Studien sind diese Kulturverfahren gut geeignet. Schließlich kann man – im Extremfall in Einzelzellkulturen – biologische Phänomene an einem Zelltyp ohne die Interferenz mit anderen Zelltypen untersuchen. Es besteht hierdurch beispielsweise die Möglichkeit beurteilen zu können, ob eine zur Kultur applizierte Substanz einen direkten Effekt auf einen interessierenden Neuronentyp hat. Alternativ können andere Zelltypen hinzugefügt werden, um deren Effekte auf die Targetzellen zu ergründen. Nachteilig ist, dass Kulturen nur bis maximal zwei Wochen kultiviert werden können und der Gewebekontext verlorengeht (Gähwiler et al., 1997). Die experimentellen Bedingungen sind wegen des

letzteren Aspektes deutlich weiter von der physiologischen Situation entfernt als in organotypischen Kulturverfahren.

Soll also primär eine Frage unter möglichst physiologischen Bedingungen untersucht werden, sind die organotypischen Zellkulturen das Verfahren der Wahl. Insbesondere Mechanismen der von Zellinteraktion abhängigen Zelldifferenzierung lassen sich hier gut untersuchen. Zur Anlage dieser Kulturen werden Organe aus embryonalen oder früh postnatalen Tieren entnommen, in Scheiben präpariert und in das Kultursetting eingebracht. In allen organotypischen Verfahren lassen sich Gewebe über mehrere Wochen in Kultur erhalten. Ein wesentlicher Unterschied der einzelnen Gewebekulturverfahren besteht in der Dicke der erhaltenen Slices. Die Rollerkulturverfahren führen nach Wochen in Kultur zu einer Reduktion der Dicke von initial 400 auf 50  $\mu\text{m}$ , wohingegen in Membrankulturen nach gleicher Ausgangsdicke noch 100 bis 150  $\mu\text{m}$  erhalten bleiben (Gähwiler et al., 1997). Aufgrund der unterschiedlichen Modifikationen ist es dem Untersucher überlassen, das zur Fragestellung jeweils am besten passende Verfahren anzuwenden. Aufgrund der Abflachung zu einer quasi einschichtigen Slice sind Rollerkulturverfahren bei Experimenten, die optimale optische Bedingungen und Zugang zu den Neuronen erfordern vorzuziehen (Gähwiler et al., 1997). Mit normalen Phasenkontrastmikroskopen können nämlich alle individuellen lebenden Zellen in jedem Teil der Kultur beobachtet werden. Zudem werden einzelne experimentelle Manipulationen wie das Trennen bestimmter Bahnverbindungen durch die feste Glasoberfläche erleichtert. Dagegen bieten mit der Membranzmethode angelegte Kulturen klare Vorteile in der Präparation und sobald eine semi-dreidimensionale Struktur benötigt wird. Dies kann zum Beispiel in Studien notwendig werden, in denen Gewebe zu morphologischen Studien seziiert werden muss, für Studien zur elektrophysiologischen Untersuchung so genannter Compound Signale von Populations-basierten Spikes oder für biochemische Studien, die größere Gewebemengen erfordern (Gähwiler et al., 1997). Hinzu kommt, dass das Gewebe während aller Kulturstadien – also auch in der Frühphase – zugänglich und beobachtbar bleibt, da es zu keinem Zeitpunkt vollständig von Matrix bedeckt ist (Gähwiler et al., 1997).

### **2.3.5. Spezielle Anforderungen an das Kulturverfahren**

Nur wenige Versuche sind bisher unternommen worden, um zu versuchen, adultes Gewebe zu kultivieren. Da unsere Forschungsgruppe jedoch speziell an der neuronalen

Überlebensregulation im adulten Gehirn interessiert ist, zielten wir in der aktuellen Studie darauf ab, Kulturen von Gewebe sexuell reifer Tiere, das heißt nach dem Entwicklungsstadium P54, anzulegen, um die Überlebenskinetiken adulter Säugetierzellen in einem organotypischen Kulturansatz zu untersuchen.

Dazu bot sich Stoppinis Protokoll an, das bereits Kulturen für Entnahmestadien ab P24 erlaubte. Eine dissoziierte Zellkultur wäre nur unter Verwendung fetaler Zellen möglich gewesen und nach Gähwilers Modell wäre die Zelldichte in den Slice-Kulturen nicht hoch genug gewesen, um eine Survivalanalyse reproduzierbar durchführen zu können. Es ergab sich allerdings das Problem, dass in Vorversuchen mit der direkten Anwendung des Protokolls nach Stoppini die mangelnde Adhärenz der Gewebescheiben an der Membran dazu führte, dass Kulturen nur bis maximal Tag 1 *in vitro* (DIV1) durchführbar waren (unveröffentlichte Daten). Dies war kein ausreichender Zeitraum für die Analyse neuronalen Überlebens, so dass für die Kultur adulten Gewebes des Zentralnervensystems eine Modifikation erfolgen musste.

#### **2.4. Fragestellung**

Zunächst sollte ein *in vitro*-System etabliert werden, das es erlaubt die Effekte von Wachstumsfaktoren auf Zellüberleben von kortikospinalen oder anderen langprojizierenden Neuronen zu untersuchen. Es ergab sich die Notwendigkeit, ein Slice-Kultur-Modell für adultes Gewebe zu entwickeln. In Vorstudien hatten sich nämlich Hinweise ergeben, dass ein relevanter Unterschied in der Regulation neuronalen Überlebens zwischen jungen und adulten Nervenzellen (oberhalb P54) bestand (unveröffentlichte Daten). Um die Adhärenz der Gewebescheiben an die Membran in den Slice-Kulturen nach Stoppini zu sichern, sollte über eine Modifikation des Protokolls ein leichter Sog an die Membran angelegt werden, der die Slices quasi an ihre Unterlage ansaugte, hierdurch stabilisierte und deren Überleben verbesserte. Daraus resultierten zunächst folgende Fragestellungen:

1. Ist es möglich über eine Modifikation des Protokolls nach Stoppini adultes Gewebe des Zentralnervensystems über einen ausreichend langen Zeitraum in organotypischen Slice-Kulturen zu erhalten?
2. Unterscheidet sich das Überleben langprojizierender Neurone in den Slice-Kulturen von dem intrinsischer Neurone?

3. Lässt sich das Überleben der langprojizierenden Neurone durch Änderung externer Bedingungen überhaupt beeinflussen?

## **2.5. Ziele der Studie**

In Bezug auf die formulierten Fragestellungen wurden folgende Ziele für die Studie formuliert:

1. Etablierung eines Kultursystems für adulte Slices.
2. Darstellung einer Überlebenskinetik von Pyramidenzellen in modifizierten Slice-Kulturen nach Stoppini.
3. Darstellung einer Überlebenskinetik von Schicht II-Neuronen in modifizierten Slice-Kulturen nach Stoppini.
4. Versuch der äußeren Beeinflussung des Überlebens lang projizierender Neurone in den Slice-Kulturen über Entzug oder Zugabe trophischer Faktoren.

### **3. MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1. Zellkultursysteme**

##### **3.1.1. Versuchstiere**

Für die Studie kamen adoleszente (P25) und adulte (>P60) Sprague Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von 80 bis 500 g zur Verwendung. Alle Versuche waren gemäß §8 Abs.1 des Tierschutzgesetzes (TSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 26. 02. 1993 (BGB1. I S.255) in Verbindung mit §1 der Verordnung über Zuständigkeiten nach dem TSchG vom 7. 10. 1987 (Amtsbl. S. 1185) durch die zuständige Kommission genehmigt und wurden nach entsprechenden Auflagen durchgeführt. Die Haltung der Tiere erfolgte in einem klimatisierten Raum mit zyklischer Tag-Nacht Beleuchtung mit 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit. Wasser und Futter (ALTRONIN Standard®) stand den Tieren nach Wunsch zur Verfügung. Die Käfige (Makrolon Typ 4) wurden von je 3 bis 5 Ratten bewohnt.

##### **3.1.2. Gewebeentnahme**

Für die Slice-Kulturen wurden junge (P25) oder adulte (>P60) Ratten durch Inhalation von Metofane in Narkose versetzt. Sobald ein tiefes Narkosestadium erreicht war, wurden die Tiere dekapitiert. Nach Entnahme des interessierenden Organes wurden die Gewebelöcke aseptisch in eisgekühlter Gey's Balanced Salt Solution (GBSS), der 6,5 mg/ml Glukose zugesetzt war, präpariert. Danach wurden die Blöcke mit einem SORVALL Mikrotom in 300 µm dicke Schnitte zerlegt. Bei der Präparation von Gehirn wurde darauf geachtet, die Schnitte als Frontalebene anzulegen. Danach wurden diese in der eisgekühlten Lösung voneinander gelöst und nachfolgend auf die Membran eines MILLICELL TM Insert Systems (0,4 µm Porengröße, 30 mm Membrandurchmesser) aufgebracht, das in eine 6-schichtige Kulturschale (costar 3516) auf einen 0,75 ml Tropfen Kulturmedium eingesetzt wurde.

### **3.1.3. Kultursystem nach Stoppini**

Im etablierten Kultursystem von Stoppini (Stoppini et al., 1991) wurden 30 mm im Durchmesser messende sterile, poröse (0,4 µm Porengröße), transparente und wenig Protein bindende Einsatzmembranen (Millicell-CM, Millipore) als Träger für die Explantate benutzt. Die Membranen wurden in ein Petri-Schälchen eingesetzt, das einen Milliliter Medium enthielt.

Getestet wurden die folgenden Kulturmedien:

Das Stoppini-Medium setzte sich aus 50% Minimal Essential Medium (MEM), 25% Hank`s Balanced Salt Solution (HBSS), 25% Pferdeserum, 0,5% Glutamin, 10000 I.E. Streptomycin und Penicillin und Glukose in einer endgültigen Konzentration von 6,5 mg/ml Medium bei einem maximalen pH von 7,2 zusammen.

Bergold-Medium enthielt 50% Basal Eagle Medium (BEM), 25 % Eagle`s Balanced Salt Solution (EBSS), 25% Pferdeserum, 1,2% 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), 0,5% Glutamin, 10000 I.E. Streptomycin und Penicillin und Glukose in einer endgültigen Konzentration von 6,5 mg/ml Medium bei einem maximalen pH von 7,2.

Murray-Medium bestand aus 50% Minimal Essential Medium (MEM), 25% Hank`s Balanced Salt Solution (HBSS), 25% Pferdeserum, 0,9% 1-molare Calciumchloridlösung, 1,8% 1-molare Magnesiumsulfatlösung, 1% 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), 0,5% Glutamin, 10000 I.E. Streptomycin und Penicillin und Glukose in einer endgültigen Konzentration von 6,5 mg/ml Medium bei einem maximalen pH von 7,2.

