

Aus dem
Institut für Biochemie und Zellbiologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Der Effekt Cerebrolysins® auf die Regenerations- und Degenerationsprozesse
im spinalmotorischen System *in vitro***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von
aus
Magdeburg

Benjamin Lucas
Eisleben
2014

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung

Lucas, Benjamin:

Der Effekt Cerebrolysin® auf die Regenerations- und Degenerationsprozesse im spinalmotorischen System in vitro. - 2014, - 95 Bl. : 27 Abb., 13 Tab., 5 Anl.

Kurzreferat:

Periphere Nervenläsionen sind schwere Verletzungen. Eine Regeneration ist zwar möglich, die Effizienz dieser Vorgänge ist jedoch nicht optimal. In dieser Arbeit wurde der Einfluss Cerebrolysin® (CL) auf regenerationsrelevante Funktionen zweier Hauptakteure im spinalmotorischen System – Schwann-Zellen (SZ) und NSC34-Zellen, eine Neuroblastom x Motoneuron-Hybridzelllinie als Modell für Motoneurone – untersucht.

CL war in der Lage, die Proliferation beider Zelltypen zu mindern. Im MTT-Test konnte eine Protektion gegenüber Sauerstoff-Glukose-Entzugsstress (OGD) für die NSC34-Zellen nachgewiesen werden. Für die SZ konnte gezeigt werden, dass CL die SZ-SZ-Adhäsion durch Translokalisierung des NCAD positiv beeinflusst. Weiterhin beschleunigte CL die initiale Wallersche Degeneration.

Für die NSC34-Zellen konnte gezeigt werden, dass CL im Normmedium die Differenzierung befördert, jedoch nicht in dem Umfang, wie es durch das spezielle Differenzierungsmedium erreicht wurde.

Molekular konnte für die NSC34-Zellen die Expression der Ca^{2+} -abhängigen Protease Calpain und deren Hemmung durch CL nachgewiesen werden.

CL zeigte insgesamt positive Effekte im Hinblick auf wichtige regenerationsrelevante Funktionen. Jedoch sind weitere Studien, insbesondere *in vivo*, vor dem Einsatz im klinischen Bereich notwendig.

Schlüsselwörter:

BrdU, Calpain, Cerebrolysin, Degeneration, Differenzierung, Motoneuron, MTT, NSC34, Proliferation, Regeneration, Schwann-Zellen

Inhaltsverzeichnis

Publikationsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	IX
1 Einführung.....	1
1.1 Anatomie und Physiologie des spinalmotorischen Systems	1
1.2 Das Rückenmark.....	2
1.3 Das Motoneuron – Zelllinie NSC34	2
1.4 Der periphere Nerv	3
1.5 Funktionsstörungen im spinalmotorischen System.....	5
1.6 Physiologische Reaktionen auf traumatische Schäden peripherer Nerven	7
1.7 Therapieansätze der peripheren Nervenläsion	8
1.8 Cerebrolysin®	8
2 Fragestellung	10
3 Material und Methoden	11
3.1 Verwendete Chemikalien, Antikörper, Materialien und Geräte	11
3.2 Kulturmedien und hergestellte Lösungen.....	11
3.3 Cerebrolysin (CL)	13
3.4 Versuchstiere	13
3.5 SZ-Fibrozyten-Kokulturen	14
3.5.1 Präparation und Kulturbedingungen	14
3.5.2 Experimentelle Gruppen für Zellstressexperimente	14
3.5.3 Metazolytetrazoliumbromid-Test (MTT-Test)	15
3.5.4 Bromodesoxyuridin (BrdU) - Zellproliferationsanalyse	16
3.5.5 Zelladhäsion – Clustering	19
3.6 Wallersche Degeneration <i>in vitro</i>	21
3.6.1 Präparation.....	21
3.6.2 Acetylcholin-Esterase (AChE) Färbung nach Karnovsky	21
3.6.3 Analyse mittels ImageJ	22
3.7 Zelllinie NSC34	24
3.7.1 Zellkultur	24
3.7.2 Kryokonservierung	24
3.7.3 MTT-Test	24
3.7.4 Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellteilungsrate	25
3.7.5 Auswachsen von Zellfortsätzen	26
3.8 Proteinbiochemische Untersuchungen	28
3.8.1 Probenmaterial.....	28
3.8.2 Proteinpräparation.....	29
3.8.3 Gelelektrophorese und Western Blot.....	30
3.9 Immunzytochemische Visualisierung.....	32

3.10 Statistische Datenauswertung	32
3.11 Verwendete Software	33
4 Ergebnisse	34
4.1 SZ-Fibrozyten-Kokulturen	34
4.1.1 MTT-Test	34
4.1.2 Zellproliferationsanalyse	36
4.1.3 Zelladhäsion – SZ-Cluster	38
4.2 Wallersche Degeneration <i>in vitro</i>	41
4.3 Zelllinie NSC34	43
4.3.1 MTT-Test	43
4.3.2 Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellteilungsrate	44
4.3.3 Auswachsen von Zellfortsätzen	46
4.4 Proteinbiochemische Untersuchungen	51
4.4.1 Western Blots	51
4.5 Immunzytochemische Visualisierung von Calpain-I	54
5 Diskussion	55
5.1 Methodendiskussion	55
5.1.1 Zellkultur, Gewebekultivierung und CL-Applikation	55
5.1.2 MTT-Test	56
5.1.3 Proliferationsanalysen	56
5.1.4 Zelladhäsion - Clustering	57
5.1.5 Auswachsen von Zellfortsätzen	58
5.1.6 AChE-Färbung und Messung	58
5.1.7 Proteinbiochemische Untersuchungen	58
5.2 Ergebnisdiskussion	60
5.2.1 Zellproliferation und -protektion	60
5.2.2 SZ-Clustering und -adhäsion	62
5.2.3 Wallersche Degeneration	63
5.2.4 Auswachsen von Zellfortsätzen	63
5.2.5 Proteinbiochemische Untersuchungen	65
5.3 Ausblick	68
6 Zusammenfassung	69
7 Literaturverzeichnis	71
8 Danksagung	79
9 Erklärung	80
10 Curriculum vitae	81
11 Anhang	82
11.1 Chemikalien und Antikörper	82
11.2 Plastik-, Glas- und Zellkulturmaterial	84
11.3 Geräte	85

Publikationsverzeichnis

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät, vertreten durch Prof. Dr. rer. nat. G. Keilhoff, mit folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Originalarbeiten

Lucas B, Pinkernelle J, Fansa H und Keilhoff G: *Effects of cerebrolysin on rat Schwann cells in vitro*. Acta Histochem. 116(5). 820–830 (2014).

Keilhoff G, **Lucas B**, Pinkernelle J, Steiner M und Fansa H: *Effects of Cerebrolysin on motor-neuron-like NSC-34 cells*. Exp Cell Res. 327(2). 234–255 (2014).

Vorträge und Posterpräsentationen

Lucas B, Pinkernelle J, Keilhoff G, Fansa H: Möglicher Nutzen von Cerebrolysin bei der Regeneration peripherer Nerven. Eine In-vitro-Modellstudie.
33. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Mikrochirurgie der peripheren Nerven und Gefäße, Wien, Österreich, 11/2011.

Lucas B, Fansa H, Keilhoff G: Effects of Cerebrolysin on Schwann cells in vitro – with regard to application points in peripheral nerve regeneration.
7th International Symposium on Neuroprotection and Neurorepair, Potsdam, 05/2012.

Lucas B, Steiner M, Fansa H, Keilhoff G: The effects of Cerebrolysin on motor neuron-like cell-line NSC34.
8th International Symposium on Neuroprotection and Neurorepair, Magdeburg, 04/2014.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AChE	Acetylcholinesterase
Akt	Serin/Threonin-Kinase
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ANOVA	engl. Analysis of Variances (Varianzanalyse)
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	engl. brain-derived neurotrophic factor
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	engl. bovine serum albumin (Rinderalbumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CL	Cerebrolysin®
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CNTF	engl. ciliary neurotrophic factor
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Csk	C-terminale Src Kinase
Diff.-Medium	Differenzierungsmedium
DIV	engl. days in vitro (Tage in vitro)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Elektrochemilumineszenz
ELISA	engl. enzyme-linked immunosorbent assay
EphB2	Ephrinrezeptor B2
FACS	engl. fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FGFR	engl. fibroblast growth factor receptor
FKS	fetales Kälberserum
FSC	engl. forward scatter – Größenparameter in der Durchflusszytometrie
G	Gauge (Kanülengrößenordnung)
g	im Zusammenhang mit der Zentripetalbeschleunigung bei Zentrifugen: mittlere Erdschwerebeschleunigung
g	im Zusammenhang mit der Masse: Gramm, SI-Einheit der Masse

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDNF	engl. glial cell-derived neurotrophic factor
GFR α 1	engl. GDNF family receptor α 1
h	Stunden
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure – Puffersubstanz
IGF-1	engl. insulin-like growth factor-1
IGF-2	engl. insulin-like growth factor-2
kDa	Kilodalton
l	Liter
LIF	engl. leukemia inhibitory factor
LMW-PTP A	engl. low molecular weight protein tyrosine phosphatase A
mA	Milliampere
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
MEM-NEAA	engl. non-essential amino acids found in the standard Minimum Essential Medium - Nicht-essentielle Aminosäuren, die im „Minimum Essential“ Medium gefunden wurden
mg	Milligramm
min	Minuten
Mio.	Million
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mol	SI-Einheit für Stoffmenge
MTT	Metazolyltetrazoliumbromid
N	Normal; Äquivalenzkonzentration, Produkt aus Stoffmengenkonzentration und stöchiometrischer Wertigkeit
N. bzw. Nn.	Nervus bzw. Nervi
N ₂	Stickstoff
NCAD	neurales Cadherin
NCAM	engl. neural cell adhesion molecule
nm	Nanometer
NSC34	engl. Neuroblastoma x spinal cord hybrid cell line (Neuroblastom x Rückenmark Hybrid-Zelllinie)
NT-3	Neurotrophin-3
NT-4	Neurotrophin-4
o.g.	oben genannten
OD	engl. oxygen deprivation (Sauerstoffentzug)
OGD	engl. oxygen-glucose-deprivation (Sauerstoff-Glukose-Entzug)
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit

p21	Inhibitor cyclin-abhängiger Kinasen
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PDGF	engl. platelet-derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PLCy	Phospholipase Cy
PNS	Peripheres Nervensystem
POD	Peroxidase
PP1/PP2A	Proteinphosphatase 1 bzw. 2A
rpm	engl. rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Zellkulturmedium, das im Roswell Park Memorial Institute entwickelt wurde
s	Sekunde
s.u. bzw. s.o.	siehe unten bzw. siehe oben
SDS	engl. sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SEM	engl. standard errors of mean (Standardfehler)
SFK	Src Familie Kinasen
SGD	Serum-Glukose-Deprivation (Serum-Glukose-Entzug)
SMI	engl. Sternberger monoclonal incorporated
Src	Tyrosinkinase
SSC	engl. side scatter – Oberflächenrauigkeitsparameter (Granularität) in der Durchflusszytometrie
SZ	Schwann-Zelle
TBS bzw. TBST	engl. Tris Buffered Saline (with Tween) – Tris gepufferte Kochsalzlösung (mit Tween)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
UK	United Kingdom
USA	United States of America
VEGF	engl. vascular endothelial growth factor
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildungen

Abb. 1.1-1 Das spinalmotorische System.....	1
Abb. 1.4-1 Nervenfasern - Morphologische und elektrophysiologische Unterschiede.....	4
Abb. 1.4-2 Der Aufbau peripherer Nerven.....	5
Abb. 1.8-1 Biologisch aktive Peptide in CL.....	9
Abb. 3.5-1 Typische Eichreihe eines MTT-Tests.....	16
Abb. 3.5-2 Thymidin (links) und Bromodesoxyuridin (rechts) im Vergleich.....	17
Abb. 3.5-3 Auswertung der BrdU-Inkorporation in die SZ.....	18
Abb. 3.5-4 ImageJ-Analyse der Clustergröße	20
Abb. 3.6-1 Digitale Analyse der AChE-gefärbten Fläche mit ImageJ.....	23
Abb. 3.8-1 Ponceau-Rot gefärbte Nitrozellulosemembran	31
Abb. 4.1-1 MTT-Test SZ-Fibrozyten-Kokulturen.....	35
Abb. 4.1-2 Zellproliferationsanalyse	36
Abb. 4.1-3 Repräsentative Gesichtsfelder der BrdU-Zellproliferationsanalyse.....	37
Abb. 4.1-4 SZ-Cluster auf Fibrozytengrund.....	39
Abb. 4.1-5 Lokalisation des NCAD innerhalb der SZ.....	40
Abb. 4.2-1 Wallersche Degeneration	41
Abb. 4.2-2 Repräsentative Nerven-Präparate unter Wallerscher Degeneration.....	42
Abb. 4.3-1 MTT-Test NSC34	43
Abb. 4.3-2 Zellproliferationsanalyse NSC34.....	45
Abb. 4.3-3 Durchschnittliche Neuritenlänge	47
Abb. 4.3-4 Durchschnittliche Länge des längsten Neuriten je Zelle.....	48
Abb. 4.3-5 Durchschnittliche Neuritenzahl	49
Abb. 4.3-6 Zellfortsätze NSC34 an DIV 4.....	50
Abb. 4.4-1 Semiquantitativer Vergleich der Calpain-I-Proteinmengen.....	51
Abb. 4.4-2 Semiquantitativer Vergleich α -Spectrin-Proteinmengen.....	53
Abb. 4.5-1 Calpain-I-Visualisierung und Quantifizierung in NSC34-Zellen an DIV 4.....	54
Abb. 5.2-1 Arbeitsmodell zur Signaltransduktion und zum CL-Einfluss in SZ	67

Tabellen

Tab. 1.5-1 Klinische Einteilung von peripheren Nervenläsionen.....	6
Tab. 3.2-1 Hergestellte Lösungen	11
Tab. 3.2-2 SZ-Medien	12
Tab. 3.2-3 NSC34-Medien	12
Tab. 3.5-1 Behandlungsschema SZ-Fibrozyten-Kokulturen	15
Tab. 3.7-1 Behandlungsschema für den MTT-Test bei NSC34-Zellen	25
Tab. 3.7-2 Behandlungsschema Zelldifferenzierung	27
Tab. 3.8-1 Behandlungsschema Western Blots	29
Tab. 3.11-1 Verwendete Software.....	33
Tab. 11.1-1 Verwendete Chemikalien, Materialien und fertige Lösungen.....	82
Tab. 11.1-2 Antikörperliste	83
Tab. 11.2-1 Verwendete Plastik-, Glas- und Zellkulturmaterialien	84
Tab. 11.3-1 Verwendete Geräte.....	85

1 Einführung

1.1 Anatomie und Physiologie des spinalmotorischen Systems

Mit dem Begriff Motorik wird die Fähigkeit der Bewegung beschrieben. Sie stellt eine der wichtigsten und zentralen Funktionen des menschlichen Körpers dar.

Nach Entstehen eines Handlungsantriebs in den höheren kortikalen Zentren wird die eigentliche Handlungsplanung der Motorik im posterior parietalen Kortex und im präfrontalen Kortex ausgeführt. Diese Planung wird unter Mithilfe der Basalganglien, des Kleinhirns und der Assoziationsareale in ein geeignetes Bewegungsprogramm umgesetzt. Die letztendliche Bewegungsausführung initiiert der Motorkortex im *Gyrus praecentralis*, dessen Signale durch den Hirnstamm und den Kleinhirnwurm überwacht werden. Diese Signale erreichen meist über die Verschaltung durch Interneurone die Motoneurone des spinalmotorischen Systems. Durch die gezielte Aktivierung und Inhibition beteiligter Motoneurone werden die zuvor geplanten komplexen Bewegungsmuster ausgeführt [46].

Das spinalmotorische System besteht aus den Motoneuronen mit den efferenten Projektionen über die Axone zu den Muskelfasern der zugehörigen motorischen Einheit (siehe Abschnitt 1.3). Die Bewegung wird im Muskel durch Muskelspindeln und in den Sehnen durch Golgi-Sehnenorgane überwacht. Die entstehenden Signale werden über afferente Projektionen zu den pseudounipolaren Neuronen der Spinalganglien weitergeleitet (siehe Abb. 1.1-1). Die supraspinalen und spinalen Projektionen der pseudounipolaren Ganglienneurone dienen dabei der Überwachung und situativen Anpassung der Bewegungsausführung [46].

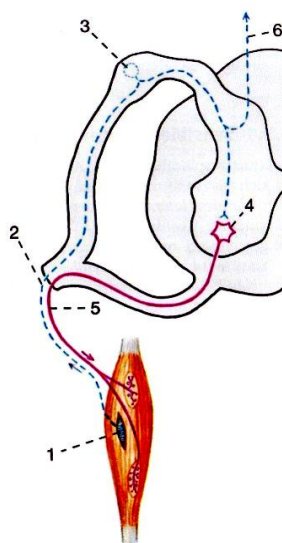


Abb. 1.1-1 Das spinalmotorische System

Die Hauptkomponenten des spinalmotorischen Systems. **(1)** Die Muskelfasern als ausführende Komponente mit einer Muskelspindel als Kontrollsystem des aktuellen Funktionszustandes der Arbeitsmuskulatur. **(2)** Das afferente Axon, welches die Informationen über den Funktionszustand an ein pseudounipolares sensorisches Neuron **(3)** im zugehörigen Spinalganglion weiterleitet. Dieses leitet die Impulse der Muskelspindel in supraspinale Richtung **(6)** und zum zugehörigen Motoneuron **(4)** der motorischen Einheit weiter. Das Motoneuron übermittelt eigene Impulse über das Axon **(5)** in Richtung Muskelfasern der motorischen Einheit. modifiziert nach [92].

1.2 Das Rückenmark

Das Rückenmark (*Medulla spinalis*) ist ein im Wirbelkanal gelegener Teil des ZNS. Es setzt sich aus der grauen und weißen Substanz zusammen. Während die weiße Substanz die aufsteigenden und absteigenden Bahnen enthält, beinhaltet die graue Substanz vor allem die Neurone und Gliazellen [92].

Die graue Substanz besteht aus einem Hinter- und einem Vorderhorn. Ab dem 8. Segment des Cervikalmarks kommt ein Seitenhorn hinzu [92].

Das Hinterhorn beinhaltet vor allem die Perikarya der sensiblen Neurone, welche Afferenzen von pseudounipolaren Ganglienzellen erhalten und die Informationen nach supraspinal weiterleiten. Das Seitenhorn enthält die Perikarya des vegetativen Nervensystems. Das Vorderhorn beinhaltet die Perikarya der Motoneurone (siehe Abschnitt 1.3), die die Skelettmuskelfasern innervieren (motorische Endstrecke) [92].

Die Gliazellen bilden einen weiteren wichtigen Zelltypus im gesamten Nervensystem.

Im ZNS kann man zwischen Astroglia, Oligodendroglia, Mikroglia und Ependymzellen unterscheiden. Sie dienen u.a. der Myelinisierung (Oligodendroglia), der Ernährung (Astroglia), der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke (Astroglia), der Liquorbildung (Ependymzellen) und der immunologischen Abwehr (Mikroglia) [92].

1.3 Das Motoneuron – Zelllinie NSC34

Das Motoneuron ist eine multipolare Nervenzelle, die eine Muskelfasergruppe über die motorischen Endplatten innerviert und so mit den innervierten Muskeln eine motorische Einheit bildet. Über den Dendritenbaum erhält es afferente Impulse von Interneuronen, den pseudounipolaren Ganglienzellen oder direkt von Neuronen des primären motorischen Kortex aus dem *Gyrus praecentralis* [46, 92].

Motoneurone werden in α -, β - und γ -Typen eingeteilt. Der Unterschied liegt im Ziel der axonalen Projektion. Die α -Motoneurone innervieren vor allem die extrafusalen Muskelfasern der Skelettmuskulatur, γ -Motoneurone vor allem die intrafusalen Muskelfasern in der Muskelspindel. Die Zielstrukturen axonaler Projektionen, ausgehend von β -Motoneuronen, stellen sowohl intra- als auch extrafusale Muskelfasern dar [46, 92].

Ein *in vitro*-Modell für die Untersuchungen von Motoneuronen stellt die Zelllinie NSC34 dar. Diese Zelllinie ist ein Fusionsprodukt aus embryonalen Motoneuron-angereicherten primären Rückenmarkszellen und Neuroblastomzellen [16]. NSC34-Zellen zeigen eine Vielzahl von Motoneuron-ähnlichen Eigenschaften. Dazu gehören u.a. das Neuritenwachstum, die Acetylcholinsynthese, das Generieren von Aktionspotentialen und die Expression von Neurofilamenten [16]. Durch diese Eigenschaften wurde diese Zelllinie als Möglichkeit zur

Neurotoxizitätstestung für Motoneurone evaluiert. Der größte Nachteil der Zelllinie ist die Beschränkung der Subkultivationsdauer auf maximal 10 Tage. Wird diese Zeit überschritten, lösen sich die Zellen vom Untergrund [21].

Die NSC34-Zellen zeigen nach entsprechender Kultivierung zwei unterschiedliche Phänotypen: kleine, proliferierende, undifferenzierte Zellen und größere, vielkernige, nichtproliferierende Zellen [23]. Um die Differenzierung der Zellen zu unterstützen, kann ein spezielles Medium verwendet werden. Damit kann die Relation von der kleinkalibrigen zur großen Subpopulation verschoben werden und ein Motoneuron-ähnlicher Phänotyp gewährleistet werden [40].

1.4 Der periphere Nerv

Der periphere Nerv ist eine Struktur, die der Leitung elektrischer Signale dient. Er setzt sich zellulär hauptsächlich aus den Fortsätzen der Neurone, Schwann-Zellen (SZ) und Fibrozyten zusammen. Diese Fortsätze werden im Folgenden als „Axone“ bezeichnet. Sie können entweder efferente Signale in Richtung der Zielorgane oder afferente Signale in Richtung ZNS übertragen.

Die Axone werden von der peripheren Glia, den SZ, umgeben. Aus elektrophysiologischer und morphologischer Sicht lassen sich myelinisierte von nichtmyelinisierten Axonen unterscheiden [46, 92].

Bei nichtmyelinisierten Axonen treten mehrere Axone gebündelt durch einen Verband von SZ hindurch und es verbleibt ein schmaler Spalt von Extrazellulärraum zwischen der Axonmembran und der Zellmembran der SZ. Somit erfolgt die elektrophysiologische Signaltransduktion kontinuierlich (siehe Abb. 1.4-1) [46].

Bei den myelinisierten Axonen umhüllt eine SZ ein Axon mehrfach und bildet so die Myelinscheide. Dies führt zu einer elektrophysiologischen Isolation der betroffenen Axonmembranabschnitte. An der Grenze zwischen zwei SZ verbleibt ein nichtisolierter Bereich, der sogenannte Ranvier-Schnürring. Diese Morphologie ändert die elektrophysiologischen Eigenschaften der Signalweiterleitung. Die Signale im myelinisierten Axon werden saltatorisch, d. h. von Schnürring zu Schnürring, übertragen (siehe Abb. 1.4-1). Dadurch erhöht sich die Nervenleitgeschwindigkeit dramatisch [46].

Der periphere Nerv entsteht aus der strukturierten Zusammenlagerung von parallel verlaufenden Nervenfasern. Er wird außen von der Adventitia, auch Paraneurium genannt, gegen die Nachbarstrukturen abgegrenzt [50].

Die einzelnen Nervenfasern lagern sich zunächst zu Nervenfaszikeln zusammen. Zwischen diesen Nervenfasern befindet sich lockeres Bindegewebe, das als Endoneurium bezeichnet

wird. Der Nervenfaszikel wird von einer bindegewebigen Hülle, dem Perineurium, umgeben von der perineurialen Basalmembran, begrenzt.

Die Faszikel legen sich parallel zusammen und bilden den eigentlichen peripheren Nerv. Zwischen den einzelnen Faszikeln befindet sich Bindegewebe, das als interfazikuläres Epineurium bezeichnet wird. Umhüllt werden diese gesamten Strukturen vom epifazikulären Epineurium, das an die Adventitia angrenzt (siehe Abb. 1.4-2) [50].

Nach der Anzahl der enthaltenen Nervenfaszikel können monofaszikuläre Nervenstrukturen mit nur einem Faszikel, oligofaszikuläre Nervenstrukturen mit 2 bis 12 Faszikeln und polyfaszikuläre Nervenstrukturen mit mehr als 12 Faszikeln unterschieden werden. Im Verlauf des Nervs von proximal nach distal ändert sich der Aufbau von poly- zu oligofaszikulär [50].

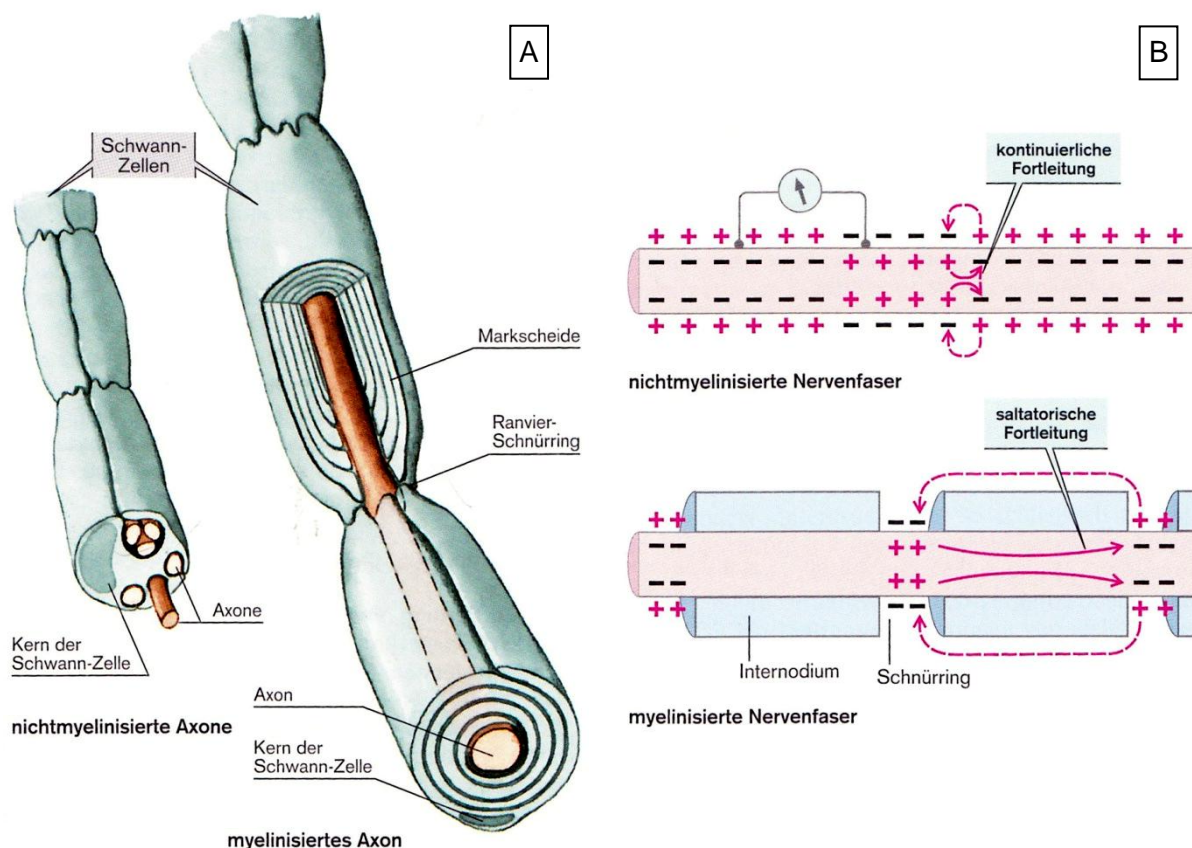


Abb. 1.4-1 Nervenfasern - Morphologische und elektrophysiologische Unterschiede

A Unterschiedliche SZ-Umhüllung bei myelinisierten und nichtmyelinisierten Axonen

B elektrophysiologische Unterschiede zwischen myelinisierten (saltatorische Fortleitung) und nichtmyelinisierten (kontinuierliche Fortleitung) Axonen. modifiziert nach [46].

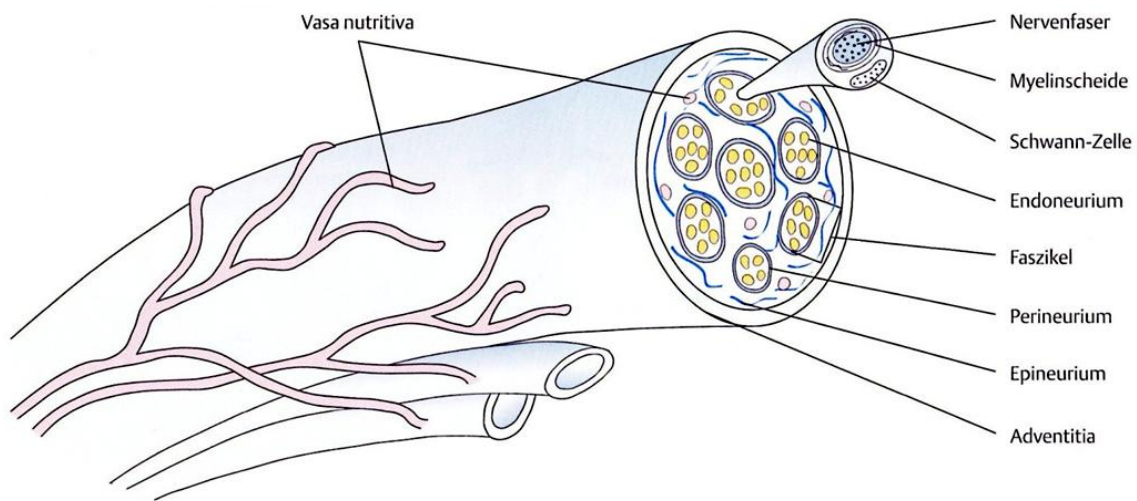


Abb. 1.4-2 Der Aufbau peripherer Nerven

Auf der Abbildung ist der strukturierte Aufbau des peripheren Nerven aus Nervenfasern, Endoneurium, Nervenfaszikel, Perineurium, Epineurium und Adventitia dargestellt. modifiziert nach [50].

1.5 Funktionsstörungen im spinalmotorischen System

Neben traumatischen Läsionen des Rückenmarks und der peripheren Nerven gehören neurodegenerative Erkrankungen zu den möglichen Ursachen für Funktionsstörungen im spinalmotorischen System. Die Symptomatik dieser Erkrankungen zeigt dabei Muskelschwächen oder Paresen der assoziierten Muskelgruppen. Im Verlauf folgen Muskelatrophien bei progredienten neurodegenerativen Prozessen oder bei ausbleibender Heilung nach einem Trauma.

Zu den neurodegenerativen Erkrankungen gehören die Motoneuronerkrankungen wie z.B. die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) oder die Spinale Muskelatrophie. Dies sind seltene Krankheiten, die auf dem Untergang des ersten oder zweiten Motoneurons beruhen, in deren Folge sich Paresen und Muskelatrophien ausbilden. Obwohl die ALS mit einer Inzidenz von 2,0 bis 2,5 je 100.000 Einwohner pro Jahr und einer Prävalenz von 3 bis 8 je 100.000 Einwohner selten auftritt, gilt sie als häufigste motorische Systemerkrankung [28, 79]. Sie ist eine Erkrankung multifaktorieller Genese. Als Mechanismen hinter dem Untergang der Motoneurone werden neben einer familiären Form durch eine Mutation in der zytosolischen Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase, mitochondriale Funktionsstörungen, axonale Transportstörungen, Exzitotoxizität oder die Reduktion von Wachstumsfaktoren diskutiert [9].

Um den Motoneuronerkrankungen therapeutisch zu begegnen, werden unter anderem neurotrophe Faktoren wie „insulin-like growth factor-1“ (IGF-1) [42] oder „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) [3] erwogen [35].

Die traumatisch bedingten Schäden des spinalmotorischen Systems können eine Läsion des Rückenmarks selbst und die Läsion eines peripheren Nervs beinhalten.

Die traumatische Rückenmarksläsion tritt dabei mit einer Inzidenz von 15 bis 30 Fälle je 1 Mio. Einwohner pro Jahr auf. Die initialen Mechanismen hierfür sind neben Verkehrsunfällen auch Sturzereignisse im Rahmen von Arbeits-, aber auch Freizeit- und Sportunfällen [91].

Die Läsionen peripherer Nerven treten wesentlich häufiger mit einer Inzidenz von 150 je 1 Mio. Einwohner pro Jahr auf. Am häufigsten sind hierbei die traumatischen N. ulnaris- und N. fibularis-Läsionen. Die Mechanismen für diese Verletzungen stellen vor allem Schnitt- und Stichverletzungen sowie Zerrungen, Quetschungen und Kompressionssyndrome dar [58].

Die klinische Einteilung der Nervenläsionen erfolgt nach Sunderland. Diese Klassifikation basiert auf der ursprünglichen Einteilung von Seddon. Dabei werden Neurapraxie, Axonotmesis und Neurotmesis unterschieden. Sunderland erweiterte diese Einteilung auf fünf Schweregrade. Der Grad I entspricht dabei der Neurapraxie und der Grad V der Neurotmesis. Die Axonotmesis wird durch Sunderland nach Beteiligung des Endo-, Peri- und Epineuriums weiter unterteilt in die Grade II bis IV (siehe Tab. 1.5-1) [89].

Tab. 1.5-1 Klinische Einteilung von peripheren Nervenläsionen

Klassifikation		Schädigungsausmaß				
Sunderland	Seddon	Myelin	Axon	Endoneurium	Perineurium	Epineurium
I	Neurapraxie	+/-	-	-	-	-
II	Axonotmesis	+	+	-	-	-
III		+	+	+	-	-
IV		+	+	+	+	-
V	Neurotmesis	+	+	+	+	+

„+“ Struktur geschädigt; „-“ Struktur intakt. modifiziert nach [5, 49].

1.6 Physiologische Reaktionen auf traumatische Schäden peripherer Nerven

Eine wichtige Voraussetzung für die Regeneration der nervalen Verbindung ist das Überleben des innervierenden Motoneurons [24]. In der Übersichtsarbeit von Fansa und Keilhoff wird die unterschiedliche Anfälligkeit für Zelltod in Abhängigkeit der Neuronlage und der Entfernung der Verletzung zum Neuron diskutiert. Dabei sind kraniale Motoneurone anfälliger als spinale Motoneurone. Außerdem nimmt die Anfälligkeit mit der Entfernung der Verletzung zum Neuron ab [24].

Neurotrophe Faktoren wie der „brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF) und der „glial cell-derived neurotrophic factor“ (GDNF) wirkten positiv auf das Überleben der Motoneurone nach Nervenläsionen [2]. Diese Faktoren verbesserten ebenfalls nach einer chronischen Kontinuitätsunterbrechung der Axone deren Regeneration. Durch die Kombination der beiden Faktoren wurde das Auswachsen der Axone weiter verbessert [11].

SZ sind selbst in der Lage, neurotrophe Faktoren zu produzieren. Das SZ-Überleben im distalen Nervenstumpf nach Axotomie ist von einem Milieu dieser selbstproduzierten Faktoren abhängig. So führte das Entfernen von IGF-2 oder „platelet-derived growth factor“ (PDGF) aus einem SZ-konditionierten Medium mittels Antikörper zu einem reduzierten Überleben der SZ-Kulturen [27, 59].

Nach der Läsion eines peripheren Nervs durchlaufen die Segmente distal und proximal der Läsionsstelle verschiedene physiologische Prozesse. Hierbei ist die SZ aktiv beteiligt.

Im distalen Nervenstumpf wird die Wallersche Degeneration eingeleitet. Sie dient dazu, dem später einsprossenden Axon eine optimale Existenzgrundlage zu bieten [24]. Zuerst werden Axoplasma und Axonmembran durch Proteasen degradiert. Dieser Vorgang ist für große Nervenfasern nach 24 bis 48 Stunden abgeschlossen [29, 86]. Danach beginnt die Phagozytose der fragmentierten Myelinbestandteile durch dedifferenzierte SZ. Es entstehen sogenannte Ovoide. Die Dedifferenzierung der SZ startet unmittelbar nach dem Kontaktverlust zum Axon. Damit einher geht die Herabregulation der Myelinsynthese [48, 53]. Nach ungefähr drei Tagen beginnt die Einwanderung von Makrophagen. Diese unterstützen die Phagozytose der Myelinovoide [24, 86, 87]. Schon während der Axon- und Myelindegradation proliferieren die SZ. Die neu entstandenen SZ verbleiben in den Endoneuralrohren und bilden dort die sogenannten Büngnerschen Bänder aus. Diese sind längsorientierte Zellsäulen und dienen später als Leitstruktur für das einwachsende Axon [24, 78].

Im proximalen Nervenabschnitt erfolgen diese Prozesse auf gleiche Weise bis zum proximal nächstgelegenen Ranvier-Schnürring. Dort bildet sich der Wachstumskolben, eine Verdickung des Axonstumpfs. Aus diesem wachsen mehrere Axonkollateralen aus und dringen im distalen Nervenstumpf in die Büngnerschen Bänder ein. Die Remyelinisierung wird durch die SZ initiiert, wenn der Kontakt zum Axon hergestellt ist [24, 78, 88].

1.7 Therapieansätze der peripheren Nervenläsion

Eine Regeneration ist im Peripheren Nervensystem (PNS) grundsätzlich möglich [81]. Bleiben die Nervenläsionen ohne Kontinuitätsunterbrechung, kann die Wiederherstellung der Nervenfunktionen spontan verlaufen. In diesen Fällen würde eine konservative Therapie bevorzugt werden. Diese beinhaltet eine konsequente physiotherapeutische Beübung, um Kontrakturen zu vermeiden. Mit einer Regeneration ist nach 3 bis 6 Monaten zu rechnen. Verzögert sich die Regeneration, sollte nach spätestens 6 Monaten eine chirurgische Revision durchgeführt werden [5, 26].

Im Fall einer bestehenden Kontinuitätsunterbrechung sollte primär die chirurgische Therapie bevorzugt werden [26]. Dabei wird nach Darstellung und Approximation der Nervenstümpfe die spannungsfreie Koaptation mittels mikrochirurgischer Nervennaht ausgeführt. Die spannungsfreie Naht kann z.B. durch eine geeignete Gelenkstellung benachbarter Gelenke unterstützt werden. Erscheint die Defektstrecke sehr ausgedehnt, z.B. nach größeren Traumata oder notwendiger Anfrischung der Nervenstümpfe, bleibt in einigen Fällen eine spannungsfreie Koaptation verwehrt. In diesem Fall muss ein Interponat eingebracht werden, das den einsprossenden Axonen als Leitschiene dient [26].

1.8 Cerebrolysin®

Cerebrolysin® (CL) ist das Produkt einer standardisierten enzymatischen Spaltung von Proteinen aus dem Gehirn von Schweinen. Es besteht zu 75 % aus freien Aminosäuren (Alanin, Arginin, Aspartat, Cystein, Glutamat, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan, Thyrosin) und zu 25 % aus Peptiden mit niedrigem Molekulargewicht [22, 34], die biologisch aktiv sind und mit Antikörpern gegen neurotrophe Faktoren reagieren. Nachgewiesen wurden u.a. die Reaktion mit Antikörpern gegen „ciliary neurotrophic factor“ (CNTF), GDNF, IGF-1 und IGF-2 (siehe Abb. 1.8-1). Entsprechende Reaktionen bei Antikörpern gegen Neurotrophin-3 (NT-3), Neurotrophin-4 (NT-4) und „leukemia inhibitory factor“ (LIF) konnten jedoch nicht nachgewiesen werden [17]. In mehreren Arbeiten wurde CL eine neuroprotektive Wirkung auf kortikale Neurone zugesprochen. Diese Effekte wurden bei Glutamatoxizität [31] und Sauerstoff-Glukose-Entzugstress (OGD) [76] in verschiedenen Modellen nachgewiesen. Eine weitere positive Wirkung konnte für CL auf das Auswachsen von Nervenfortsätzen in kortikalen Neuronen gezeigt werden [34].

In klinischen Studien profitierten Patienten von einer Kombinationstherapie aus CL und einer Fibrinolyse im neurologischen Outcome 10 Tage nach einem ischämischen Hirninfarkt [47]. Auch Patienten, die an degenerativen ZNS-Erkrankungen wie Morbus Alzheimer litten,

profitierten von einer CL-Behandlung. So verbesserte CL in einer prospektiven Studie bei Patienten mit mildem Morbus Alzheimer die kognitive Funktion [1].

CL besitzt in 44 Ländern weltweit die Zulassung zur Behandlung von dementiellen Erkrankungen und Schlaganfällen [6].

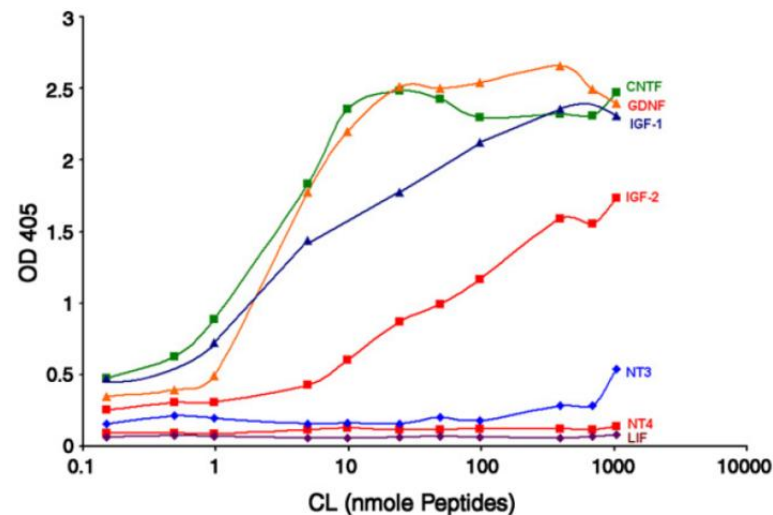


Abb. 1.8-1 Biologisch aktive Peptide in CL

ELISA-basierter Nachweis biologisch aktiver Peptide in CL, die mit Antikörpern gegen CNTF, GDNF, IGF-1 und IGF-2 reagieren. Antikörper gegen NT-3 und NT-4 sowie LIF reagierten hingegen nicht mit CL. modifiziert nach [17].

2 Fragestellung

Grundsätzlich ist eine Regeneration nach Schäden im PNS möglich. Die dabei stattfindenden Prozesse verlaufen jedoch nicht mit der bestmöglichen Effizienz.

Unsere Arbeitshypothese basierte auf den oben ausgeführten neuroprotektiven Effekten von CL in Zellstressmodellen kortikaler Neurone. Daraus leiteten wir ab, dass eine adäquate Auswirkung auf die komplexen Vorgänge während der Regeneration der peripheren Nerven erwartet werden darf.

Ziel dieser Arbeit war somit, die Effekte der neurotrophen Substanz CL auf die Regeneration und Zellfunktion der Hauptakteure des spinalmotorischen Systems, den SZ und Motoneuronen, darzustellen.

Als *in vitro*-Modelle dienten hierfür primäre SZ-Fibrozyten-Kokulturen, primäre organotypische *Nervus-ischiadicus*-Kulturen und NSC34-Zellkulturen. An diesen Modellen wurden CL-Effekte auf die Proliferationsrate, die Zelldifferenzierung, die Widerstandsfähigkeit gegen Zellstressbedingungen, die Wallersche Degeneration, das Auswachsen von Nervenfortsätzen und die Calpain-Aktivität untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Chemikalien, Antikörper, Materialien und Geräte

Alle Chemikalien, Antikörper, Geräte, Plastik-, Glas- und Einwegmaterialien sind von den im Anhang (siehe Abschnitt 8) angegebenen Herstellern und Lieferanten bezogen, soweit im Text nicht anders angegeben.

3.2 Kulturmedien und hergestellte Lösungen

Alle Lösungen und modifizierte Zellmedien wurden nach Standardprotokollen hergestellt.

Tab. 3.2-1 Hergestellte Lösungen

Bezeichnung	Inhalt
Boratpuffer (pH = 8,5)	Natriumtetraborat 0,06 mol/l
FACS-Puffer	BSA 0,2 % in PBS
Homogenisierungspuffer	Phosphat-Puffer (pH = 7,4) 0,5 mol/l Protease-Inhibitor-Tablette 1 Stück / 10 ml
Karnovsky-Medium	Acetylthiocholiniodid 1,80 mmol/l Kaliumhexacyanoferrat(II) 0,52 mmol/l Kupfersulfat 3,13 mmol/l Natriumcitrat 5 mmol/l Phosphat-Puffer (pH = 6,5) 65,83 mmol/l
Laufpuffer Pierce® 10x	HEPES 1 mol/l SDS 34,676 mmol/l TRIS 1 mol/l
Laufpuffer Serva 10x	Glycin 1,92 mol/l SDS 34,676 mmol/l TRIS 0,25 mol/l
MTT-Reagenz	3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid 14,482 mmol/l
TBST (pH = 7,6)	Natriumchlorid 136,893 mmol/l TRIS 19,977 mmol/l TWEEN® 20 0,814 mmol/l
Transferpuffer	Glycin 143,866 mmol/l Methanol 4,931 mol/l SDS 2,6 mmol/l TRIS 18,739 mmol/l
Ponceau-Rot Färbelösung	Essigsäure 0,525 mol/l Ponceau S 2,630 mmol/l

Tab. 3.2-2 SZ-Medien

Bezeichnung	Mediumgrundlage	Zusätze
Lysemedium	DMEM High Glucose	D-Glucose 1,5 g/l Streptomycin 50 µg/ml Penicillin 50 U/ml Collagenase 0,05 % Dispase 1,25 U/ml Hyaluronidase 0,1 %
Normmedium	DMEM High Glucose	Streptomycin 50 µg/ml Penicillin 50 U/ml D-Glucose 1,5 g/l FKS 10 %
Präparationsmedium	DMEM High Glucose	Streptomycin 50 µg/ml Penicillin 50 U/ml D-Glucose 1,5 g/l
SGD-Stressmedium	DMEM no Glucose pyruvatfrei	Streptomycin 50 µg/ml Penicillin 50 U/ml

Tab. 3.2-3 NSC34-Medien

Bezeichnung	Mediumgrundlage	Zusätze
Differenzierungsmedium nach Kaiser et al. [40]	DMEM / Ham's F12	FKS 1 % Ciprobay 1 % MEM-NEAA 1 %
Kryomedium		Normmedium 82 % steriles DMSO 18 %
Normmedium	DMEM no Glucose pyruvatfrei	D-Glucose 4,5 g/l FKS 10 % Ciprobay 0,2 %
OGD-Stressmedium	DMEM no Glucose pyruvatfrei	FKS 10 % Ciprobay 0,2 %

3.3 Cerebrolysin (CL)

CL wurde in Ampullen zu 1 ml oder 10 ml verwendet und in Aliquots zu je 1 ml aufgeteilt. In 1 ml CL waren 215,2 mg proteolytische Peptidfraktion enthalten. CL wurde experimentell in Endkonzentrationen von 0,5 mg/ml (2,3 µl/ml), 2,5 mg/ml (11,6 µl/ml) und 5,0 mg/ml (23,2 µl/ml) im Zellmedium eingesetzt. Dazu wurde CL entweder 24 h vor Stressinduktion (Pre-CL-Gruppe), zur Stressinduktion (Para-CL-Gruppe) oder 8 h nach Stressinduktion (Post-CL-Gruppe) in das jeweilige Zellmedium gegeben. Nach telefonischer Rücksprache mit dem Hersteller wurden die Aliquots und Originalampullen im Kühlschrank bei 4 °C unter Lichtabschluss gelagert.

3.4 Versuchstiere

Für die Promotion wurden Versuchstiere ausschließlich als Materiallieferanten verwendet. Damit waren alle Versuche nur anzeigepflichtig. Eine entsprechende Genehmigung lag vor (AZ: 2-946 Uni MD). Es wurden Ratten beiderlei Geschlechts vom Typ Wistar (Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland) verwendet. Für die SZ-Präparation waren die Tiere zwischen 5 und 9 Tagen alt. Die Nerven für die Versuche zur Wallerschen Degeneration wurden den Tieren im Alter von ca. 10 Wochen entnommen. Alle Tiere stammten aus der Zucht des Instituts für Biochemie und Zellbiologie der Universität Magdeburg und wurden im Zentralen Tierlabor nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes gehalten. Die Aufzucht der Tiere erfolgte in Standard-Makrolonkäfigen Typ III mit einem Tag-Nacht-Zyklus von 12 h. Dabei waren Wasser und Futter (Standardfutter Altromin 1324™, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) bzw. bei den Jungtieren der Kontakt zum Muttertier bis unmittelbar vor der Gewebe- bzw. Organentnahme jederzeit zugänglich. Die Raumtemperatur wurde ständig in einem Bereich von 21 °C ± 1 °C gehalten. Alle Organentnahmen wurden unter der Aufsicht einer Person mit erforderlicher Erlaubnis und Qualifikation durchgeführt. Die dazu notwendige Tiertötung wurde von einer Person mit der erforderlichen Erlaubnis und Qualifikation zur Durchführung von Tierversuchen ausgeführt.

3.5 SZ-Fibrozyten-Kokulturen

3.5.1 Präparation und Kulturbedingungen

Nach der Verletzung eines peripheren Nervs kommen SZ in Kontakt mit Fibrozyten und beeinflussen auf diesem Weg das Verhalten von SZ z.B. durch Stimulation der SZ-SZ Adhäsion. Dieser Effekt suggeriert eine wichtige Rolle beider Zelltypen während der Regeneration nach einer solchen Verletzung [70]. Um exakt diese Umweltbedingungen zu simulieren, wurde eine SZ-Fibrozyten-Kokultur verwendet und aus den Spinalganglien von Wistar-Ratten im Alter zwischen 5 und 9 Tagen unter sterilen Bedingungen präpariert. Dazu wurden die Tiere dekapitiert, die Wirbelsäule nach Desinfektion in 70 % Ethanol dargestellt und der *Canalis vertebralis* unter Mikroskopsichtkontrolle eröffnet. Das Rückenmark wurde entfernt und der *Canalis vertebralis* mit Hilfe eines sterilen Stieltupfers geweitet. Die Spinalganglien wurden unter Mikroskopsicht entfernt und in 4 ml Lysemedium (siehe Tab. 3.2-2) gesammelt [44]. Nach einer Inkubationszeit von 3 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde diese Suspension mittels mehrfachen Aspirierens durch 18 G und 23 G Kanülen homogenisiert und bei 360 g 5 bis 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und das Zellpellet in Normmedium (siehe Tab. 3.2-2) resuspendiert. Die Zellkonzentration der Stammlösung wurde nun mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt und die Zellen in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen je ml Medium auf Laminin-beschichtete Deckgläschen in Petrischalen (35 mm) gegeben (0. Tag *in vitro*; DIV 0). Bei allen Zellstressexperimenten wurde ein Mediumwechsel mit Normmedium an DIV 2 durchgeführt.

3.5.2 Experimentelle Gruppen für Zellstressexperimente

An DIV 5 wurden die bisher gleich behandelten Proben in drei Gruppen aufgeteilt. In der Pre-CL-Gruppe wurde CL in den Konzentrationen 0,5 mg/ml und 2,5 mg/ml zugegeben, währenddessen die Para-CL-Gruppe und Kontrollgruppe unbehandelt blieben. An DIV 6 wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und jeweils die eine Hälfte der Gruppen mit Normmedium (nur mechanischer Stress durch Mediumwechsel) und die andere Hälfte zusätzlich mit Serum-Glucose-Deprivation-(SGD)-Stressmedium (siehe Tab. 3.2-2) weiterkultiviert. Bei allen Proben der Pre-CL-Gruppe wurde CL in der jeweiligen Konzentration erneut zugegeben. Die Proben der Para-CL-Gruppe wurden nun erstmalig mit CL in den Konzentrationen 0,5 mg/ml und 2,5 mg/ml behandelt und die Proben der Kontrollgruppe unbehandelt belassen (siehe Tab. 3.5-1).

Tab. 3.5-1 Behandlungsschema SZ-Fibrozyten-Kokulturen

DIV	Normmedium			SGD-Medium		
	Kontrolle	Pre-CL	Para-CL	Kontrolle	Pre-CL	Para-CL
0	Ausstreuen in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen je Petrischale					
2	Entfernen des kompletten Mediums und hinzufügen von frischem Normmedium					
5	-	+	-	-	+	-
6	Entfernen des kompletten Mediums und hinzufügen von:					
	Normmedium			SGD-Medium		
	-	+	+	-	+	+
6 + 24/48 h	MTT-Tests oder Fixation für Cluster-Analyse					

+ CL-Zugabe; - ohne CL-Zugabe.

CL wurde jeweils in Konzentrationen von 0,5 mg/ml und 2,5 mg/ml verwendet.

3.5.3 Metazolyltetrazoliumbromid-Test (MTT-Test)

Der MTT-Test ist ein Globaltest, der im Allgemeinen als Proliferations- und Zytotoxizitätsassay verwendet wird. Mit Hilfe des MTT-Tests wurde die Zellviabilität innerhalb der SZ-Fibrozyten-Kokulturen untersucht, um die Dosierung und das Applikationsregime zu evaluieren. Er basiert auf der mitochondrialen Verstoffwechselung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid in violettes Formazan (siehe Abb. 3.5-1), welches photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm quantifizierbar ist.

Die hierzu benötigten Zellkulturen wurden in Laminin-beschichteten 96-well Platten in einer Ausgangskonzentration von 10.000 Zellen je Vertiefung in 100 µl Normmedium angezüchtet und nach o.g. Schema (siehe Tab. 3.5-1) behandelt. Die letzte Reihe jeder 96-well Platte wurde zur Leerwertbestimmung mit 100 µl je Vertiefung Normmedium ohne Zellen gefüllt. Jeweils 24 h und 48 h nach Stressinduktion wurden MTT-Tests durchgeführt. Dazu wurden 8 µl MTT-Reagenz (siehe Tab. 3.2-1) in jede Vertiefung hinzu pipettiert und 3 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium vorsichtig entfernt, 100 µl Dimethyl Sulfoxid (DMSO) hinzugefügt, die Platten 1 min lang auf einen Schüttler gestellt und die Suspension damit vermischt. Die Proben wurden anschließend sofort mit Hilfe eines Tecan „Infinite M200“-Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm und einem Referenzwert bei 690 nm photometrisch vermessen.

Zur Quantifizierung des Leerwertes wurde jeweils die letzte Reihe jeder 96-well Platte mit 100 µl DMSO gefüllt und ebenfalls photometrisch quantifiziert.

Zur Datenaufbereitung wurden von jedem Messwert der Mittelwert der 12 Leerwerte sowie die jeweiligen Referenzwerte abgezogen.

Alle Experimente wurden in drei voneinander unabhängigen Ansätzen durchgeführt. Innerhalb der Ansätze wurden 6 Wiederholungen pro Gruppe durchgeführt. Die Mittelwerte der zugehörigen Messungen gingen in die statistische Datenaufarbeitung ein.

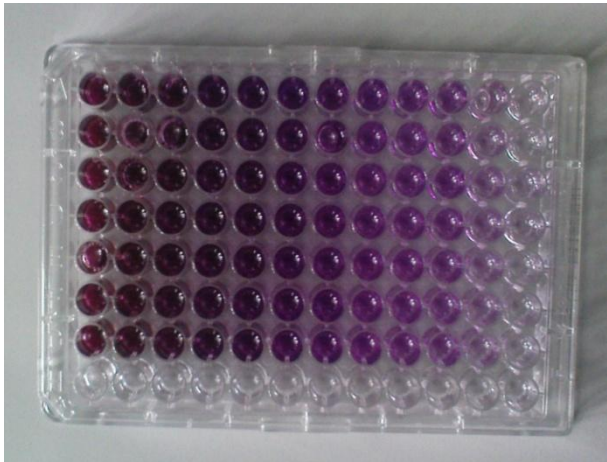


Abb. 3.5-1 Typische Eichreihe eines MTT-Tests

absteigende Zellkonzentrationen von links nach rechts.

3.5.4 Bromodesoxyuridin (BrdU) - Zellproliferationsanalyse

Bromodesoxyuridin (BrdU) ist ein Derivat des Nukleosids Thymidin (siehe Abb. 3.5-2), welches während der Replikation der Desoxyribonukleinsäure (DNA) in der S-Phase des Zellzyklus anstelle des Thymidins eingebaut wird. Das eingebaute BrdU kann anschließend immunhistochemisch im Zellkern der Zellen nachgewiesen werden, die während der BrdU-Exposition die S-Phase ganz oder teilweise durchlaufen haben.

Um den Einfluss von CL auf die Zellproliferation zu untersuchen, wurden SZ-Fibrozyten-Kokulturen wie oben beschrieben erstellt. Abweichend von den Zellstressexperimenten wurde CL sofort nach Präparation in Konzentrationen von 0,5 mg/ml und 2,5 mg/ml hinzugefügt. Der Kontrollgruppe wurde während der gesamten Kultivation kein CL appliziert. Ein Mediumwechsel wurde an DIV 2 komplett durchgeführt. An DIV 5 wurde nur noch jeweils 1 ml Medium ausgewechselt.

An DIV 2 und 6 wurde die BrdU-Inkorporation als Maß für die mitotische Aktivität quantifiziert. Die Kulturen wurden dazu 24 h vor Fixierung mit je 1 µl/ml Medium BrdU (1000x) im Brutschrank inkubiert. Nach BrdU-Exposition wurde das Zellmedium vollständig entfernt, und die Kulturen mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) über Nacht fixiert. Anschließend wurden die Proben dreimal mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) gespült und 1 h in 2 N Salzsäure (HCl) bei 37 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Boratpuffer (pH =

8,5) und dreimaligem PBS-Spülen wurde der primäre Antikörper anti-BrdU (1:100) über Nacht hinzugefügt. Die Zellidentifikation wurde durch die immunzytochemische Ko-Färbung mit dem polyklonalen anti-S100 Antikörper (1:100; SZ-spezifisch), dem monoklonalen Anti-Fibronectin Antikörper (1:500; Fibrozyten-spezifisch) oder dem monoklonalen Anti-SMI 31 Antikörper (pan-neuronal neurofilament; 1:5000; Neuron-spezifisch) erreicht. Am nächsten Tag wurden die Kulturen dreimal mit PBS gespült und die entsprechenden sekundären Antikörper anti-rat Alexa 540 (1:500), sowie anti-mouse oder anti-rabbit Alexa 488 (1:500) für 3 h hinzugefügt. Nach dreimaligem PBS-Spülen wurden die bewachsenen Deckgläschen mit Immu-Mount auf Objektträgern aufgebracht. Zur Auswertung wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop Axiolmager.M1 unter 10-facher Vergrößerung Aufnahmen von 5 Gesichtsfeldern je Probe gespeichert. Von jedem Gesichtsfeld wurden die Anzahl BrdU-gefärbter und die Gesamtanzahl an S100-positiven SZ ausgezählt (siehe Abb. 3.5-3). Für die statistische Analyse wurde dieses Experiment in 9 unabhängigen Ansätzen durchgeführt.

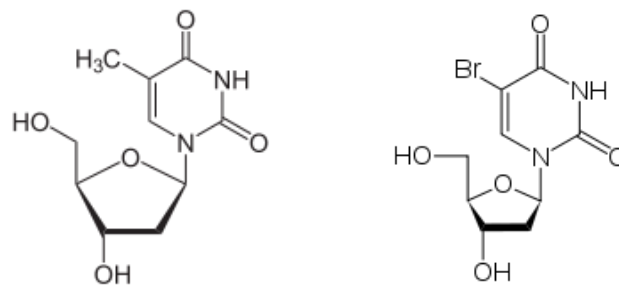


Abb. 3.5-2 Thymidin (links) und Bromodesoxyuridin (rechts) im Vergleich

Quellen: <http://de.wikipedia.org/wiki/Thymidin>
<http://de.wikipedia.org/wiki/Bromdesoxyuridin>

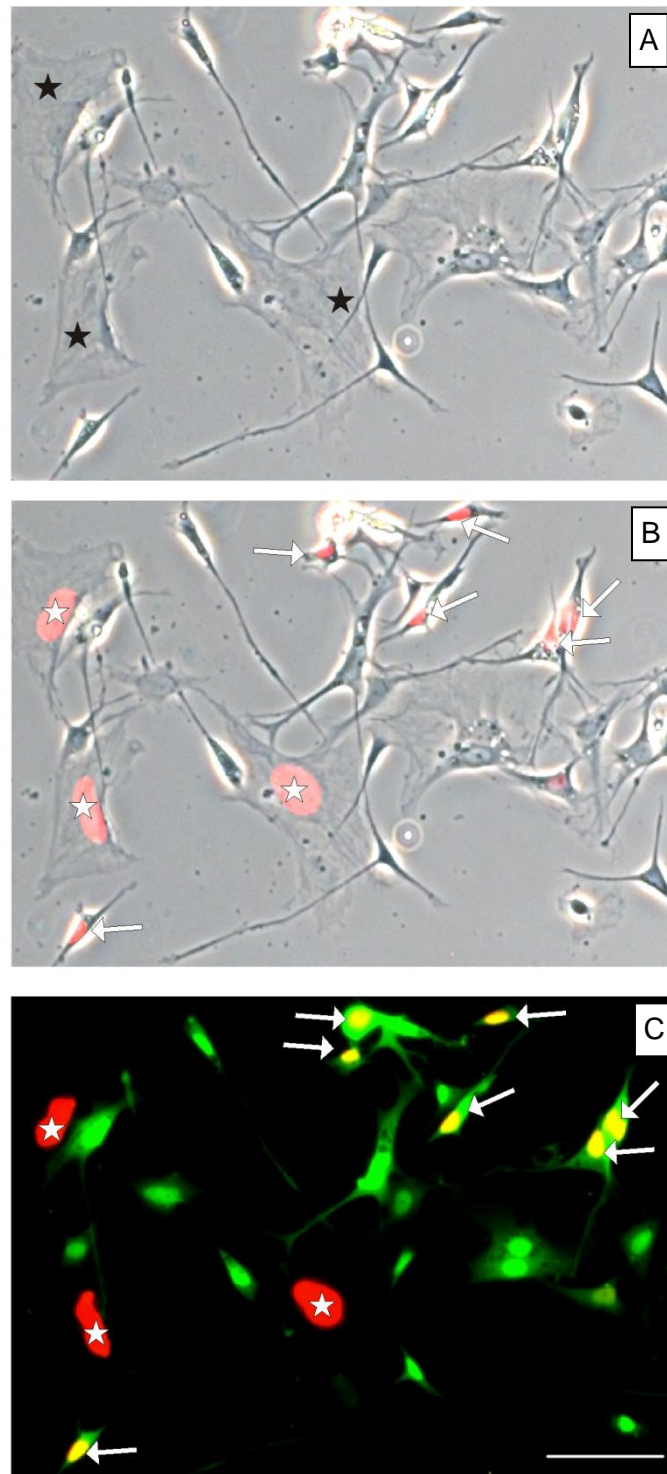


Abb. 3.5-3 Auswertung der BrdU-Inkorporation in die SZ

(A) Phasenkontrastdarstellung einer SZ-Fibrozyten Kokultur mit spindelförmigen bi- oder tripolaren SZ und Fibrozyten (schwarze Sterne) mit einem flächigem Zellkörper und bienenwabenartigen Fortsätzen. **(B)** Die rote immunzytochemische BrdU-Anfärbung von Zellnuklei zeigt mitotisch aktive SZ (Pfeile) und Fibrozyten (weiße Sterne) an. **(C)** Für eine genaue Unterscheidung von BrdU-positiven SZ (Pfeile) und BrdU-positiven Fibrozyten (weiße Sterne) wurde eine immunzytochemische Anti-S100 Kofärbung (grün) durchgeführt. Zur Auswertung wurden die BrdU-positiven SZ und die Gesamtanzahl von SZ ausgezählt und in Relation gesetzt. Skalierung = 50 µm.

3.5.5 Zelladhäsion – Clustering

SZ in Kokultur mit Fibrozyten sind in der Lage, auf dem Fibrozytenrasen Zellverbände, sogenannte Cluster, zu bilden. Diese Fähigkeit spielt eine wichtige Rolle für die Bildung der Büngnerschen Bänder. Speziell das Ausbilden von Clustern auf dem Fibrozytenuntergrund ist eine wichtige Funktion während der direktionalen Migration und Ausbildung von Gewebebrücken zwischen den Nervenstümpfen [70].

Um den Effekt von CL auf diese wichtige Eigenschaft zu quantifizieren, wurden SZ-Fibrozyten-Kokulturen nach o.g. Schema (siehe Tab. 3.5-1) behandelt und deren Clustergrößen wie im Weiteren beschrieben analysiert. Es wurden Proben jeweils 24 h und 48 h nach Stressinduktion untersucht. Dazu wurde das Medium vollständig entfernt, zweimal vorsichtig mit vorgewärmtem PBS gespült und anschließend in 4 % PFA über Nacht bei 4 °C fixiert. Am nächsten Tag wurden die Proben dreimal mit PBS für 10 min gespült, 30 min mit FKS blockiert und mit den primären Antikörpern anti-S100 (1:100) und anti-NCAD (1:500, neurales Cadherin) über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem PBS-Spülen wurden die sekundären Antikörper anti-rabbit-Alexa 540 (1:500) und anti-mouse-Alexa 488 (1:500) für 3 h dazugegeben. Nach weiteren drei PBS-Spülschritten wurden die Proben, wie unter Abschnitt 3.5.4 beschrieben, mit Immu-Mount auf Objektträger aufgebracht. Zur Analyse der Clustergrößen wurden 10 verschiedene Cluster pro Probe mit einem Fluoreszenzmikroskop AxioImager.M1 unter 10-facher Vergrößerung digitalisiert und anschließend deren Flächenausdehnung mit Hilfe von ImageJ [73] untersucht. Dazu wurden die Fluoreszenzbilder mit der Color-Threshold(Farbschwellenwert)-Funktion von ImageJ so bearbeitet, dass nur die anti-S100-gefärbte Fläche getrennt vom Hintergrund betrachtet wurde (siehe Abb. 3.5-4A+B). Nun wurde die entsprechende Bildstelle mit Hilfe der Polygon-Auswahl selektiert (siehe Abb. 3.5-4D) und anschließend der Flächeninhalt der Polygonselektion sowie der darin enthaltene relative Anteil an Threshold-Fläche gemessen und so die eigentliche Clusterfläche errechnet.

Zur subzellulären Lokalisationsbestimmung des neuralen Cadherins wurden 5 verschiedene Cluster pro Probe unter 63-facher Vergrößerung digitalisiert und qualitativ ausgewertet.

Alle Experimente wurden in 9 voneinander unabhängigen Ansätzen durchgeführt.