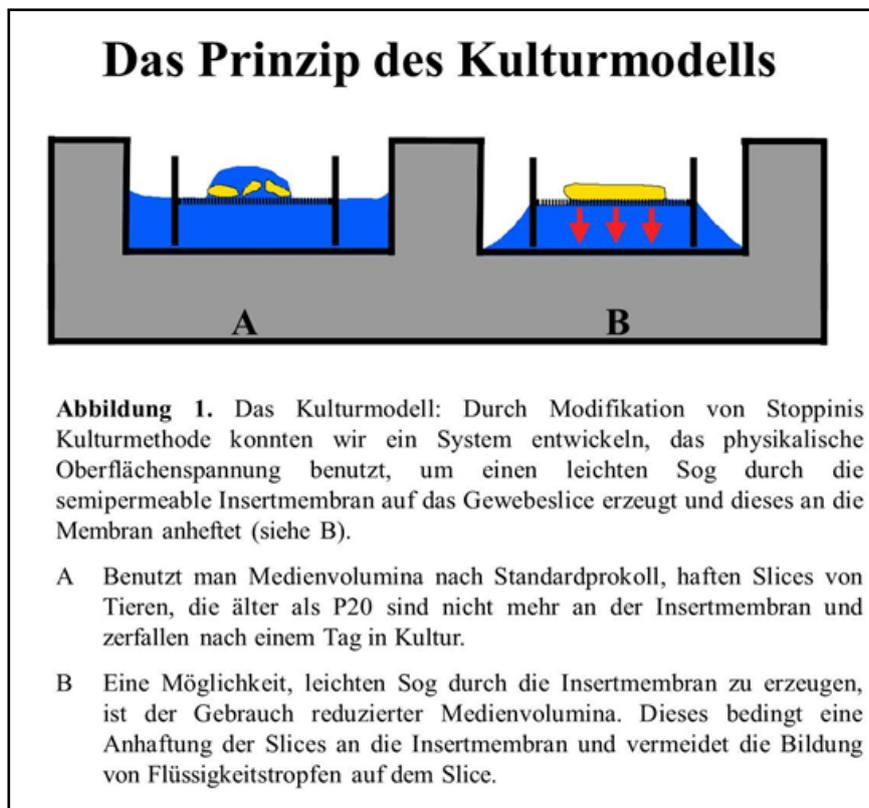
Das interessierende Gewebe wurde entnommen, mit einem Mikrotom in die gewünschte Schichtdicke geschnitten und auf die angefeuchtete Membran aufgebracht. Die Membran durfte nicht vollständig mit Medium bedeckt sein, damit die Explantate weiterhin Kontakt zur Luft halten konnte. Die Petri-Schälchen wurden sodann in einen Inkubator bei 36°C Umgebungstemperatur bei einer 5%igen Kohlendioxidanreicherung der Luft platziert und kultiviert. Zweimal pro Woche erfolgte ein Medienwechsel.

### 3.1.4. Vorversuche

In unseren Händen gelangen Vorversuche mit dem Kultursystem nach Stoppini für Gewebeschnitte von sensomotorischem Kortex der Ratte nur bei Tieren bis zum postpartalen Tag 20. Ab Tag 21 adhärten die Slices sehr schlecht und zerfielen bis zum Abschluss des ersten Kulturtages (DIV1). Wir beobachteten, dass die Abschnitte dieser Slices, die noch eine gewisse Adhärenz aufwiesen, deutlich besser erhalten waren, als die nicht adhärierenden Sliceareale. Es lag daher nahe, dass Adhärenz ein ausschlaggebendes Kriterium für ein Gelingen adulter Slices darstellte. Um dieses zu erreichen, erarbeiteten wir ein Konzept, um leichten Sog von unten an den Slice anzulegen und ihn hierdurch auf der Kulturmembran zu stabilisieren. Dafür nutzten wir die Kapillarkräfte der Flüssigkeit durch die semipermeable Membran hindurch, indem wir die Menge an hinzugefügtem Kulturmedium reduzierten (s. Abbildung 1).

### 3.1.5. Modifizierung des Kultursystems nach Stoppini

Im modifizierten Kultursystem nach Stoppini wurden ebenfalls 30 mm im Durchmesser



messende sterile, poröse (0,4 µm Porengröße), transparente und wenig Protein bindende Einsetzmembranen (Millicell-CM, Millipore) als Träger für die Explantate benutzt. Die Membranen wurden in ein 6-schächtiges Kulturschälchen eingesetzt, das nur mit exakt 750 µl Medium gefüllt wurde, um einen Medienkonus zu

erzeugen, der von der Insert-Membran weg zeigte und einen hydrostatischen Druck nach unten auf das Slice erzeugte. Damit konnte Tropfenbildung auf dem Slice verhindert und eine verbesserte Adhärenz an die Membran gewährleistet werden (s. Abbildung 1).

Als Kulturmedien wurden zwei verschiedene Ansätze eingesetzt:

Das Stoppini-Medium setzte sich aus 50% Minimal Essential Medium (MEM), 25% Hank`s Balanced Salt Solution (HBSS), 25% Pferdeserum, 0,5% Glutamin, 10000 I.E. Streptomycin und Penicillin und Glukose in einer endgültigen Konzentration von 6,5 mg/ml Medium bei einem maximalen pH von 7,2 zusammen.

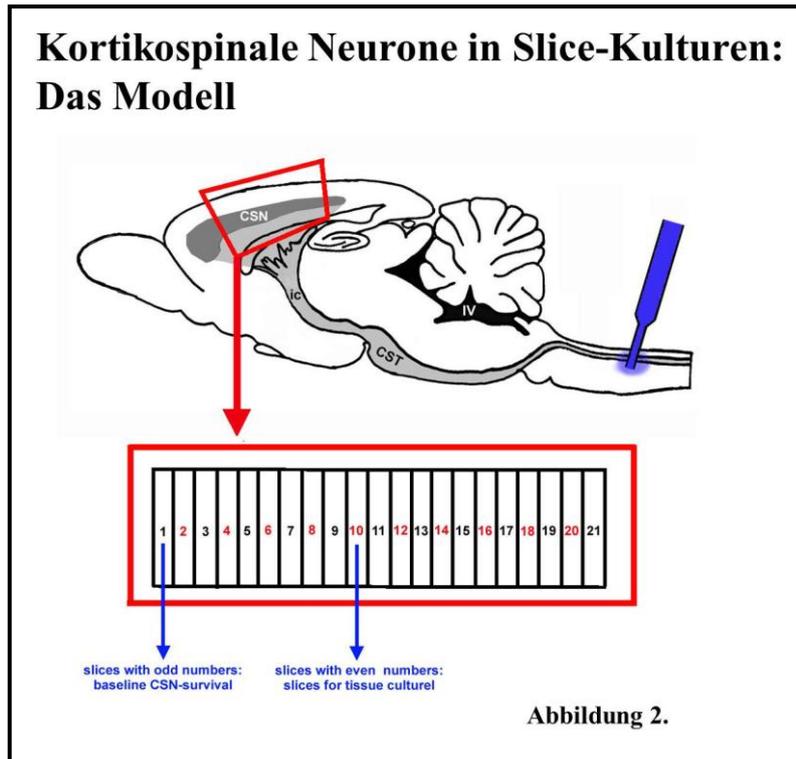
Das definierte Medium wurde aus 50% Minimal Essential Medium (MEM), 25% Hank`s Solution, 25% phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) und Glukose in einer endgültigen Konzentration von 6,5 mg/ml Medium sowie 0,5 ml Glutamin angesetzt. Mithilfe dieses Ansatzes sollte die unspezifische trophische Unterstützung der Neuronen durch die Proteine im Pferdeserum verhindert werden.

Das interessierende Gewebe wurde entnommen, mit einem Mikrotom in die gewünschte Schichtdicke von 300 µm geschnitten und auf die angefeuchtete Membran aufgebracht, nachdem ein Tropfen von lediglich 750 µl Medium eingebracht worden war. Durch diese Anordnung konnte verhindert werden, dass das Explantat von zu viel Medium bedeckt wurde und zu wenig Kontakt zur Luft bekam.

Die Kulturschälchen wurden anschließend in einen Inkubator bei 36°C Umgebungstemperatur und einer 5%igen Kohlendioxidanreicherung der Luft platziert und kultiviert. Die Zeiten in Kultur variierten zwischen DIV 1 und DIV 21 (zwischen 1 und 21 Tagen *in vitro*). Alle drei Tage erfolgte ein Medienwechsel mit Austausch von 500 µl Medium.

### **3.2. Experimenteller Aufbau der Studie**

Zur Untersuchung des kortikospinalen Systems der Ratte wurde vor Gewebeentnahme der Fluoreszenztracer „Fast Blue“ (FB) im Bereich des zervikalen Rückenmarks in den kortikospinalen Trakt injiziert (s. Abbildung 2). Fast Blue wurde danach retrograd durch die Axone zu den Zellkörpern der kortikospinalen Neurone transportiert. Diese ließen sich dann in Schicht V des Kortex durch die Anwesenheit des blau fluoreszierenden Fast Blue fluoreszenzmikroskopisch erkennen.



Die Tiere wurden getötet und das Zentralnervensystem entnommen. Der sensorische Kortex wurde präparatorisch isoliert und mithilfe eines Mikrotomes in Slices von 300 µm Dicke zerteilt. Jedes zweite dieser Slices wurde auf eine Insertmembran aufgezogen (so genannte „gerade“ = „even“ Slices, s. Abbildung 2), die anderen direkt fixiert und auf einen

Objektträger aufgezogen (so genannte „ungerade“ = „odd“ Slices, s. Abbildung 2).

Um die Überlebensrate der kortikospinalen Neuronen zu vordefinierten Zeitpunkten festzustellen, wurden die Slices aus der Kultur entnommen und fixiert. Zunächst erfolgte eine Auszählung der kortikospinalen Neurone der benachbarten, nicht kultivierten und initial fixierten „ungeraden“ Slices. Auf Basis dieser Zählungen erfolgte die Berechnung eines Mittelwertes für die jeweils zwischengelagerten, in Kultur genommenen „geraden“ Slices („Sandwich-Interpolation“). Dieser wurde als näherungsweise Ausgangswert des kultivierten Slices angenommen und ins Verhältnis zur aktuell erhältlichen Zellzahl. So konnte die Rate überlebender Neurone näherungsweise quantifiziert werden. Der gleiche Ansatz wurde mit unterschiedlichen Medien wiederholt und auch für die Quantifizierung anderer, HOECHST 33342 gefärbter, Neuronenpopulationen verwendet.

### 3.3. Histologische Charakterisierung und Färbemethoden

Für die verschiedenen Ansätze der Beurteilung der Gewebemorphologie und der Überlebenskinetiken an bestimmten Zellpopulationen waren unterschiedliche Färbemethoden notwendig.

So konnten Nativ-Slices und Kryoschnitte gut mit gängigen histologischen Färbemethoden zur Mikroskopie kontrastiert werden. Hingegen waren Gewebeslices nach mehreren Tagen in Kultur durch diese Methoden kaum noch anfärbbar, wenn sie nicht zu Kryostatschnitten weiter verarbeitet worden waren. Als Ursache vermuteten wir die Ausbildung einer Glianarbe durch Astrozytenproliferation am Rand des Slices, die eine ausreichende Diffusion der Färbung in das Gewebe verhinderte. Somit musste für die morphologische Beurteilung kultivierter, nicht Kryostat geschnittener Slices HOECHST 33342 verwendet werden, welches auch bei voll ausgeprägter Glianarbe ausgezeichnet in den Slice diffundierte. Da Überlebensanalysen an Gesamtslices, die nicht Kryostat geschnitten waren, durchgeführt wurden, kam dort auch HOECHST 33342 zur Anwendung. Nur bei der Analyse kortikospinaler Neurone war dies nicht notwendig, da diese schon vor der Kultur mit Fast Blue markiert worden waren.