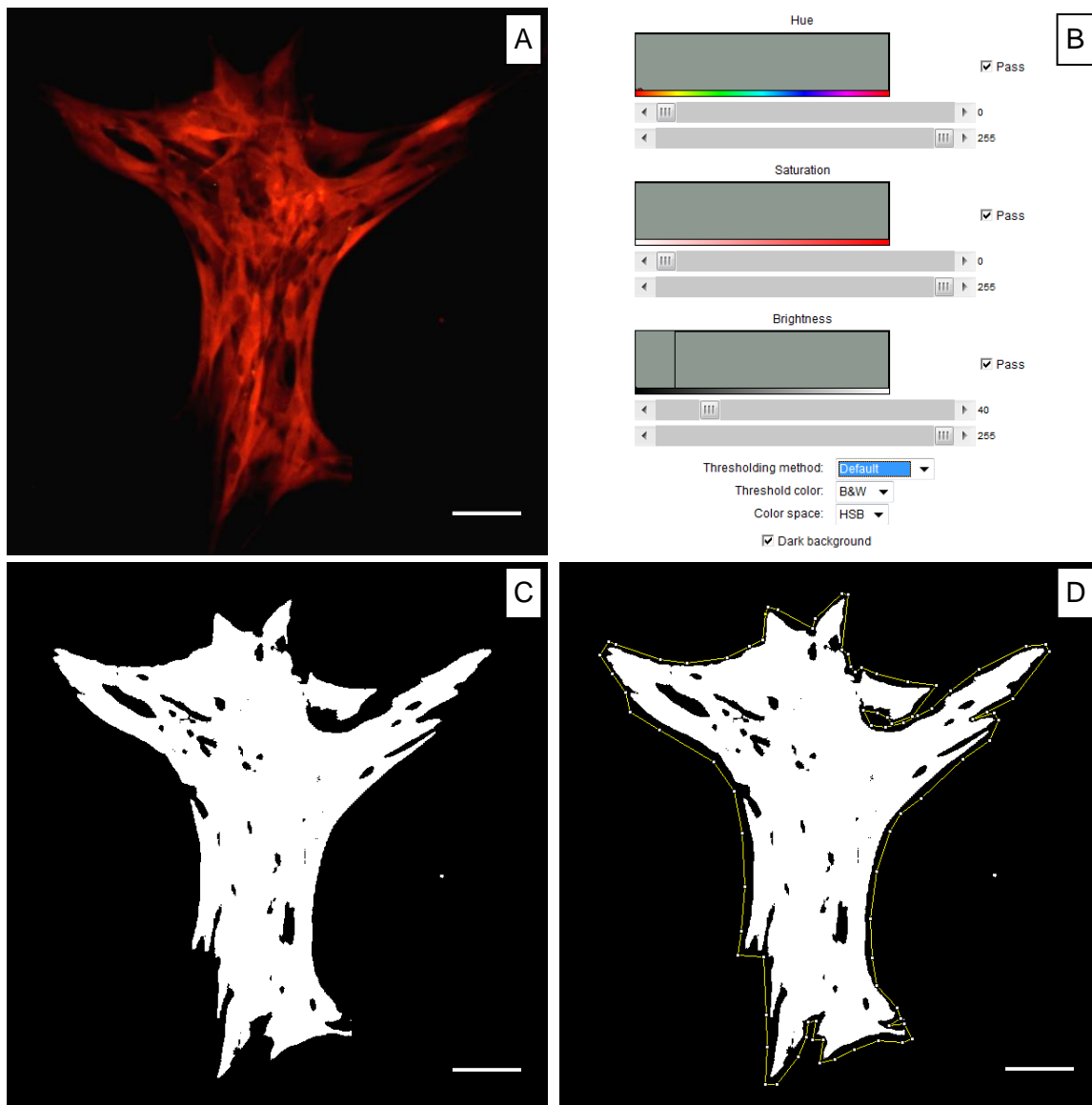


Abb. 3.5-4 ImageJ-Analyse der Clustergröße

A-D Analyseschritte für die Clustergrößenbestimmung mittels ImageJ.

A repräsentatives Cluster (rot = anti-S100-Färbung). **B** Threshold-(Schwellenwert)-Funktion von ImageJ; gemessen wird die rote Farbe im kompletten Bereich und bei voller Sättigung mit dunklem Hintergrund, die Helligkeit (Brightness) steuert die Hintergrunddeselektion von der Färbung. **C** Cluster nach Threshold-Funktion, weiß ist dabei die Threshold-Fläche. **D** Grobumrandung der zu messenden Fläche. Skalierung = 50 μm .

3.6 Wallersche Degeneration *in vitro*

3.6.1 Präparation

Für die Untersuchung des Einflusses von CL auf die Wallersche Degeneration wurde der *Nervus ischiadicus* als *in vitro*-Modell genutzt. Dieser Nerv stammt aus dem *Plexus lumbosacralis* und besitzt sowohl motorische als auch sensible Faseranteile der hinteren Extremität der Ratten. Durch seine leicht erreichbare Lage eignet er sich besonders zur einfachen und möglichst atraumatischen Präparation.

Zur Entnahme des Nervs wurden Wistar-Ratten gemischten Geschlechts im Alter von ca. 10 Wochen verwendet. Alle Tiere wurden vor der Präparation mittels Isofluran tief narkotisiert und dekapitiert. Danach wurden die Tiere in 70 % Ethanol desinfiziert und das lumbo-dorsale Fell entfernt. Nach einem ca. 1 cm langen Längsschnitt über der proximalen hinteren Extremität wurde der bindegewebige Raum, in dem der *Nervus ischiadicus* zusammen mit Begleitgefäßen verläuft, eröffnet und stumpf geweitet. Der Nerv wurde nun in seinem Verlauf dargestellt, weit distal aber noch vor der Bifurkatio durchtrennt, nach proximal mobilisiert und kurz nach dem Austritt aus dem Plexus lumbosacralis abgesetzt. Nun wurde der Nerv nach Waschen in PBS in drei gleichgroße Teile aufgeteilt und in drei verschiedenen 35 mm Petrischalen in SZ-Normmedium (siehe Tab. 3.2-2) inkubiert. Zu einer Hälfte der kultivierten Nervensegmente wurde CL (0,5 mg/ml oder 2,5 mg/ml) hinzugegeben, die andere Hälfte wurde unbehandelt als Kontrollgruppe weitergeführt. Das Medium wurde an DIV 3 vollständig gewechselt und die entsprechenden Konzentrationen CL wieder hinzugegeben. Jeweils an DIV 3, 5 und 7 wurden Proben mit 4 % PFA über Nacht fixiert und anschließend die Acetylcholin-Esterase nach Karnovsky angefärbt.

3.6.2 Acetylcholin-Esterase (AChE) Färbung nach Karnovsky

Acetylcholin ist einer der wichtigsten Neurotransmitter in vielen Lebewesen. Es vermittelt die direkte Reizübertragung an der motorischen Endplatte. Acetylcholin-Esterase (AChE) ist ein Enzym, welches Acetylcholin in seine Hauptkomponenten Acetat und Cholin spaltet. Damit terminiert es die Wirkung Acetylcholins im synaptischen Spalt und die Erregung des nachgeschalteten Muskels.

Mit Hilfe der AChE-Färbung nach Karnovsky kann man die motorischen Fasern eines gemischten Nervs darstellen. Dazu wurden die fixierten Nerven über Nacht in 30 % Saccharose gegeben und am nächsten Tag mit einem Kryomikrotom 20 µm dicke Längsschnitte erstellt. Zur Färbung der AChE wurden die Schnitte in Karnovsky-Medium (siehe Tab. 3.2-1) 24 h lang inkubiert. Danach wurden die Schnitte zweimal in PBS gewaschen und mit DePeX auf Objektträger aufgebracht.

3.6.3 Analyse mittels ImageJ

Für jeden Nerv wurden 10 verschiedene Schnittflächen mit einem Auflichtmikroskop unter 10-facher Vergrößerung (DMI600B, siehe Tab. 11.3-1) aufgenommen.

Zur digitalen Analyse wurde jedes Bild in 32-bit Graustufen konvertiert (siehe Abb. 3.6-1 A und B) und mit der Threshold-Funktion von ImageJ wurde ein Grenzwert festgelegt, der die AChE-Färbung vom Hintergrund trennt. Dabei ist es notwendig gewesen, für jede Schnittfläche einen individuellen Grenzwert festzulegen (siehe Abb. 3.6-1 C), um eine optimale Differenzierung zwischen Hintergrundfärbung und AChE-Färbung zu erreichen. Dieses Vorgehen diente dazu, maximale Messsicherheit zu gewährleisten.

Der Nervenschnitt wurde anschließend mit der Polygonselektion umrandet (siehe Abb. 3.6-1 B). Der Quotient der AChE-gefärbten Fläche zur umrandeten Gesamtfläche des Nervs wurde durch ImageJ [73] ermittelt. Dies entsprach dem relativen Anteil der AChE-gefärbten Fläche zur Gesamtfläche des Nervs.

Um eine exakte Verrechnung der einzelnen analysierten Nervenschnitte jedes Nervs zu erreichen, mussten aus diesen Daten rückwirkend die AChE-gefärbten Flächen berechnet werden. Zur Datenaufarbeitung wurden danach die Gesamtflächen und die errechneten AChE-gefärbten Flächen der 10 Schnittflächen summiert. Anschließend wurde der Quotient aus summierter AChE-gefärbter Fläche zu summierter Gesamtfläche gebildet.

Zur statistischen Analyse wurde jeweils der Quotient der summierten Flächen betrachtet. Dabei wurde das Experiment in 7 voneinander unabhängigen Ansätzen durchgeführt.

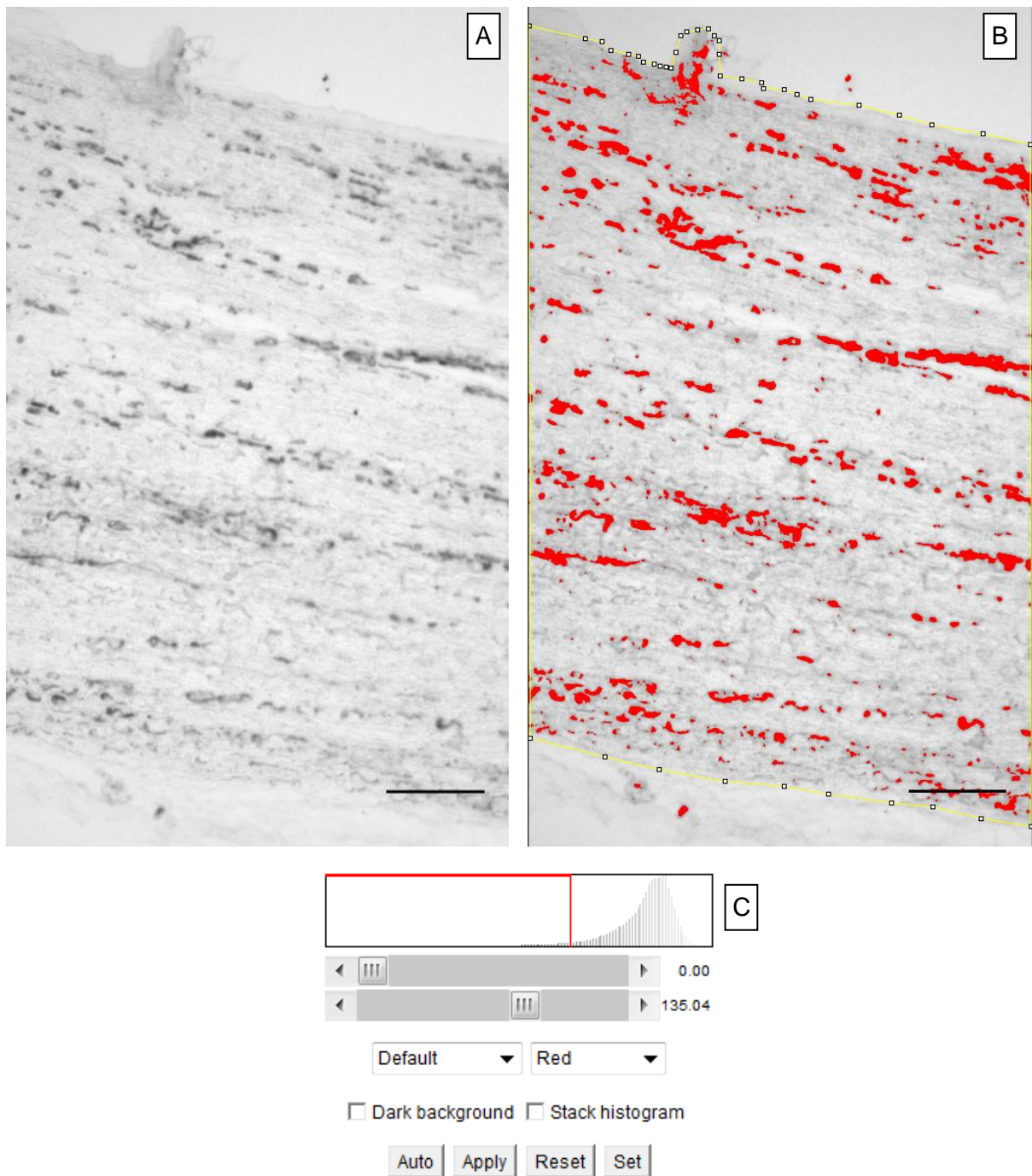


Abb. 3.6-1 Digitale Analyse der AChE-gefärbten Fläche mit ImageJ

A repräsentativer Nervenschnitt. **B** Nervenschnitt nach Konvertierung in 32-bit Graustufen, Anwendung der Threshold-Funktion und Polygonselektion des Nervenschnitts; die roten Flächen entsprechen dabei den Arealen, die durch die Threshold-Funktion als AChE-Färbung erkannt wurden. **C** Threshold-Funktion von ImageJ; linke und rechte Grenze zur Grauwertanalyse werden individuell für jeden Nerv gesetzt, um maximale Messsicherheit zu gewährleisten. Skalierung = 100 µm.

3.7 Zelllinie NSC34

3.7.1 Zellkultur

Die Zellen der Zelllinie NSC34 wurden für jedes Experiment aus einem eigenen Aliquot mindestens 7-10 Tage vorkultiviert, bevor sie für die eigentlichen Experimente benutzt wurden. Die Zellen wurden dazu aus -80 °C schnell erwärmt, das Kryomedium (siehe Tab. 3.2-3) 1:1 mit NSC34-Normmedium verdünnt und bei 360 g für 10 min abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgegossen, die Zellen in 30 ml NSC34-Normmedium resuspendiert und auf zwei Anzuchtflaschen (75 cm²) aufgeteilt. Die Zellen wurden während der Anzucht nach jeweils 3-5 Tagen insgesamt zweimal gesplittet. Dazu wurde das Medium vollständig entfernt und 5 ml frisches NSC34-Normmedium hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Untergrund gelöst, auf zwei Anzuchtflaschen aufgeteilt und die Volumina mit NSC34-Normmedium auf jeweils 15 ml ergänzt.

Nach der Anzucht wurden die Medien vollständig aus den Flaschen entfernt, jeweils 5 ml NSC34-Normmedium hinzugegeben, die Zellen mit Zellschabern vom Untergrund gelöst und in einem Zentrifugenröhrchen (50 ml, Falcon) gesammelt. Anschließend wurde die Zellkonzentration mit einer Neubauer Zählkammer ermittelt und die Zellen in einer experimentspezifischen Konzentration in die jeweiligen Kulturbedingungen gegeben.

3.7.2 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung expandierter Zellproben wurde das Zellmedium vollständig aus den Anzuchtflaschen entfernt, die Zellen mittels Zellschaber gelöst und in 100 % FKS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Zentrifugenröhrchen (50 ml, Falcon) gesammelt und 1:1 mit Kryomedium verdünnt. Die entstandene Suspension wurde nun gut vermischt, in Kryoröhrchen bei -80 °C eingefroren und bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt (s.o.).

3.7.3 MTT-Test

In Analogie zu dem MTT-Versuch an SZ-Fibrozyten-Kokulturen wurden für die Zelllinie NSC34 ebenfalls MTT-Tests durchgeführt. Die Zellkulturen wurden in einer Zelldichte von 10.000 Zellen je Vertiefung in 96-well Platten ausgestreut. An DIV 1 wurde ein kompletter Mediumwechsel durchgeführt und entweder NSC34-Normmedium oder OGD-Stressmedium hinzugefügt (siehe Tab. 3.2-3). Für die Kultivation unter OGD-Bedingungen wurden die Zellen einer anaeroben Atmosphäre von 5 % CO₂ und 95 % N₂ ausgesetzt. CL wurde jeweils in den Konzentrationen 0,5 mg/ml, 2,5 mg/ml und 5,0 mg/ml verwendet und entweder 24 h

vor und zum Mediumwechsel (Pre-CL), nur zum Mediumwechsel (Para-CL) oder 8 h nach dem Mediumwechsel (Post-CL) hinzugegeben. Die MTT-Tests wurden jeweils 24 h und 48 h nach Mediumwechsel durchgeführt. Das Behandlungsschema für die MTT-Tests ist in Tab. 3.7-1 zusammengefasst.

Der experimentelle Ablauf des MTT-Tests glich hierbei weitestgehend dem für SZ-Fibrozyten-Kokulturen (vgl. Abschnitt 3.5.3). Abweichend wurden pro Gruppe 12 Wiederholungen je Ansatz analysiert und deren Mittelwerte analog zu den Experimenten der SZ-Fibrozyten-Kokulturen zur statistischen Analyse verwendet. Die Experimente wurden in 3 unabhängigen Ansätzen durchgeführt.

Tab. 3.7-1 Behandlungsschema für den MTT-Test bei NSC34-Zellen

DIV	NSC34-Normmedium				OGD-Medium			
	Kontrolle	Pre-CL	Para-CL	Post-CL	Kontrolle	Pre-CL	Para-CL	Post-CL
0	Ausstreuen der NSC34-Zellen in einer Konzentration von 10.000 Zellen/Vertiefung in 96-well Platten							
	-	+	-	-	-	+	-	-
1	Entfernen des kompletten Kulturmediums und Zugabe von: NSC34-Normmedium und Weiterkultivation unter Normbedingungen				OGD-Medium und Weiterkultivation unter OGD-Bedingungen			
	-	+	+	-	-	+	+	-
1 + 8 h	-	-	-	+	-	-	-	+
1 + 24/48 h	MTT-Test							

+ CL-Zugabe; - keine CL-Zugabe.

CL wurde jeweils in Konzentrationen von 0,5, 2,5 und 5,0 mg/ml hinzugegeben.

3.7.4 Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellteilungsrate

Die Bestimmung der Zellteilungsrate wurde für NSC34-Zellen ebenfalls mittels BrdU-Einbau durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.5.4). Im Gegensatz zur Methode für SZ wurde hier jedoch der APC-BrdU-Kit (BD Bioscience, Deutschland) für Durchflusszytometer verwendet. Dafür wurden jeweils 200.000 Zellen in Anzuchtflaschen (25 cm²) ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Kultiviert wurden die Zellen analog zu den Bedingungen für MTT-Tests in den Para-CL Gruppen (siehe Tab. 3.7-1). Es kam nur die hohe CL-Konzentration von 5,0 mg/ml zur Anwendung, da sich diese Konzentration im Bereich der MTT-Tests als die wirkungsstärkste darstellte (vgl. Abschnitt 4.3.1). Die Analyse

der Zellproliferation wurde jeweils 24 h und 48 h nach Stressinduktion bzw. CL-Zugabe und entsprechend des mitgelieferten Protokolls durchgeführt.

Zur Zellmarkierung wurden den Proben 10 µl BrdU (1 mM) je 1 ml Medium hinzugegeben und der Ansatz für 1 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium vollständig abgegossen, die Zellen mittels Zellschaber in 2 ml PBS vom Untergrund gelöst und in FACS-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde nun für 15 min bei 300 g zentrifugiert und der Überstand danach abgesaugt. Die Proben wurden in 100 µl Cytofix/Cytoperm (BrdU Kit) resuspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach diesem und jedem weiteren Schritt wurden die Proben durch Zugabe von 1 ml Perm/Wash Puffer (BD), anschließendem Zentrifugieren für 10 min bei 300 g und Absaugen des Überstands gewaschen. Nach dem ersten Waschschrift wurden die Zellen in 100 µl Cytoperm Permeabilization Puffer Plus (BD) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden nun erneut in 100 µl Cytofix/Cytoperm Puffer für 5 min bei Raumtemperatur refixiert. Anschließend wurden 100 µl DNase (300 µg/ml, BD) zu jeder Probe hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert, um dem Antikörper APC-anti-BrdU Zugang zum eingebauten BrdU zu ermöglichen. Durch Zugabe von je 50 µl APC-anti-BrdU (1:50, BD) zu jeder Probe und anschließender Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde das eingebaute BrdU fluoreszenzmarkiert. Nach einem abschließenden Waschschrift wurden die Zellen in 200 µl FACS-Puffer (siehe Tab. 3.2-1) resuspendiert und mit einem Durchflusszytometer FACSCanto II (BD, Deutschland) analysiert. Dabei wurden Größe, Granularität und Fluoreszenzintensität der APC-anti-BrdU-Färbung im APC-Kanal für mindestens 10.000 Zellen pro Probe gemessen. Das Experiment wurde insgesamt in 9 unabhängigen Ansätzen durchgeführt.

3.7.5 Auswachsen von Zellfortsätzen

Für die Motoneuron-ähnlichen Zellen der Zelllinie NSC34 wurde die Fähigkeit der Neuritenausbildung und der CL-Einfluss darauf untersucht. Dazu wurden die Anzahl der Neuriten pro Zelle und deren jeweilige Länge bestimmt [52]. Da das Auswachsen von Neuriten bei den NSC34-Zellen Ausdruck eines Differenzierungsprozesses ist, kann dieser Prozess durch die Applikation von einem speziellen Differenzierungsmedium (Diff.-Medium, siehe Tab. 3.2-3) unterstützt werden [40].

Experimentell wurden NSC34-Zellen in einer Zelldichte von 150.000 Zellen in Zuchtflaschen (75 cm²) in Normmedium angezüchtet. Nach einer Fotodokumentation wurde an DIV 1 das Medium vollständig entfernt und die Proben aufgeteilt in Inkubation mit: (i) Normmedium ohne CL, (ii) Normmedium mit CL 0,5 mg/ml, (iii) Diff.-Medium ohne CL und (iv) Diff.-Medium mit CL 0,5 mg/ml (siehe Tab. 3.2-3). CL wurde jeden Tag in einer Konzentration von

0,5 mg/ml frisch hinzugegeben. Zur Datengewinnung wurde jeden Tag eine Fotodokumentation mit einem inversen Phasenkontrastmikroskop DMI 3000 (20-fache Vergrößerung) an festgelegten Stellen in den Kulturen vorgenommen. Nach der Fotodokumentation an DIV 5 und 8 wurden vollständige Mediumwechsel durchgeführt und in die entsprechenden Proben 0,5 mg/ml CL hinzugegeben. Insgesamt wurden pro Gruppe die Neuritenanzahlen von 450 Zellen mit Hilfe von ImageJ [73] quantifiziert und deren Neuriten mit dem Werkzeug „segmentierte Linie“ manuell ausgemessen [52].

Tab. 3.7-2 Behandlungsschema Zelldifferenzierung

DIV	Normmedium		Diff.-Medium	
	Kontrolle	CL täglich 0,5	Kontrolle	CL täglich 0,5
0	Zellen in NSC34-Normmedium ausstreuen, Zelldichte = 150.000 Zellen je Anzuchtflasche (75 cm ²)			
1	Medium vollständig entfernen zum Beseitigen des Zelldetritus und Zugabe von NSC34-Normmedium		Diff.-Medium	
	-	+	-	+
	digitale Fotodokumentation des Ausgangszustandes			
2	-	+	-	+
3	-	+	-	+
4	-	+	-	+
5	digitale Fotodokumentation			
	Mediumwechsel			
	NSC34-Normmedium		Diff.-Medium	
	-	+	-	+
6	-	+	-	+
7	-	+	-	+
8	digitale Fotodokumentation			
	Mediumwechsel			
	NSC34-Normmedium		Diff.-Medium	
	-	+	-	+
9	-	+	-	+
10	Abschließende Fotodokumentation und Beendigung des Experiments			

Wenn nicht anders deklariert, wurde die digitale Dokumentation des Experiments ab DIV 1 täglich nach der CL-Zugabe der entsprechenden Proben durchgeführt. CL jeweils in mg/ml. + CL-Zugabe; - keine CL-Zugabe.

3.8 Proteinbiochemische Untersuchungen

Um die Wirkungen von CL auf Proteinebene zu untersuchen, wurden Western Blots durchgeführt.

Beim Western Blot werden präparierte Zellproteine mit Hilfe einer Gelelektrophorese nach dem Molekülradius aufgetrennt. In einem weiteren Schritt werden die aufgetrennten Proteine mit Hilfe einer zweiten Elektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Die Richtung der zweiten Elektrophorese steht dabei senkrecht zur Richtung der Proteinauftrennung. Im weiteren Verlauf werden die Proteine mit Hilfe proteinspezifischer Bindung eines primären Antikörpers markiert. Dieser wird mit einem sekundären Peroxidasegekoppelten Antikörper spezifisch gebunden und der entstandene Komplex mit einer anschließenden Elektrochemilumineszenz-Reaktion auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht.

3.8.1 Probenmaterial

Zur proteinbiochemischen Bestimmung wurden NSC34-Zellen nach dem Schema aus Tab. 3.8-1, welches von den Zelldifferenzierungsexperimenten abgeleitet wurde, angezüchtet. Es wurden dafür Proben unter NSC34-Normmedium, OGD-Medium und Diff.-Medium akquiriert. Für die Kultivierung unter OGD-Bedingungen wurden die Zellen analog den Bedingungen der MTT-Tests einer anaeroben Atmosphäre ausgesetzt. CL wurde entweder täglich in einer Konzentration von 0,5 mg/ml oder einmalig nach DIV 4 in einer Konzentration von 5,0 mg/ml hinzugegeben.

An DIV 4 wurde erneut gruppenspezifisch CL hinzugegeben und der Mediumwechsel für die OGD-Gruppen durchgeführt, die Proben dann 6 h im Brutschrank inkubiert und anschließend gesammelt. Dazu wurden die Zellen einer Anzuchtflasche (75 cm²) für jede Kulturbedingung verwendet. Das Medium jeder Flasche wurde vollständig entfernt, jeweils 1 ml PBS hinzugegeben, die Zellen mit einem Zellschaber vom Untergrund gelöst und die Zellsuspension in einem Reaktionsgefäß (2 ml, Eppendorf) gesammelt. Die Proben wurden nun für 10 min bei 300 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zu den Zellpellets wurden jeweils 200 µl Homogenisierungspuffer zugegeben und jede Probe mit einem Homogenisator mit 10 Hüben homogenisiert. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet verworfen. Die Homogenate wurden bei -20 °C bis zur Proteinbestimmung gelagert.

Tab. 3.8-1 Behandlungsschema Western Blots

DIV	DMEM			OGD			Diff.-Medium		
	Kontrolle	CL 0,5	CL 5,0	Kontrolle	CL 0,5	CL 5,0	Kontrolle	CL 0,5	CL 5,0
0	Zellen ausstreuen								
1	Medium vollständig entfernen zum Beseitigen des Zelldetritus und Zugabe von NSC-Normmedium						Diff.-Medium		
	-	+	-	-	+	-	-	+	-
2	-	+	-	-	+	-	-	+	-
3	-	+	-	-	+	-	-	+	-
4	-	-	-	Mediumwechsel auf OGD-Medium und Weiterkultivation unter OGD-Bedingungen			-	-	-
	-	+	+	-	+	+	-	+	+
4 +6h	Proben sammeln								

CL jeweils in mg/ml; + CL-Zugabe; - keine CL-Zugabe.

3.8.2 Proteinpräparation

Die Proteinmengenbestimmung der Homogenate wurde mit einem Pierce® BCA-Protein-Assay in 96-well Platten in Doppelbestimmung durchgeführt. Dazu wurden die Proben gegen eine Proteineichreihe mit Konzentrationen von 1,2 µg/µl, 1,0 µg/µl, 0,8 µg/µl, 0,6 µg/µl, 0,4 µg/µl, 0,2 µg/µl, 0,1 µg/µl und einem Leerwert, bestehend aus Homogenisierungspuffer, abgeglichen. Für die Eichreihe wurde das mitgelieferte BSA als Proteinstandard verwendet. Je Vertiefung wurden 25 µl Proteinstandard oder 25 µl der 1:10 verdünnten Probe und 200 µl Reaktionsgemisch eingebracht. Das Reaktionsgemisch bestand aus einer 1:1 Mischung aus Reagenz A und B des BCA-Assay. Die entstehenden Suspensionen wurden nun mit einem Plattenschüttler für 30 s bei 450 rpm vermischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Platten 2 min auf Raumtemperatur abgekühlt und erneut auf einem Plattenschüttler bei 450 rpm vermischt. Nun wurden die Extinktionen mit Hilfe eines Tecan „Infinite M200“-Readers photometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Aus den Extinktionen der Eichreihe wurde mittels linearer Regression eine Ausgleichsgerade ermittelt. Anhand dieser Ausgleichsgeraden wurden die Proteinmengen der Proben rechnerisch bestimmt und die Mittelwerte aus deren Doppelbestimmung gebildet.

Zum Standardisieren der Proteinkonzentration auf 1 µg/µl wurden die berechneten Mengen Protein mit 50 µl Roti-Load®-4x-Puffer vermischt und die Volumina mit Homogenisierungspuffer auf 200 µl ergänzt. Anschließend wurden diese standardisierten Proteinhomogenate für 10 min in einem Thermomixer bei 95 °C und 1000 rpm inkubiert. Danach wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung in der Gelelektrophorese bei -20 °C gelagert.

3.8.3 Gelelektrophorese und Western Blot

Zur Proteinauftrennung wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Die verwendeten Gele waren Pierce® Polyacrylamidgel Precise™ Protein Gele (Gradient 4 - 20 %) für die Calpain-I-Versuche und SERVAGel™ TG PRiME™ 4-12 % Gradientengele für die αII-Spectrin-Versuche. Durch die Verwendung dieser Gradientengele ließen sich größere Proteinmassenbereiche darstellen.

Bevor die Proben aufgetragen werden konnten, wurde das entsprechende Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt und mit dem zugehörigen Laufpuffer geflutet. Nun wurden die Geltaschen mehrfach mit Laufpuffer gespült und anschließend je Tasche 10 µl Probenmaterial (1,0 µg/µl) eingebracht. Die Elektrophorese wurde für die Pierce® Gele 15 min bei 100 mA je Gel begonnen und danach für 30 min bei 50 mA je Gel fortgeführt. Für die Gele von Serva wurde die Elektrophorese für 40 min bei 50 mA je Gel durchgeführt. Das Gel wurde danach aus der Elektrophoresekammer entfernt, auf eine Nitrozellulosemembran aufgebracht, im Sandwich-Verfahren von Schaumstoff und Filterpapier umschichtet und in die Blotkammer eingebracht. Anschließend wurde die Blotkammer mit Transferpuffer aufgefüllt. Die Kathode der Stromversorgung wurde nun auf der Seite des Gels, die Anode auf der Seite der Nitrozellulosemembran angebracht und der Western Blot für 90 min bei 200 mA durchgeführt. Danach wurde die Nitrozellulosemembran in destilliertem Wasser gespült, in Ponceau-Rot-Färbelösung für 10 min gefärbt, anschließend mit destilliertem Wasser gespült und die Nitrozellulosemembranen auf Filterpapier getrocknet (siehe Abb. 3.8-1). Die Membranen wurden nun bis zur weiteren Verwendung in Filterpapier verpackt bei Raumtemperatur gelagert.

Zur weiteren Aufarbeitung und immunhistochemischen Anfärbung der Proteine wurden die getrockneten Nitrozellulosemembranen zweimal mit destilliertem Wasser gespült, um die Ponceau-Rot-Färbung auszuwaschen und anschließend für 10 min in TBST gespült. Um unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden, wurden die Membranen nun für 1 h in Milchpulverlösung (5 %) geblockt. Anschließend wurden die Nitrozellulosemembranen in TBST gespült und in 5 ml Primär-Antikörperlösung in einem Zentrifugenröhrchen (50 ml, Falcon) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als Primär-Antikörper kamen anti-µ-Calpain (1:750),

anti-Spectrin alpha chain (1:1000) und anti-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH; 1:500) zum Einsatz (siehe Tab. 11.1-2).

Am nächsten Tag wurden die Nitrozellulosemembranen dreimal für 10 min in TBST gespült, der sekundäre Antikörper anti-mouse Peroxidase (POD; 1:5000) (siehe Tab. 11.1-2) hinzugefügt, für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal mit TBST für 10 min gespült. Nun wurden die beiden Komponenten des Elektrochemilumineszenz (ECL)-Kits 1:1 vermischt und die Nitrozellulosemembranen darin für 1 min inkubiert. Abschließend wurden die Membranen in einem Fotolabor unter Rotlicht auf Röntgenfilme gelegt und diese unter Lichtabschluss für maximal 5 min belichtet. Danach wurden die Röntgenfilme mit einer Entwicklermaschine Kodak Curix 60 entwickelt.

Die entstandenen Proteinbanden wurden semiquantitativ mit Hilfe von GeneTools (Synoptics Ltd., Cambridge, UK) einer digitalen Grauwertanalyse unterzogen. Zur Standardisierung wurden die Messwerte aller Proteinbanden relativ auf die gemessenen Werte der GAPDH-Banden bezogen.

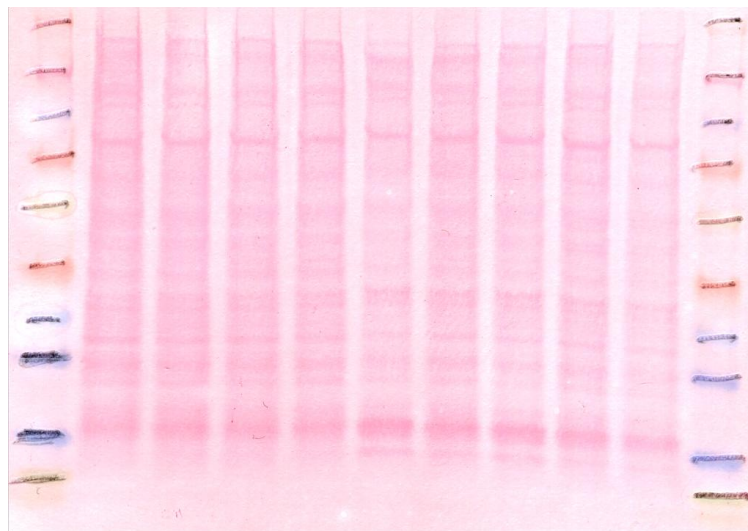


Abb. 3.8-1 Ponceau-Rot gefärbte Nitrozellulosemembran

Repräsentative Ponceau-Rot Färbung einer Nitrozellulosemembran.

Von links nach rechts: Markerbande, Normmedium-Kontrollgruppe, Normmedium CL 0,5 mg/ml, Normmedium CL 5,0 mg/ml, OGD-Medium-Kontrollgruppe, OGD-Medium CL 0,5 mg/ml, OGD-Medium CL 5,0 mg/ml, Diff.-Medium-Kontrollgruppe, Diff.-Medium CL 0,5 mg/ml, Diff.-Medium CL 5,0 mg/ml und Markerbande.

3.9 Immunzytochemische Visualisierung

Parallel zu den proteinbiochemischen Untersuchungen wurde für Calpain-I eine immunzytochemische Anfärbung durchgeführt. Dazu wurden je 60.000 NSC34-Zellen auf Deckgläschen (25 mm) in 35 mm Petrischalen angezüchtet. Das Behandlungsschema für diese Untersuchungen glich dem Schema für die proteinbiochemischen Untersuchungen (siehe Tab. 3.8-1). Am DIV 4 wurden die Kulturen in 4 % PFA über Nacht bei 4 °C fixiert. Am nächsten Tag wurden die Proben dreimal mit PBS für 10 min gespült, 30 min mit FKS blockiert und mit den primären Antikörpern anti- μ -Calpain (1:100) und anti-beta III-tubulin (1:1000) über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem PBS-Spülen wurden die sekundären Antikörper anti-rabbit-Alexa 540 (1:500) und anti-mouse-Alexa 488 (1:500) für 3 h dazugegeben. Nach weiteren drei PBS-Spülschritten wurden die Proben, wie unter Abschnitt 3.5.4 beschrieben, mit Immu-Mount auf Objektträger aufgebracht. Zur semiquantitativen Analyse wurden anschließend 3 Gesichtsfelder pro Präparat mit einem Fluoreszenzmikroskop AxioImager.M1 unter 20-facher Vergrößerung digitalisiert. Die Einstellungen des Mikroskops und Expositionszeiten der Fluoreszenzanregung wurden pro Kanal auf Grundlage der Kontrollpräparate gewählt und alle Präparate mit den gleichen Einstellungen bearbeitet. Die Färbeintensität von Calpain-I wurde mit der „Auto Measure“-Funktion ermittelt, welche in der „AxioVision Rel. 4.8. Imaging Software“ enthalten ist. Für jede Behandlungsgruppe wurden 3 Präparate analysiert. Die Experimente wurden jeweils in zweifacher Ausführung durchgeführt.

3.10 Statistische Datenauswertung

Bei allen Daten wurden t-Tests bei zwei unterschiedlichen Gruppen oder ANOVA-Varianzanalyse gefolgt von Bonferroni-Post-hoc-Tests bei mehr als zwei Gruppen berechnet. Zum Generieren qualitativer Hypothesen wurde für die Pilotstudie mit Hilfe der MTT-Tests für die Zelllinie NSC34 zur Konzentrationsfindung eine Alphareduktion vernachlässigt und t-Tests der einzelnen CL-Behandlungsgruppen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe durchgeführt.

Zur Analyse wurde GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., USA) Version 4 genutzt.

3.11 Verwendete Software

Tab. 3.11-1 Verwendete Software

Beschreibung	Programm und Hersteller
Mikroskopsoftware	Leica LAS AF 2.6.0.7266, Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim AxioVision Rel. 4.8, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Bildverarbeitung	GIMP 2.8.10 (http://www.gimp.org/)
	ImageJ [73]
Statistische Analyse	GraphPad Prism 4, Graphpad Software Inc, USA
Textverarbeitung	Microsoft Word 2007, Microsoft Corporation, Redmond, USA
Tabellenkalkulation	Microsoft Excel 2007, Microsoft Corporation, Redmond, USA
Grauwertanalyse	GeneTools, Synoptics Ltd., Cambridge, UK

4 Ergebnisse

4.1 SZ-Fibrozyten-Kokulturen

Die SZ-Fibrozyten-Kokulturen wurden mittels Zell-spezifischer immunhistochemischer Färbung evaluiert (SZ: Anti-S100, Fibrozyten: Anti-Fibronectin, Neurone: Anti-SMI 31). Dabei wurde ein mittlerer SZ-Gehalt von ca. 60 % und ein Fibrozyten-Gehalt von ca. 40 % ermittelt. Der Anteil an Neuronen war geringer als 1 %.

4.1.1 MTT-Test

Der MTT-Test wurde als Globaltest für Zellviabilität und Proliferation innerhalb der SZ-Fibrozyten-Kokulturen verwendet. Dieser Test basiert auf dem spezifischen Umsatz des MTT-Reagenz zu Formazan durch ausschließlich lebende Zellen.

Das mitochondrial umgesetzte Formazan wurde nachfolgend photometrisch bestimmt und korrelierte mit der Anzahl lebender Zellen in der Kultur [14, 62].

Die Extinktionen aller CL-behandelten sowie unter SGD-Stressbedingungen kultivierter Proben wurden auf die der unbehandelten Kontrollgruppe unter Normmedium bezogen, welche als 100 % angenommen wurde.

Unter Normmedium konnte CL, unabhängig von der Konzentration, keine signifikanten Veränderungen der Extinktionen im Vergleich zur Kontrollgruppe erwirken.

Unter SGD war eine Reduktion der Extinktionen im Vergleich zur Normmedium-Kontrollgruppe sowohl 24 h als auch 48 h nach Stressinduktion zu verzeichnen, was auf eine geringere Zellzahl innerhalb der Kultur hinwies.

Wie schon unter Normmedium konnte CL die Extinktionen im Vergleich zur SGD-Kontrollgruppe nicht signifikant beeinflussen. Damit schien CL zumindest keinen toxischen Einfluss in den getesteten Konzentrationen und Applikationsregimen zu haben (siehe Abb. 4.1-1).

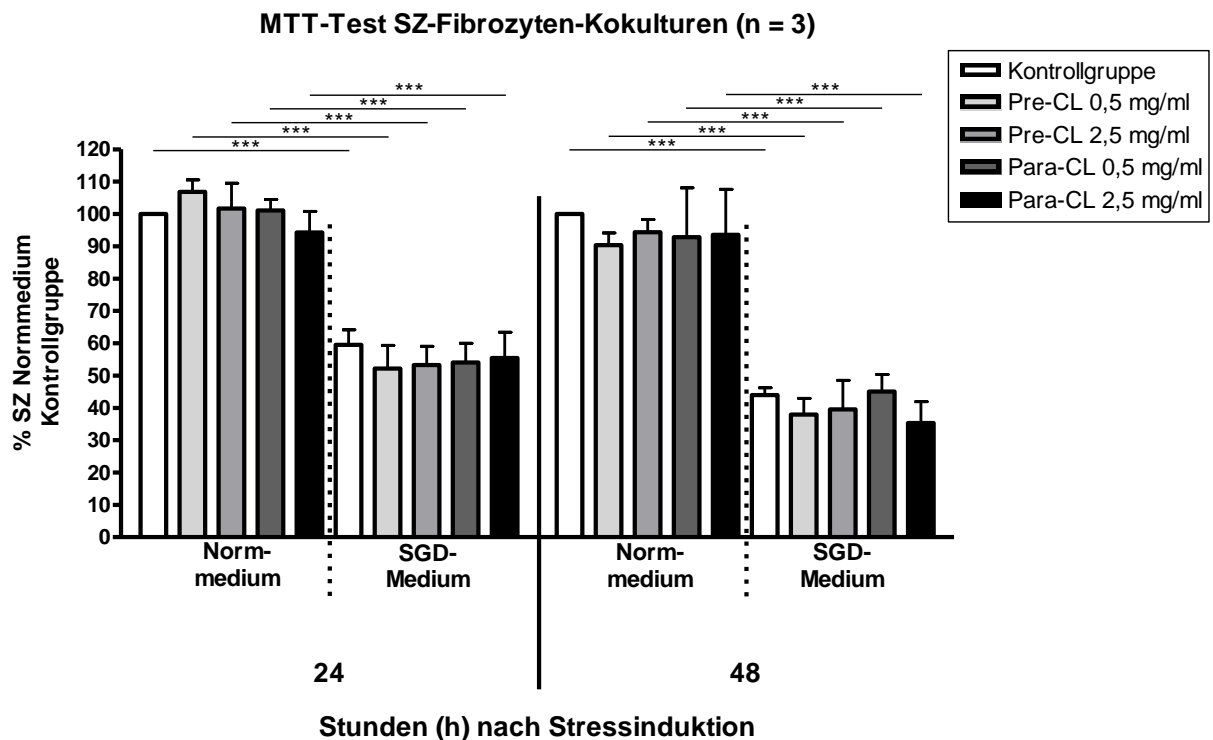


Abb. 4.1-1 MTT-Test SZ-Fibrozyten-Kokulturen

MTT-Ergebnisse auf die jeweilige Kontrollgruppe (als 100 % gesetzt) normiert (Mittelwert + SEM; n = 3). Zu beiden Zeitpunkten führte die SGD-Behandlung im Vergleich zu den Normmedium-Gruppen zu einem Abfall der Extinktionen. Für CL konnte weder unter Normmedium noch unter SGD ein signifikanter Einfluss auf den Formazanumsatz nachgewiesen werden.

Two-way ANOVA: $F_{CL\text{-Behandlung}} = 28,42$; $DF_n = 9$; $DF_d = 40$; $p < 0,0001$; Bonferroni Post-hoc Tests: statistisch signifikante Unterschiede: *** $p < 0,001$.

4.1.2 Zellproliferationsanalyse

SZ gehören zu den postmitotischen Zellen. Nach dem Kontaktverlust zum Axon bei einer peripheren Nervenläsion dedifferenzieren sie jedoch und erlangen so die Fähigkeit zur Proliferation wieder. Dieses Verhalten zeigten die SZ ebenfalls *in vitro*.

Die mittleren Proliferationsraten wurden durch BrdU-Färbung ermittelt (siehe Abb. 4.1-3 A-L) und betrugen für die unbehandelten Kontrollgruppen in Abhängigkeit von der Kultivationsdauer 30 % an DIV 2 und 40 % an DIV 6.

CL war in der Lage, die Proliferationsrate zu vermindern. Sowohl an DIV 2 als auch an DIV 6 war unter CL-Applikation eine signifikante Reduktion der Proliferation im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollgruppen zu verzeichnen (siehe Abb. 4.1-2 und Abb. 4.1-3). An DIV 2 verstärkte sich der Effekt mit steigender Konzentration (siehe Abb. 4.1-2). An DIV 6 war zwischen beiden Konzentrationen kein signifikanter Unterschied mehr nachweisbar (siehe Abb. 4.1-2).

Zusätzlich schien CL die Proliferation von Fibrozyten drastisch zu senken (siehe Abb. 4.1-3; nicht quantifiziert).

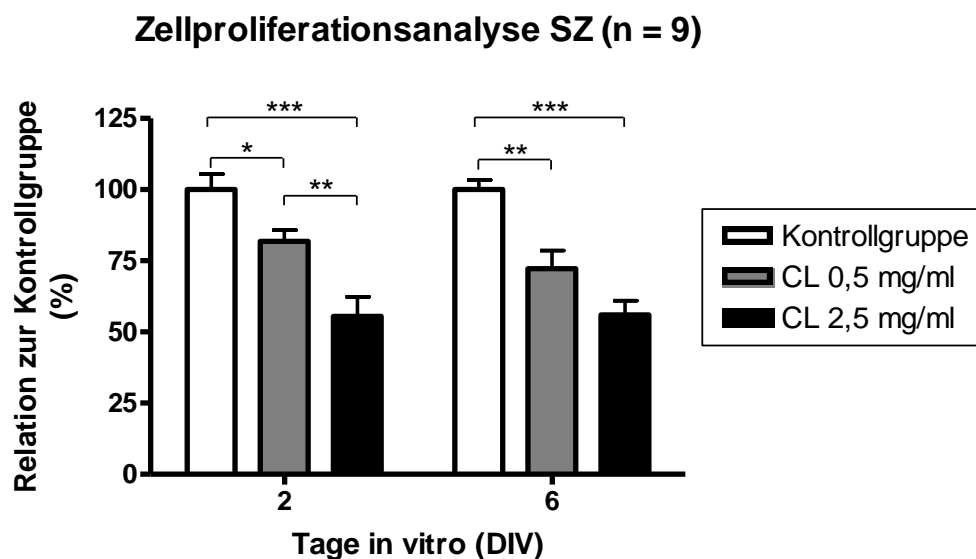


Abb. 4.1-2 Zellproliferationsanalyse

Darstellung der Relation BrdU-positiver SZ zur Anzahl gezählter SZ, normiert zur jeweiligen Kontrollgruppe (Mittelwert + SEM; n = 9). Die Auswertung BrdU-positiver SZ zeigte eine CL-induzierte Proliferationsinhibition an DIV 2 und 6. An DIV 2 konnte eine Konzentrationsabhängigkeit aufgezeigt werden. Höher dosiert (2,5 mg/ml vs. 0,5 mg/ml) reduzierte CL die Proliferation signifikant stärker. An DIV 6 war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar. Two-way ANOVA: $F_{\text{CL-Behandlung}} = 34,52$; $DF_n = 2$; $DF_d = 48$; $p < 0,0001$; Bonferroni Post-hoc Tests: statistisch signifikante Unterschiede: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

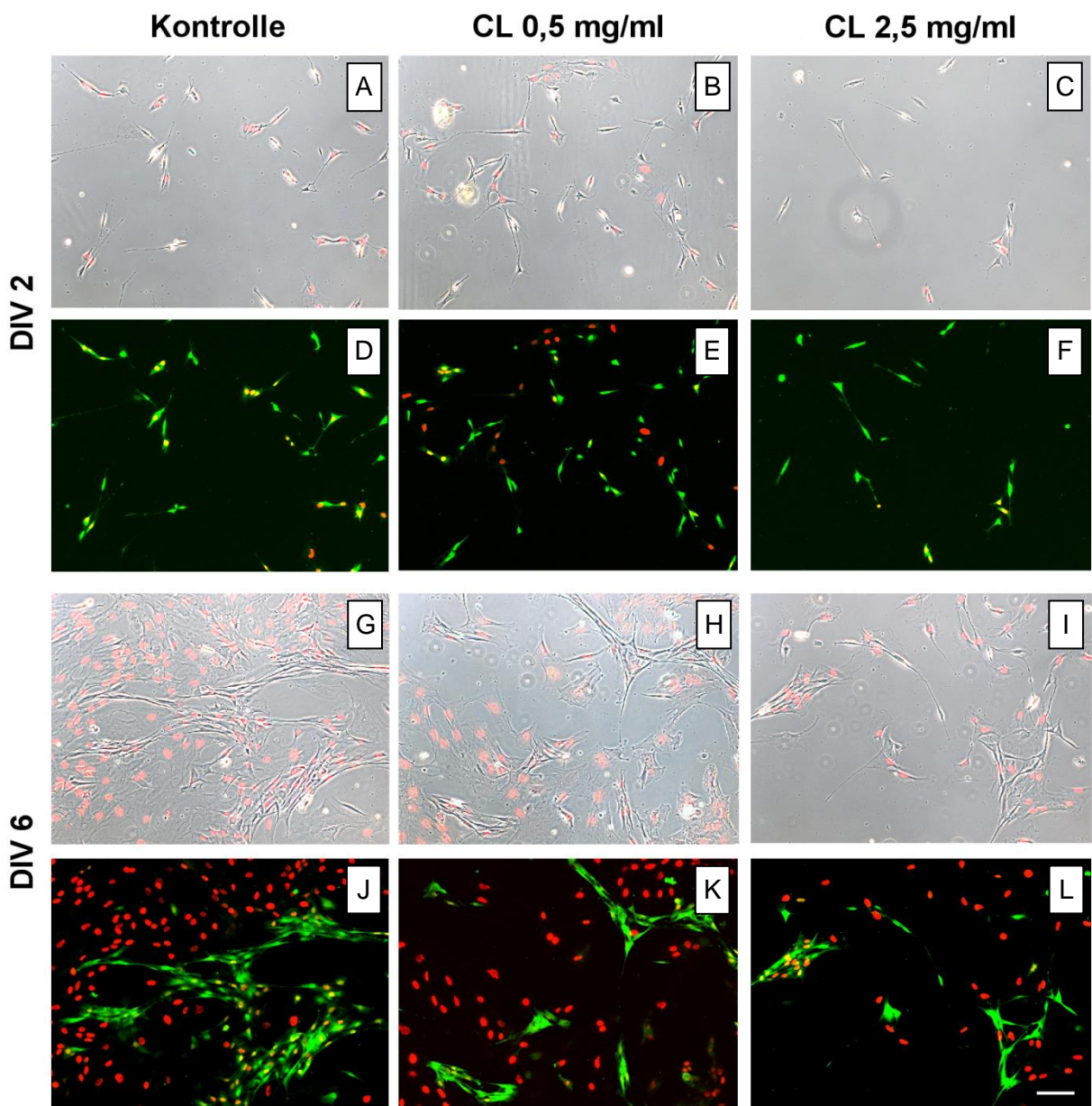


Abb. 4.1-3 Repräsentative Gesichtsfelder der BrdU-Zellproliferationsanalyse

(A-L) Repräsentative Gesichtsfelder mit BrdU-positiven Zellen (rote Nuklei). (A-C, G-I) Phasenkontrast Aufnahmen zur Darstellung der gesamten Kokultur, (D-F, J-L) Anti-S100 Kofärbung zur Identifizierung von SZ (grün). DIV 2 (A-F) und DIV 6 (G-L). (A, D, G, J) Kontrollgruppe. (B, E, H, K) CL 0,5 mg/ml. (C, F, I, L) CL 2,5 mg/ml. CL verminderte sowohl die Proliferation von SZ als auch von Fibrozyten (nicht quantifiziert). Skalierung = 100 μ m.

4.1.3 Zelladhäsion – SZ-Cluster

Das Bilden von Zellverbänden, sogenannte Cluster, durch SZ stellt eine Voraussetzung für die Regeneration nach peripheren Nervenläsionen dar. Die Zellverbände sind strukturelle Voraussetzung und Bestandteil der Büngnerschen Bänder. Diese Strukturen dienen im distalen Nervenstumpf dem einwachsenden Axon als Leitschiene. Somit sollte eine verbesserte Cluster-Bildung zu einer verbesserten Regeneration führen.

Während des Wachstums *in vitro* bildeten die SZ über dem Fibrozytenrasen Cluster, die in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer an Größe zunahmen. Der mechanische Stress während des Mediumwechsels an DIV 6 führte zu einer prägnanten Auflockerung der Clusterstrukturen. Innerhalb der folgenden 24 h wurden diese unter Normmedium partiell reorganisiert.

Zum Mediumwechsel (mechanische Stressinduktion) wurde nach vollständigem Entfernen des alten Mediums entweder frisches Normmedium (nur mechanischer Stress) oder SGD-Medium (zusätzlich SGD-Stress) hinzugegeben. CL wurde analog zum MTT-Test entweder 24 h vor Mediumwechsel und parallel zum Mediumwechsel (Pre-Stres) oder ausschließlich parallel zum Mediumwechsel (Para-CL) hinzugegeben. Für die computerbasierte Analyse der Clustergrößen wurden alle Gruppen auf die Normmedium-Kontrollgruppe bezogen, welche als 100 % angenommen wurde.

Unter Normmedium konnte CL den Reorganisationsprozess nach mechanischem Stress verbessern. Dabei wurden die größten Cluster in den Para-CL-Gruppen 24 h nach Stressinduktion und in den Pre-CL-Gruppen 48 h nach Stressinduktion gefunden (siehe Abb. 4.1-4 A vs. C, E vs. G, I; Abb. 4.1-4 K)

SGD behinderte den Reorganisationsprozess (siehe Abb. 4.1-4 A vs. B; Abb. 4.1-4 K). CL konnte dieser SGD-induzierten Cluster-Inhibition entgegenwirken. Allerdings waren die CL-Effekte erst nach 48 h und nur in der Pre-CL-Gruppe sichtbar. Dort konnte bei einer CL-Konzentration von 0,5 mg/ml kein signifikanter Unterschied der Clustergrößen im Vergleich zur Normmedium-Kontrollgruppe mehr nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.1-4 D vs. A, F, H, J; Abb. 4.1-4 K).

Zusammenfassend konnte man positive CL-Effekte auf das SZ-Clustern unter Norm- und SGD-Medium erkennen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass CL das Potenzial besitzen könnte, die Bildung Büngnerscher Bänder nach einer Nervenläsion zu befördern.

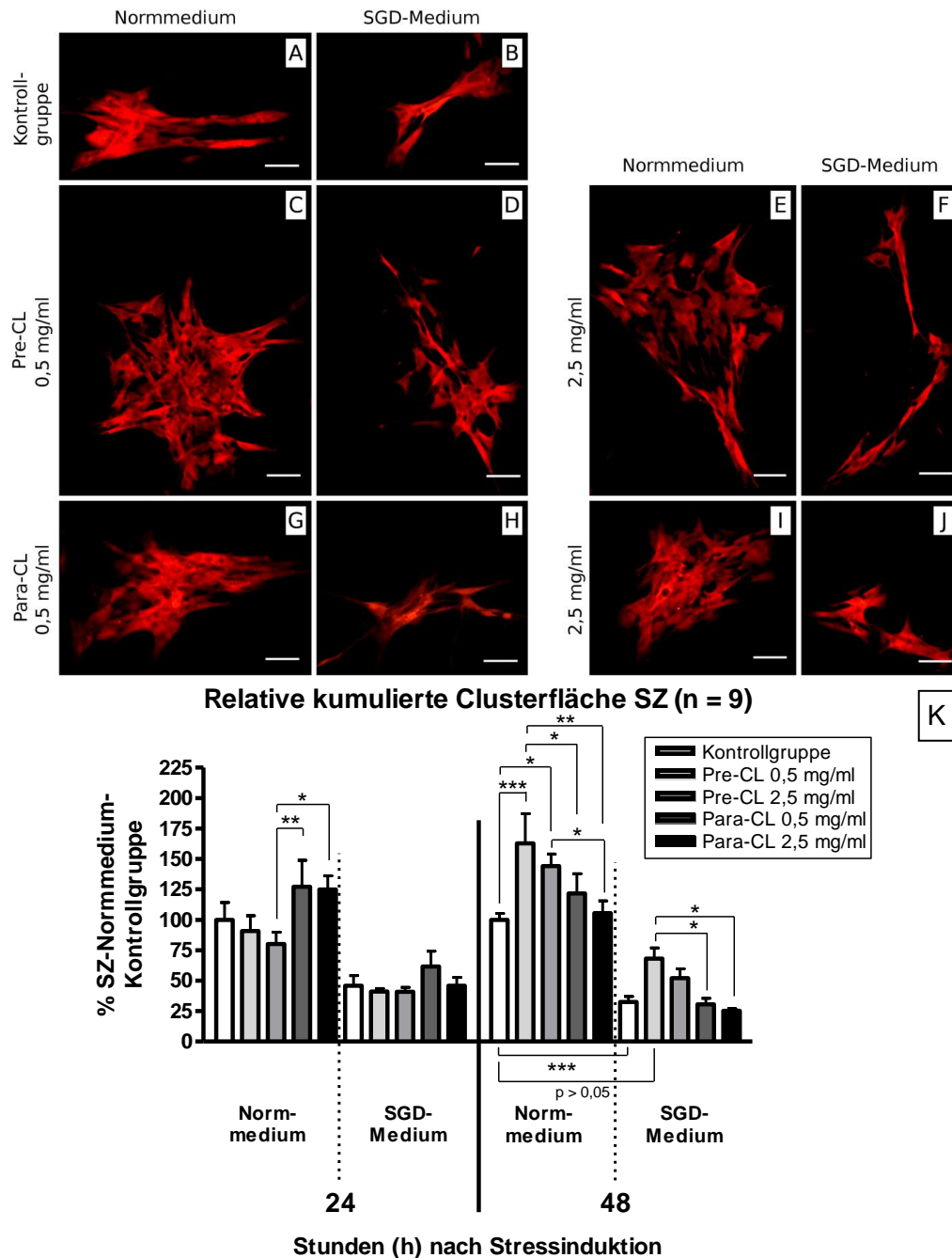


Abb. 4.1-4 SZ-Cluster auf Fibrozytengrund

(A-J) Repräsentative SZ-Cluster (S100 = rot) 48 h nach Stressinduktion. Skalierung = 50 μ m. (K) Unter Normmedium reorganisierten sich die aufgelockerten Cluster nach mechanischem Stress teilweise innerhalb von 24 h. CL verbesserte das Reorganisieren signifikant in Abhängigkeit von der Einwirkzeit. Die computerbasierte Analyse zeigte die größten Cluster 24 h nach Stressinduktion in den Para-CL-Gruppen, sowie nach 48 h in den Pre-CL-Gruppen. SGD inhibierte den Reorganisationsprozess signifikant. CL wirkte dieser Inhibition 48 h nach Stressinduktion entgegen. Im Gegensatz zur SGD-Kontrollgruppe konnte bei einer Pre-CL-Applikation (0,5 mg/ml) kein statistisch signifikanter Unterschied zur Normmedium-Kontrollgruppe mehr gezeigt werden. Two-way ANOVA: $F_{CL\text{-Behandlung}} = 22,72$; $DFn = 9$; $DFd = 160$; $p < 0,0001$; Bonferroni Post-hoc Tests: statistisch signifikante Unterschiede: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Mittelwert + SEM; $n = 9$.

Die Fähigkeit der SZ zur Bildung von Clustern beruht u.a. auf der Relokalisierung des neuronalen Cadherins (NCAD) zu den SZ-SZ-Kontaktstellen [70]. Da die stärksten CL-Effekte 48 h nach Stressinduktion und bei Pre-CL-Applikation (0,5 mg/ml) erzielt wurden, erfolgte die qualitative Untersuchung der NCAD-Färbung unter diesen Konditionen.

In der Normmedium-Kontrollgruppe war eine verstärkte NCAD-Anfärbung im Bereich der SZ-Membranen zu erkennen (siehe Abb. 4.1-5 A). Die Pre-CL-Applikation in der geringeren Konzentration (0,5 mg/ml) führte zu einer leichten Intensitätssteigerung im Bereich der SZ-Membranen (siehe Abb. 4.1-5 B).

SGD bewirkte eine Translokation des NCAD ins Zytoplasma (siehe Abb. 4.1-5 C). Die Pre-CL-Applikation wirkte dem entgegen; NCAD war wieder an den SZ-Membranen zu finden (siehe Abb. 4.1-5 D). Diese Ergebnisse gingen konform mit den größeren Clustern unter CL-Applikation.

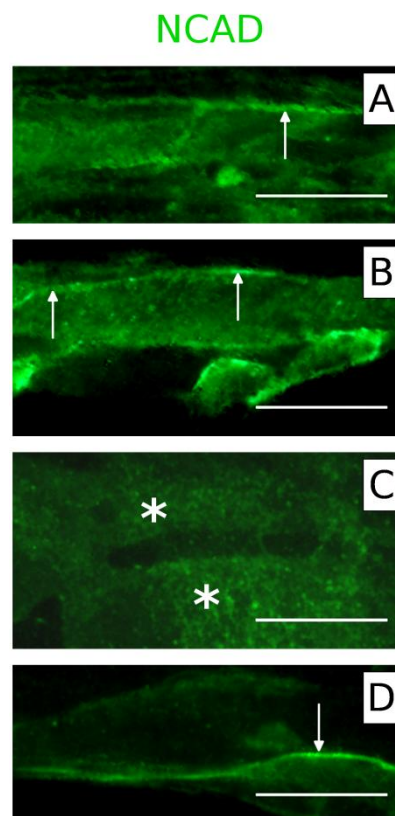


Abb. 4.1-5 Lokalisation des NCAD innerhalb der SZ

Repräsentative Verteilungsmuster von NCAD 48 h nach Stressinduktion, immunhistochemisch dargestellt. Unter Normmedium (mechanischer Stress) **(A)** war NCAD hauptsächlich im Bereich der SZ-Membranen lokalisiert (Pfeile). Pre-CL in der geringeren Konzentration **(B: 0,5 mg/ml)** führte zu einer Signalanhebung an den SZ-Membranen. SGD zusätzlich zum mechanischen Stress **(C)** bewirkte eine Translokation des NCAD ins Zytoplasma (Sterne). Pre-CL **(D: 0,5 mg/ml)** war in der Lage, NCAD zur SZ-Membran (Pfeile) zu relokieren. Skalierung = 10 µm.

4.2 Wallersche Degeneration *in vitro*

Die Wallersche Degeneration wurde an *N. ischiadicus*-Präparaten *ex vivo* mit Hilfe der AChE als Marker für motorische Fasern analysiert.

An DIV 3 war die Faser-Fragmentierung als klares Zeichen für eine reguläre Wallersche Degeneration nachweisbar (siehe Abb. 4.2-1 B vs. Abb. 4.2-2 A-C).

CL war in der Lage, die Wallersche Degeneration zu befördern, was durch die signifikant verringerte Menge an AChE-Färbung gezeigt wurde (siehe Abb. 4.2-1 und Abb. 4.2-2 A versus B+C). Dieser Effekt war nur initial an DIV 3, jedoch nicht mehr an DIV 5 bzw. 7 nachweisbar (siehe Abb. 4.2-1 und Abb. 4.2-2 D-I).

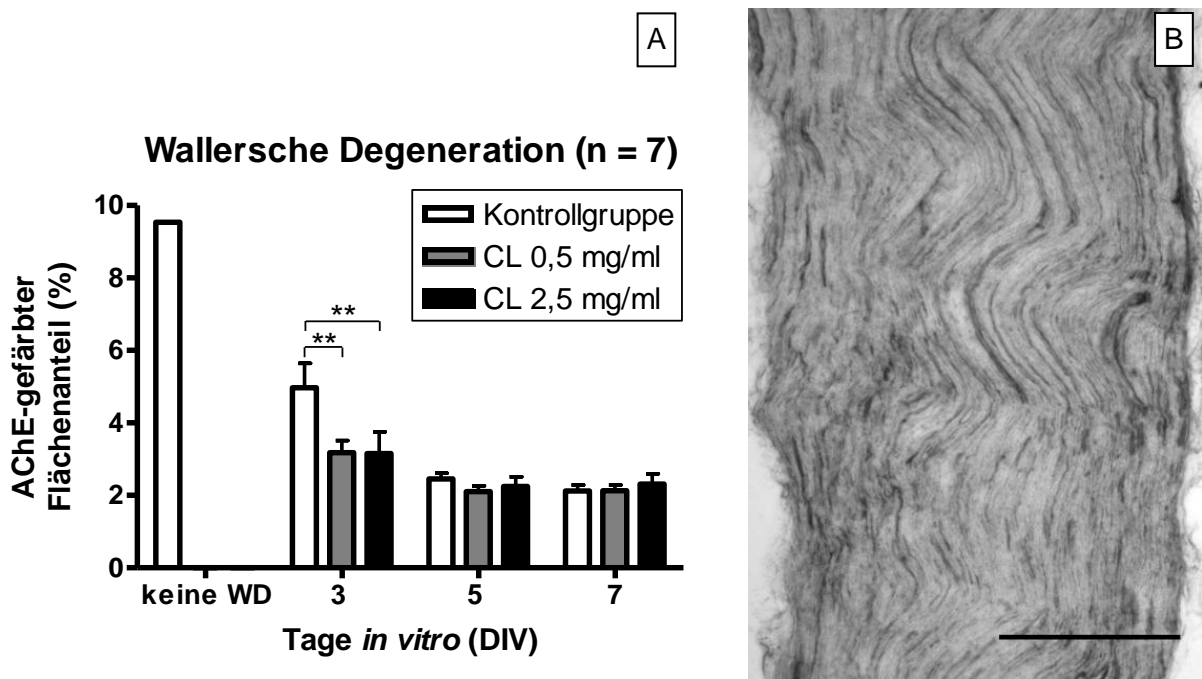


Abb. 4.2-1 Wallersche Degeneration

(A) Die computerbasierte Analyse der AChE-gefärbten Fläche zeigte in der Kontrollgruppe an DIV 3 einen signifikant geringeren Anteil an AChE-Färbung im Vergleich zum frisch fixierten Nerv. CL verstärkte den Abfall der AChE-Färbung an DIV 3 signifikant, beschleunigte die Wallersche Degeneration also initial. An DIV 5 und DIV 7 war der CL-Effekt jedoch nicht mehr nachweisbar. „keine WD“ = Messwerte des direkt nach Präparation fixierten *N. ischiadicus* ohne stattgefundene Wallersche Degeneration.

Two-way ANOVA: $F_{\text{CL-Behandlung}} = 3,28$; $DF_n = 2$; $DF_d = 78$; $p < 0,05$; Bonferroni Post-hoc Tests: statistisch signifikante Unterschiede: $**p < 0,01$; Mittelwert + SEM; Für die Analysen wurden mindestens 7 unabhängige Proben pro Gruppe einbezogen.

(B) Repräsentativer Längsschnitt eines direkt nach Präparation fixierten *N. ischiadicus*, welcher noch keiner Wallerschen Degeneration unterlag. Skalierung = 200 µm.