Sollte lediglich die Gewebemorphologie von länger in Kultur befindlichen Slices untersucht werden, kamen Standardfärbungen an Kryostatschnitten der entsprechenden Slices zur Anwendung. Hierzu wurden die Slices nach der interessierenden Zeit in Kultur für 20 Minuten in PBS-gepufferter 4%iger Paraformaldehydlösung fixiert, in PBS-gepufferter 30%iger Saccharose über Nacht kryogeschützt und am nächsten Tag auf Trockeneis gefroren. Das Gewebe wurde dann entweder tangential oder transversal auf einem Kryostat in 6 µm dicke Schnitte verarbeitet. Diese Schnitte wurden entweder mit Kresylviolett oder Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

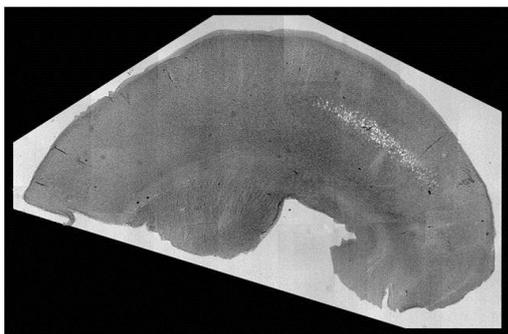
Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine Färbemethode aus zwei Einzelfärbungen, mit der Strukturen feingeweblicher Schnitte für morphologische Untersuchungen im mikroskopischen Bild angefärbt werden können. Hämatoxylin färbt basophile Strukturen blau, insbesondere Zellkerne mit der darin enthaltenen DNA und das mit Ribosomen angereicherte endoplasmatische Retikulum. Eosin färbt alle azidophilen Strukturen rot und damit im Wesentlichen Zellplasmaproteine. Nach der Hämatoxylin-Färbung musste zunächst der pH-Wert durch eine Spülung mit Leitungswasser gehoben werden, wodurch erst der typische Umschlag des Farbtones in Blauviolett erfolgte, danach folgte die Zytoplasmafärbung in einer alkoholischen Lösung von Eosin. Weitere Spülschritte in alkoholischen Lösungen aufsteigender Konzentration bis hin zu reinem Alkohol dehydrierten das Gewebe, das nachfolgend noch mit Xylol geklärt und in Entellan eingebettet wurde.

Die Kresylviolett-Färbung ist ein Oxacinfarbstoff, der insbesondere die Nissl-Schollen von Neuronen, also das endoplasmatische Retikulum, aufgrund der dort enthaltenen RNA blauviolett färbt. Das Gewebe wurde zunächst für zwei Minuten in eine 0,5%igen Lösung aus Kresylviolett getaucht und nachfolgend mit destilliertem Wasser gespült. Weitere Spülschritte in alkoholischen Lösungen aufsteigender Konzentration bis hin zu reinem Alkohol dehydrierten das Gewebe, das nachfolgend noch mit Xylol geklärt und in Entellan eingebettet wurde.

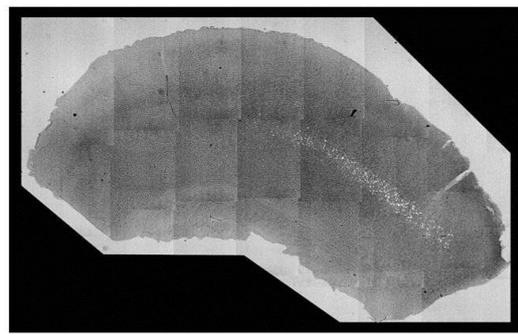
Die Gesamtslices wurden nach der Zeit in Kultur nach dem Erhalt der Neurone in den kortikalen Schichten II und V beurteilt, respektive dem Erhalt der intrinsischen und langprojizierenden Neurone des Zentralnervensystems.

Zur Darstellung der intrinsischen Schicht II-Neurone wurden diese mit dem Fluoreszenzfarbstoff HOECHST 33342 angefärbt. Das ist ein Vitalfarbstoff zur DNA-Färbung, der bevorzugt an A-T-Basenpaare bindet. Die Grundlösung wurde zunächst mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 1 mM gebracht. Von dieser wurde die Färbung bis zu einer finalen Konzentration von 10  $\mu$ M in das Medium gegeben. Dieses musste eine Stunde bei 36°C inkubiert werden, damit die Diffusion ins Gewebe gewährleistet war. Die so behandelten Slices wurden anschließend wie oben beschrieben fixiert, auf Objektträger aufgezogen, luftgetrocknet, in aufsteigender Alkoholreihe entwässert, in Xylol geklärt und mit Entellan eingedeckt.

### CSN-enthaltendes Slice vor Kultur



### CSN-enthaltendes Slice nach DIV3



**Abbildung 3.** Slices mit Fluoreszenz markierten kortikospinalen Neuronen vor und drei Tage nach Kultur. Die Slices sind einem ein Jahr alten Tier entnommen. Das linke ist aus einer „ungeraden“ Serie, d.h. von denen, die der Bestimmung der Ausgangszahl der kortikospinalen Neurone dienen. Das rechts ist aus einer „geraden“ Serie, d.h. von denen, die in Kultur genommen werden. Die Slices wurden UV-Licht ausgesetzt, um die Fast Blue markierten kortikospinalen Neurone (helle Zellen in Schicht 5) sichtbar zu machen.

Unter UV-Illumination ließ sich anhand der jeweiligen Zelldichte der typische sechsschichtige Aufbau des Neokortex darstellen und somit die Schicht II identifizieren. Als Neuronen wurden nur Zellen in dieser Schicht mit einem klar sichtbaren Nucleolus identifiziert (s. Abbildung 4).

Die kortikospinalen Neurone wurden vorab mit dem Fluoreszenztracer Fast Blue (für Quantifizierungen) oder RDX (Gemisch aus Rhodamin Dextranen und Rhodamin-B-Isonthiozyanat (Giehl and Tetzlaff, 1996); nur für Vorversuche) retrograd markiert. Fast Blue ist eine Fluoreszenzfärbung, die häufig als neuronaler Tracer eingesetzt und zeitweilig auch als hydrophiler retrograder Tracer bezeichnet wird. Rhodamin Dextran wird als fluoreszentes Dextran routinemäßig benutzt, um neuronale Projektionen antero- oder retrograd zu markieren. RDX wird nur in vitale Zellen aufgenommen und besteht aus einer Mischung aus 15% Rhodamin Dextran 10000, 10% Rhodamin Dextran 3000 und 10% Rhodamin-B-Isothiozyanat in 0,2% Dimethylsulfoxid (DMSO). Die Injektion erfolgte bei den adulten Tieren mindestens eine Woche, bei adoleszenten Tieren minimal 2 bis 3 Tage vor Gewebeentnahme auf Höhe des 4. und 5. Zervikalsegmentes des Rückenmarkes mit je Seite 0,8 µl Fast Blue in 0,2% Dimethylsulfoxid (DMSO) respektive je Seite 1 µl RDX.

### **3.4. Analyse neuronalen Überlebens in den Kulturen**

#### **3.4.1. Markierung und Identifizierung kortikospinaler Neurone**

Zum retrograden Tracing der kortikospinalen Neurone wurden Fluoreszenztracer (Fast Blue oder Rhodamin Dextran) auf Höhe des 4. und 5. zervikalen spinalen Segmentes injiziert (Bonatz et al., 2000). Die Anästhesie wurde unter einer kombinierten Hypothermie und Metofane-Inhalationsanästhesie bei früh postnatalen oder unter einer intraperitonealen Injektionsanästhesie mit 40 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital und 150 mg/kg Körpergewicht Chloralhydrat bei adulten Ratten durchgeführt.

Nach Ablauf der für das Tracing notwendigen Zeit wurde der sensorimotorische Kortex *en bloc* entnommen, vom übrigen Hirngewebe isoliert und in der Frontalebene in anterior-posteriorer Richtung in 300 µm dicke Gewebeschnitte zerteilt. Die Gewebeschnitte wurden entsprechend ihrer anterior-posterioren Anordnung in einer 24-schächtigen Kulturschale gesammelt und somit die anatomische Lokalisation der einzelnen Slices nachvollziehbar

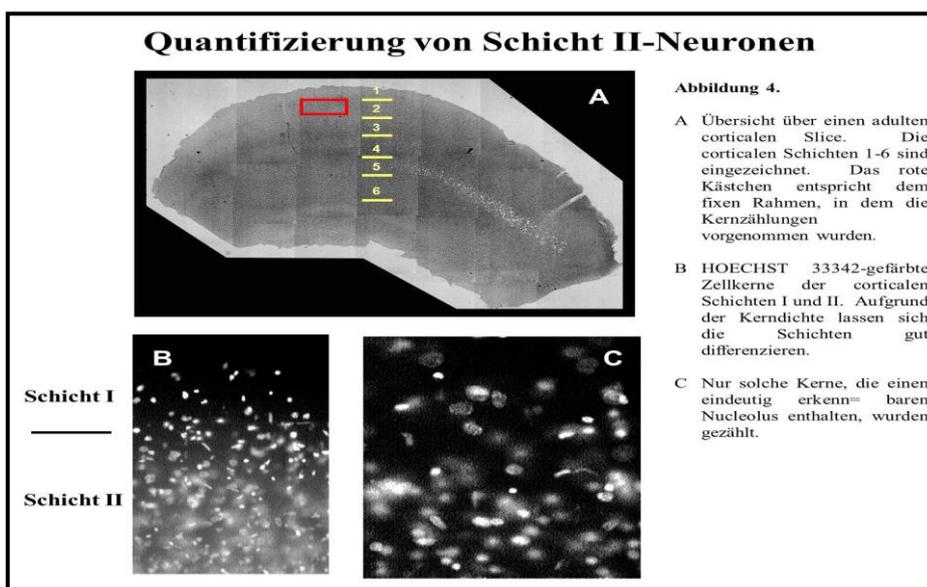
gemacht. Die Gewebeschnitte mit „geraden“ Nummern wurden in Kultur genommen, diejenigen mit „ungeraden“ Nummern wurden sofort fixiert, um die Ausgangszahl der Neurone vor Beginn der Kultur näherungsweise festlegen zu können (s. Abbildung 2.).

Unter entsprechender Illumination stellten sich die kortikospinalen Neurone als Fluoreszenz Tracer-gefüllte pyramidale Konfiguration grösser als 4 µm im Durchmesser dar (Bonatz et al., 2000, s. Abbildung 3) dar.

### 3.4.2. Markierung und Identifizierung kortikaler Schicht II-Neurone

Auch für die Analyse von kortikalen Schicht II-Neuronen wurde der sensorimotorische Kortex *en bloc* entnommen, vom übrigen Hirngewebe isoliert und in der Frontalebene in anterior-posteriorer Richtung in 300 µm dicke Gewebeschnitte zerteilt. Die Gewebeschnitte wurden entsprechend ihrer anterior-posterioren Anordnung in einer 24-schächtigen Kulturschale gesammelt und somit die anatomische Lokalisation der einzelnen Slices nachvollziehbar gemacht. Die Gewebeschnitte mit „geraden“ Nummern wurden in Kultur genommen, diejenigen mit „ungeraden“ Nummern wurden fixiert, um die Ausgangszahl der Neurone vor Beginn der Kultur näherungsweise festlegen zu können. Die Gewebeschnitte in Kultur wurden eine Stunde vor Fixierung mit HOECHST 33342 in einer Gesamtkonzentration von 5 mg/ml bezogen auf das Kulturmedium behandelt.