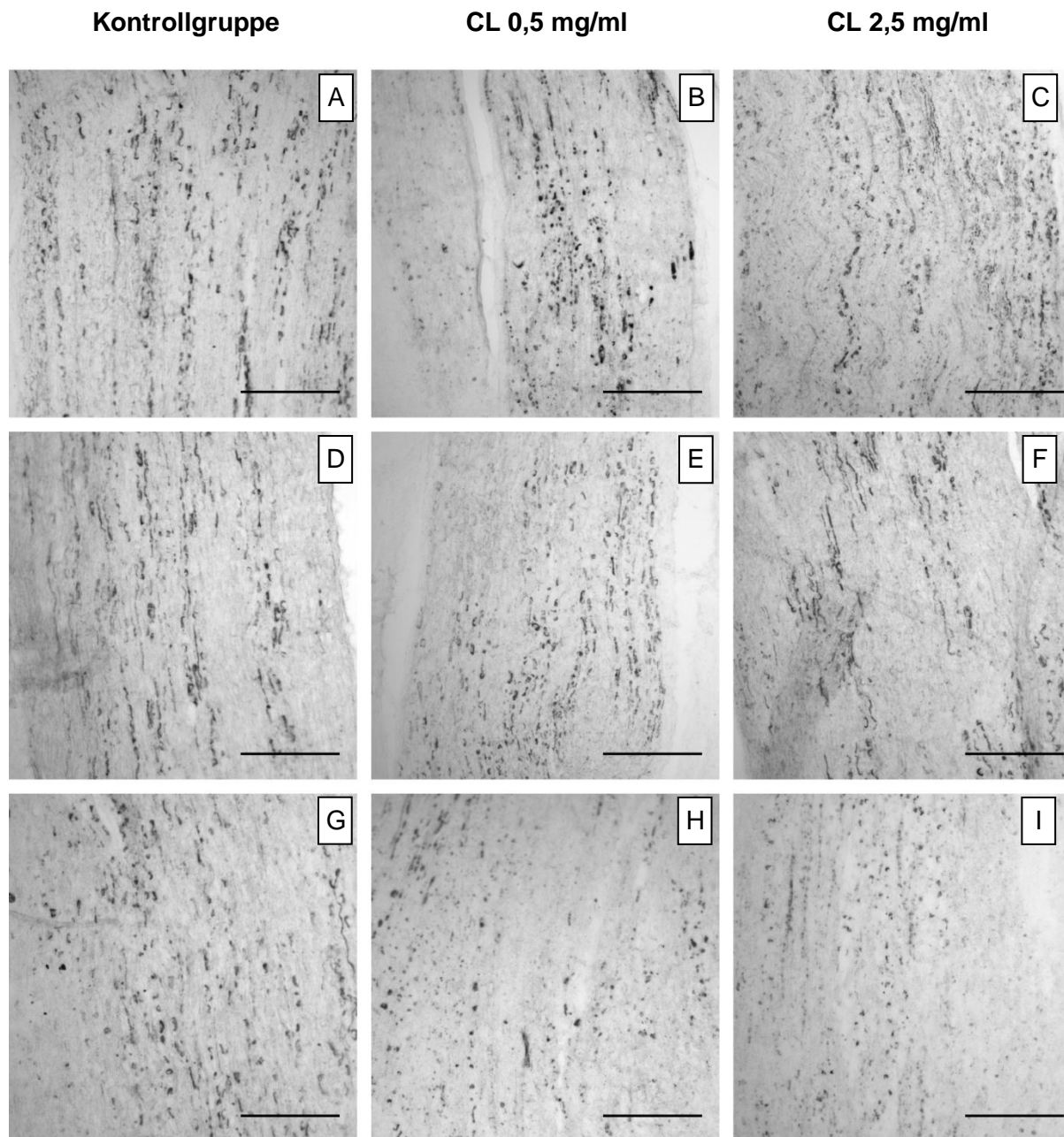


Abb. 4.2-2 Repräsentative Nerven-Präparate unter Wallerscher Degeneration

An DIV 3 (**A-C**) konnte unter CL-Applikation ein Abfall der AChE-gefärbten Fläche nachgewiesen werden, was einer beschleunigten Wallerschen Degeneration entspricht. Diese Unterschiede waren an DIV 5 (**D-F**) und 7 (**G-I**) kompensiert. Skalierung = 200 µm.

4.3 Zelllinie NSC34

4.3.1 MTT-Test

Wie schon bei den SZ-Experimenten, diente der MTT-Test auch hier als Globaltest für die CL-Wirkung auf Zellproliferation und/oder Zellviabilität.

Unter Normmedium konnte bei CL-Applikation in höheren Dosen (2,5 mg/ml und 5,0 mg/ml) eine Reduktion der metabolischen Aktivität der Zellen nachgewiesen werden. Dieser Effekt erreichte 48 h nach Stressinduktion, jetzt OGD, statistische Signifikanz (siehe Abb. 4.3-1) und wies auf eine anti-proliferative und/oder zytotoxische Potenz des CL hin.

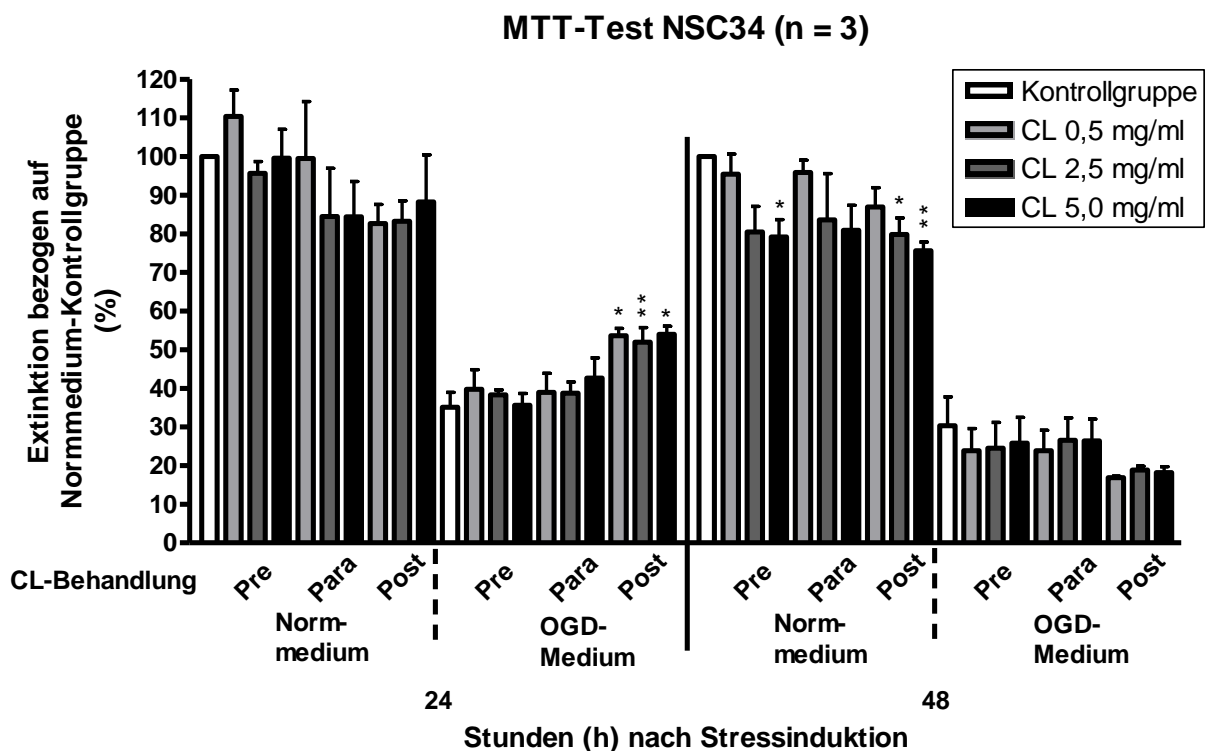


Abb. 4.3-1 MTT-Test NSC34

Unter Normmedium führte die CL-Applikation in höheren Dosen zu einem Abfall lebender Zellen. Dieser Effekt erreichte jedoch erst 48 h nach Stressinduktion und nur in der Pre- (nur 5,0 mg/ml) und Post-CL-Gruppe (2,5 mg/ml und 5,0 mg/ml) statistische Signifikanz. OGD führte zu einer Reduktion der lebenden Zellen auf unter 50 % im Vergleich zur Normmedium-Kontrollgruppe. Die CL-Applikation unter OGD konnte nur 24 h nach Stressinduktion in der Post-CL-Gruppe zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl lebender Zellen führen. Dieser Effekt war 48 h nach Stressinduktion nicht mehr nachweisbar. Es bestand sogar ein umgekehrter Trend. Two-way ANOVA: $F_{\text{CL-Behandlung}} = 45,43$; $DF_n = 19$; $DF_d = 80$; $p < 0,0001$. t-Tests der einzelnen CL-Gruppen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe nach Vernachlässigung der Alphareduktion, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Mittelwert + SEM; $n = 3$.

OGD reduzierte die metabolische Aktivität auf weniger als die Hälfte im Vergleich zur Normmedium-Kontrollgruppe. CL konnte der OGD-induzierten Verminderung 24 h nach Insult in der Post-CL-Gruppe signifikant entgegenwirken ($p < 0,001$; siehe Abb. 4.3-1). Dieser proliferative und/oder protektive Effekt war jedoch nur temporär und wies nach 48 h sogar eine gegenläufige Tendenz auf.

4.3.2 Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellteilungsrate

Da der MTT-Test nicht zwischen Zellproliferation und Zellviabilität unterscheidet, wurde mit der FACS-basierten Messung der BrdU-Inkorporation eine unabhängige Exploration der Zellteilungspotenz vorgenommen. Für die Untersuchungen wurde CL in einer Konzentration von 5,0 mg/ml eingesetzt, da sich diese als die wirkungsstärkste im MTT-Test dargestellt hat. Motoneurone gehören wie die SZ zu den postmitotischen Zellen im adulten Organismus. Die Zellen der Zelllinie NSC34 besitzen jedoch durch ihre Hybridisierung mit Neuroblastom-Zellen wieder die Möglichkeit zur Proliferation [16].

Unter Normmedium betrug die mittlere Proliferationsrate ca. 52 %. Die CL-Applikation führte nach 24 h zu einer signifikanten Reduktion der Proliferationsrate. Dieser Effekt war jedoch nach 48 h nicht mehr nachweisbar (siehe Abb. 4.3-2 A und C vs. D).

Auch OGD verminderte die Proliferationsrate gegenüber der Normmedium-Kontrollgruppe signifikant (siehe Abb. 4.3-2 A und C vs. E). Wie schon unter Normbedingungen führte eine CL-Applikation wiederum nur 24 h nach Stressinduktion zu einer weiteren signifikanten Reduktion der Proliferationsrate (siehe Abb. 4.3-2 A und E vs. F).

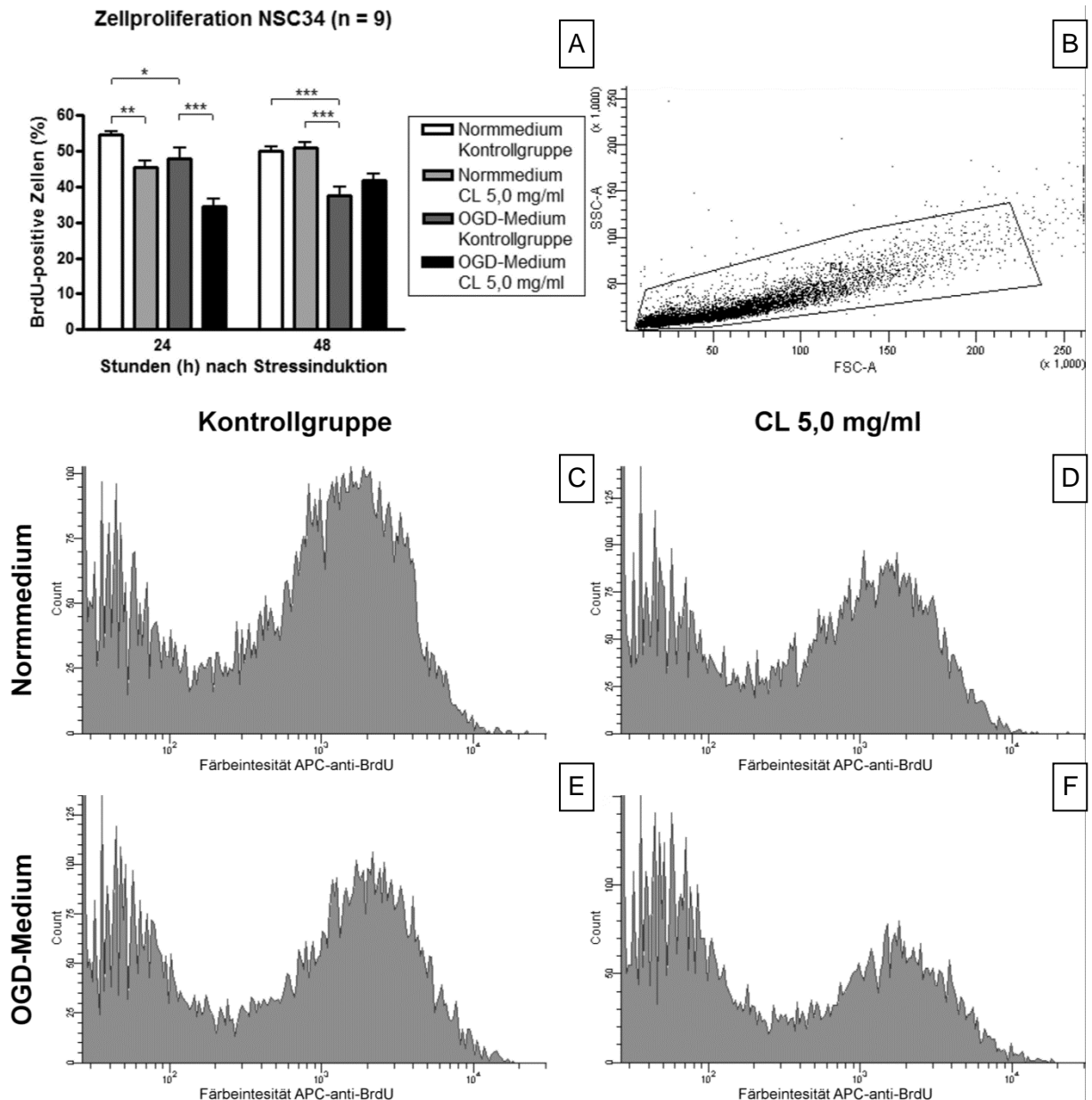


Abb. 4.3-2 Zellproliferationsanalyse NSC34

(A) Die durchflusszytometrische Messung der Zellproliferationsrate zeigte unter Normmedium einen signifikanten CL-induzierten Abfall nach 24 h. Nach 48 h war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar. OGD reduzierte die Proliferationsrate zu beiden Zeitpunkten signifikant. CL konnte diesen Abfall nach 24 h signifikant verstärken. Two-way ANOVA: $F_{\text{CL-Behandlung}} = 18,62$; $DF_n = 3$; $DF_d = 64$; $p < 0,0001$; Bonferroni Post-hoc Tests: statistisch signifikante Unterschiede: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Mittelwert + SEM; $n = 9$.

(B) Repräsentative FSC/SSC-Darstellung. FSC (Abszisse) ist ein Maß für die Größe der Zellen, SSC (Ordinate) ist ein Maß für die Granularität der Zellen. Nur Zellen, die sich im Auswahlfilter (Gate) befanden, gingen in die Histogramm-Analysen ein.

(C-F) Repräsentative Histogramme der APC-anti-BrdU-positiven Zellen nach 24 h.

4.3.3 Auswachsen von Zellfortsätzen

Salomoni und Mitarbeiter beschrieben in einer Übersichtsarbeit, dass eine Verringerung der Proliferation zur Zelldifferenzierung führt [74]. Ein wichtiger Differenzierungsprozess von Motoneuronen besteht in der Bildung von Fortsätzen. Im gesunden Organismus innervieren Motoneuronen mit ihrem Axon den zugehörigen Zielmuskel. Nach der Läsion eines peripheren Nerven wird diese Verbindung jedoch unterbrochen. Durch Regenerationsmechanismen ist dieser Zustand teilweise reversibel. Dazu findet im proximalen Nervenstumpf ein Wachstum des verletzten Axons statt. Die NSC34-Zellen besitzen ebenfalls die Fähigkeit zur Ausbildung von Zellfortsätzen, im Folgenden als Neuriten bezeichnet. Dieses für die Regeneration bedeutungsvolle Differenzierungsverhalten der NSC34-Zellen wurde im Hinblick auf die Anzahl ausgebildeter Neuriten je Zelle und die jeweilige Neuritenlänge untersucht.

Dabei kam die geringste CL-Konzentration (0,5 mg/ml) zum Einsatz, da CL in dieser Versuchsreihe über einen längeren Zeitraum appliziert wurde und toxische Effekte durch CL-Kumulationen ausgeschlossen werden sollten.

Im Allgemeinen war ein erstes Neuritenwachstum zwischen DIV 2 und DIV 3 zu beobachten. In der Normmedium-Kontrollgruppe waren die Neuritenlängen ab DIV 3 relativ konstant bei ca. 20 µm. Bei einer CL-Applikation wurden signifikant längere Neuriten gegenüber der Normmedium-Kontrollgruppe an DIV 4 ($p < 0,001$, siehe Abb. 4.3-6) und an DIV 5 ($p < 0,05$) nachgewiesen. Diese signifikanten Längenunterschiede waren nach dem Mediumwechsel ab DIV 6 nicht mehr vorhanden (siehe Abb. 4.3-3). Offensichtlich führte der Mediumwechsel am Ende von DIV 5 zu einer Retraktion der Zellfortsätze.

Unter Diff.-Medium wurden an DIV 4 ($p < 0,01$, siehe Abb. 4.3-6) und DIV 5 ($p < 0,05$) signifikant längere Neuriten im Vergleich zur Normmedium-Kontrollgruppe gemessen. In Analogie zum Normmedium waren diese Effekte ab DIV 6 nicht mehr vorhanden.

CL beschleunigte das unter Diff.-Medium ohnehin bessere Neuritenwachstum weiter, so dass bereits an DIV 3 ($p < 0,01$) signifikant längere Neuriten im Vergleich zur Normmedium-Kontrollgruppe vorhanden waren. Dieser Effekt hielt an DIV 4 ($p < 0,001$, siehe Abb. 4.3-6) und DIV 5 ($p < 0,01$) an. Darüber hinaus wurden auch nach dem ersten Mediumwechsel an DIV 6 signifikant längere Neuriten im Vergleich zu allen anderen Behandlungsgruppen gemessen (vs. Normmedium-Kontrollgruppe: $p < 0,001$; vs. Normmedium + CL: $p < 0,001$; vs. Diff.-Medium-Kontrollgruppe: $p < 0,01$; siehe Abb. 4.3-3). Das unterstreicht eine für das Neuritenwachstum förderliche Potenz von CL.

Beschränkte man die Auswertung auf den längsten Neuriten je Zelle, ergab sich ein ähnliches Bild (siehe Abb. 4.3-4).

Unter Normmedium lag die durchschnittliche Neuritenlänge ab DIV 3 bei ca. 25 μm . CL führte an DIV 4 ($p < 0,01$, siehe Abb. 4.3-6) zu signifikant längeren Neuriten gegenüber der Kontrollgruppe (siehe Abb. 4.3-4).

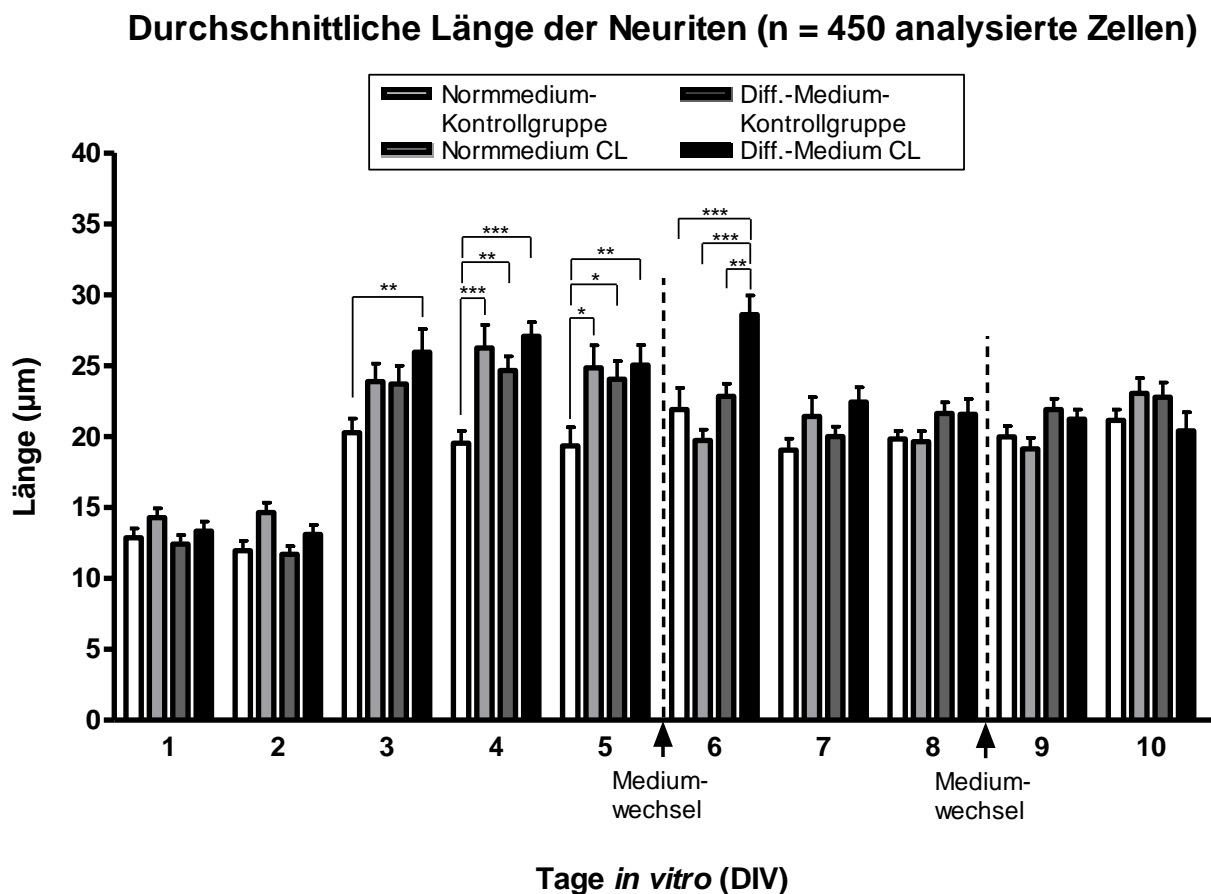


Abb. 4.3-3 Durchschnittliche Neuritenlänge

Die durchschnittliche Neuritenlänge ließ eine beginnende Differenzierung zwischen DIV 2 und 3 erkennen. Im weiteren Zeitverlauf blieben die Neuritenlängen in der Kontrollgruppe relativ konstant. Eine CL-Applikation resultierte an DIV 4 und DIV 5 in längeren Neuriten. Nach dem Mediumwechsel ab DIV 6 war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar. Diff.-Medium induzierte ein adäquates Neuritenwachstum. CL unter Diff.-Medium erzielte bereits an DIV 3 und auch noch nach dem Mediumwechsel an DIV 6 einen signifikanten Anstieg der Neuritenlängen. Two-way ANOVA: $F_{\text{CL-Behandlung}} = 15,83$; $DFn = 3$; $DFd = 24216$; $p < 0,0001$; Bonferroni Post-hoc Tests: statistisch signifikante Unterschiede: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Mittelwert + SEM.

Den gleichen Effekt hatte der Einsatz von Diff.-Medium an DIV 4 ($p < 0,05$; siehe Abb. 4.3-4 und Abb. 4.3-6) und DIV 8 ($p < 0,05$; siehe Abb. 4.3-4). Die CL-Applikation unter Diff.-Medium ergab auch in Bezug auf den längsten Neuriten bereits an DIV 3 einen signifikanten Effekt ($p < 0,001$). Dieser Effekt persistierte an DIV 4 ($p < 0,001$; siehe Abb. 4.3-6), DIV 5 ($p < 0,05$) und auch nach dem ersten Mediumwechsel ($p < 0,05$). Eine Addition der positiven Effekte von Diff.-Medium und CL, wie bei der durchschnittlichen Neuritenlänge nach Mediumwechsel, war nicht vorhanden; an DIV 10 waren die Neuriten bei CL-Applikation unter Diff.-Medium sogar signifikant kürzer ($p < 0,05$; siehe Abb. 4.3-4).

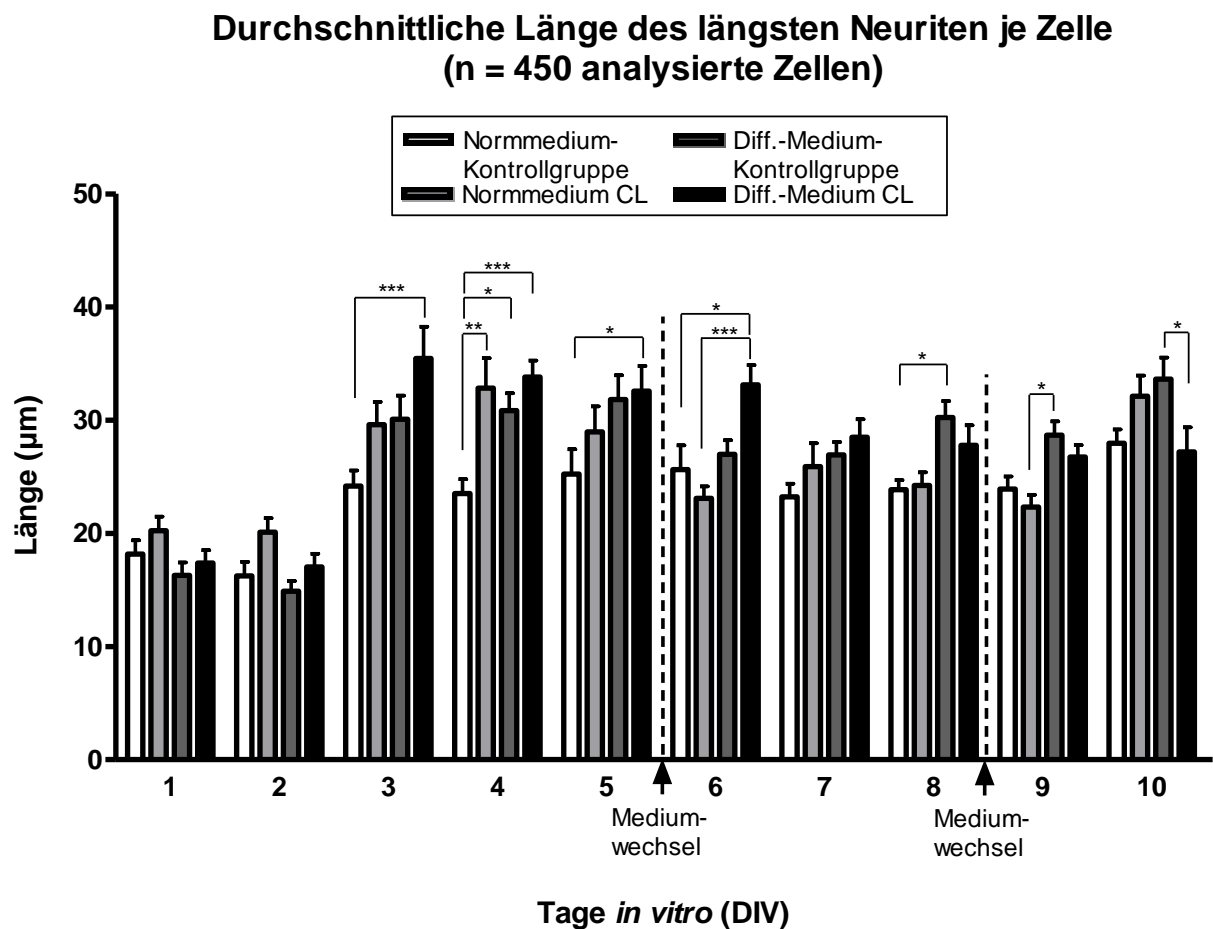


Abb. 4.3-4 Durchschnittliche Länge des längsten Neuriten je Zelle

Die Neuritenlängen blieben im Normmedium ab DIV 3 relativ konstant. Die CL-Applikation resultierte in längeren Neuriten an DIV 4. Die Applikation von Diff.-Medium hatte den gleichen Effekt. Außerdem führte Diff.-Medium auch an DIV 8 zu längeren Neuriten. CL-Applikation zum Diff.-Medium resultierte von DIV 3 bis DIV 6 in längeren Neuriten verglichen zur Normmedium-Kontrollgruppe, nicht jedoch zur Diff.-Medium-Kontrollgruppe. An DIV 10 wurde sogar ein signifikanter Abfall der Neuritenlängen beobachtet. Two-way ANOVA: $F_{\text{CL-Behandlung}} = 14,24$; $DF_n = 3$; $DF_d = 13512$; $p < 0,0001$; Bonferroni Post-hoc Tests: statistisch signifikante Unterschiede: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Mittelwert + SEM.

Als weiterer aussagekräftiger Parameter für die Differenzierung von Nervenzellen wurde die durchschnittliche Neuritenzahl je Zelle (siehe Abb. 4.3-5 und Abb. 4.3-6) analysiert.

Dabei wurde ein wellenähnlicher Verlauf gefunden (siehe Abb. 4.3-5), wobei die Neuritenretraktion sowohl mit dem Stress des Mediumwechsels als auch mit einem Nährstoffverbrauch im Normmedium zu korrelieren schien.

Unter Normmedium konnte CL die durchschnittliche Neuritenzahl nicht verändern (siehe Abb. 4.3-5).

Diff.-Medium verbesserte auch diesen Parameter ab DIV 3. Die CL-Applikation unter Diff.-Medium behinderte das bereits an DIV 5 signifikant ($p < 0,05$).

Damit spricht einiges dafür, dass das Diff.-Medium das Neuritenwachstum grundsätzlich stimuliert und eine Relationsverschiebung zum Motoneuron-ähnlichen Phänotyp bewirkt. CL kann diesen Effekt nicht weiter verstärken, sondern führt im Diff.-Medium im Sinne einer Depletion zur Verschlechterung der Neuritogenese (siehe Abb. 4.3-5).

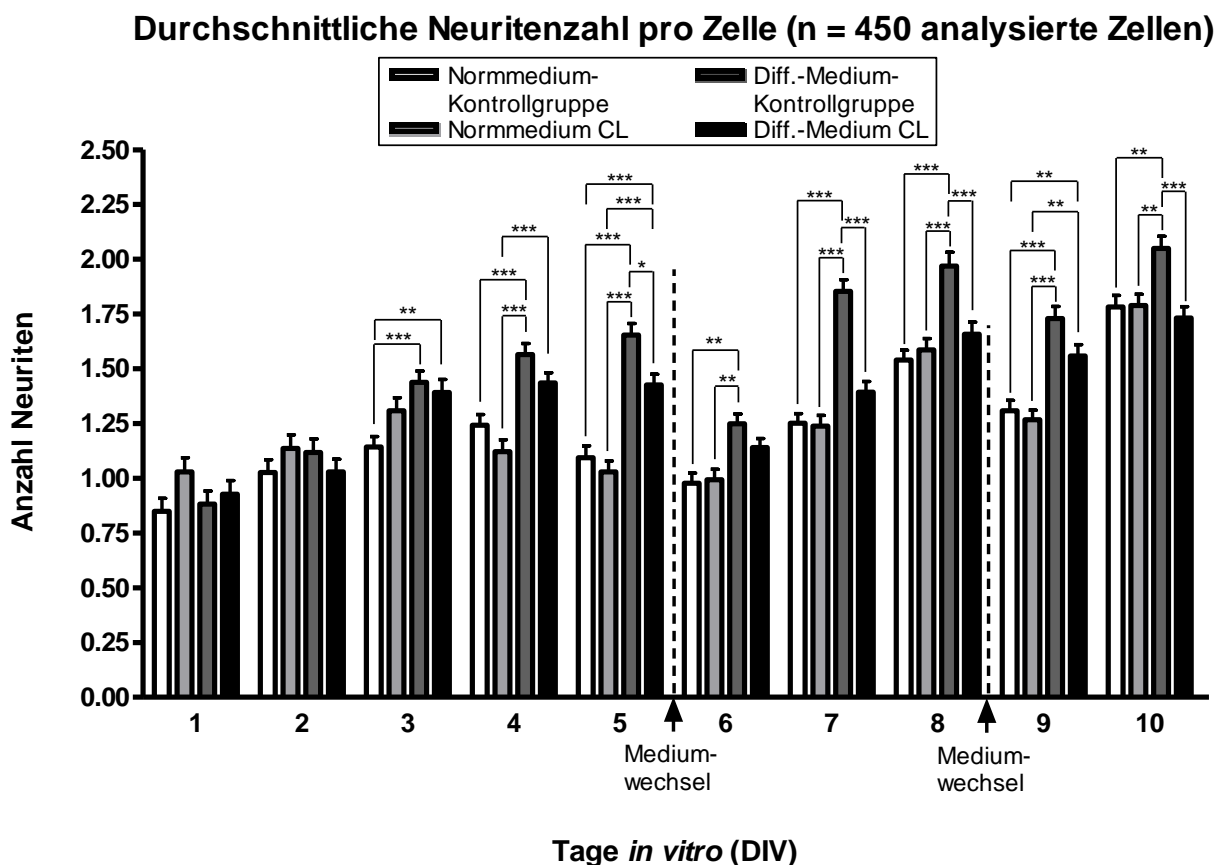


Abb. 4.3-5 Durchschnittliche Neuritenzahl

Die durchschnittliche Neuritenzahl zeigte für die CL-Applikation unter Normmedium keine signifikanten Effekte. Diff.-Medium bewirkte ab DIV 3 einen signifikanten Anstieg. Dieser Effekt persistierte auch nach beiden Mediumwechseln. Eine zusätzliche CL-Applikation wirkte diesem Effekt ab DIV 5 entgegen. Two-way ANOVA: $F_{\text{CL-Behandlung}} = 79,55$; $DF_n = 3$; $DF_d = 17960$; $p < 0,0001$; Bonferroni Post-hoc Tests: statistisch signifikante Unterschiede: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Mittelwert + SEM.