### 3.4.3. Quantifizierung von Schicht II-Neuronen



Die Zellzählung der mit HOECHST 33342 gefärbten Zellkerne wurde unter UV-Fluoreszenz in 20facher Vergrößerung vorgenommen. Gezählt wurden alle Zellen mit

einem bemerkbaren Nucleolus in einem vorher festgelegten quadratischen Abschnitt der Schicht II (s. Abbildung 4). Die Überlebensraten wurden für verschiedene Zeitpunkte der Kultur errechnet, indem die Zellzahlen der in Kultur genommenen Gewebeschnitte zum Mittelwert der benachbarten und nicht kultivierten Slices in Bezug gesetzt wurden.

#### **3.4.4. Quantifizierung von kortikospinalen Neuronen**

Die Zellzählung der kortikospinalen Neurone wurde unter UV-Fluoreszenz in 20facher Vergrößerung durchgeführt. Kriterien eines kortikospinalen Neurons waren eine Fast Blue-gefüllte pyramidale Konfiguration grösser als 4 µm im Durchmesser (Bonatz et al., 2000).

Da die Absolutzahlen kortikospinaler Neurone entlang der anterior-posterioren Lage im Kortex einen Peak-förmigen Verlauf zeigen (Bonatz et al., 2000), war es notwendig, die Ausgangszahl näherungsweise in jedem Gewebeschnitt vor der Kultur festzustellen. Deswegen wurden den zuvor entlang dieser Verteilung sukzessive gesammelten Gewebeschnitte in „ungerade“ (Schnitt Nr. 1, 3, 5, etc.) und „gerade“ (Schnitt Nr. 2, 4, 6, etc.) Nummern zugeteilt. Die „ungeraden“ Schnitte wurden unverzüglich nach der Präparation fixiert, während die „geraden“ Schnitte in Kultur genommen wurden. Nach der entsprechenden Zeit in Kultur wurden die kortikospinalen Neurone in den „geraden“ wie den „ungeraden“ Schnitten ausgezählt. Das Überleben kortikospinaler Neurone wurde berechnet in Bezug zur näherungsweise bestimmten Ausgangszahl der jeweils benachbarten „ungeraden“ Gewebeschnitte und als „Prozent Überleben“ ausgedrückt.

#### **3.4.5. Statistik der Survivalanalysen**

Zur statistischen Berechnung der Ergebnisse wurden die Mittelwerte des prozentualen Überlebens der Neurone gebildet und mit der jeweils zugehörigen Standardabweichung in positive und negative Richtung dargestellt.

Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels ANOVA gefolgt von *Fisher's least significance difference test* (Fisher LSD) ermittelt.

### **3.5. Homogenisate**

#### **3.5.1. Herstellung der Homogenisate**

Für die Herstellung von Homogenisaten unterschiedlicher Hirnareale präparierten wir Gewebeblöcke von Thalamus, Hippocampus, Hirnstamm, Rückenmark, Kleinhirn und Kortex nach einem etablierten Protokoll (Henderson et al., 1981). Diese wurden in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), die Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA) (3 mM), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (1 mM), Aprotinin (5 mIU/ml), Pepstatin (0,5 µg/ml) und Phenylmethylsulphonylfluorid (0,1 mM) enthielt, bei 0°C homogenisiert. Die Homogenisate wurden bei 36000g für eine Stunde zentrifugiert, die klaren Überstände gesammelt und auf die Proteinkonzentration analysiert. Anschließend wurden die proteinhaltigen Lösungen bei -80°C aufbewahrt und in einer endgültigen Konzentration von 40 µg/ml zum Kulturmedium hinzugefügt.

#### **3.5.2. Statistik der Homogenisatexperimente**

Zunächst konnte mittels ANOVA gezeigt werden, dass die Unterschiede der Mittelwerte der einzelnen experimentellen Gruppen signifikant ( $p < 0,001$ ) unterschiedlich waren. Über einen *post hoc-Fisher's least significance difference test* (FLSD) wurde die statistische Signifikanz des Überlebens zwischen den unterschiedlichen experimentellen Gruppen bestimmt.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. Etablierung des Systems

#### 4.1.1. Histologische Charakterisierung

Von embryonalem oder früh postnatalem Gewebe war lange bekannt, dass es sich in Gewebekulturen über Wochen erhalten ließ (Gähwiler et al., 1997).

In den Vorversuchen konnte bei Anwendung unserer modifizierten Kulturtechnik auch für adult entnommenes Gewebe ein Erhalt der gewebespezifischen Zytoarchitektur nach mehreren Tagen *in vitro* gezeigt werden.



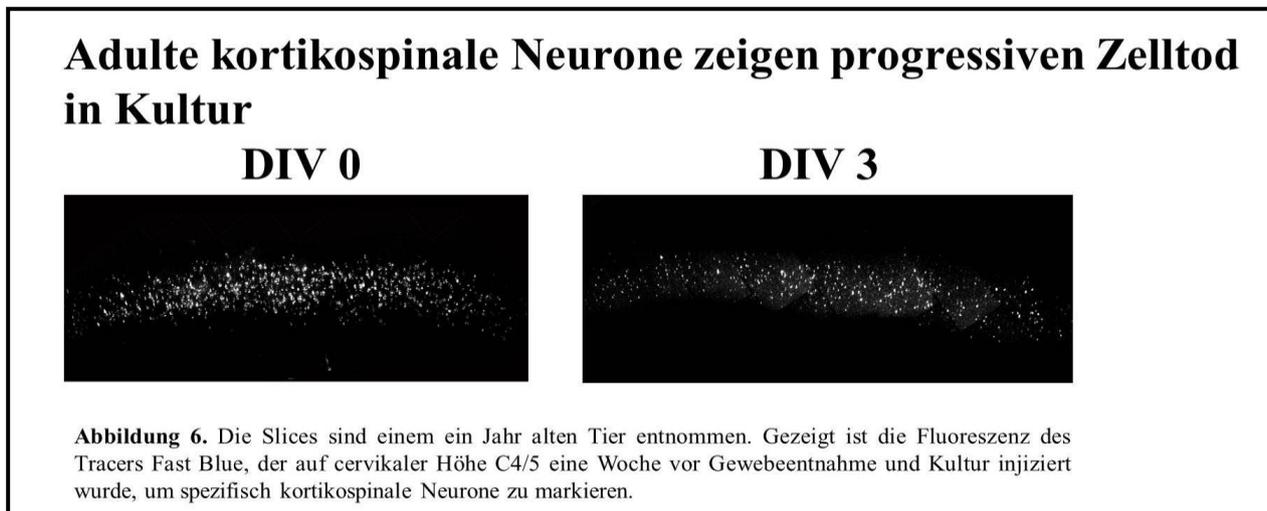
Ergebnisse

Die untersuchten Gewebe waren Herz, Leber, Niere, Lunge und insbesondere Kortex. Dass sich die Slices nicht zersetzten, ließ sich gut mikroskopisch in Kryoschnitten nach histologischen Standardfärbungen belegen (s. Abbildung 5).

Somit bestand Anhalt dafür, dass auch Subpopulationen der kortikalen Neurone zumindest mittelfristig in den Slice Kulturen überleben konnten. Eine Survivalanalyse schien dementsprechend durchführbar.

Im Kontext der Vorversuche wurden verschiedene Medien verwendet (siehe ‚Material und Methoden‘). Hierbei stellte sich das Stoppini Medium als das für unseren experimentellen Ansatz geeignetste heraus.

#### 4.1.2. Überlebenskinetiken verschiedener Zellpopulationen

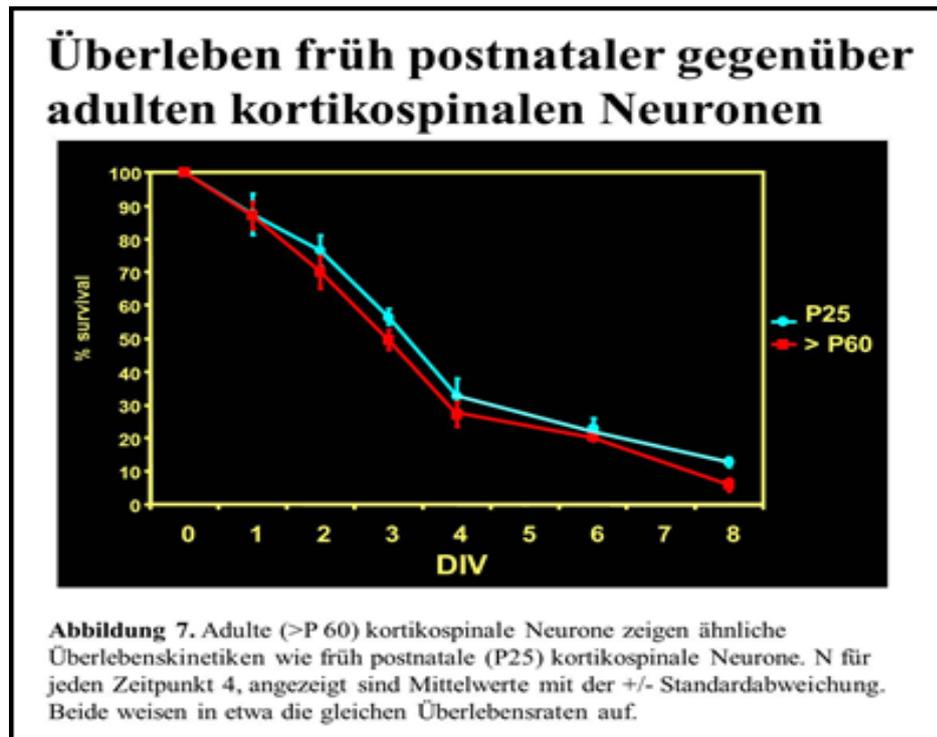


Für adulte kortikospinale Neurone war bekannt, dass diese *in vivo* nach Axotomie, zu einem hohen Prozentsatz absterben (Giehl and Tetzlaff, 1996).

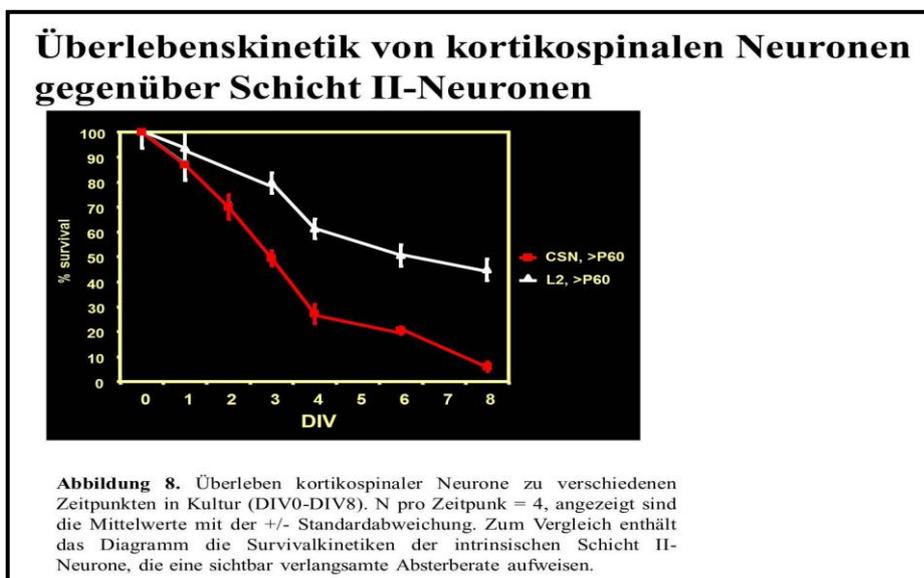
Ein sukzessives Absterben adulter kortikospinaler Neurone in den Slice Kulturen konnte qualitativ schon in den fluoreszenzmikroskopischen Übersichten beobachtet werden. (s. Abbildung 3).

Die Quantifizierung dieses Absterbens erfolgte an Slices adulter (>P60) und früh postnataler (P25) Kortex-Slices in Stoppini-Medium. Die Überlebenskinetiken zeigten maximalen Zelltod zwischen Tag 0 und 4 *in vitro*. Danach verlangsamte sich die Zelltodynamik (s. Abbildung 7), was in etwa dem Verlauf des Axotomie induzierten Absterbens kortikospinaler Neurone *in vivo* entspricht. Kortikospinale Neurone der Entnahmestadien P25 und P60 zeigten eine

prinzipiell identische Absterbedynamik über die Zeit in Kultur (Abbildung 7).



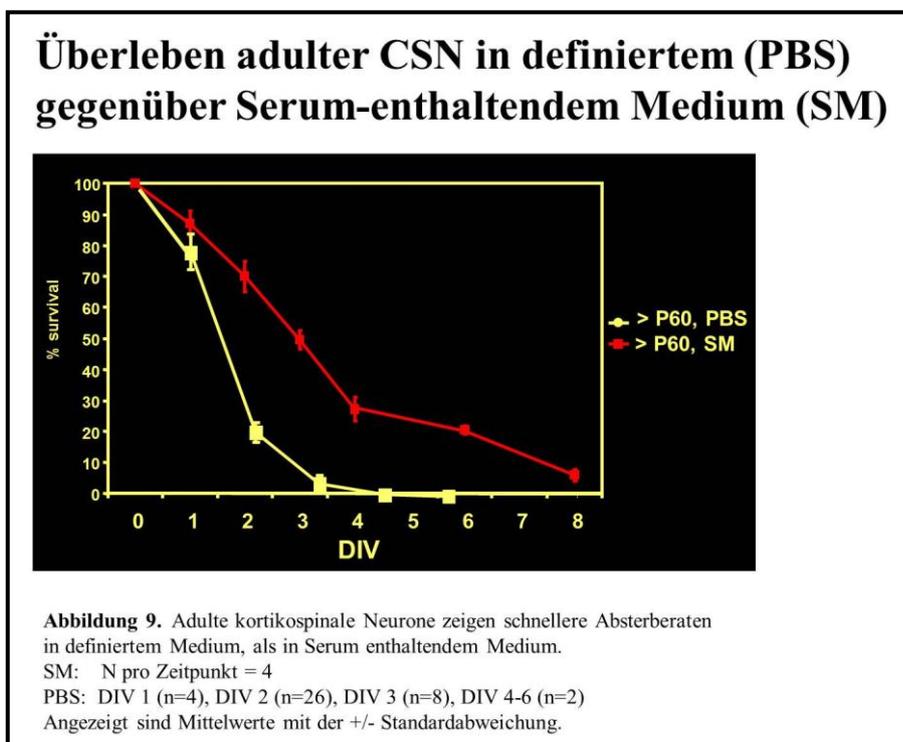
Im Gegensatz zu den subkortikal projizierenden kortikospinalen Neuronen zeigten intrinsische kortikale Schicht II-Neuronen eine deutlich verlangsamte Absterberate (s. Abbildung 8). Dies deutet darauf hin, dass innerhalb kortikaler Slices trophische Supportfaktoren existieren, die das Überleben intrinsischer Neurone relativ selektiv fördern. Diese Beobachtung legt auch nahe, dass Zelltod in den Slices eher differenzierte Überlebensregulation verschiedener neuronaler Subpopulationen, denn generelles Absterben widerspiegelt.



## 4.2. Untersuchung trophischer Einflüsse auf Überleben kortikospinaler Neurone im Slice-Kultur-Modell

### 4.2.1. Entzug trophischer Faktoren

Um abschätzen zu können, ob eine trophische Einflussnahme von außen auf das neuronale Überleben in den Slice-Kulturen überhaupt möglich war, sollten zunächst trophische Supportfaktoren entzogen werden. Hierdurch war eine Akzeleration des Absterbens zu erwarten. Trophische Supportfaktoren sind im Stoppini Medium im Pferdeserum enthalten. Dieses wurde daher durch phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) ersetzt.



Die Überlebenskinetik der kortikospinalen Neurone in einer Kultur mit definiertem Medium stellte sich erwartungsgemäß mit einer deutlich schnelleren Absterberate dar, als im Pferdeserum-enthaltenden Medium (s. Abbildung 9). Bereits zwischen dem

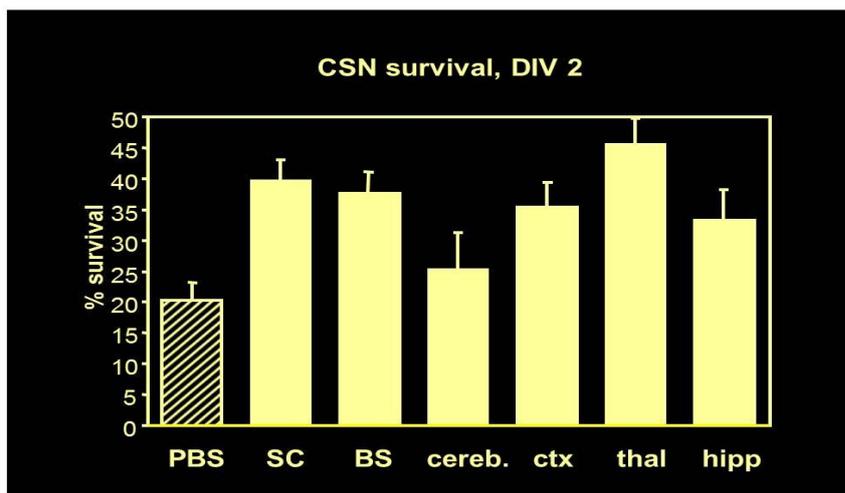
ersten und zweiten Tag *in vitro* war ungefähr die Hälfte aller kortikospinalen Neurone abgestorben und nach vier Tagen *in vitro* konnten praktisch keine überlebenden Neurone mehr gefunden werden. Aus der Überlebenskurve ergibt sich der Zeitpunkt DIV2 als der experimentell geeignetste. An diesem ließ sich der Überlebens-fördernde Effekt von in definiertes Medium zugegebenen Substanzen auf kultivierte kortikospinale Neurone am besten testen.

Die Untersuchung kortikospinalen Überlebens in definiertem Medium zeigte weiterhin, dass eine Einflussnahme auf deren Überleben im Slice von außen überhaupt möglich war.

#### 4.2.2. Einfluss verschiedener Hirnareale auf das Überleben kortikospinaler Neurone

Nach der gängigen Neurotrophinhypothese werden Neuronen – neben auto- und parakrinen Mechanismen – über retrograden Transport aus ihren Zielprojektionen mit Faktoren versorgt, die ihr Überleben fördern (Barde et al., 1989; Korsching et al., 1993). Daher entstand die Idee zu untersuchen, inwieweit Proteinextrakte aus unterschiedlichen Hirnregionen aus der Umgebung des Verlaufes des kortikospinalen Traktes das Überleben kortikospinaler Neuronen beeinflussen können.

### Homogenisate verschiedener Hirnareale Haben differentielle Effekte auf das Überleben adulter CSN an DIV 2



**Abbildung 10.** Überleben kortikospinaler Neurone bei DIV 2 in definiertem Medium (PBS, N=26) und in definiertem Medium plus Homogenisaten von Rückenmark (SC, N=8), Hirnstamm (BS, N=8), Kleinhirn (cereb., N=6), Kortex (ctx, N=8), Thalamus (thal., N=8) oder Hippocampus (hipp., N=8). Wie bestimmt durch ANOVA ( $p < 0.001$ ) gefolgt von post hoc Fisher LSD Test waren Thalamus, Rückenmark, Hirnstamm, Kortex und Hippocampus signifikant unterschiedlich von PBS ( $p < 0,05$ ) und Thalamus war signifikant unterschiedlich von Kleinhirn ( $p < 0,05$ ) und Hippocampus ( $p < 0,1$ ), Kleinhirn gegen PBS nicht signifikant. Angezeigt sind Mittelwerte mit der +/- Standardabweichung.

Dafür wurden bestimmte Hirnareale präpariert und zu Homogenisaten verarbeitet. Die präparierten Gewebelöcke entstammten Arealen, die sowohl Projektionen kortikospinaler Neurone erhielten (Rückenmark, Thalamus, Kortex, Hirnstamm), als auch Arealen, die keine

direkten Projektionen in oder aus kortikospinalen Neuronen (Kleinhirn, Hippocampus) erhielten.

Nach Zugabe dieser Homogenisate in das Kulturmedium konnte tatsächlich gezeigt werden, dass Extrakte bestimmter Areale das Überleben kortikospinaler Neurone *in vitro* positiv beeinflussen konnten (s. Abbildung 10).

Es zeigten sich nach zwei Tagen *in vitro*, dass Homogenisate aus Hirnstamm, Hippocampus, Thalamus, Kortex und Rückenmark signifikant erhöhte Überlebensraten im Vergleich zur Kontrolle ( $p < 0,05$ ) erzeugen (s. Abbildung 10). Dies deutet auf einen Gehalt des jeweiligen Homogenisates an trophischen Faktoren hin, der Überleben der Neurone unterstützen kann. Zusätzlich fanden sich innerhalb der Gruppen signifikante Unterschiede von Homogenisaten des Thalamus gegenüber Kleinhirn ( $p < 0,05$ ) und Hippocampus ( $p < 0,1$ ) (s. Abbildung 10). Dies kann bedeuten, dass Areale, die keine direkten neuronalen Projektionen mit den kortikospinalen Neuronen unterhalten, weniger oder gar keine trophischen Faktoren exprimieren, die für das Überleben kortikospinaler Neurone relevant sind.

Insgesamt jedoch konnten damit gute Hinweise gesammelt werden, dass innerhalb des Zentralnervensystems Supportmechanismen existieren, die zum Beispiel über Expression trophischer Faktoren in Zielgebieten der Innervation das Überleben adulter kortikospinaler Neurone fördern können.

## 5. DISKUSSION

Bisherige Studien unserer Arbeitsgruppe untersuchten Einflüsse auf das Überleben des adulten kortikospinalen Systems in Läsionsmodellen *in vivo*. Die vorliegende Studie etablierte ein Kulturmodell für Gewebeschnitte des Zentralnervensystems mit speziellem Blick auf das adulte kortikospinale System *in vitro*. Ziel war es, einzelne Einflussfaktoren auf das neuronale Überleben aus dem allgemeinen Netzwerk herauslösen und unabhängig von bestehenden Innervationszuflüssen untersuchen zu können.

Es ließ sich nachweisen, dass neuronale Zellpopulationen in kortikalen Gewebeschnitten mehrere Tage *in vitro* überleben können. Eine Einflussnahme auf das Überleben von außen war sowohl durch Entzug als auch durch Zugabe trophischer Faktoren möglich.

### 5.1. Slice-Kulturverfahren

In wie weit ist das von uns modifizierte Slice-Kulturverfahren überhaupt in der Lage, Gewebe in Kultur zu erhalten und kann differentielles Überleben in Kinetiken erfasst werden?

Zunächst zeigt die histologische Untersuchung der Gewebeslices, dass die morphologische Struktur des jeweils kultivierten Ursprungsgewebes in diesem System über mehrere Tage erhalten werden kann. Dies ist bereits ein relativ sicherer Indikator für die Vitalität der meisten Zelltypen innerhalb der Slices. Dass sich unterschiedliche Zelltodkinetiken verschiedener neuronaler Subpopulationen erfassen lassen, ist ein weiterer. Die Ergebnisse der Zelltodkinetiken der intrinsischen Schicht II-Neurone im Vergleich zu kortikospinalen Neuronen konnte belegen, dass intrinsische kortikale Neurone eine deutlich langsamere Absterberate im Gegensatz zu den lang projizierenden kortikospinalen Neuronen aufwiesen. Es liegt daher nahe, dass differentielle Überlebensmechanismen unterschiedlicher adulter Neuronenpopulationen *in vitro* über einen bestimmten Zeitraum untersuchbar sind. Unterstützt wird diese Schlussfolgerung durch die Beeinflussbarkeit kortikospinaler Überlebenskinetik in definiertem Medium und unter Zugabe von Homogenisaten bestimmter Gehirnareale.

Trotz grundsätzlicher Eignung unseres Modells zur Analyse von Überlebensmechanismen adulter ZNS Neurone *in vitro* ergaben sich einige methodologische Limitationen. So hatten

wir in initialen Versuchen zur Bestimmung des Effektes von Neurotrophinen keine Wirkung auf kortikospinales Überleben in Kultur feststellen können (nicht gezeigte Daten). Wir führten dies auf die bekanntermaßen schwierige Diffusion von Neurotrophinen in das Neuropil zurück (Giehl and Tetzlaff, 1996), die wahrscheinlich durch die sich in der Sliceperipherie entwickelnde Glianarbe weiter erschwert wurde. Durch diesen Umstand ist die Diffusion vor allem hochmolekularer Testsubstanzen in die Slices vermutlich erschwert. Die Beeinflussung kortikospinalen Überlebens in definiertem Medium und nach Zugabe spinaler, medullärer und thalamischer Homogenisate könnte auf niedermolekularen, trophisch wirksamen Substanzen oder besser diffundiblen Wachstumsfaktoren beruhen. Weitere Untersuchungen werden erforderlich sein, diese Fragen zu klären.

Im Vergleich mit dissoziierten Zellkulturen oder Zelllinien imitiert das Slice-Kultursystem die *in vivo*-Situation treffender. Ein großer Vorteil der Kultur mikroskopisch untersuchbarer Gewebeslices ist die Näherung an die *in vivo*-Situation durch den Erhalt der Einbettung in die lokale Matrix aus Neuronen und deren Konnektionen sowie Gliazellen. Allerdings ist nicht gewiss, in welchem Ausmaß dieses System tatsächlich die physiologische Situation *in vivo* reflektiert. Die Slices sind bei allen erhaltenen Anteilen der Konnektionen doch aus dem weitaus größeren Teilen der Faserverbindungen des Organsystems herausgelöst. Dies ist allerdings andererseits auch ein erwünschter Effekt. In der Folge wollen wir nämlich den Einfluss des Erhaltes der verschiedenen Konnektionen auf neuronales Überleben bestimmter neuronaler Subpopulationen untersuchen.

## **5.2. Methodik für die Survivalanalyse**

Die kortikospinalen Neurone sind aufgrund des Tracings mit Injektion von Fast-Blue in den kortikospinalen Trakt auf Höhe des Zervikalmarkes über ihre Projektion eindeutig von intrinsischen Neuronen in der Schicht V abgrenzbar. Problematisch bei der Zellzählung könnte eventuelles Sekundärtracing werden, da zerfallende Neurone den Fluoreszenzfarbstoff an die Umgebung abgeben, benachbarte Gliazellen diesen aufnehmen, Fast-Blue markierte Zellen imitieren und damit höhere Zellzahlen vortäuschen könnten. Dass ein Sekundärtracing jedoch keine entscheidende Fehlerquelle darstellt, lässt sich aus Folgendem ableiten: Die Zellzahlen nach einem Tag *in vitro* (DIV 1) sind grundsätzlich so viel niedriger als vor der Kultivierung (DIV 0), so dass die Tendenz eindeutig gegen einen signifikanten Effekt durch Sekundärtracing spricht. Darüber hinaus ist aus den *in vivo*-Settings bekannt, dass bei den

verwendeten Tracern Sekundärtracing nur für die primär markierten Neuronen umgebenden Gliazellen wichtig ist. Zwar nehmen diese den Tracer auf, Gliazellen stellen sich in Fast Blue Färbung jedoch kugelförmig dar, wohingegen die Neurone mikroskopisch eine polygonale beziehungsweise pyramidale Struktur aufweisen (Bonatz et al., 2000). Damit lag eine gute Differenzierungsmöglichkeit vor.

Die Zählmethode der Zellzählungen war eine so genannte neuronale Profilzählung zur Erfassung markierter neuronaler Profile in einem Slice. Eine alternative Methode zur Quantifizierung von Zellzahlen ist die optische Dissektormethode, eine stereologische Technik zur Zellgrößen unabhängigen Abschätzung von Gesamtzellzahlen innerhalb eines bestimmten Gewebavolumens anhand von Serienschritten durch dieses Gewebe (Howard et al., 1985; Gundersen et al., 1988; West and Gundersen, 1990). Da es bei unseren Quantifizierungen nicht auf die Ermittlung der Gesamtzahlen bestimmter Neuronentypen innerhalb eines Gehirnareals aus Serienschritten ankam, sondern auf die Bestimmung von Zellzahlen innerhalb eines Slices, erschien eine Profilzählung angemessener, weil deutlich weniger aufwendig. Theoretisch ergeben sich bei Profilzählungen im Vergleich zu stereologischen Methoden wie der optischen Dissektormethode Probleme vor allem aus der Zellgröße. Profilzählungen tendieren dazu, die Zahl kleiner Partikel zu unterschätzen. Dies könnte beispielsweise bei während der Kultivierung geschrumpften Neuronen relevant sein. Wegen der großen Präparatdicke (300  $\mu\text{m}$  Slices) und durch die Anwendung des sehr niedrig angesetzten Größenkriteriums (bei kortikospinalen Neuronen: ‚größer als 4  $\mu\text{m}$ ‘, bei Schicht II Neuronen: ‚Alles‘) in Kombination mit einem morphologischen Kriterium (bei kortikospinalen Neuronen: ‚pyramidenförmig‘; bei Schicht II Neuronen: ‚Nucleus‘) ergibt sich bei unseren Profilzählungen allerdings diesbezüglich kein Problem. Wir konnten diese Annahme durch einen Vergleich dieser Methode zur optischen Dissektormethode belegen (Bonatz et al., 2000). An methodischer Limitierung unseres Auszählungsansatzes bleibt, dass er in Bezug auf die Bestimmung absoluter Gesamtzahlen gezählter Partikel in definierten Volumina weniger präzise ist, als die optische Dissektormethode (West et al., 1999). In unserer Versuchsanordnung war das jedoch nicht relevant, da es nicht um die Erfassung absoluter Zellzahlen, sondern um die Relation von Zellzahlen über einen Zeitverlauf zu einem Ausgangswert ging.

Sowohl bei Schicht II Neuronen als auch bei kortikospinalen Neuronen konnten diese Ausgangswerte nicht direkt bestimmt werden, sondern mussten über „Sandwich-

Interpolation“ geschätzt werden. Bei beiden Neuronentypen stellt dieses Vorgehen nach unserem Verständnis kein Problem dar. Relevante Dichteschwankungen von Schicht II Neuronen sind nur zwischen funktionell unterschiedlichen Kortexarealen beschrieben (Amunts and Zilles, 2001; Zilles et al., 1991). Da die Slices zur Schicht II-Quantifizierung aus einem funktionell einheitlichen Areal – dem Motorkortexäquivalent der Ratte – stammen, erachten wir auch im von uns durchgeführten Ansatz die Beeinflussung durch Dichteschwankungen von Slice zu Slice für wenig relevant. Die erzielten minimalen Standardabweichungen der Überlebenskinetiken sprechen für diese Sichtweise. Ähnliches gilt für kortikospinale Neurone. Wir hatten bei diesem Neuronentyp sogar ein zusätzliches Kriterium zur Überprüfung der Validität unserer „Sandwich-Interpolation“. Die anterior-posteriore Verteilung kortikospinaler Neurone zeigt einen typischen zweigipfeligen Verlauf der pro Frontalebene vorkommenden Zellzahlen (Bonatz et al. 2000). Der posteriore Gipfel entspricht dem primären Motorkortex der Ratte, aus dem wir die Slices gewonnen haben. Die in der „Sandwich-Interpolation“ erhaltenen Ausgangswerte entsprachen durchgehend und exakt dem Verlauf des beschriebenen zweiten Gipfels. Dies spricht nicht nur für Vertretbarkeit dieses Quantifizierungsansatzes, sondern auch für die reproduzierbare Präparationstechnik der für die Untersuchungen verwendeten motorkortikalen Areale.

Bei den Zellzählungen wurden Überlebenskinetiken zweier verschiedener neuronaler Zellpopulationen erstellt, die jedoch mit unterschiedlichen Färbemethoden dargestellt wurden. Der Vergleich dieser unterschiedlich dargestellten Zellgruppen wird dadurch legitimiert, dass aus ähnlichen Ansätzen *in vivo* bei der Darstellung kortikaler Motoneuronen nach spinaler Axotomie Vergleiche der Überlebensraten ein und desselben Zelltyps akzeptiert sind, die auf unterschiedlichen Darstellungsmethoden mit Hämatoxylin-Eosin und Fluorogold beruhen (Hains et al., 2003). Außerdem ging es nicht um den Vergleich absoluter Zellzahlen, sondern um prozentuales Absterben von Zellpopulationen über einen Zeitverlauf. Schließlich wäre ein Vergleich zwischen intrinsisch kortikalen Neuronen und exklusiv lang projizierenden kortikalen Neuronen mangels Differenzierungsmöglichkeit auf eine andere Weise nicht möglich.

### **5.3. Überlebenskinetiken**

Die Ergebnisse der Überlebenskinetiken ergeben in diesem Studienansatz die diskussionswürdigsten Aspekte.

Es finden sich deutliche Unterschiede zugunsten der Überlebensraten der intrinsischen Neurone, die ihre Zuflüsse und Projektionen zu großen Teilen aus der näheren Umgebung des Slices erhalten. Im Gegensatz dazu zeigen die kortikospinalen Neurone, deren Innervationsgebiete außerhalb des Slices im Rückenmark liegen, niedrigere Überlebensraten. Dies ist als Hinweis aufzufassen, dass innerhalb des Slices trophische Faktoren persistieren, die das Überleben der intrinsischen Neurone fördern, die dorthin ihre Zielprojektionen unterhalten. Darüber hinaus kann dies als Hinweis darauf aufgefasst werden, dass die intakte Projektion kortikospinaler Neurone einen positiven Einfluss auf ihr neuronales Überleben nimmt. Als ursächliches Korrelat kann man eine Versorgung mit neurotrophischen Faktoren über retrograden axonalen Transport aus der Zielprojektion annehmen. Nach der klassischen Neurotrophin-Hypothese vermeiden Neuronen programmierten Zelltod während der Ontogenese durch einen Wettkampf um die knappe Ressource an vorhandenen Neurotrophinen (Moses et al., 2002). Einen Vorteil dabei verschaffen sich Neuronen, die ihre Zielprojektion erreichen, da aus dem Innervationsgebiet neurotrophische Faktoren aufgenommen und retrograd im Axon zum Zellsoma transportiert werden (Barde et al., 1989). Mit dieser Hypothese lassen sich die aus den Zellkulturversuchen abgeleiteten Annahmen gut in Übereinklang bringen.