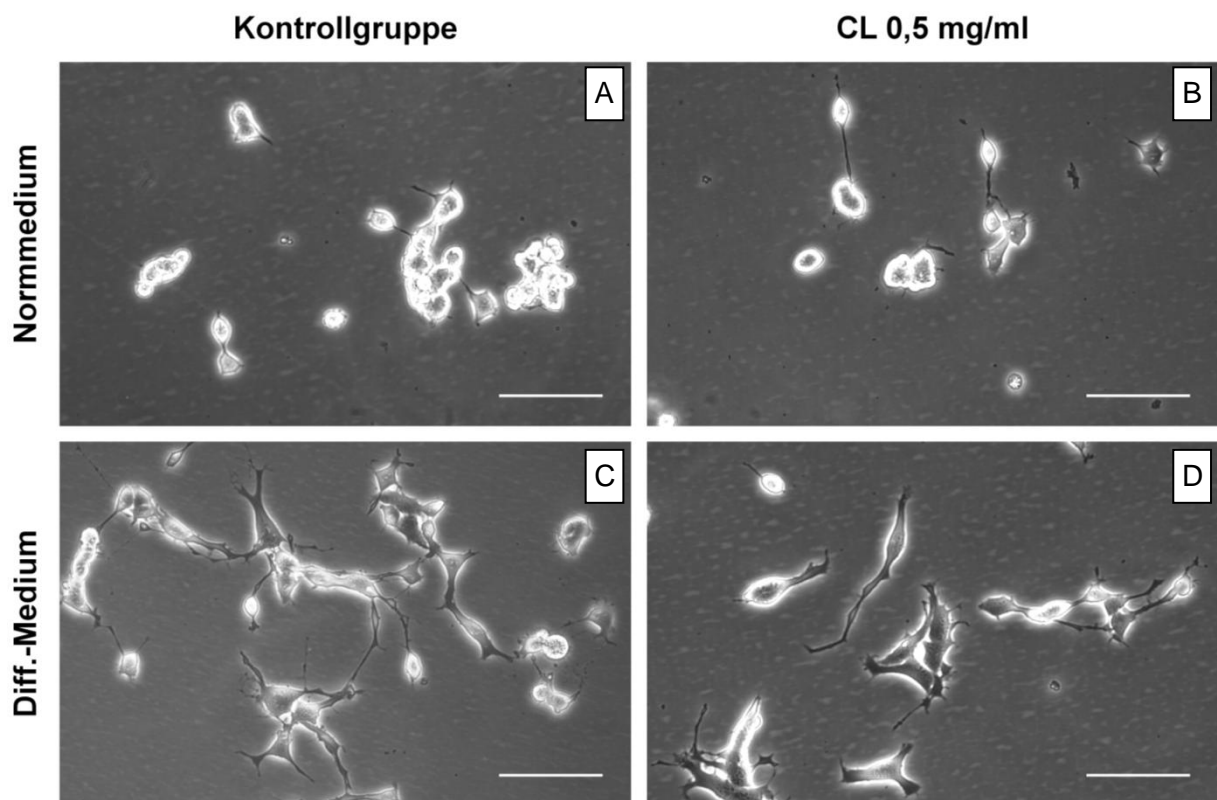


Abb. 4.3-6 Zellfortsätze NSC34 an DIV 4

(A-D) Repräsentative Phasenkontrast-Aufnahmen an DIV 4. Im Vergleich zur Normmedium-Kontrollgruppe **(A)** führte die CL-Applikation unter Normmedium **(B)** zu verbessertem Neuritenlängenwachstum bis auf das Niveau der Diff.-Medium-Gruppen **(C, D)**. Das Auswachsen von neuen Neuriten wurde jedoch nicht beeinflusst. In der Diff.-Medium-Kontrollgruppe **(C)** wurde ebenfalls eine signifikante Steigerung der Neuritenlänge im Vergleich zur Normmedium-Kontrollgruppe festgestellt. Zusätzlich steigerte das Diff.-Medium das Auswachsen neuer Neuriten. CL war unter Diff.-Medium **(D)** nicht in der Lage, diese Prozesse weiter zu verbessern. Skalierung = 100 μm .

4.4 Proteinbiochemische Untersuchungen

4.4.1 Western Blots

Um die zuvor ermittelten Ergebnisse molekular zu unterlegen, wurden Western Blots durchgeführt und per semiquantitativer Grauwertanalyse ausgewertet.

Für CL ist bekannt, dass es einen inhibitorischen Effekt auf Calpain ausüben kann [100]. Aus diesem Grund wurde die Expression sowohl von Calpain-I als auch vom Calpain-Substrat α -II-Spectrin unter CL-Applikation untersucht.

Calpain-I ergab Banden bei 80 kDa und 78/76 kDa (sowie einige kleinere Banden, nicht dargestellt) als Produkt einer Autoproteolyse (siehe Abb. 4.4-1 C).

Unter Normmedium führten beide CL-Dosen (0,5 mg/ml; 5,0 mg/ml) zu einer Verstärkung der 80 kDa- und der 78/76 kDa-Form (siehe Abb. 4.4-1 A-C).

OGD induzierte vornehmlich die 80 kDa-Bande. Beide CL-Dosen zeigten unter OGD keine signifikanten Effekte. Diff.-Medium hatte keinen Einfluss auf die Calpain-I-Expression. Auch die CL-Applikation unter Diff.-Medium veränderte diese nicht (siehe Abb. 4.4-1 A - C).

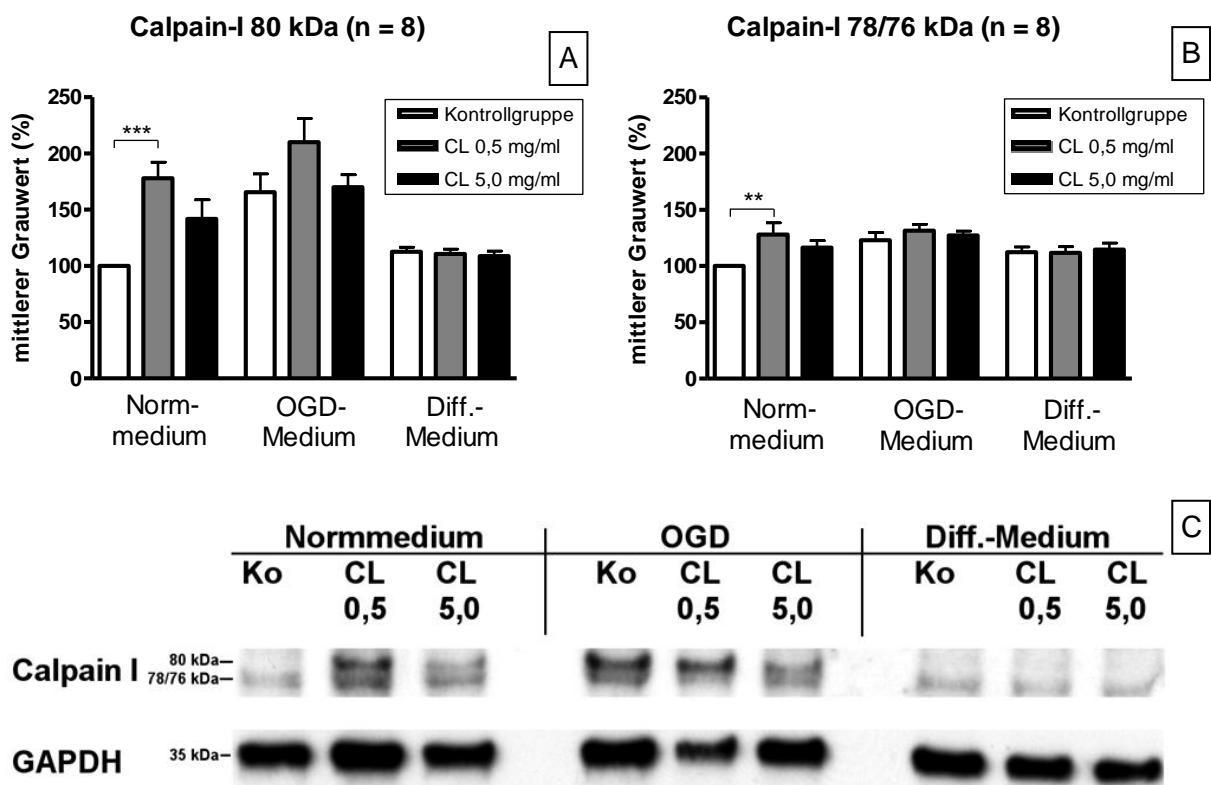


Abb. 4.4-1 Semiquantitativer Vergleich der Calpain-I-Proteinmengen

Die semiquantitative Grauwertanalyse für die (A) Calpain-I 80 kDa-Bande und die (B) Calpain-I 78/76 kDa-Bande zeigte für beide Formen einen Anstieg unter CL-Applikation sowohl unter Normbedingungen als auch unter OGD. OGD selbst bewirkte eine signifikante Zunahme der 80 kDa-Form. Diff.-Medium war dagegen unwirksam. One-way ANOVA: 80 kDa-Form: $F_{8,63} = 9,726$; $p < 0,0001$; 76 kDa-Form: $F_{8,63} = 2,884$; $p < 0,01$; Bonferroni Post-hoc Tests: statistisch signifikante Unterschiede: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Mittelwert + SEM; $n = 8$.

(C) Repräsentativer Western Blot für Calpain-I und GAPDH als Housekeeping-Protein.

Die Anfärbung des zytoskeletalen Proteins α I-Spectrin führte zu Banden bei 260 kDa, 150 kDa, 145 kDa und 120 kDa. Die 260 kDa-Bande stellte dabei das ungespaltene Protein dar. Die kleineren Banden entstanden durch die Proteolyse von α I-Spectrin mittels Calpain und Caspase-3. Die 150 kDa-Bande stellte das gemeinsame Proteolyseprodukt durch Calpain und Caspase-3 dar. Die spezifischen Proteolyseprodukte durch ausschließlich Calpain bzw. Caspase-3 waren in den Banden bei 145 kDa bzw. 120 kDa sichtbar [63, 64, 96] (siehe Abb. 4.4-2 A).

Das 260 kDa α I-Spectrin wurde weder durch OGD, noch durch Diff.-Medium und auch nicht durch CL-Applikation beeinflusst (siehe Abb. 4.4-2 B).

Das 150 kDa-Proteolyseprodukt wurde durch die einmalige CL-Applikation von 5,0 mg/ml unter Normmedium signifikant reduziert (siehe Abb. 4.4-2 C).

OGD führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Calpain-vermittelten Proteolyse im Vergleich zur Normmedium-Kontrollgruppe ($p < 0,01$; nicht eingezeichnet). Eine tägliche CL-Applikation von 0,5 mg/ml unter OGD bewirkte eine signifikante Induktion der Proteolyse im Vergleich zur OGD-Kontrollgruppe (siehe Abb. 4.4-2 C).

Die Applikation von Diff.-Medium führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion des 150 kDa-Proteolyseproduktes im Vergleich zur Normmedium-Kontrollgruppe ($p < 0,001$; nicht eingezeichnet). CL hatte unter Diff.-Medium keinen signifikanten Einfluss auf die Expression dieses Proteolyseproduktes (siehe Abb. 4.4-2 C).

Das 145 kDa-Proteolyseprodukt wurde durch die einmalige CL-Applikation von 5,0 mg/ml unter Normmedium ebenfalls signifikant reduziert (siehe Abb. 4.4-2 D).

OGD und Diff.-Medium zeigten einen Trend zur Reduktion im Vergleich zur Normmedium-Kontrollgruppe, der jedoch keine statistische Signifikanz erreichte. CL hatte unter beiden Konditionen keinen signifikanten Einfluss (siehe Abb. 4.4-2 D).

Ähnlich der 260 kDa-Fraktion konnte für das 120 kDa-Proteolyseprodukt kein signifikanter Effekt für OGD, Diff.-Medium oder eine CL-Applikation gezeigt werden (siehe Abb. 4.4-2 E); ein Hinweis darauf, dass ein Apoptose-relevanter Aufschluss des Spectrins in unserem System keine Rolle spielt.

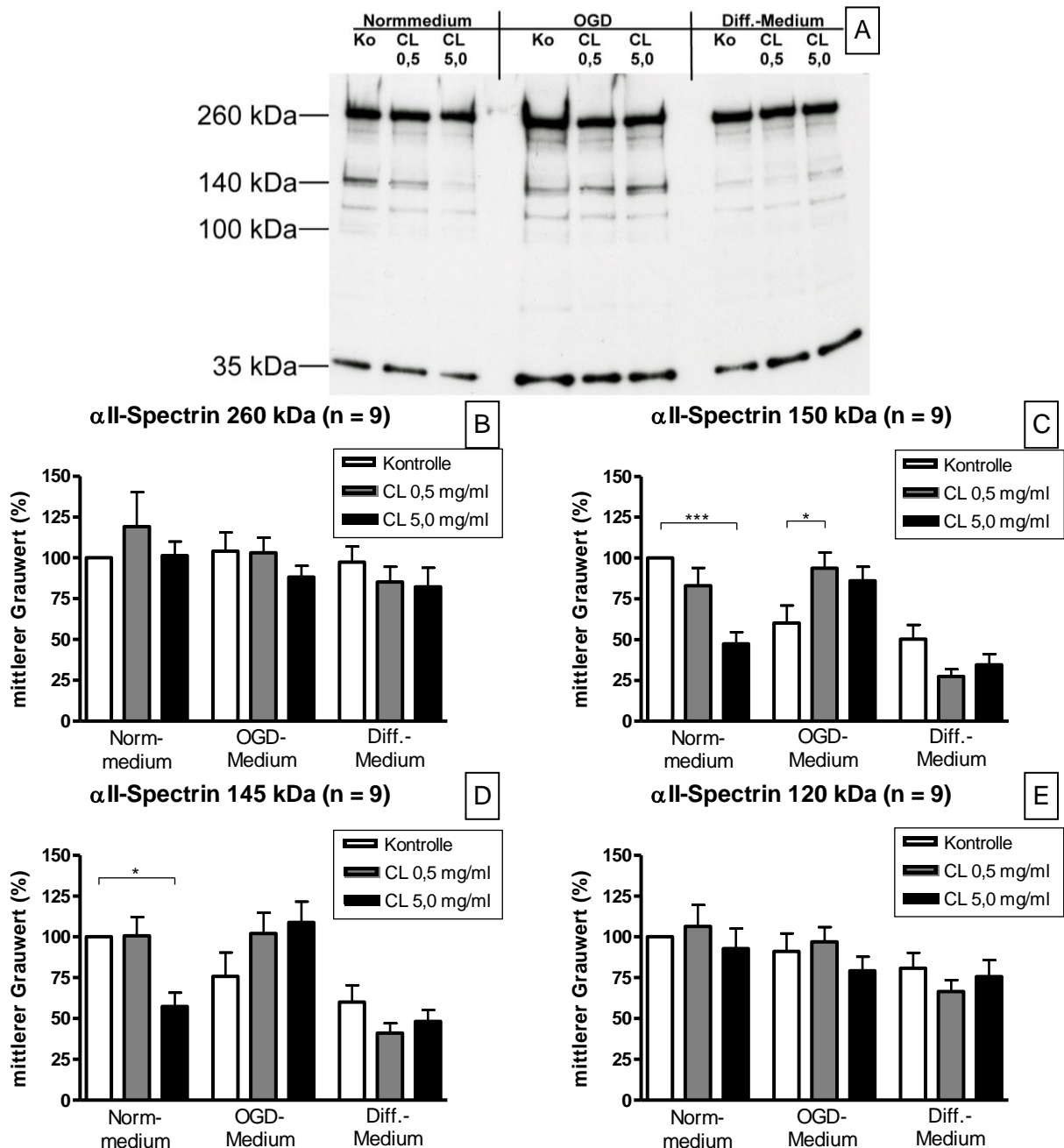


Abb. 4.4-2 Semiquantitativer Vergleich αII-Spectrin-Proteinmengen

(A) Repräsentativer Western Blot für αII-Spectrin und GAPDH. (B) Das 260 kDa-αII-Spectrin zeigte keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Kulturbedingungen und CL-Applikation. (C) Das 150 kDa-Proteolyseprodukt wurde unter Normmedium durch CL (5,0 mg/ml) signifikant reduziert. Auch OGD ($p < 0,01$) und Diff.-Medium ($p < 0,001$) reduzierten diese Fraktion im Vergleich zur Normmedium-Kontrollgruppe signifikant (nicht eingezeichnet). Die Kombination von OGD und CL führte jedoch zu einer signifikanten Steigerung der 150 kDa-Fraktion. Unter Diff.-Medium zeigte CL keinen signifikanten Effekt. (D) Das 145 kDa-Proteolyseprodukt zeigte ein ähnliches Muster: unter Normmedium signifikante Reduktion durch CL (5,0 mg/ml), tendenzielle Reduktion unter OGD- und Diff.-Medium. Allerdings hatte CL jetzt weder unter OGD noch unter Diff.-Medium einen signifikanten Effekt. (E) Das 120 kDa-Proteolyseprodukt zeigte keine Abhängigkeit von Kulturbedingungen und CL-Applikation. One-way ANOVA (i) 240 kDa: $F_{8,72} = 1,056$; $p = 0,4035$; (ii) 150 kDa: $F_{8,72} = 10,89$; $p < 0,0001$; (iii) 145 kDa: $F_{8,71} = 6,647$; $p < 0,0001$ und (iv) 120 kDa: $F_{8,72} = 1,786$; $p = 0,0939$; Bonferroni Post-hoc Tests: statistisch signifikante Unterschiede: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; Mittelwert + SEM; $n = 9$.

4.5 Immunzytochemische Visualisierung von Calpain-I

Die Western Blot-Analysen wurden durch die immunzytochemische Visualisierung von Calpain-I ergänzt. NSC34-Zellen exprimieren Calpain-I unter Normbedingungen nachweislich, aber nicht hervorragend (siehe Abb. 4.5-1 A, B). CL steigerte die Intensität deutlich (siehe Abb. 4.5-1 C, D). Auch OGD führte zu einer klaren Intensitätssteigerung (siehe Abb. 4.5-1 E). Der Einsatz des Diff.-Mediums veränderte die Calpain-I-Expression im Vergleich zur Normmedium-Kontrollgruppe nicht (siehe Abb. 4.5-1 H), womit die Western Blot-Befunde bestätigt wurden. In beiden Fällen hat CL keinen sichtbaren Einfluss auf die Expression. Das steht nicht im Widerspruch zu den Western Blots, da die Immunzytochemie nicht zwischen den einzelnen Calpain-I-Fractionen unterscheiden kann. Noch einmal konnte die Überlegenheit des Diff.-Mediums in Bezug auf das Neuritenwachstum, jetzt mit Hilfe der β -III-Tubulin-Kofärbung, aufgezeigt werden (siehe Abb. 4.5-1 H - J).

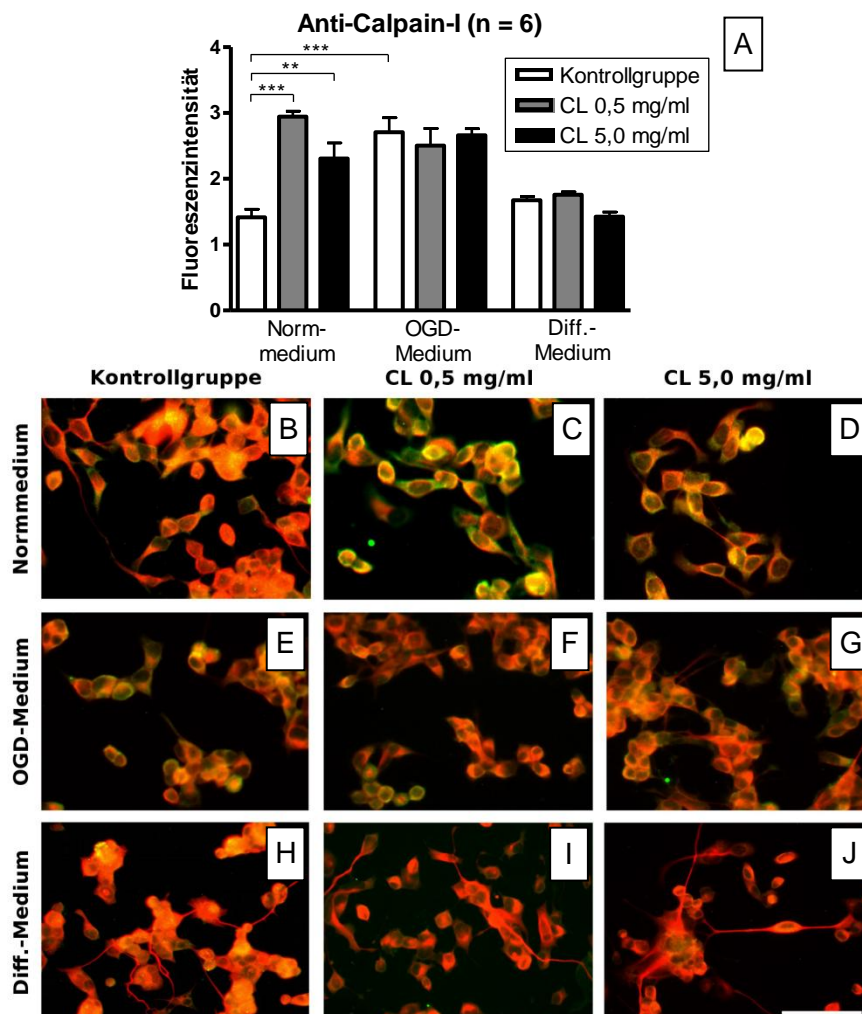


Abb. 4.5-1 Calpain-I-Visualisierung und Quantifizierung in NSC34-Zellen an DIV 4

(A) Semiquantitative Bestimmung von Calpain-I und (B-J) repräsentative Immunfluoreszenzdarstellung von Calpain-I (grün) und β -III-Tubulin (rot) an DIV 4. Bei CL-Applikation konnte unter Normmedium (B-D) wie auch unter OGD (E-G) eine Intensitätssteigerung der Calpain-I-Fluoreszenz gezeigt werden. Unter Diff.-Medium (H-J) war eine solche Induktion nicht sichtbar. Skalierung = 100 μ m.

5 Diskussion

5.1 Methodendiskussion

5.1.1 Zellkultur, Gewebekultivierung und CL-Applikation

Die Präparation der SZ aus Spinalganglien ist eine anerkannte und innerhalb der Arbeitsgruppe etablierte Methode [71]. Sie ermöglichte die Herstellung disperser SZ-Fibrozyten-Kokulturen, eine Quasi-Simulation der Verhältnisse nach Neurotmesis. SZ kommen nach Neurotmesis mit Fibrozyten in Kontakt und interagieren mit diesen [70]. Dadurch eignet sich unser Modell sehr gut für *in vitro* Untersuchungen in Bezug auf Nervenläsionen.

Ein Modell für die Wallersche Degeneration *in vitro* ist nicht allgemein etabliert. Die „Kultivierung“ des *N. ischiadicus ex vivo* gelang jedoch über mehrere Tage gut und konnte so als Testmodell verwendet werden (modifizierte Methode nach [80]). Dieser Nerv besitzt den Vorteil der einfachen und schnellen Präparation, wodurch seine schnelle Weiterversorgung im physiologischen Milieu des Mediums gewährleistet war. Mit der Entnahme des Nerven wurden die Verbindungen zu den Motoneuronen durchtrennt und so Bedingungen vergleichbar denen nach Neurotmesis *in vivo* geschaffen. Ein wichtiger Unterschied zur dispersen SZ-Fibrozyten-Kokultur bestand darin, dass die SZ im Nervenpräparat in ihrer „natürlichen“ Umgebung verblieben, da sie nicht von den Nervenfasern separiert wurden und die Nervenstrukturen die Wallersche Degeneration durchliefen. Diese wurde in dem von uns verwendeten Nerven-Modell (fast) ausschließlich von den im Fokus stehenden SZ bewerkstelligt. *In vivo* wandern bereits am 2. Tag post Insult Makrophagen in den abgetrennten Nervenstumpf ein, diese fehlen in unserem Modell, was eine Zuordnung der ablaufenden Prozesse zu den SZ ermöglichte. Außerdem wurde die Versuchstierzahl mit unserem Ansatz reduziert, da die entnommenen Nerven geteilt und so für die Kontrolle und mehrere CL-Konzentrationen gleichzeitig verwendet werden konnten. Bei einem *in vivo*-Ansatz wäre dafür jeweils ein Tier notwendig gewesen.

Die Zelllinie NSC34 ist ein seit den 1990er Jahren etabliertes Modell für Studien an Motoneuronen. Die Zellen besitzen viele Motoneuron-ähnliche Eigenschaften. Dazu gehört unter anderem das in dieser Arbeit untersuchte Auswachsen von Neuriten. Eine Beschränkung besteht jedoch in der relativ kurzen maximalen Kultivationsdauer, die hier 10 Tage betrug. Die hohe Proliferationsrate [16, 21] führt bei längerer Haltung *in vitro* zu mehrschichtigen Kulturen. Das würde die Auswertung behindern und zu sekundären Effekten (z.B. Kontaktinhibition) führen, die die Ergebnisse beeinflussen. Auch muss kritisch vermerkt werden, dass NSC34-Zellen in Bezug auf die Proliferation kein optimales Modell darstellen, da sie auf Grund ihrer Genese, Hybridisierung mit Neuroblastom-Zellen, eine gesteigerte Proliferationsrate aufweisen.

CL wurde in Dosen verwendet (0,5 mg/ml = 2,3 µl/ml; 2,5 mg/ml = 11,6 µl/ml; 5,0 mg/ml = 23,2 µl/ml), die sich in anderen Arbeiten etabliert haben. So wurden von Zhang und Mitarbeitern CL-Konzentrationen von 5 bis 20 µl/ml verwendet [102]. In einer Arbeit von Hutter-Paier und Mitarbeitern wurden Konzentrationen zwischen 0,8 und 6,4 mg/ml getestet [37].

5.1.2 MTT-Test

Der MTT-Test ist seit Anfang der 1980er Jahre als Proliferations- und Zytotoxizitätstest etabliert. Der Test basiert auf der Reduktion des MTT-Reagenz in Formazan durch ausschließlich lebende Zellen [14, 62]. Dabei korreliert die photometrisch bestimmbare Menge an Formazan sehr gut mit der Anzahl lebender Zellen [14].

Der MTT-Test ist ebenfalls für NSC34-Zellen beschrieben und evaluiert [36]. Da eine Zelllinie eine Monokultur darstellt, gelten die Aussagen des MTT-Test vollumfänglich.

Für die Kokultur von SZ und Fibrozyten ist der MTT-Test jedoch nur als Globaltest geeignet, weil durch ihn keine Unterscheidung des Umsatzes durch SZ und Fibrozyten möglich ist. Somit ist das gemessene Ergebnis durch den gemeinsamen Umsatz des MTT-Reagenz in Formazan bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurden vor Verwendung der MTT-Tests Eichreihen erstellt, um die optimalen Ausgangszellmengen für die SZ-Fibrozyten-Kokulturen und NSC34-Zellkulturen zu ermitteln. Für die Experimente wurden auf dieser Grundlage Zellkonzentrationen gewählt, bei der die gemessenen Extinktionen im linearen Bereich lagen.

Der MTT-Test lässt keine Unterscheidung zwischen Zellproliferation und Zellprotektion zu. Um die gewonnenen Ergebnisse dahingehend zu verifizieren, wurden zur Zellproliferation unabhängige Experimente durchgeführt.

5.1.3 Proliferationsanalysen

Die Proliferationsanalyse von SZ-Fibrozyten-Kokulturen und NSC34-Zellen mit Hilfe von BrdU-Inkorporation ist eine gut etablierte, akzeptierte Methode [12, 19]. Die immunzytochemische Darstellung des inkorporierten BrdU wurde in der Arbeitsgruppe schon vielfach angewendet [43].

Um eine korrekte Diskriminierung der SZ von den Fibrozyten zu erreichen, wurde eine spezifische Gegenfärbung der SZ mittels Anti-S100 durchgeführt. Für die Auswertung wurden für jede Probe 5 festgelegte Stellen im Präparat digitalisiert, um den subjektiven Bildselektionseffekt zu vermeiden.

Ein wichtiges Ziel bei dieser Methode für die SZ-Fibrozyten-Kokultur ist ein optimales Management der BrdU-Expositionszeit und der Zelldichte der SZ. Für die Expositionszeit sind Zeitspannen von 18 h bis 48 h beschrieben [12]. In der vorliegenden Arbeit wurde mit 24 h ein eher kurzer Expositionszeitraum gewählt, um eine zu große Zunahme der Zelldichte zu vermeiden, da diese auch bei SZ proliferationshemmend wirkt [15]. Um eine geeignete Zellteilungsrate innerhalb der gesamten Inkubationszeit zu erreichen, musste die Ausgangszellmenge entsprechend klein gewählt werden, durfte aber auch nicht zu klein sein, da sich sonst kein Zellrasen bildet. Die kurze Überlebenszeit hatte außerdem den Vorteil, dass die Beschränkungen der Methode, wie z.B. Zelltoxizität durch BrdU-Inkorporation in die DNA oder Reduktion des immunzytochemischen BrdU-Signals durch Zellteilung, nicht signifikant ins Gewicht fielen.

Für die NSC34-Zellen wurde ein BrdU-Kit zur Auswertung am Durchflusszytometer verwendet. Dies ermöglichte eine objektivere Analyse der Zellproliferation, da zum einen wesentlich größere Zellmengen (mindestens 10.000 Zellen pro Probe) innerhalb kürzester Zeit analysierbar waren. Zum anderen unterliegt diese Methode durch Randomisierung der Zellen während des Vermischens keiner Selektion durch die Bildauswahl, welche bei der mikroskopischen Auswertung von Zellfärbungen durch das Festlegen von feststehenden Bildstellen nicht vollständig ausgeschlossen werden kann.

Die durchflusszytometrische Messung der Proliferationsrate war in der vorliegenden Arbeit aufgrund der schlechten Diskriminierbarkeit der SZ und Fibrozyten mittels S100-Färbung im Durchflusszytometer nicht möglich, weswegen auf die immunzytochemische Färbung und mikroskopische Auswertung zurückgegriffen wurde.

5.1.4 Zelladhäsion - Clustering

Während der Regenerationsphase nach Nervenläsionen bilden SZ die Büngnerschen Bänder. Diese längsorientierten Zellsäulen dienen dem einsprossenden Axon als Leitschiene [24, 78]. Aus diesem Grund ist die Fähigkeit der SZ, Cluster zu bilden, als Modell für die Büngnerschen Bänder ein wichtiger Bestandteil meiner *in vitro* Untersuchungen zur Nervenregeneration.

In der Literatur sind Ansätze zur Analyse der Cluster beschrieben, wie z.B. das Auszählen der in Clustern liegenden SZ [70]. Der Nachteil hierbei liegt darin, dass nicht unterschieden wird, wie groß die Cluster sind und die SZ letztlich auch in wesentlich kleineren Clustern auftreten können. Da in der vorliegenden Arbeit generell mit SZ-Fibrozyten-Kokulturen gearbeitet wurde, ist die Bereitschaft der SZ, Cluster zu generieren, generell größer als in aufgereinigten SZ-Kulturen [70]. Aus diesem Grund wurde auf das Messen der Clustergrößen zurückgegriffen.

Ein wichtiger molekularer Mechanismus, der das Bilden von SZ-Clustern bei Kontakt mit Fibrozyten unterstützt, ist die Sox2-abhängige Translokation des NCAD aus dem Zytoplasma zu den Kontaktstellen zwischen SZ. Dies ist das Resultat der Ephrin-B/Ephrinrezeptor B2 (EphB2)-Interaktion zwischen Fibrozyt und SZ [70]. Aus diesem Grund wurde die Lokalisation des NCAD mittels immunzytochemischer Anfärbung mikroskopisch, qualitativ analysiert und der Cluster-Analyse zur Seite gestellt.

5.1.5 Auswachsen von Zellfortsätzen

Die Zelllinie NSC34 bildet nach entsprechender Kultivationsdauer zwei unterschiedliche Phänotypen aus: kleine, proliferierende, nichtdifferenzierte Zellen und größere, vielkernige, nichtproliferierende Zellen [23]. Mit Hilfe eines speziellen Diff.-Mediums kann eine Relationsverschiebung zum größeren, Motoneuron-ähnlichen Phänotyp erreicht werden [40]. In der vorliegenden Arbeit wurde ein für das Auswachsen von Neuriten hippocampaler Neurone etablierter Ansatz [52] für NSC34-Zellen adaptiert. Die Zahl der untersuchten Neurone wurde dabei auf 450 je Gruppe festgelegt und diese wurden im Abstand von jeweils 24 h vom DIV 1 bis DIV 10 mit einem Phasenkontrastmikroskop (20-fache Vergrößerung) untersucht. Analog zur Methode von Li et al. [52] wurde die Anzahl der Neuriten je Zelle und deren Längen bestimmt.

5.1.6 AChE-Färbung und Messung

Die Anfärbung der motorischen Nervenfasern mittels AChE-Färbung nach Karnovsky ist ein seit langer Zeit verwendetes und in der Arbeitsgruppe etabliertes Verfahren [45]. Um die übliche qualitative (subjektive) Auswertung der Wallerschen Degeneration durch Bildvergleiche zu objektivieren, wurde in meiner Arbeit ein neues Messverfahren etabliert. Dabei wurden die AChE-gefärbten Anteile selektiv markiert und auf die Gesamtfläche des Nervs bezogen. Um tierspezifische Fehler und solche durch selektive Nervenauswahl zu vermeiden, wurden von jedem Tier beide Nerven präpariert, so dass pro Tier ein individueller Kontrollnerv und mehrere CL-Präparate generiert wurden.

5.1.7 Proteinbiochemische Untersuchungen

Die proteinbiochemische Untersuchung mittels Western Blot ist eine etablierte Methode, so auch für die Zelllinie NSC34 [83]. Sie ermöglichte den Nachweis von Protein auch in geringen Mengen und semiquantitative Vergleiche zwischen spezifischen Proteinen innerhalb eines Blots. Für CL wurde beschrieben, dass Proteasen wie z.B. Calpain inhibiert

werden und CL somit den zellulären Umsatz von u.a. Zytoskelett-Proteinen hemmt [100]. Zur Bestimmung der Calpain-Aktivität wurde der etablierte Ansatz über den Vergleich der relativen Mengen der spezifischen Calpain- und Caspase-3-abhängigen Proteolyseprodukte von α II-Spectrin durchgeführt [63, 64, 96] und mit den relativen Mengen Calpain-I korreliert. Als Housekeeping-Protein kam GAPDH zum Einsatz, da die Verwendung von β -Aktin aufgrund der Calpain-inhibitorischen Komponente größere Schwankungen in Zusammenhang mit der CL-Applikation vermuten ließ. Durch die Gefahr unspezifischer Antigen-Antikörper-Reaktionen war die Korrelation zu den Zellkultur- und Immunzytochemie-Ergebnissen unbedingt notwendig. Die Ergebnisse des Western Blots sollten deshalb auch nie isoliert betrachtet werden.

5.2 Ergebnisdiskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von CL auf SZ-Fibrozyten-Kokulturen und die Motoneuron-ähnliche Zelllinie NSC34 im Hinblick auf seinen möglichen Einsatz nach Läsion peripherer Nerven untersucht. Die Hauptergebnisse dieser Untersuchungen sind: CL (i) verzögerte die Zellproliferation von SZ und NSC34-Zellen, (ii) schützte SZ gegen SGD-induzierten Zellstress, (iii) schützte NSC34-Zellen gegen OGD-induzierten Zellstress, (iv) verbesserte das SZ-Clustern, (v) beschleunigte die Wallersche Degeneration initial, (vi) verbesserte die Zelldifferenzierung von NSC34-Zellen und (vii) inhibierte Calpain.

5.2.1 Zellproliferation und -protektion

Adulte SZ bilden zwei Phänotypen aus, zum einen die myelinisierenden und zum anderen die nicht-myelinisierenden SZ. Ihre Progenitor-Zellen stammen aus der Neuralleiste und differenzieren über unreife zu adulten SZ. Bis einschließlich des Stadiums der unreifen SZ sind diese Zellen zur Proliferation befähigt [60, 85]. Eine wichtige Eigenschaft dieser Zellen besteht darin, dass der letzte Differenzierungsschritt grundsätzlich umkehrbar ist. Dies geschieht mit dem Verlust des axonalen Kontakts z.B. bei der Läsion eines peripheren Nerven oder der *in vitro*-Kultivierung [60]. Diese Reprogrammierung stellt eine wichtige Grundlage für die anschließende Wallersche Degeneration, wobei es zur Proliferation der SZ und Phagozytose von Myelinovoiden durch SZ kommt [48, 53], und für die Überbrückung der Defektstrecke durch die Büngnerschen Bänder dar, was die Fähigkeit zur Migration der SZ voraussetzt [70]. Nach erfolgreicher Wiederherstellung des axonalen Kontakts redifferenzieren die SZ und starten, je nach Phänotyp, die Remyelinisierung [25, 60, 77].

Motoneurone gehören wie die SZ im adulten Organismus zu den postmitotischen Zellen. Die Zellen der Zelllinie NSC34 besitzen jedoch durch ihre Hybridisierung mit Neuroblastom-Zellen die Möglichkeit zur Proliferation [16].

Die CL-Applikation zeigte einen anti-proliferativen Effekt für beide Zelltypen, SZ und NSC34-Zellen. SZ proliferieren nach peripheren Nervenläsionen, um ihren vielen Aufgaben gerecht werden zu können [48, 53]. Eine Proliferationshemmung durch CL erschien somit negativ und wurde im Weiteren näher untersucht.

CL enthält Peptide mit Immunreaktivität gegen IGF-1- und IGF-2-Antikörper [17], welche für SZ als Proliferationsinduktoren gelten [84]. Auf den ersten Blick steht der gefundene anti-proliferative Effekt der Literaturlage entgegen [102]. Dort wurde die Proliferation von neuronalen Stammzellen der Subventrikularzone durch vergleichbare Dosen CL erhöht. Aufgrund der Effektaufhebung nach spezifischer Inhibition des Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Akt Signalwegs wurde die Proliferationssteigerung einer vorgeschalteten Stimulation

via CL zugeschrieben [102]. Jedoch bestehen methodische Unterschiede zur vorliegenden Arbeit. Zum einen wurden hier SZ, stammend aus dem PNS, und die Zelllinie NSC34, stammend aus dem Rückenmark, anstelle von neuronalen Stammzellen aus dem Großhirn untersucht. Weiterhin wurden die neuronalen Stammzellen für 7 Tage mit einmaliger CL-Zugabe nach Präparation inkubiert [102]. In der vorliegenden Arbeit wurde CL für maximal 48 h hinzugegeben. Dabei war die Proliferationsverzögerung nur in den ersten 24 h zu erkennen.

In der Literatur finden sich auch Arbeiten, die unsere Ergebnisse unterstützen. Für CL wurde eine Komponente beschrieben, die intrazelluläre Proteasen wie Calpain inhibiert [100]. Als Ergebnis einer Calpain-Inhibition wurde weiterhin eine Reduktion der Proliferation neuronaler Stammzellen (Zelllinie NS-TGFP) beschrieben [75], was meine Ergebnisse bestätigt.

Dieser Effekt wurde darauf zurückgeführt, dass Calpain den Proliferationsinhibitor p21 spaltet, der im Zellzyklus den G1-S-Phasenübergang inhibiert [18, 75]. Somit könnte der anti-proliferative CL-Effekt durch die, aus dem Calpain-Block resultierende, Akkumulation von p21 erklärt werden. Dadurch würde der Übergang von der G1- zur S-Phase verzögert, was in meiner Arbeit durch die verminderte BrdU-Inkorporation belegt wurde.

Für die NSC34-Zellen zeigte ich zusätzlich, dass OGD die Proliferation hemmt. Dieser Effekt wurde sowohl für neurale Stammzellen [41] als auch für Astrozyten beschrieben [101]. Als mögliche Ursache wurde die Reduktion des ATP-Spiegels während der OGD diskutiert [101]. CL verstärkte den OGD-induzierten anti-proliferativen Effekt weiter. Wie oben schon diskutiert, könnte der anti-proliferative CL-Effekt mit der für CL beschriebenen Calpain-inhibierenden Komponente zusammenhängen.

Der MTT-Test zeigte für die SZ/Fibrozyten-Kokultur eine Toxizität von SGD. Die Applikation von CL veränderte dieses Phänomen nicht, obwohl ein additiver Proliferationsblock denkbar war. Das könnte als indirekter Beweis für einen protektiven CL-Effekt gewertet werden. Da in CL eine IGF-1- und IGF-2-ähnliche Komponente nachgewiesen werden konnte [17], wird die hier demonstrierte protektive Potenz von CL gegenüber SZ auch durch die Literaturlage unterstützt. So wurde gezeigt, dass IGF-2 einen protektiven Effekt auf SZ gegen den Zellstress während des Verlustes des axonalen Kontaktes bot [59].

Das Überleben des innervierenden Motoneurons ist ebenfalls eine wichtige Grundvoraussetzung für die Regeneration einschließlich der späteren axonalen Reinnervation [24]. OGD-Medium führte zu einem massiven Zelluntergang. Die Gabe von CL wirkt dem jedoch entgegen, obwohl CL unter Normbedingungen zur Verminderung der Zellzahl führt. Das spricht für einen protektiven CL-Effekt unter Stress. Dieser protektive Effekt wird durch die Literatur unterstützt. Für CL wurde bereits gezeigt, dass es cervikale Motoneurone nach Avulsionsverletzungen der Vorderwurzel vor dem Zelltod schützt [33].

5.2.2 SZ-Clustering und -adhäsion

Nach einer peripheren Nervenläsion wird eine Gewebebrücke zwischen den beiden Nervenstümpfen gebildet (Büngnersche Bänder – endoneurale Basalmembranröhren [13]). Dazu migrieren sowohl SZ aus beiden Nervenstümpfen als auch Fibrozyten und bilden distinkte Zellcluster [70]. SZ unterliegen einem extremen Zellstress nach dem Verlust des axonalen Kontakts. Auf dieser Grundlage sollte eine SZ-schützende Substanz die Bildung der Büngnerschen Bänder unterstützen. IGF-2, für das eine Immunreaktivität von CL nachgewiesen wurde, kommt hierfür in Frage, da es einen protektiven Effekt auf SZ gegen den Zellstress während des Verlustes des axonalen Kontaktes zeigte [17, 27, 59].

Die Verbesserung des SZ-Clusterings könnte ebenso durch die GDNF-ähnliche Komponente von CL vermittelt werden. Vom GDNF ist bekannt, dass es die SZ-Migration aus *N. ischiadicus*-Explantaten von neugeborenen Ratten stimuliert [17, 69]. Weiterhin hängt die Ausbildung von SZ-Cluster ab von der Translokalisierung des NCAD aus dem Zytoplasma in die Zellmembran, speziell an die SZ-SZ-Kontaktstellen [70]. Dieser Effekt wurde als Ergebnis der Stimulation des ephrin-B/Eph-B2-Signalwegs beschrieben, welcher durch die Interaktion zwischen Fibrozyt und SZ nach Läsionen peripherer Nerven aktiviert wird [70]. Während der Differenzierung der SZ wird die Expression von NCAD herunter reguliert. Nach peripheren Nervenläsionen dedifferenzieren SZ und NCAD wird wieder exprimiert [20, 70, 97]. Somit könnte auch NCAD ein mögliches Interventionsziel darstellen. In der vorliegenden Arbeit war CL in der Lage, die Translokalisierung von NCAD zu den SZ-SZ-Kontaktstellen zu unterstützen und das Ausbilden von SZ-Cluster zu unterstützen.

In Assoziation mit ischämischen Hirnläsionen wurde eine Calpain-vermittelte Spaltung des NCAD in kortikalen Zellen beschrieben [39]. Ähnliche Mechanismen erwarten wir für das PNS und es fand sich auch wirklich eine Abnahme der SZ-Clustergröße unter SGD (eine Komponente der Ischämie *in vivo*, [7]). Weiterhin konnte ich zeigen, dass das NCAD unter SGD im Zytoplasma lokalisiert war. Eine CL-Applikation unter SGD-Medium hob diese Phänomene auf: NCAD wurde wieder an den SZ-SZ Kontaktstellen gefunden und die SZ-Clustergröße nahm zu. Zumindest partiell kann dieser CL-Effekt auf die im Kapitel 5.2.1 beschriebenen Calpain-inhibierenden Fraktion des CL zurückgeführt werden.

Ein hypothetischer Mechanismus (siehe Abb. 5.2-1) für das verbesserte SZ-Clustering könnte die Translokalisierung von NCAD in Richtung der Zellmembranen durch die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration darstellen [51]. Das könnte durch die Aktivierung des GDNF family receptor α 1 (GFR α 1) erreicht werden [10, 57, 90], der auch von SZ exprimiert wird [69, 93, 94]. Andere Arbeiten zeigten in SZ die Aktivierung eines neural cell adhesion molecule (NCAM) vermittelten Signalwegs durch GDNF und GFR α 1 [38, 69]. Weiterhin wurde für diesen NCAM-abhängigen Signalweg innerhalb hippocampaler Neurone eine Koaktivierung des „fibroblast growth factor receptor“ (FGFR), die nachfolgende Aktivierung

der Phospholipase $\text{C}\gamma$ ($\text{PLC}\gamma$) und damit eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beschrieben [38, 66, 67, 72]. Diese Signaltransduktionskaskade wird in der Arbeit von Iwase et al. auch für SZ diskutiert [38]. Da CL eine GDNF-Immunreaktivität zeigt [17], scheint es damit durchaus möglich, dass dieser Weg eine Rolle für die Translokalisierung des NCAD und die daraus folgende Verbesserung des SZ-Clusterings unter CL spielt.

5.2.3 Wallersche Degeneration

SZ sind initial ein wichtiger zellulärer Bestandteil der Wallerschen Degeneration [48, 53]. Erst nach ungefähr 3 Tagen kommt es *in vivo* zur Einwanderung von Makrophagen, die im weiteren Verlauf die Phagozytose von Myelinovoiden unterstützen [24, 86, 87]. Im gewählten Modell wurde die Wallersche Degeneration der *Nn. ischiadici in vitro* untersucht, weswegen die Einwirkung von Makrophagen eine untergeordnete Rolle spielte und die Ergebnisse als Wirkung der SZ gewertet werden konnten.

Eine wichtige Grundlage für eine erfolgreiche Wallersche Degeneration stellt das Überleben von SZ im Nervenstumpf dar. Dieses ist von einer Reihe neurotropher Faktoren abhängig. Dazu gehört mit dem IGF-2 eine CL-Komponente [17, 27, 59]. Damit sollte CL das Überleben von SZ und damit die Wallersche Degeneration fördern. Weiterhin ist eine entsprechende phagozytotische Kapazität der SZ für eine erfolgreiche Wallersche Degeneration notwendig. In der Literatur wurde eine Stimulation der phagozytotischen Aktivität von neutrophilen Granulozyten in Mäusen durch CL beschrieben [4]. In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings nur eine temporäre Verbesserung der Wallerschen Degeneration aufgezeigt. Dieser Effekt könnte mit der anti-proliferativen Eigenschaft von CL zusammenhängen, die in der vorliegenden Arbeit für SZ nachgewiesen wurde. Unter diesem Aspekt würde die initial bessere Wallersche Degeneration unter CL-Applikation im zeitlichen Verlauf konterkarieren. Weiterhin könnte die Stimulation der Wallerschen Degeneration durch die ebenfalls in CL enthaltene Calpain-hemmende Komponente antagonisiert werden, da Calpain sehr wichtig für eine reguläre Wallersche Degeneration ist [54], man denke nur an das abzuräumende Zytoskelett in den Nervenfortsätzen.

5.2.4 Auswachsen von Zellfortsätzen

In Abhängigkeit vom Applikationsregime wurden in der vorliegenden Arbeit positive CL-Einflüsse auf das Neuritenwachstum von NSC34-Zellen nachgewiesen. So fand sich an DIV 4 ein signifikanter Anstieg der Neuritenlängen.

Eine solche CL-induzierte signifikante Verlängerung der Fortsätze an DIV 4 und DIV 8 wurde auch für embryonale Telencephalon-Neurone von Hühnern beschrieben [34]. Der dabei

gezeigte Langzeiteffekt an DIV 8 konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht nachgewiesen werden. Das könnte einerseits am unterschiedlichen Zelltyp liegen. Zum anderen wurde in der vorliegenden Arbeit ein wellenähnlicher Verlauf mit Neuritenretraktion gefunden, der mit dem Auswechseln des Zellmediums und dem Nährstoffverbrauch korrelierte. NSC34-Zellen weisen eine hohe basale Mitoserate auf, so dass jeweils an DIV 5 und DIV 8 ein Mediumwechsel notwendig war. In den neuronalen Primärkulturen [34] konnte hingegen bis zum DIV 8 auf einen Mediumwechsel verzichtet werden.

Und auch *in vivo* wurde für CL ein positiver Effekt auf Motoneurone beschrieben. So wurde für Avulsionsverletzungen bei Ratten nach intrathekalen CL-Applikationen neben dem o.g. verbesserten Überleben der Motoneurone auch ein besseres Auswachsen von Axonen im Vergleich zu unbehandelten aber auch zu BDNF-behandelten Tieren gezeigt [32].

Molekular könnten diese beobachteten Effekte durch die schon mehrfach erwähnte Calpain-inhibierende Fraktion des CL erklärt werden. So wurde durch Calpain-Inhibition bei neuronalen Stammzellen (Zelllinie NS-TGFP) neben der Proliferationshemmung eine bessere Differenzierung gefunden. Dabei wurde ein Rückgang Nestin-positiver neuronaler Stammzellen zu Gunsten β -III-Tubulin-positiver jugendlicher Neurone beobachtet; ein eindeutiger Hinweis auf den Verlust des Stammzellcharakters und den Beginn der neuronalen Differenzierung [75]. Das ist gut erklärbar; Calpain ist als spezifische Protease am Abbau zytoskeletaler Proteine wie z.B. Tubulin und Microtubuli-assoziiertes-Protein-2 (MAP2) beteiligt [8]. Tubulin wirkt am Aufbau von Mikrotubuli und damit auch von Axonen mit. Eine Calpain-Inhibition, in meinem Fall durch CL induziert, wird also zur Stabilisierung bis hin zum Auf-/Ausbau des Zytoskeletts in den Nervenfasern führen. Das wurde auch in anderen Arbeitsgruppen gezeigt. So fanden sich unabhängig von einer *de novo*-Synthese höhere MAP2-Level nach CL-Applikation in primären, neuronalen Telencephalonkulturen von Hühnerembryonen [99].

In der Übersichtsarbeit von Salomoni und Mitarbeitern wird weiterhin eine Verlängerung der G1-Phase als Stimulation zur Differenzierung diskutiert [74]. Damit wäre die oben diskutierte anti-proliferative Wirkung von CL ein weiterer möglicher Mechanismus, um das verbesserte Neuritenwachstum zu erklären.

Unter Diff.-Medium zeigten die NSC34-Zellen erwartbar die beste Differenzierung mit vielen und auch langen Neuriten. Eine CL-Applikation hatte hier nur sehr geringe Effekte. Ganz offensichtlich ist das Diff.-Medium in seiner Zusammensetzung optimal und darüber hinaus ein sehr guter Puffer; CL kann keine zusätzlichen Effekte erzielen.

5.2.5 Proteinbiochemische Untersuchungen

Unter dem Überbegriff „Calpain“ wird eine Familie Ca^{2+} -abhängiger, spezifischer Proteasen verstanden. Zu den Mitgliedern gehören u.a. μ -Calpain (Calpain-I) und m-Calpain (Calpain-II). Diese typischen Calpain-Isoformen besitzen eine proteolytische (ca. 80 kDa) und eine regulatorische Untereinheit (ca. 28 kDa, für eine Übersichtsarbeit siehe Goll et al. 2003 [30]). Als Substrat haben im PNS u.a. die zytoskeletalen Proteine Tubulin und Microtubuli-assoziiertes-Protein [8, 95], das Strukturprotein α II-Spectrin [82, 95] und das Adhäsionsprotein NCAD [39, 95] besondere Bedeutung. Außer diesen Zielproteinen besitzen Calpain I und II die Fähigkeit zur Autoproteolyse. Dabei wird die große Untereinheit initial auf ein Molekulargewicht von 76 kDa proteolysiert. Nach längerer Autoproteolyse ist auch dieses Fragment nicht mehr nachweisbar und es sind nur noch Fragmente mit einem Molekulargewicht unter 60 kDa nachzuweisen [68].

Das Strukturprotein Spectrin setzt sich hauptsächlich als Heterotetramer aus den Isoformen der zwei Untereinheiten α - und β -Spectrin zusammen. Die Untereinheit α -Spectrin wird in zwei Isoformen eingeteilt – α I- und α II-Spectrin. Während α I-Spectrin vor allem als Strukturprotein innerhalb der Erythrozytenmembran bekannt ist, kommt α II-Spectrin in allen anderen Zelltypen vor. Dabei spielt α II-Spectrin u.a. eine Rolle für die Stabilität der Plasmamembran als Bestandteil des Zytoskeletts (für eine Übersichtsarbeit siehe [55]). Als Proteolyseprodukt durch die Proteasen Calpain [82, 95] und Caspase-3 [64, 96] entstehen in nicht-erythrozytären Zellen neben dem intakten α II-Spectrin (240 kDa) drei spezifische Banden. Dabei stellt die Bande bei 150 kDa das gemeinsame Proteolyseprodukt durch Calpain und Caspase-3 [63, 64, 96], die Bande bei 145 kDa das spezifische Calpain-abhängige Proteolyseprodukt [63, 64] und die Bande bei 120 kDa das spezifische Proteolyseprodukt durch Caspase-3 [64, 96] dar.

Wie in der Übersichtsarbeit von Goll et. al. diskutiert, liegt das meiste Calpain in einer inaktivierten Form vor. Für den Aktivitätsgrad des Calpains spielen mehrere Regulationsmechanismen eine Rolle: z.B. die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, der Phosphorylierungsgrad des Calpains und die Expression des endogenen Calpain-Inhibitors Calpastatin [30]. Daher ist die exprimierte Calpain-Menge nur unzureichend aussagekräftig, wenn es um die Calpain-Aktivität geht; der Nachweis des α II-Spectrin-Umsatzes schafft Abhilfe.

Unter CL-Applikation im Normmedium wurde mehr Calpain-I innerhalb der 80 kDa-Bande gefunden. Bei einer kontinuierlichen CL-Applikation konnte sogar in der 76 kDa-Bande mehr Calpain-I nachgewiesen werden. Eine größere Menge an Calpain-I fand sich auch in der Immunzytochemie. Allerdings wurden für α II-Spectrin sowohl eine Reduktion der 150 kDa-, als auch der 145 kDa-Bande gefunden. Die 120 kDa-Bande hingegen zeigte keinen signifikanten Unterschied. Das lässt auf einen Calpain-assoziierten Effekt schließen; die

Caspase-vermittelte Apoptose scheint zweitrangig zu sein. Die Reduktion der α II-Spectrin-Proteolyse bei gleichzeitiger Erhöhung der Calpain-I-Mengen im Western Blot deutet auf eine signifikante Inhibition der Calpain-Aktivität durch CL hin. Dieses Ergebnis passt sehr gut zu der schon mehrfach angesprochenen Calpain-inhibitorischen Komponente des CL [100].

Unter OGD-Medium zeigte sich ebenfalls eine Reduktion der 150 kDa- und 145 kDa-Bande des α II-Spectrins bei erhöhter Calpain-I-Expression im Western Blot. Dieses Ergebnis steht auf den ersten Blick entgegen der aktuellen Literaturlage, da durch OGD eine Induktion der Calpain-Aktivität mit nachfolgender Erhöhung der α II-Spectrin-Proteolyseprodukte zu erwarten wäre [61]. In der Literatur sind jedoch auch Hinweise zu finden, dass die Calpain-vermittelte Proteolyse des α II-Spectrins durch seine Phosphorylierung mittels der Tyrosinkinase Src gehemmt werden kann [65]. Im Zusammenhang mit Anoxie wurde wiederum eine Aktivierung von Src Familie Kinasen (SFK) beschrieben [98]. Wie oben bereits ausgeführt, beeinflusst auch OGD die Phosphorylierung [41, 101]. Damit kann vermutet werden, dass OGD mit einer Phosphorylierung des α II-Spectrins einhergeht, wodurch seine Proteolyse durch Calpain eingeschränkt würde.

Bei der Kombination von CL-Applikation und OGD zeigte sich für die Calpain-I-Expression ein ähnliches Bild. Allerdings fand sich jetzt ein Anstieg der 150 kDa-Bande des α II-Spectrins und damit ein Hinweis auf eine gesteigerte Calpain-Aktivität. Dieses Ergebnis steht im klaren Widerspruch zur von uns vertretenen These von der Calpain-Inhibition durch CL. Eine mögliche Erklärung wäre, dass CL die src-vermittelte Phosphorylierung des α II-Spectrins aufhebt. Dass CL die Phosphorylierung von Zytoskelettelementen wie dem Tau-Protein reduzieren kann, ist bereits gut belegt [56].

Unter Diff.-Medium zeigte sich insgesamt weniger Calpain-Aktivität bei gleichbleibenden Calpain-I-Mengen und wieder kein CL-Effekt. Dieses Ergebnis unterstützt das oben diskutierte Primat der differenzierungsförderlichen Wirkung des Mediums, das sicherlich auch die Unterdrückung der Calpain-Aktivität beinhaltet [18, 75].

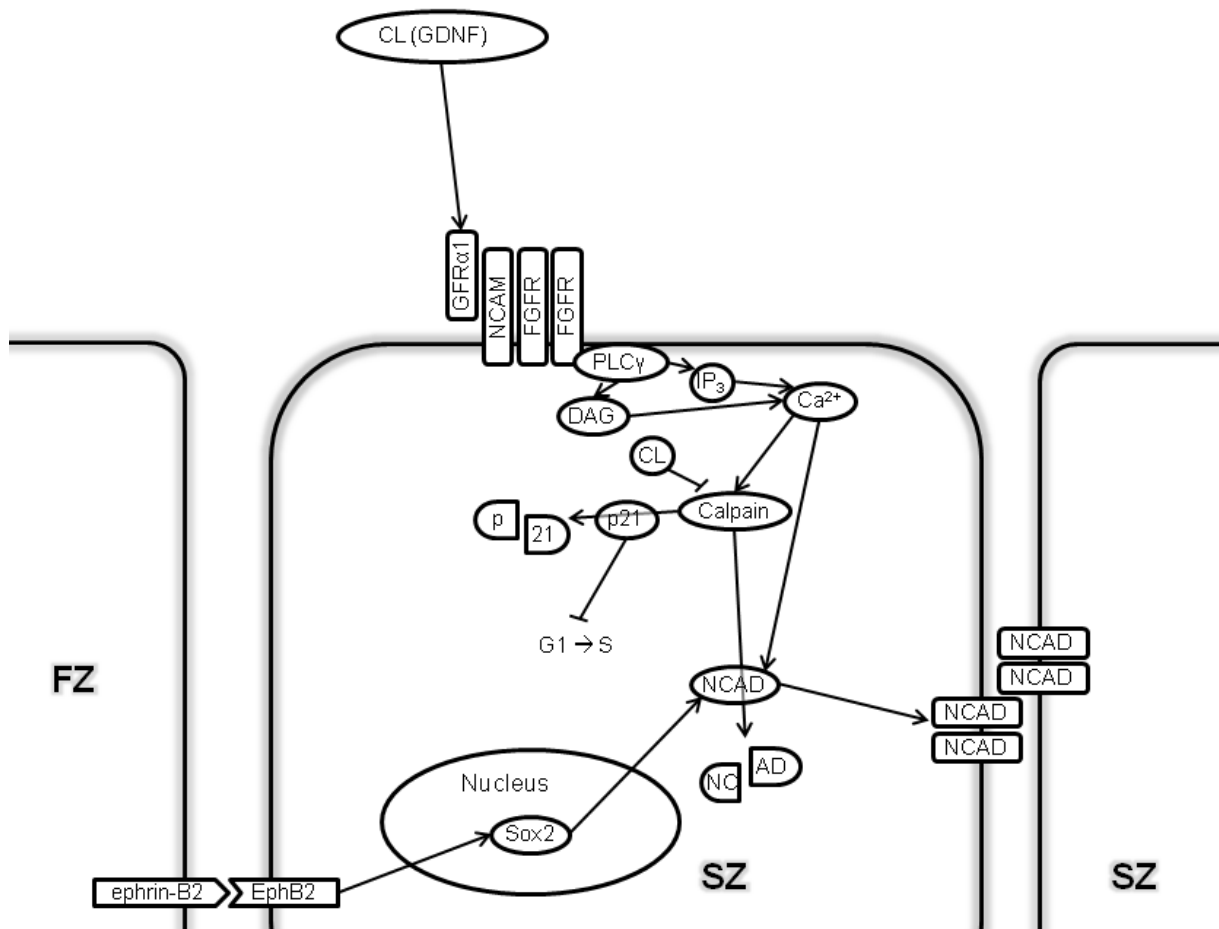


Abb. 5.2-1 Arbeitsmodell zur Signaltransduktion und zum CL-Einfluss in SZ

Nach einer peripheren Nervenläsion kommen SZ mit Fibrozyten (hier: FZ) in Kontakt. Die Sox2-abhängige Signalkaskade durch Bindung von ephrin-B2 und EphB2 führt zur Translokation von NCAD aus dem Zytoplasma in die Zellmembran zu den SZ-SZ-Kontaktstellen und steigert somit deren Adhäsion, Voraussetzung für die Ausbildung der Büngnerschen Bänder.

Die GDNF-ähnliche CL-Komponente bindet an den GFRα1-Rezeptor und aktiviert über die Mitbeteiligung von NCAM und dem FGFR die PLCγ-Signalkaskade, die intrazellulären Ca²⁺-Konzentration wird erhöht und die Translokation von NCAD aus dem Zytoplasma zur Zellmembran unterstützt. Mit zeitlicher Verzögerung führt der erhöhte Ca²⁺-Spiegel jedoch zur Calpain-Aktivierung, in deren Folge NCAD gespalten und inaktiviert wird. Die Calpain-inhibitorische CL-Komponente verhindert das Spalten von NCAD und steigert damit weiter die Adhäsion. Weiterhin verhindert diese Komponente das Spalten des Proliferationsinhibitors p21, stabilisiert ihn damit und arretiert die SZ so in der G1-Phase des Zellzyklus. DAG = Diacylglycerin; IP₃ = Inositoltrisphosphat
erstellt nach [18, 38, 39, 51, 66, 67, 69, 70, 72]

5.3 Ausblick

In dieser Arbeit standen mit den SZ und den Motoneuronen die zwei Hauptakteure der peripheren Nervenregeneration im Mittelpunkt. Aber natürlich sind auch die anderen Gliazelltypen – Astro-, Oligodendro- und Mikroglia – an diesen komplexen Vorgängen beteiligt. Deshalb wurden nach Abfassung der vorliegenden Arbeit Pilotstudien zum CL-Effekt auf die Zelllinien C6, OLN-96 und BV2 mit gleichen experimentellen Ansätzen durchgeführt.

Die Gliom-Zelllinie C6 wurde als Modell für Astrozyten untersucht. Hier fanden wir, ganz im Gegensatz zu den bisherigen Ergebnissen, eine CL-induzierte Zellproliferation. Über die Ursachen dieser Differenz können wir momentan nur spekulieren. Sehr wahrscheinlich spielt dabei die Tatsache eine wichtige Rolle, dass C6-Zellen eine reine Tumor-Zelllinie sind. SZ sind Primärzellen und NSC34-Zellen sind „nur“ Hybridom-Zellen, enthalten also auch Primärzellkomponenten. Als Modell für Oligodendrozyten kamen OLN-93-Zellen zum Einsatz. Hierbei waren die Proliferations-relevanten CL-Effekte denen bei SZ und NSC34-Zellen vergleichbar. Die CL-Wirkung auf Mikroglia wurde an einer BV2-Zelllinie untersucht, wobei auch hier Ergebnisse erzielt wurden, die im Einklang mit denen für SZ und NSC34-Zellen stehen. Damit fällt die C6-Zelllinie in Bezug auf seine CL-Sensitivität komplett aus dem von uns evaluierten CL-Wirkungsrahmen. Da auch die OLN-93-Zellen, sie wurden aus Primärzellkulturen subkultiviert, und die BV2-Zellen, generiert aus retroviral immortalisierter primärer Mikroglia, keine reinen Tumor-Zelllinien repräsentieren, werden wir in diese Richtung weiterforschen. Es steht zu befürchten, dass CL in Bezug auf Tumorzellen eine fördernde Wirkung haben könnte. Das wiederum würde seinen Einsatz zur Förderung der Nervenregeneration zumindest bei Patienten mit Tumorerkrankungen stark einschränken und muss deshalb gezielt und gründlich abgeklärt werden.

6 Zusammenfassung

Die Regenerationsprozesse nach Verletzung peripherer Nerven sind zwar grundsätzlich möglich, verlaufen allerdings nicht mit der bestmöglichen Effizienz.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den CL-Effekten auf Regenerations-relevante Zellfunktionen zweier Hauptakteure im spinalmotorischen System, den SZ und den Motoneuronen, *in vitro*. In dieser Arbeit wurde als Modell für die SZ bewusst eine SZ-Fibrozyten-Kokultur gewählt, da diese ähnliche Bedingungen wie nach Neurotmesis simuliert. Als Modell für Motoneurone kam hier die Hybridzelllinie NSC34 zum Einsatz.

CL war in der Lage, die **Proliferation** beider Zelltypen signifikant zu hemmen, was im Hinblick auf eine Regeneration auf den ersten Blick negativ erscheint. Stellt man jedoch die verringerte Proliferation mit einer zunehmenden Differenzierung bzw. Spezialisierung in Beziehung, ändert sich die Aussage grundlegend.

Für eine erfolgreiche Regeneration sind die SZ-vermittelte Wallersche Degeneration und die Ausbildung Büngnerscher Bänder wichtige Prozesse, die von der SZ-Spezialisierung abhängen. Bei der **Wallerischen Degeneration** wird der distale Nervenstumpf bereinigt und zum Einwachsen der Axone aus dem proximalen Stumpf vorbereitet. Während der initialen Phase dedifferenzieren die SZ und phagozytieren Myelinovoide deutlich bevor nach einigen Tagen Makrophagen einwandern und diese Prozesse unterstützen. In unserem *in vitro*-Modell wurde eine temporäre Verbesserung der Wallerschen Degeneration durch CL nachgewiesen, was als Hinweis auf eine verbesserte Spezialisierung gewertet werden kann.

Die **Büngnerschen Bänder** stellen eine Gewebebrücke zwischen den beiden Nervenstümpfen durch u.a. migrierende SZ dar und bilden somit eine Leitschiene für das wieder einwachsende Axon. Unser *in vitro*-Modell zeigte eine Verbesserung der SZ-Adhäsion durch CL und suggeriert damit auch hier einen positiven Effekt in Bezug auf die relevante SZ-Spezialisierung.

In den Experimenten mit der **NSC34-Zelllinie** zeigte sich eine CL-vermittelte Verbesserung des Neuritenwachstums, eines der markantesten Zeichen für neuronale Differenzierung. Auch die Tatsache, dass CL im Differenzierungsmedium keine weitere Verbesserung bewirken konnte, macht daran keine Abstriche – das Differenzierungsmedium war von vornherein optimal gewählt.

Eine weitere wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Regeneration stellt das **Überleben des Motoneurons** dar. Der MTT-Test belegte protektive CL-Effekte gegenüber OGD, womit CL eine auch diesbezüglich förderliche Eigenschaft erkennen ließ.

Bezüglich möglicher Ansatzpunkte für die beschriebenen CL-Effekte gaben die **Western Blot**-Experimente erste Hinweise. Sie zeigten, dass CL die Expression der Ca^{2+} -abhängigen Protease Calpain und die damit verbundene Proteolyse des Zytoskelettproteins α II-Spectrin beeinflusst.