Schließlich legen die Überlebensanalysen insgesamt den Schluss nahe, dass sich unser Testsystem zur Untersuchung trophischer Einflüsse auf neuronales Überleben eignet. Der Medienwechsel von Stoppini- zu definiertem Medium zeigt signifikante Unterschiede neuronaler Überlebensraten zuungunsten des definierten Mediums nach Entzug des Pferdeserums als Medienbestandteil. Dass der Effekt durch Entzug trophischer Faktoren in diesem Versuchsaufbau auch wieder umgekehrt werden kann, zeigen die Homogenisat-Experimente, in denen Homogenisate verschiedener Hirnareale in definiertem Medium im Vergleich zu den Kontrollen neuronales Überleben fördern können. Dies zeigt zudem, dass trophische Faktoren das kultivierte Gewebe erreichen können. Weitere Survivalanalysen sind dementsprechend in diesem System potentiell möglich.

Mithilfe unseres Kulturmodelles lässt sich die Situation, die sich für kortikospinale Neurone nach Axotomie *in vivo* auf Höhe der Capsula interna ergibt, relativ gut imitieren. Auch *in vivo* werden durch eine Läsion der inneren Kapsel die meisten Afferenzen in und Efferenzen aus dem Kortex unterbrochen. Unterschiede ergeben sich bezüglich intrakortikaler langer Projektionen und katecholaminergen Inputs aus dem Locus coeruleus, welcher über das

mediale Vorderhirnbündel von rostral in den Kortex verläuft. Bei der Läsion der inneren Kapsel bleiben diese beiden Konnektivitätstypen erhalten, in den Slice Präparationen werden sie abgetrennt. Der Einfluss dieser potentiellen Quellen trophischen Supports auf kortikospinales Überleben könnte durch Co-Kulturen von Slices des motorischen Kortex mit Slices anderer kortikaler Areale – beziehungsweise Locus coeruleus-Slices – oder durch Zugabe von Homogenisaten der entsprechenden Gebiete ins Kulturmedium untersucht werden. Zumindest den experimentellen Ansatz mit Homogenisaten betreffend weisen die Ergebnisse der vorliegenden Studie (s. Abbildung 10) auf eine gute Möglichkeit zur Identifizierung trophischen Supports kortikospinaler Neurone aus anderen Gehirnarealen hin.

Hingegen sind Probleme eines Co-Kultur Ansatzes schon im gegenwärtigen Stadium des präsentierten Slice Kultur Modells erkennbar. Co-Kulturen würden vor allem auf den Einfluss morphologisch fassbarer Konnektivität zwischen den untersuchten Arealen abzielen. Bisher ist es uns allerdings nicht gelungen, substantielles axonales Wachstum aus den Slices heraus, geschweige denn in einen anderen Slice hinein zu stimulieren. Selbiges wäre unabdingbare Voraussetzung, um zum Beispiel den Einfluss membrangebundener trophischer Einflüsse einer extra- oder intrakortikalen Projektion auf kortikospinale Neuronen zu untersuchen.

#### **5.4. Ausblick**

Um die bisherigen Versuchsreihen sinnvoll fortzusetzen, sollte zunächst noch ein fehlendes Areal des Zentralnervensystems mit einer wichtigen Projektion des kortikospinalen Traktes präpariert und homogenisiert werden. Diese wichtige Relaisstation in der Modulation der Entladungsrate des kortikospinalen Traktes ist das Striatum.

Wenn sämtliche wichtigen Projektionsareale in die Versuche Eingang gefunden haben, ist der nächste sinnvolle Schritt, zu testen, ob eine Änderung der Proteinkonzentration der Homogenisate zu quantitativ abstufbaren Effekten führt. Bisher wurde nur eine Proteinkonzentration untersucht, die aus *in vivo*-Versuchen abgeleitet wurde.

Da bereits bei der Verwendung zweier verschiedener Medien unterschiedliche Überlebensraten zu erkennen sind, ist eine weitere sinnvolle Variation des Versuchsaufbaus ein Wechsel zu weiteren Medien mit unterschiedlichen trophischen Beimengungen, um darüber differentielle Effekte zu sehen und gegebenenfalls unspezifisch oder spezifisch neuronales Überleben stimulierende Substanzen isolieren zu können.

In den Slices sind sicher überlebende Neuronen für mehrere Tage *in vitro* kultivierbar. Dieser Umstand alleine jedoch sagt noch nichts über die physiologische Zellfunktion aus. Ob diese auch nach mehreren Tagen *in vitro* erhalten ist, wäre über elektrophysiologische Versuchsreihen zu testen.

Als Ausblick auf die weitere Zukunft ist der Einfluss der Homogenisate verschiedener Hirnareale auf das neuronale Überleben kortikospinaler Neurone näher zu beleuchten. Hier wäre es sinnvoll, die molekularen Einzelsubstanzen zu isolieren und zu analysieren, die für den Überlebenseffekt verantwortlich sind. Gegebenenfalls ließen sich auch die Mechanismen, die zu den überlebensfördernden Effekten führen, bestimmen, indem Rezeptoren, Liganden und Signaltransduktionswege manipuliert werden. Es böte sich hier beispielsweise die Applikation funktionsblockierender Antikörper oder die Verwendung genetisch modifizierter Tiere an.

In der Folge könnte ein etabliertes *in vivo*-Modell einer neurodegenerativen Erkrankung benutzt werden, um relevante Areale zu kultivieren. Zum Beispiel kann das Mesencephalon eines etablierten Modelles des Morbus Parkinson benutzt werden.

Dies kann therapeutisch sehr interessant sein, da direkte Einflüsse auf neuronales Überleben spezifischer pathologisch relevanter Zellpopulationen gemessen werden könnten. Eventuell wäre über dieses Modell sogar die Entwicklung und Evaluation neuer therapeutischer Strategien zur Neuroprotektion *in vitro* vor der Anwendung in klinischen Studien möglich.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

Aguayo, A.J. et al. (1991) Degenerative and regenerative responses of injured neurons in the central nervous system of adult mammals. *Philos.Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 331: 337-43.

Altar, C.A. et al. (1994) In situ hybridization of trkB and trkC receptor mRNA in rat forebrain and association with high-affinity binding of [125I]BDNF, [125I]NT-4/5 and [125I]NT-3. *Eur J Neurosci.* 6:1389-405.

Amunts, K. and Zilles, K. (2001) Advances in cytoarchitectonic mapping of the human cerebral cortex. *Neuroimaging Clinics of North America* 11, 151-69, *Eur. J. Neurosci.* 6: 1389-405. Anton, E.S. et al. (1994) Nerve growth factor and its low-affinity receptor promote Schwann cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U-S-A* 91: 2795-9 .

Banker, G.A et al. (1977) Rat hippocampal cells in dispersed cell culture. *Brain Research* 126: 397-425.

Bartlett, W.P. and Banker, G.A. (1984a) An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. I. Cells which develop without intercellular contacts. *J. Neurosci.* 8:1944-53.

Barbacid, M. et al. (1994) The Trk family of neurotrophin receptors. *J. Neurobiol.* 25: 1386-1403.

Barbacid, M. et al (1995) Neurotrophic factors and their receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 148-155.

Barde, Y.A. et al. (1988) What, if anything, is a neurotrophic factor? *Trends in Neurosc.* 11: 343-346.

Barde, Y.A. et al. (1989) Trophic factors and neuronal survival. *Neuron* 2: 1525-34.

Benowitz, L.I. and Routtenberg, A. (1997) GAP-43: An intrinsic determinant for neuronal development and plasticity. *Trends in Neurosc.* 20: 84-91.

Berkelaar, M. et al. (1994) Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J. Neurosci.* 14: 4368-74.

Bisby, M.A. and Tetzlaff, W. (1992) Changes in cytoskeletal protein synthesis following axon injury and during axon regeneration. *Mol. Neurobiol.* 6: 107-123.

Bolz, J. et al. (1990) Formation of target-specific neuronal projections in organotypic slice cultures from rat visual cortex. *Nature* 346: 359-62.

Bonatz, H., Röhrig, S., Mestres, P., Meyer, M. and Giehl, K.M. (2000) An axotomy model for the induction of death of rat and mice corticospinal neurons *in vivo*. *J. Neurosci. Meth.* 100: 105-115.

Braschler, U.F. et al. (1989) A modified roller tube technique for organotypic cocultures of embryonic rat spinal cord, sensory ganglia and skeletal muscle. *J. Neurosci. Methods* 29: 121-9.

Bronfman, F.C. et al. (2007) Endosomal transport of neurotrophins: roles in signaling and neurodegenerative diseases. *Dev. Neurobiol.* 67: 1183-203.

Cajal, R.Y. et al. (1928/1991) Degeneration and regeneration of the nervous system. New York: Hafner.

Chen, D.F. et al. (1997) Bcl-2 promotes regeneration of severed axons in mammalian CNS. *Nature* 385: 434-439.

Chou, S.M. et al. (1995) Pathology of Motor System Disorders. In *Motor Neuron Disease, Biology and Management*. Edited by P. N. Leigh and M. Swash. London Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag, 53-92.

Conner, J. M. et al. (1997) Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J. Neurosci.* 17: 2295-2313.

- Conover, J.C. and Yancopoulos, G.D. (1997) Neurotrophin regulation of the developing nervous system: analyses of knockout mice. *Rev-Neurosci.* 8: 13-27.
- Cramer, S.C. and Chopp, M. (2000) Recovery recapitulates ontogeny. *Trends in Neurosci.*, 23: 265-271.
- Dale, S.M. et al. (1995) Corticospinal motor neurons in the adult rat: degeneration after intracortical axotomy and protection by ciliary neurotrophic factor (CNTF). *Exp-Neurol.* 135: 67-73.
- Davies, A.M. et al. (1997) Neurotrophin switching: where does it stand? *Current Opinion in Neurobiology* 7: 110-115.
- Dobrowsky, R.T. et al. (1994) Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor. *Science* 265: 1596-9.
- Ernfors, P. et al. (1990) Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron* 5: 511-26.
- Esteban, P. F. et al. (2006) A kinase deficient TrkC-receptor isoform activates Arf6-Rac1 signaling through the scaffold protein tamalin. *J. Cell Biol.* 173: 291-299.
- Frade, J.M., Rodriguez Tebar, A. and Barde, Y.A. (1996) Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* 383: 166-8 .
- Jaeger, C. et al. (1989) Organotypic slice cultures of dopaminergic neurons of substantia nigra. *Brain Res. Bull.* 22: 981-91.
- Gähwiler, B.H. et al. (1981) Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods* 4: 329-42.

Gähwiler, B.H. et al. (1985) Functional innervation of cultured hippocampal neurones by cholinergic afferents from co-cultured septal explants. *Nature* 313: 577-579.

Gähwiler, B.H. and Llano, I. (1989) Sodium and potassium conductances in somatic membranes of rat Purkinje cells from organotypic cerebellar cultures. *J. Physiology* 417: 105-22.

Gähwiler, B.H. et al. (1997) Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci.* 10: 471-477.

Ghosh, A. et al. (1994) Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science* 263: 1618-23.

Ghosh, A. and Greenberg, M.E. (1995) Distinct roles of bFGF and NT-3 in the regulation of cortical neurogenesis. *Neuron* 1: 89-103.

Giehl, K.M. and Tetzlaff, W. (1996) BDNF and NT-3, but not NGF, prevent axotomy induced death of rat corticospinal neurons *in vivo*. *Eur-J-Neurosci.* 8:1167-75.

Giehl, K.M. et al. (1997) GDNF is a trophic factor for adult rat corticospinal neurons and promotes their long-term survival after axotomy *in vivo*. *Eur-J-Neurosci.* 9: 2479-88.

Giehl, K.M. et al. (1998b) The survival-promoting effect of glial cell line-derived neurotrophic factor on axotomized corticospinal neurons *in vivo* is mediated by an endogenous brain-derived neurotrophic factor mechanism. *J-Neurosci.* 18: 7351-7360.

Giehl, K.M. et al. (2001) Endogenous BDNF and NT-3 antagonistically regulate survival of axotomized corticospinal neurons *in vivo*. *J. Neurosci.* 21: 3492-502.

Glass, D.J. et al. (1991) TrkB mediates BDNF/NT-3-dependent survival and proliferation in fibroblasts lacking the low affinity NGF receptor. *Cell* 66: 405-13.

Gundersen, H. J. G. et al. (1988) The new stereological tools: dissector, fractionator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96:857-81.

Gurtner, G.C. et al. (2007) Progress and Potential for Regenerative Medicine. Annual Review of Medicine 58: 299-312

Hains, B. C. et al. (2003) Primary cortical motor neurons undergo apoptosis after axotomizing spinal cord injury. Com. Neurol. 462: 328-341.

Hamanoue, M. et al. (1999) p75-mediated NF-kappaB activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor. Mol. Cell. Neurosci. 14: 28-40.

Hammond, E.N. et al. (1999) BDNF, but not NT-3, promotes long-term survival of axotomized adult rat corticospinal neurons in vivo. Neuroreport 10: 2671-5.

Harrington, A.W. et al. (2004) Secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 16: 6226-30.

Hefti, F. et al. (1994) Neurotrophic factor therapy for nervous system degenerative diseases. J. Neurobiol. 25: 1418-35.

Henderson, C. E. et al. (1981) Neurite outgrowth from embryonic chicken spinal cords is promoted by media conditioned by muscle cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2625-29.

Howard, V. et al. (1985) Unbiased estimation of particle density in the tandem scanning reflected light microscope. J. Microsc. 138: 203-12.

Ip, N.Y. and Yancopoulos, G.D. (1996) The neurotrophins and CNTF: two families of collaborative neurotrophic factors. Annu Rev Neurosci. 19: 491-515.

Jing, S. et al. (1992) Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors. Neuron 9: 1067-79.

Johnson, D. et al. (1986) Expression and structure of the human NGF receptor. Cell 47: 545-54.

- Kaplan, D.R. and Stephens, R.M. (1994) Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor. *J. Neurobiol.* 25: 1404-17.
- Kennedy, P.R. et al. (1990) Corticospinal, rubrospinal and rubro-olivary projections: a unifying hypothesis. *Trends in Neurosci.* 13: 474-9, 1990
- Kokaia, Z. et al. (1993a) Coexpression of neurotrophins and their receptors in neurons of the central nervous system. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A* 90: 6711-5.
- Korsching, S. et al. (1993) The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J. Neurosci.* 13: 2739-48.
- Knöpfel, T. et al. (1989) Organotypic Co-Cultures of Rat Locus Coeruleus and Hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 1: 678-689.
- Lee, R. et al. (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294: 1945-1945.
- Lewin, G.R. and Barde, Y.A. (1996) Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci.* 19: 289-317.
- Liang, F.Y. et al. (1991) Corticomotoneuronal connections in the rat: evidence from double-labeling of motoneurons and corticospinal axon arborizations. *J. Comp. Neurol.* 311: 356-66.
- Lindsay, R.M. et al. (1996) Therapeutic potential of the neurotrophins and neurotrophin-CNTF combinations in peripheral neuropathies and motor neuron diseases. *Ciba Found Symp.* 196: 39-48.
- Maisonpierre, P.C. et al. (1990) NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron* 5: 501-9.
- McBride, R.L. et al. (1989) Prelabeled red nucleus and sensorimotor cortex neurons of the rat survive 10 and 20 weeks after spinal cord transection. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 48: 568-76.

- Merline, M. and Kalil, K. (1990) Cell death of corticospinal neurons is induced by axotomy before but not after innervation of spinal targets. *J. Comp. Neurol.* 296: 506-16
- Middelton, G. et al. (2000) Cytokine-induced nuclear factor kappa B activation promotes the survival of developing neurons. *J. Cell Biol.* 148: 325-32.
- Miller, F.D. et al. (1989) Rapid induction of the major embryonic alpha-tubulin mRNA, T alpha 1, during nerve regeneration in adult rats. *J. Neurosci.* 9: 1452-63.
- Miranda, R.C. et al. (1993) Neuronal colocalization of mRNAs for neurotrophins and their receptors in the developing central nervous system suggests a potential for autocrine interactions. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A* 90: 6439-43.
- Moses, V.C. et al. (2002) Neurotrophins: To Cleave or Not to Cleave. *Neuron* 33, 9-12.
- Nudo, R.J. and Masterton, R.B. (1988) Descending pathways to the spinal cord: a comparative study of 22 mammals. *J. Comp. Neurol.* 277: 53-79
- Nudo, R.J. and Masterton, R.B. (1990) Descending pathways to the spinal cord, III: Sites of origin of the corticospinal tract. *J. Comp. Neurol.* 296: 559-83.
- Ostergaard, K. et al. (1991) Tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons in organotypic slice cultures of the rat striatum and neocortex. *Exp. Brain Res.* 82: 547-565.
- Paxinos, G. and Watson, C. (1982) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, Sydney.
- Paxinos, G. et al. (1985) *The rat nervous system*. Academic Press, Sydney.
- Porter, R. et al. (1985) The corticomotoneuronal component of the pyramidal tract: corticomotoneuronal connections and functions in primates. *Brain Res.* 357: 1-26
- Rabizadeh, S. et al. (1993) Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science* 261: 345-8.

Radeke, M.J. et al. (1987) Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature* 325: 593-7.

Raineteau, O. and Schwab, M.E. (2001) Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury. *Nature Reviews Neuroscience* 2:263-273.

Reichardt, L. F. et al. (2006) Neurotrophin-regulated signaling pathways. *Philos. Trans. R. Soc.* 361: 1545-64.

Rose C. R. et al. (2003), Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signaling in glia cells. *Nature* 426: 74-78.

Romijn, H.J. et al. (1988) A procedure for culturing rat neocortex explants in a serum-free nutrient medium. *J. Neurosci. Methods* 23: 75-83.

Schwab, M.E. et al. (1993) Experimental aspects of spinal cord regeneration. *Curr. Opin. Neurol. Neurosurg.* 6: 549-53

Shulga A., Thomas-Crussels J., Sigl T, Blaesse A., Mestres P., Meyer M., Yan Q., Kaila K., Saarma M., Rivera C., and Giehl K.M.. (2008) Posttraumatic GABA(A)-mediated (Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub> increase is essential for the induction of brain-derived neurotrophic factor dependent survival of mature central neurons. *J Neurosci.* 27: 6996-7005.

Snider, W.D. et al. (1994) Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell* 77: 627-38.

Stoppini, L. et al. (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods* 37: 173.

Swash, M. and Schwartz, M.S. (1995) Motor Neuron Disease: The Clinical Syndrome. In *Motor Neuron Disease, Biology and Management*, 1-17. Edited by P. N. Leigh and M. Swash. London Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag.

Tetzlaff, W. and Bisby, M.A.(1989)Axonal transport and localization of B-50/GAP-43-like immunoreactivity in regenerating sciatic and facial nerves of the rat. *J. Neurosci.* 9: 1303-13.

Tetzlaff, W. et al. (1994) Response of rubrospinal and corticospinal neurons to injury and neurotrophins. *Prog Brain Res* 103: 271-86.

Tetzlaff, W. and Bisby, M.A. (1996) Reductions in motoneuronal neurofilament synthesis by successive axotomies: a possible explanation for the conditioning lesion effect on axon regeneration. *Exp. Neurol.* 139: 95-106.

Tominaga, K. et al. (1994) Organotypic slice culture of the rat suprachiasmatic nucleus: sustenance of cellular architecture and circadian rhythm. *J. Neurosci.* 59: 1025-1042.

Tucker, K.L. et al. (2001) Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nature Neuroscience* 4: 29-37.

Udvardi, A.J. et al. (2001) GAP-43 promoter elements in transgenic zebrafish reveal a difference in signals for axon growth during CNS development and regeneration. *Development* 128: 1175-1182.

Verdi, J.M. et al. (1994) p75<sup>LNGFR</sup> regulates Trk signal transduction and NGF-induced neuronal differentiation in MAH cells. *Neuron* 12: 733-45.

Villegas Perez, M. P. et al. (1988) Influences of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *J. Neurosci.* 8: 265-80.

Villegas Perez, M. P. et al. (1993) Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J. Neurobiol.* 24: 23-36, 1993

Walsh, G. et al. (1995) Nervous excitement over neurotrophic factors. *Biotech.* 13: 1167-1171.

West, M. J. and Gundersen, H. J. (1990) Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 296: 1-22.

West, M.J. et al. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *Trends Neurosci.* 22: 51-61.

Whishaw, I.Q. et al. (1993) Proximal and distal impairments in rat forelimb use in reaching follow unilateral pyramidal tract lesions. *Behav. Brain Res.* 56: 59-76.

Wood, H. et al. (2001) A Gap between development and repair. *Nature Reviews Neuroscience* 2: 223.

Yamashita, T. et al. (1999) Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* 24, 585-93.

Yan, Q. and Miller, J.A. (1993) The use of trophic factors in degenerative motoneuron diseases. *Exp. Neurol.* 124: 60-3.

Yan, Q. et al. (1997a) Immunocytochemical localization of TrkB in the central nervous system of the adult rat. *J. Comp. Neurol.* 378: 135-157.

Yan, Q. et al. (1997b) Expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* 78: 431-448.

Zilles et al.(1991). Neurotransmitter receptors and cortical architecture. *Journal für Hirnforschung* 32: 343-356

## 7. DANKSAGUNG

Dank gilt allen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Bedanken möchte ich mich zu allererst bei Herrn Prof. Dr. med. Klaus Giehl, der mir das Thema zur Verfügung gestellt, die Arbeit betreut hat und in (fast :-)) jeder Lebenslage hilfreich unterstützend da war, sowie Herrn Prof. Dr. med. Pedro Mestres, der diese Arbeit schlussendlich trotz der langen Wartezeit noch unter seine Fittiche genommen hat.

Meine Eltern, Eva und Heinrich Gerowitt, sind immer für mich da gewesen und haben finanziell und moralisch auch das Voranbringen meiner Promotion (trotz aller Freisemester und Auslandsaufenthalte) unter vielem mehr immer unterstützt. Danke für alles!

Am Ende hat meine Frau, Dr. med. Andrea Erdmann, geborene Bergmann, mir den letzten Schubs verpasst und mich mit sanftem Druck schlussendlich zum Abschluss dieser Arbeit motiviert. Danke für die freie Zeit zum Schreiben in der stressigen Zeit!

Vielen Dank auch an Justus und Moritz, schon alleine dafür, dass ihr überhaupt da seid, meine süßen kleinen Söhne! Ich bin stolz auf Euch!