Obwohl die hier aufgezeigten Daten insgesamt auf positive CL-Effekte in Bezug auf Prozesse der peripheren Nervenregeneration hinweisen, sind weitere Experimente, vor allem an organotypischen Modellen bzw. *in vivo*-Studien, notwendig, bevor an einen klinischen Gebrauch gedacht werden kann.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Alvarez XA, Cacabelos R, Sampedro C, Aleixandre M, Linares C, Granizo E, Doppler E und Moessler H: *Efficacy and safety of Cerebrolysin in moderate to moderately severe Alzheimer's disease: results of a randomized, double-blind, controlled trial investigating three dosages of Cerebrolysin*. Eur J Neurol. 18(1). 59–68 (2011).
- [2] Aszmann OC, Korak KJ, Kropf N, Fine E, Aebischer P und Frey M: *Simultaneous GDNF and BDNF application leads to increased motoneuron survival and improved functional outcome in an experimental model for obstetric brachial plexus lesions*. Plast Reconstr Surg. 110(4). 1066–1072 (2002).
- [3] Azzouz M, Ralph GS, Storkebaum E, Walmsley LE, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Carmeliet P und Mazarakis ND: *VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model*. Nature. 429(6990). 413–417 (2004).
- [4] Belokrylov GA, Popova OI, Derevnina ON und Molchanova IV: *[Ambiguous effect of large and small doses of amino acid preparations on the immune response and phagocytosis in mice]*. Biull Eksp Biol Med. 117(5). 500–501 (1994).
- [5] Berger A, Hierner R, Rohde U und Shen ZL: *Diagnostik und Therapie peripherer Nervenverletzungen. Das "Integrative Therapiekonzept"*. Unfallchirurg. 102(1). 59–68 (1999).
- [6] Berk C und Sabbagh MN: *Successes and failures for drugs in late-stage development for Alzheimer's disease*. Drugs Aging. 30(10). 783–792 (2013).
- [7] Bialik S, Cryns VL, Drincic A, Miyata S, Wollowick AL, Srinivasan A und Kitsis RN: *The mitochondrial apoptotic pathway is activated by serum and glucose deprivation in cardiac myocytes*. Circ Res. 85(5). 403–414 (1999).
- [8] Billger M, Wallin M und Karlsson JO: *Proteolysis of tubulin and microtubule-associated proteins 1 and 2 by calpain I and II. Difference in sensitivity of assembled and disassembled microtubules*. Cell Calcium. 9(1). 33–44 (1988).
- [9] Boillée S, Vande Velde C und Cleveland DW: *ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors*. Neuron. 52(1). 39–59 (2006).
- [10] Borrello MG, Alberti L, Arighi E, Bongarzone I, Battistini C, Bardelli A, Pasini B, Piutti C, Rizzetti MG, Mondellini P, Radice MT und Pierotti MA: *The full oncogenic activity of Ret/ptc2 depends on tyrosine 539, a docking site for phospholipase Cgamma*. Mol Cell Biol. 16(5). 2151–2163 (1996).
- [11] Boyd JG und Gordon T: *Glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor sustain the axonal regeneration of chronically axotomized motoneurons in vivo*. Exp Neurol. 183(2). 610–619 (2003).
- [12] Calderón-Martínez D, Garavito Z, Spinel C und Hurtado H: *Schwann cell-enriched cultures from adult human peripheral nerve: a technique combining short enzymatic dissociation and treatment with cytosine arabinoside (Ara-C)*. J Neurosci Methods. 114(1). 1–8 (2002).
- [13] Campbell WW: *Evaluation and management of peripheral nerve injury*. Clin Neurophysiol. 119(9). 1951–1965 (2008).

- [14] Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD und Mitchell JB: *Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing*. Cancer Res. 47(4). 936–942 (1987).
- [15] Casella GT, Wieser R, Bunge RP, Margitich IS, Katz J, Olson L und Wood PM: *Density dependent regulation of human Schwann cell proliferation*. Glia. 30(2). 165–177 (2000).
- [16] Cashman NR, Durham HD, Blusztajn JK, Oda K, Tabira T, Shaw IT, Dahrouge S und Antel JP: *Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons*. Dev Dyn. 194(3). 209–221 (1992).
- [17] Chen H, Tung YC, Li B, Iqbal K und Grundke-Iqbal I: *Trophic factors counteract elevated FGF-2-induced inhibition of adult neurogenesis*. Neurobiol Aging. 28(8). 1148–1162 (2007).
- [18] Chen Z, Knutson E, Kurosky A und Albrecht T: *Degradation of p21cip1 in cells productively infected with human cytomegalovirus*. J Virol. 75(8). 3613–3625 (2001).
- [19] Cho GW, Kim GY, Baek S, Kim H, Kim T, Kim HJ und Kim SH: *Recombinant human erythropoietin reduces aggregation of mutant Cu/Zn-binding superoxide dismutase (SOD1) in NSC-34 cells*. Neurosci Lett. 504(2). 107–111 (2011).
- [20] Crawford AT, Desai D, Gokina P, Basak S und Kim HA: *E-cadherin expression in postnatal Schwann cells is regulated by the cAMP-dependent protein kinase a pathway*. Glia. 56(15). 1637–1647 (2008).
- [21] Durham HD, Dahrouge S und Cashman NR: *Evaluation of the spinal cord neuron X neuroblastoma hybrid cell line NSC-34 as a model for neurotoxicity testing*. Neurotoxicology. 14(4). 387–395 (1993).
- [22] Ebewe Arzneimittel G.m.b.H. (Unterach, AT): *Verwendung einer Mischung von Peptiden und Aminosäuren für die Prophylaxis oder Behandlung von Dementia*. Patent DE69126563T2, 05.02.1998.
- [23] Eggett CJ, Crosier S, Manning P, Cookson MR, Menzies FM, McNeil CJ und Shaw PJ: *Development and characterisation of a glutamate-sensitive motor neurone cell line*. J Neurochem. 74(5). 1895–1902 (2000).
- [24] Fansa H und Keilhoff G: *Faktoren, die die Regeneration peripherer Nerven beeinflussen*. Handchir Mikrochir plast Chir. 35(02). 72–82 (2003).
- [25] Fawcett JW und Keynes RJ: *Peripheral nerve regeneration*. Annu Rev Neurosci. 13. 43–60 (1990).
- [26] Frey M und Gamper UN: *Allgemeines zur Therapie peripherer Nervenläsionen*. In: Mumenthaler M, Schliack H und Frey M (eds.): *Läsionen peripherer Nerven und radikuläre Syndrome*. pp. 93–107. Thieme, Stuttgart [u.a.]. 9. Auflage. 2007.
- [27] Frostick SP, Yin Q und Kemp GJ: *Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration*. Microsurgery. 18(7). 397–405 (1998).
- [28] Gastl R und Ludolph AC: *Amyotrophic lateral sclerosis*. Nervenarzt. 78(12). 1449–1457 (2007).

- [29] George EB, Glass JD und Griffin JW: *Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels*. J Neurosci. 15(10). 6445–6452 (1995).
- [30] Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W und Cong J: *The calpain system*. Physiol Rev. 83(3). 731–801 (2003).
- [31] Gutmann B, Hutter-Paier B, Skofitsch G, Windisch M und Gmeinbauer R: *In vitro models of brain ischemia: the peptidergic drug cerebrolysin protects cultured chick cortical neurons from cell death*. Neurotox Res. 4(1). 59–65 (2002).
- [32] Haninec P, Dubový P, Sámal F, Houstava L und Stejskal L: *Reinnervation of the rat musculocutaneous nerve stump after its direct reconnection with the C5 spinal cord segment by the nerve graft following avulsion of the ventral spinal roots: a comparison of intrathecal administration of brain-derived neurotrophic factor and Cerebrolysin*. Exp Brain Res. 159(4). 425–432 (2004).
- [33] Haninec P, Houst'ava L, Stejskal L und Dubový P: *Rescue of rat spinal motoneurons from avulsion-induced cell death by intrathecal administration of IGF-I and Cerebrolysin*. Ann Anat. 185(3). 233–238 (2003).
- [34] Hartbauer M, Hutter-Paier B und Windisch M: *Effects of Cerebrolysin on the outgrowth and protection of processes of cultured brain neurons*. J Neural Transm. 108(5). 581–592 (2001).
- [35] Hedlund E, Hefferan MP, Marsala M und Isacson O: *Cell therapy and stem cells in animal models of motor neuron disorders*. Eur J Neurosci. 26(7). 1721–1737 (2007).
- [36] Huang Y, Liu J, Wang Lz, Zhang Wy und Zhu Xz: *Neuroprotective effects of cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib against toxicity of LPS-stimulated macrophages toward motor neurons*. Acta Pharmacol Sin. 26(8). 952–958 (2005).
- [37] Hutter-Paier B, Steiner E und Windisch M: *Cerebrolysin protects isolated cortical neurons from neurodegeneration after brief histotoxic hypoxia*. J Neural Transm Suppl. 53. 351–361 (1998).
- [38] Iwase T, Jung CG, Bae H, Zhang M und Soliven B: *Glial cell line-derived neurotrophic factor-induced signaling in Schwann cells*. J Neurochem. 94(6). 1488–1499 (2005).
- [39] Jang YN, Jung YS, Lee SH, Moon CH, Kim CH und Baik EJ: *Calpain-mediated N-cadherin proteolytic processing in brain injury*. J Neurosci. 29(18). 5974–5984 (2009).
- [40] Kaiser M, Maletzki I, Hülsmann S, Holtmann B, Schulz-Schaeffer W, Kirchhoff F, Bähr M und Neusch C: *Progressive loss of a glial potassium channel (KCNJ10) in the spinal cord of the SOD1 (G93A) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis*. J Neurochem. 99(3). 900–912 (2006).
- [41] Kalluri HSG, Eickstaedt J und Dempsey RJ: *Oxygen glucose deprivation inhibits the growth and ERK phosphorylation of neural progenitor cells in vitro*. Neurosci Lett. 426(3). 145–148 (2007).
- [42] Kaspar BK, Lladó J, Sherkat N, Rothstein JD und Gage FH: *Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model*. Science. 301(5634). 839–842 (2003).
- [43] Keilhoff G: *nNOS deficiency-induced cell proliferation depletes the neurogenic reserve*. Neurosci Lett. 505(3). 248–253 (2011).

- [44] Keilhoff G, Schild L und Fansa H: *Minocycline protects Schwann cells from ischemia-like injury and promotes axonal outgrowth in bioartificial nerve grafts lacking Wallerian degeneration*. Exp Neurol. 212(1). 189–200 (2008).
- [45] Keilhoff G, Wiegand S und Fansa H: *Vav deficiency impedes peripheral nerve regeneration in mice*. Restor Neurol Neurosci. 30(6). 463–479 (2012).
- [46] Klinke R, Pape HC und Silbernagl S: Physiologie. Thieme, Stuttgart. 5. Auflage. 2005.
- [47] Lang W, Stadler CH, Poljakovic Z, Fleet D und Lyse Study Group: *A prospective, randomized, placebo-controlled, double-blind trial about safety and efficacy of combined treatment with alteplase (rt-PA) and Cerebrolysin in acute ischaemic hemispheric stroke*. Int J Stroke. 8(2). 95–104 (2013).
- [48] LeBlanc AC und Poduslo JF: *Axonal modulation of myelin gene expression in the peripheral nerve*. J Neurosci Res. 26(3). 317–326 (1990).
- [49] Lee SK und Wolfe SW: *Peripheral nerve injury and repair*. J Am Acad Orthop Surg. 8(4). 243–252 (2000).
- [50] Lehmann TN und Kalbhenn T: *Traumatische Schädigungen der Wurzeln und peripheren Nerven*. In: Wallesch CW, Dietz V und Unterberg A (eds.): Neurotraumatologie. pp. 196–211. Thieme, Stuttgart. 1. Auflage. 2005.
- [51] Letourneau PC, Roche FK, Shattuck TA, Lemmon V und Takeichi M: *Interactions of Schwann cells with neurites and with other Schwann cells involve the calcium-dependent adhesion molecule, N-cadherin*. J Neurobiol. 22(7). 707–720 (1991).
- [52] Li N, Zhang X, Song Q, Su R, Zhang Q, Kong T, Liu L, Jin G, Tang M und Cheng G: *The promotion of neurite sprouting and outgrowth of mouse hippocampal cells in culture by graphene substrates*. Biomaterials. 32(35). 9374–9382 (2011).
- [53] Liu HM, Yang LH und Yang YJ: *Schwann cell properties: 3. C-fos expression, bFGF production, phagocytosis and proliferation during Wallerian degeneration*. J Neuropathol Exp Neurol. 54(4). 487–496 (1995).
- [54] Ma M, Ferguson TA, Schoch KM, Li J, Qian Y, Shofer FS, Saatman KE und Neumar RW: *Calpains mediate axonal cytoskeleton disintegration during Wallerian degeneration*. Neurobiol Dis. 56. 34–46 (2013).
- [55] Machnicka B, Grochowalska R, Bogusławska DM, Sikorski AF und Lecomte MC: *Spectrin-based skeleton as an actor in cell signaling*. Cell Mol Life Sci. 69(2). 191–201 (2012).
- [56] Masliah E und Díez-Tejedor E: *The pharmacology of neurotrophic treatment with Cerebrolysin: brain protection and repair to counteract pathologies of acute and chronic neurological disorders*. Drugs Today (Barc). 48 Suppl A. 3–24 (2012).
- [57] Mason I: *The RET receptor tyrosine kinase: activation, signalling and significance in neural development and disease*. Pharm Acta Helv. 74(2-3). 261–264 (2000).
- [58] Masuhr KF und Neumann M: Neurologie. Das duale Lehrbuch. Thieme, Stuttgart. 6. Auflage. 2007.

- [59] Meier C, Parmantier E, Brennan A, Mirsky R und Jessen KR: *Developing Schwann cells acquire the ability to survive without axons by establishing an autocrine circuit involving insulin-like growth factor, neurotrophin-3, and platelet-derived growth factor-BB*. J Neurosci. 19(10). 3847–3859 (1999).
- [60] Mirsky R, Woodhoo A, Parkinson DB, Arthur-Farraj P, Bhaskaran A und Jessen KR: *Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation*. J Peripher Nerv Syst. 13(2). 122–135 (2008).
- [61] Montero M, Poulsen FR, Noraberg J, Kirkeby A, van Beek J, Leist M und Zimmer J: *Comparison of neuroprotective effects of erythropoietin (EPO) and carbamylerythropoietin (CEPO) against ischemia-like oxygen-glucose deprivation (OGD) and NMDA excitotoxicity in mouse hippocampal slice cultures*. Exp Neurol. 204(1). 106–117 (2007).
- [62] Mosmann T: *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods. 65(1-2). 55–63 (1983).
- [63] Nath R, Raser KJ, Stafford D, Hajimohammadreza I, Posner A, Allen H, Talanian RV, Yuen P, Gilbertsen RB und Wang KK: *Non-erythroid alpha-spectrin breakdown by calpain and interleukin 1 beta-converting-enzyme-like protease(s) in apoptotic cells: contributory roles of both protease families in neuronal apoptosis*. Biochem J. 319 (Pt 3). 683–690 (1996).
- [64] Newcomb-Fernandez JK, Zhao X, Pike BR, Wang KK, Kampfl A, Beer R, DeFord SM und Hayes RL: *Concurrent assessment of calpain and caspase-3 activation after oxygen-glucose deprivation in primary septo-hippocampal cultures*. J Cereb Blood Flow Metab. 21(11). 1281–1294 (2001).
- [65] Nicolas G, Fournier CM, Galand C, Malbert-Colas L, Bournier O, Kroviarski Y, Bourgeois M, Camonis JH, Dhermy D, Grandchamp B und Lecomte MC: *Tyrosine phosphorylation regulates alpha II spectrin cleavage by calpain*. Mol Cell Biol. 22(10). 3527–3536 (2002).
- [66] Nielsen J, Gotfryd K, Li S, Kulahin N, Soroka V, Rasmussen KK, Bock E und Berezin V: *Role of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)-neural cell adhesion molecule (NCAM) interactions in induction of neurite outgrowth and identification of a binding site for NCAM in the heel region of GDNF*. J Neurosci. 29(36). 11360–11376 (2009).
- [67] Niethammer P, Delling M, Sytnyk V, Dityatev A, Fukami K und Schachner M: *Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuritogenesis*. J Cell Biol. 157(3). 521–532 (2002).
- [68] Nishimura T und Goll DE: *Binding of calpain fragments to calpastatin*. J Biol Chem. 266(18). 11842–11850 (1991).
- [69] Paratcha G, Ledda F und Ibáñez CF: *The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands*. Cell. 113(7). 867–879 (2003).
- [70] Parrinello S, Napoli I, Ribeiro S, Digby PW, Fedorova M, Parkinson DB, Doddrell RDS, Nakayama M, Adams RH und Lloyd AC: *EphB signaling directs peripheral nerve regeneration through Sox2-dependent Schwann cell sorting*. Cell. 143(1). 145–155 (2010).

- [71] Pinkernelle J, Calatayud P, Goya GF, Fansa H und Keilhoff G: *Magnetic nanoparticles in primary neural cell cultures are mainly taken up by microglia*. BMC Neurosci. 13. 32 (2012).
- [72] Povlsen GK, Ditlevsen DK, Berezin V und Bock E: *Intracellular signaling by the neural cell adhesion molecule*. Neurochem Res. 28(1). 127–141 (2003).
- [73] Rasband WS: *ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1997-2012*, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. 2012.
- [74] Salomoni P und Calegari F: *Cell cycle control of mammalian neural stem cells: putting a speed limit on G1*. Trends Cell Biol. 20(5). 233–243 (2010).
- [75] Santos DM, Xavier JM, Morgado AL, Solá S und Rodrigues CMP: *Distinct regulatory functions of calpain 1 and 2 during neural stem cell self-renewal and differentiation*. PLoS One. 7(3). e33468 (2012).
- [76] Schauer E, Wronski R, Patockova J, Moessler H, Doppler E, Hutter-Paier B und Windisch M: *Neuroprotection of cerebrolysin in tissue culture models of brain ischemia: post lesion application indicates a wide therapeutic window*. J Neural Transm. 113(7). 855–868 (2006).
- [77] Scherer S und Salzer J: *Axon-Schwann cell interactions during peripheral nerve degeneration and regeneration*. In: Jessen K und Richardson W (eds.): Glial Cell Development: Basic Principles and Clinical Relevance. pp. 299–330. Oxford University Press. 2. Auflage. 2001.
- [78] Schröder J: *Histopathologie der Läsionen und der Regenerationsvorgänge im peripheren Nervensystem*. In: Mumenthaler M, Schliack H und Frey M (eds.): Läsionen peripherer Nerven und radikuläre Syndrome. pp. 13–22. Thieme, Stuttgart [u.a.]. 9. Auflage. 2007.
- [79] Seljeseth YM, Vollset SE und Tysnes OB: *Increasing mortality from amyotrophic lateral sclerosis in Norway?* Neurology. 55(9). 1262–1266 (2000).
- [80] Shen ZL, Lassner F, Becker M, Walter GF, Bader A und Berger A: *Viability of cultured nerve grafts: An assessment of proliferation of Schwann cells and fibroblasts*. Microsurgery. 19(8). 356–363 (1999).
- [81] Shim S und Ming GL: *Roles of channels and receptors in the growth cone during PNS axonal regeneration*. Exp Neurol. 223(1). 38–44 (2010).
- [82] Siman R, Baudry M und Lynch G: *Brain fodrin: substrate for calpain I, an endogenous calcium-activated protease*. Proc Natl Acad Sci U S A. 81(11). 3572–3576 (1984).
- [83] Skorupa A, King MA, Aparicio IM, Dussmann H, Coughlan K, Breen B, Kieran D, Concannon CG, Marin P und Prehn JHM: *Motoneurons secrete angiogenin to induce RNA cleavage in astroglia*. J Neurosci. 32(15). 5024–5038 (2012).
- [84] Sondell M, Fex-Svenningsen A und Kanje M: *The insulin-like growth factors I and II stimulate proliferation of different types of Schwann cells*. Neuroreport. 8(13). 2871–2876 (1997).
- [85] Stewart HJ, Morgan L, Jessen KR und Mirsky R: *Changes in DNA synthesis rate in the Schwann cell lineage in vivo are correlated with the precursor–Schwann cell transition and myelination*. Eur J Neurosci. 5(9). 1136–1144 (1993).

- [86] Stoll G, Griffin JW, Li CY und Trapp BD: *Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation*. J Neurocytol. 18(5). 671–683 (1989).
- [87] Stoll G, Jander S und Myers RR: *Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation*. J Peripher Nerv Syst. 7(1). 13–27 (2002).
- [88] Stoll G und Müller HW: *Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights*. Brain Pathol. 9(2). 313–325 (1999).
- [89] Sunderland S: *A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function*. Brain. 74(4). 491–516 (1951).
- [90] Takahashi M: *The GDNF/RET signaling pathway and human diseases*. Cytokine Growth Factor Rev. 12(4). 361–373 (2001).
- [91] Tegenthoff M, Sindern E, Vorgerd M und Kotterba S: *Krankheiten des Nervensystems*. In: Fritze J und Mehrhoff F (eds.): Die ärztliche Begutachtung. pp. 235–260. Springer Berlin Heidelberg. 2012.
- [92] Trepel M: Neuroanatomie. Urban & Fischer, München [u.a.]. 3. Auflage. 2004.
- [93] Trupp M, Belluardo N, Funakoshi H und Ibáñez CF: *Complementary and overlapping expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), c-ret proto-oncogene, and GDNF receptor- α indicates multiple mechanisms of trophic actions in the adult rat CNS*. J Neurosci. 17(10). 3554–3567 (1997).
- [94] Trupp M, Scott R, Whittemore SR und Ibáñez CF: *Ret-dependent and -independent mechanisms of glial cell line-derived neurotrophic factor signaling in neuronal cells*. J Biol Chem. 274(30). 20885–20894 (1999).
- [95] Vosler PS, Brennan CS und Chen J: *Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration*. Mol Neurobiol. 38(1). 78–100 (2008).
- [96] Wang KK, Posmantur R, Nath R, McGinnis K, Whitton M, Talanian RV, Glantz SB und Morrow JS: *Simultaneous degradation of α - and β -spectrin by caspase 3 (CPP32) in apoptotic cells*. J Biol Chem. 273(35). 22490–22497 (1998).
- [97] Wanner IB, Guerra NK, Mahoney J, Kumar A, Wood PM, Mirsky R und Jessen KR: *Role of N-cadherin in Schwann cell precursors of growing nerves*. Glia. 54(5). 439–459 (2006).
- [98] Weilingner NL, Tang PL und Thompson RJ: *Anoxia-induced NMDA receptor activation opens pannexin channels via Src family kinases*. J Neurosci. 32(36). 12579–12588 (2012).
- [99] Wronski R, Kronawetter S, Hutter-Paier B, Crailsheim K und Windisch M: *A brain derived peptide preparation reduces the translation dependent loss of a cytoskeletal protein in primary cultured chicken neurons*. J Neural Transm Suppl. 59. 263–272 (2000).
- [100] Wronski R, Tompa P, Hutter-Paier B, Crailsheim K, Friedrich P und Windisch M: *Inhibitory effect of a brain derived peptide preparation on the Ca^{++} -dependent protease, calpain*. J Neural Transm. 107(2). 145–157 (2000).

- [101] Yung HW und Tolkovsky AM: *Erasure of kinase phosphorylation in astrocytes during oxygen-glucose deprivation is controlled by ATP levels and activation of phosphatases.* J Neurochem. 86(5). 1281–1288 (2003).
- [102] Zhang C, Chopp M, Cui Y, Wang L, Zhang R, Zhang L, Lu M, Szalad A, Doppler E, Hitzl M und Zhang ZG: *Cerebrolysin enhances neurogenesis in the ischemic brain and improves functional outcome after stroke.* J Neurosci Res. 88(15). 3275–3281 (2010).

8 Danksagung

An allererster Stelle bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Gerburg Keilhoff. Obwohl in der Arbeitsgruppe schon einige Doktoranden beschäftigt waren, vertraute Sie mir dieses spannende Thema an und übernahm meine Betreuung. Vielen Dank für die vielen konstruktiven Gespräche, die jederzeit offene Tür und stete Motivation.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. med. Hisham Fansa für die große Unterstützung, konstruktive Kritik, die Bereitstellung des Cerebrolinsins und den Beistand während meines ersten Kongressvortrages in Wien.

Ein weiterer Dank gilt dem Institutsdirektor Prof. Dr. rer. nat. Klaus-Dieter Fischer für den uneingeschränkten Zugang zu allen Ressourcen des Instituts.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Zellbiologie für das allzeit offene Ohr und die Bereitschaft, mir bei Problemen zu helfen. Im Besonderen danke ich Leona Bück, Karla Klingenberg und Susanne Bonifatius für die große Hilfsbereitschaft während meiner experimentellen Phase und das große Engagement für mein Projekt. Weiterhin danke ich Gudrun Schmidt, die immer noch eine Ratte für mich fand.

Besonders möchte ich mich bei Josephine Pinkernelle für die viele Zeit bedanken, die sie dafür opferte, um mir zusammen mit Leona Bück die grundlegenden Zellkulturtechniken und die Präparation der SZ-Fibrozyten-Kokultur beizubringen.

Ein großer Dank geht an Michael Steiner, der mir während meiner ersten Schritte am Durchflusszytometer und an den Mikroskopen mit Rat und Tat weit über Feierabend zur Seite stand, sowie während der Inkubationspause meinen Hang zum Coffein teilte.

Ein besonderer Dank geht an Dr. med. Stefanie Jörgens, die sowohl meine Freude bei gelungenen Experimenten teilte, als mir auch bei diversen Rückschlägen beistand. Vielen Dank für dein großes Verständnis für mein wissenschaftliches Interesse und dein großes Durchhaltevermögen.

Abschließend danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mir immer ein offenes Ohr boten und mich ständig motivierten.

9 Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**„Der Effekt Cerebrolysins® auf die Regenerations- und Degenerationsprozesse
im spinalmotorischen System *in vitro*“**

im Institut für Biochemie und Zellbiologie

mit Unterstützung durch Frau Prof. Dr. rer. nat. Gerburg Keilhoff

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 20.05.2015

Benjamin Lucas

10 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Benjamin Lucas
geboren am 22.10.1987
in Eisleben

Schulische und universitäre Ausbildung

1994 – 1998	Grundschule Ahlsdorf
1998 – 2000	Sekundarschule „Gustav Heinemann“ Ahlsdorf
2000 – 2007	Gottfried-August-Bürger-Gymnasium Benndorf Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,0)
2008 – 2010	Vorklinisches Studium im Fachbereich Humanmedizin an der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg
2010	Abschluss des 1. Abschnitts der ärztlichen Prüfung (Note: 1,5)
2010 – 2014	Klinisches Studium im Fachbereich Humanmedizin an der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg
2014	Abschluss des 2. Abschnitts der ärztlichen Prüfung

Famulaturen und Praktisches Jahr

08/2011	Famulatur Innere Medizin, Helios Klinikum Hettstedt
08/2011	Famulatur Unfallchirurgie, Helios Klinikum Hettstedt
09/2011	Famulatur Radiologie, Universitätsklinikum Magdeburg
09/2011	Famulatur Anästhesie, Universitätsklinikum Magdeburg
03/2012	Praxisfamulatur Handchirurgie, Dr. med. A. Mahlfeld, Magdeburg
08/2012	Famulatur Unfallchirurgie, BG Klinik Bergmannstrost, Halle/Saale
09/2012	Famulatur Allgemeinmedizin, Dipl.-Med. E.-M. Geisler, Helbra
08/2013 – 12/2013	PJ Orthopädie, Pfeiffersche Stiftungen, Magdeburg
12/2013 – 03/2014	PJ Chirurgie, Klinikum Magdeburg gGmbH
03/2014 – 07/2014	PJ Innere Medizin, AMEOS Klinikum Schönebeck

Wehrersatzdienst

09/2007 – 05/2008 Zivildienst im Kreisbehindertenverband Eisleben e.V.

Benjamin Lucas
Magdeburg, 20.05.2015

11 Anhang

11.1 Chemikalien und Antikörper

Tab. 11.1-1 Verwendete Chemikalien, Materialien und fertige Lösungen

Material	Hersteller bzw. Bezugsquelle
3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Acetylthiocholiniodid	Fluka, Sigma Aldrich, München, Deutschland
APC BrdU Kit	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Bromodesoxyuridin (1000x)	Boehringer, Ingelheim, Deutschland
BSA	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Cerebrolysin®	Ever Neuro Pharma, Unterach, Österreich
Ciprobay	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Collagenase	Sigma Aldrich, München, Deutschland
DePeX	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
D-Glucose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethyl Sulfoxid Emplura®	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dispase	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
DMEM / F12	Gibco® Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
DMEM High Glucose	Gibco® Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
DMEM No-Glucose pyruvatfrei	Gibco® Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Entwicklerlösung G153	Agfa HealthCare GmbH, Bonn, Deutschland
Ethanol 96 %	Otto Fischar GmbH und Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
fetales Kälberserum	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Fixierlösung Rapid Fixer G354	Agfa HealthCare GmbH, Bonn, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Boehringer, Ingelheim, Deutschland
Hyaluronidase	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Hyperfilm™ ECL 18x24 cm	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
Immu-Mount	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Kaliumhexacyanoferrat(II)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kupfersulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Laminin	Sigma Aldrich, München, Deutschland
MEM-NEAA	Gibco® Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Natriumtetraborat	Sigma Aldrich, München, Deutschland

Material	Hersteller bzw. Bezugsquelle
Nitrozellulosemembran Hyobond-C extra	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Phosphat gepufferte Salzlösung	Gibco® Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Pierce® BCA Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, USA
Pierce® ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, USA
Pierce® Polyacrylamidgel Precise™ Protein Gel (Gradient 4 - 20 %) 15 wells	Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, USA
Polysorbat 20 (TWEEN® 20)	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Proteaseinhibitor	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
Roti®-Load 1; reduzierend 4x	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Saccharose	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Salzsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SERVAGel™ TG PRiME™ 4-12 % 12 wells	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Streptomycin/Penicillin	Gibco® Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
TRIS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ponceau S	Sigma Aldrich, München, Deutschland

Tab. 11.1-2 Antikörperliste

primärer Antikörper	Ver- dünnung	Hersteller	sekundärer Antikörper	Ver- dünnung	Hersteller
Polyclonal Anti-S100	1:100	Dako, Hamburg	anti-rabbit Alexa 540 bzw. anti-rabbit Alexa 488	beide 1:500	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Monoclonal Anti-BrdU	1:100	AbD Serotec, Düsseldorf Deutschland	anti-rat Alexa 540	1:500	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Monoclonal Anti-Calpain I	Western Blot: 1:750	Millipore GmbH, Schwalbach	Polyclonal HRP- conjugated goat anti- mouse IgG	1:5000	Dianova, Hamburg, Deutschland
	Immun- zytochemie: 1:100		anti-mouse Alexa 488	1:500	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Monoclonal Anti-NCAD	1:500	BD Bioscience, Heidelberg	anti-mouse Alexa 488	1:500	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

primärer Antikörper	Verdünnung	Hersteller	sekundärer Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Monoclonal Anti-GAPDH	1:500	Millipore GmbH, Schwalbach	Polyclonal HRP-conjugated goat anti-mouse IgG	1:5000	Dianova, Hamburg, Deutschland
Monoclonal Anti-Spectrin alpha chain (nonerythroid), clone AA6	1:1000	Millipore GmbH, Schwalbach	Polyclonal HRP-conjugated goat anti-mouse IgG	1:5000	Dianova, Hamburg, Deutschland
Monoclonal Anti-Fibronectin	1:500	Millipore GmbH, Schwalbach	anti-mouse Alexa 488	1:500	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Monoclonal anti-SMI 31	1:5000	Covance Inc. München, Deutschland	anti-mouse Alexa 488	1:500	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Polyclonal Neuronal Class III β -Tubulin	1:1000	Covance Inc. München, Deutschland	anti-rabbit Alexa 540	1:500	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

11.2 Plastik-, Glas- und Zellkulturmaterial

Tab. 11.2-1 Verwendete Plastik-, Glas- und Zellkulturmaterialien

Material	Hersteller bzw. Bezugsquelle
25 cm ² Zuchtflaschen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
35 mm Petrischalen	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, Deutschland
75 cm ² Zuchtflaschen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
96 well Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Deckgläschen 25 mm	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Eppendorf Safe Lock Reaktionsgefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Kanülen 18G ; 23G	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Objekträger	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Pipettenspitzen 10 μ l; 200 μ l 1000 μ l	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reagenz Reservoir 50 ml steril	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Spritzen 5 ml, 10 ml, 25 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Messpipetten cellstar 10 ml, 25 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Material	Hersteller bzw. Bezugsquelle
Zentrifugenröhrchen Typ Falcon 15 ml; 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

11.3 Geräte

Tab. 11.3-1 Verwendete Geräte

Gerätename und Beschreibung	Hersteller bzw. Bezugsquelle
Biohit 12-Kanalpipetten 50 µl, 300 µl	Sartorius Weighing Technology GmbH, Rosbach vor der Höhe Deutschland
CO ₂ Inkubator Forma Series II Water Jacket	Thermo Scientific, Wilmington USA
CO ₂ Inkubator Heraeus 6000	Heraeus Holding GmbH, Hanau Deutschland
CO ₂ -Inkubator C200 (für OGD Experimente)	Labotect GmbH, Rosdorf Deutschland
Durchflusszytometer FACSCanto II	BD Bioscience, Heidelberg Deutschland
Elektrophoresekammer Mighty Small 250	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA
Epson Perfection 4870 Photo	EPSON Deutschland GmbH, Meerbusch, Deutschland
Feinpipetten Research 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 5000 µl	Eppendorf AG, Hamburg Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axiolmager.M1	Carl Zeiss AG, Jena Deutschland
Gefrierschränke -20 °C	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss Deutschland
Gefrierschränke -80 °C	Thermo Scientific, Wilmington USA
Homogenisierer Xenox MHX/E	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
inverses Phasenkontrast-Mikroskop DMI 3000	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar Deutschland
Kryomikrotom CM3050S	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar Deutschland
Kühlschränke	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss Deutschland
Laborzentrifuge UEC Force IV	Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau Deutschland
Mikroskop DMI6000B	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar Deutschland
Multimode-Mikroplatten Reader Infinite M200	Tecan, Crailsheim Deutschland
Neubauer Zählkammer	Fein-Optik, Blankenburg Deutschland
Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach Deutschland

Gerätename und Beschreibung	Hersteller bzw. Bezugsquelle
Röntgenfilm Entwicklmaschine AGFA Curix 60	Agfa HealthCare GmbH, Bonn, Deutschland
Stereomikroskop S6E	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar Deutschland
Sterilwerkbänke Hera Guard und HeraSafe KS12	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Stromversorgung EV215	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortex	Scientific Industries Inc., New York USA
Waagen	Sartorius Weighing Technology GmbH, Rosbach vor der Höhe Deutschland
Western Blotkammer TE 22 Mini Transfer Tank	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA
Zentrifuge Biofuge 15R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge für Durchflusszytometrie Multifuge X3R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland