

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR NEUROLOGIE
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**GLIALER UND NEURONALER ZELLERSATZ IM GEHIRN UND ZERVIKALEN
RÜCKENMARK NACH THORAKALER RÜCKENMARKVERLETZUNG AM
TIERMODELL DER RATTE**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Birthe Kierdorf

2011

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR NEUROLOGIE
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**GLIALER UND NEURONALER ZELLERSATZ IM GEHIRN UND ZERVIKALEN
RÜCKENMARK NACH THORAKALER RÜCKENMARKVERLETZUNG AM
TIERMODELL DER RATTE**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Birthe Kierdorf

2011

Dekan:	Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Norbert Weidner
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Peter Angele
Tag der mündlichen Prüfung:	9. August 2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Neuroanatomische Grundlage	4
2.1.1 Steuerung der Willkürmotorik	4
2.1.2 Orte der Neurogenese	4
2.2 Klinische Aspekte des spinalen Traumas	5
2.2.1 Epidemiologische und sozioökonomische Aspekte	5
2.2.2 Pathophysiologie des Rückenmarktraumas	6
2.2.3 Klinisches Erscheinungsbild	7
2.2.4 Etablierte Therapieverfahren	7
2.3 Experimentelle Therapieansätze des spinalen Traumas	8
2.3.1 Applikation von Wachstumsfaktoren	8
2.3.2 Zellersatz und Biomaterialien	8
2.3.3 Neutralisierung von Wachstumsinhibitoren	9
2.4 Spontane Erholung nach spinalem Trauma bei Mensch und Nager	9
2.4.1 Plastizitätsphänomene durch axonale und / oder synaptische Reorganisation	10
2.4.2 Spontaner Zellersatz im Rückenmark	10
2.4.3 Zellersatz im Gehirn	11
2.5 Fragestellung	12
3 Material und Methoden	14
3.1 Versuchstiere	14
3.2 Experimentelles Design	14
3.2.1 Spinale Kontusion	14
3.2.3 Verhaltenstest	15
3.3 Gewebepräparation	17
3.4 Immunhistochemische Untersuchungen	17
3.5 Quantitative Analyse	19

3.6	Analyse der Zelldifferenzierung	21
3.7	Statistik.....	22
4	Ergebnisse	23
4.1	Spontane Erholung der Lokomotion nach spinaler Kontusion am Tiermodell der Ratte	23
4.2	Zellersatz im Gehirn nach spinalem Trauma	24
4.2.1	Zellüberleben und Zelldifferenzierung in der SVZ	24
4.2.1.1	Neurogenese in der SVZ	25
4.2.1.2	Gliogenese in der SVZ	26
4.2.2	Zellüberleben und Zelldifferenzierung im CC	27
4.2.2.1	Neurogenese im CC	28
4.2.2.2	Gliogenese im CC	28
4.2.3	Zellüberleben und Zelldifferenzierung im MK	29
4.2.3.1	Neurogenese im MK.....	30
4.2.3.2	Gliogenese im MK	30
4.3	Zellersatz im zervikalen Rückenmark nach thorakalem Trauma	31
4.3.1	Zellüberleben im Zentralkanal des zervikalen Rückenmarks	31
4.3.1.1	Gliogenese im Zentralkanal des zervikalen Rückenmarks	32
4.3.2	Zellüberleben in der wS / gS des zervikalen Rückenmarks	33
4.3.2.1	Gliogenese in der wS / gS des zervikalen Rückenmarks	33
5	Diskussion	35
	Abkürzungsverzeichnis.....	III
	Abbildungsverzeichnis	V
	Tabellenverzeichnis.....	VI
	Literaturverzeichnis	VII
	Danksagung	XIII
	Curriculum Vitae	XIV
	Betreuung der Dissertation	XV
	Eigenständigkeitserklärung.....	XVI

1 Zusammenfassung

Nach einer traumatischen Querschnittlähmung können durchtrennte Axone nicht regenerieren. Trotzdem kann es, insbesondere bei Patienten mit inkompletter Schädigung des Rückenmarks, zu einer spontanen funktionellen Erholung kommen. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind bisher nicht geklärt. Basierend auf der Tatsache, dass das erwachsene (adulte) zentrale Nervensystem in der Lage ist, neue Nervenzellen (Neurone) und Gliazellen aus einem Pool an endogenen Vorläuferzellen zu generieren (Neurogenese/Gliogenese) und dass neurale Stammzellen in läsionierte Bereiche des zentralen Nervensystems rekrutiert werden, soll in der vorliegenden Studie herausgefunden werden, ob ein endogener Zellersatz (Neuro- oder Gliogenese) im Gehirn (Subventrikulärzone, Corpus Callosum, Motorkortex) oder in bestimmten Rückenmarksbereichen entfernt von der Läsion ein strukturelles Korrelat für die spontane funktionelle Erholung darstellt. Ratten zeigen auch nach traumatischer Querschnittverletzung das Phänomen der spontanen funktionellen Erholung, das heißt, nach kurzer Zeit können sie ihre zuvor gelähmten Hinterläufe wieder bewegen und funktionell einsetzen.

Erwachsene weibliche Ratten erhielten eine standardisiert durchgeführte Kontusion des thorakalen Rückenmarks. Nicht läsionierte Ratten dienten als Kontrollgruppe. In den darauffolgenden 6 Wochen wurde wöchentlich die Bewegungsfähigkeit der Tiere mit einer semiquantitativen Skala erfasst. Post mortem wurden die Tiere strukturell hinsichtlich Zellproliferation und Zelldifferenzierung in der Subventrikulärzone, dem Corpus Callosum, dem Motorkortex und dem zervikalen Rückenmark mittels Immunhistochemie untersucht.

Schon wenige Tage nach Kontusion mit daraus resultierender Paraplegie der Hinterläufe begannen die Ratten, sich spontan zu erholen, das heißt ihre gelähmten Hinterläufe zunehmend funktionell relevant wieder einzusetzen. Ab dem 36. postoperativen Tag war ein nahezu intaktes Bewegungsverhalten zu beobachten.

Strukturell ergab sich auf der Ebene des neuronalen Ersatzes in den untersuchten Regionen des Gehirns (Subventrikulärzone, Corpus Callosum, Motorkortex) lediglich ein Hinweis auf vermehrten Nervenzellersatz in der Subventrikulärzone. Hingegen wurden signifikant mehr gliale Zellen im zervikalen Rückenmark gefunden. Hier ist es möglich, dass der Ersatz degenerierter Oligodendroglia, die auch weit ent-

fernt von einer Rückenmarkläsion absterben, zumindest partiell zur spontanen funktionellen Erholung beigetragen hat.

2 Einleitung

Bei einer traumatischen Rückenmarkschädigung handelt es sich um ein dramatisches Krankheitsbild aus traumatologischer und neurologischer Sicht. Eine entsprechende Schädigung führt zur inkompletten bis kompletten Durchtrennung des Rückenmarks, die sich klinisch in einem Querschnittsyndrom mit mehr oder weniger kompletter Lähmung der Extremitäten, Sensibilitätsausfall und vegetativen Ausfällen manifestiert. Da das Rückenmarksgewebe unwiederbringlich zugrunde geht, kommt es beim Menschen zu keiner spontanen Restitution. Klinisch anwendbare regenerationsfördernde therapeutische Verfahren existieren bis zum heutigen Tag nicht.

Warum ist diese schwere funktionelle Beeinträchtigung nicht spontan umkehrbar? Zum einen kommt es zu einem Gewebeuntergang des Rückenmarks im Bereich der Verletzung, der nicht adäquat ersetzt werden kann. Im Gegensatz zu einer Hautverletzung, bei der entsprechende Epithelzellen ersetzt werden und auf diesem Weg die Haut regeneriert, kann das abgestorbene Rückenmarksgewebe des Menschen nicht ersetzt werden, das heißt, untergegangene Nervenzellen (Neurone) und gliale Stütz-zellen (Astro- und Oligodendroglia) werden nicht oder nur in unzureichendem Maß ersetzt. Betroffene Neurone sind nicht mehr in der Lage, ihre durchtrennten Axonprojektionen wieder aussprossen zu lassen und in der Folge ursprüngliche Zielneurone zu re-innervieren. Zum anderen ist neben der fehlenden Regenerationsbereitschaft der Neurone beziehungsweise deren Degeneration das wachstumsinhibierende Milieu im Bereich der Rückenmarkläsion für die mangelnde axonale Aussprossung verantwortlich (Tuszynski and Kordower, 1999).

Trotz aller Widrigkeiten kommt es beim Menschen wie auch bei Ratten, vor allem nach inkompletter Rückenmarkläsion, zumindest zu einer partiellen Erholung. Zugrunde liegende Mechanismen der spontanen Erholung sind unklar.

Da im Bereich der Läsion, wie beschrieben, kein ausreichender Zellersatz stattfindet, soll hier untersucht werden, ob entfernt von der thorakalen Rückenmarkverletzung (Motorkortex, subkortikale Strukturen, zervikales Rückenmark) Zellersatz stattfindet, der ein Korrelat der beobachteten spontanen funktionellen Erholung darstellen könnte.

Ein möglicher Kompensationsmechanismus stellt die sogenannte **adulte Neurogenese** dar, die im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht werden soll. In den letzten 10 bis 15 Jahren konnte nachgewiesen werden, dass auch beim adulten

Säugetier kontinuierlicher Zellersatz von Gliazellen (Gliogenese) und Nervenzellen = Neuronen (Neurogenese) stattfindet. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es nun, zu untersuchen, ob Neurogenese und/oder Gliogenese in Bereichen, in denen Zelluntergang nach spinalem Trauma passiert, einen Kompensationsmechanismus für die beobachtete spontane funktionelle Erholung der Ratte darstellen. Sollte ein entsprechender Mechanismus nachweisbar sein, könnte dies die Grundlage für einen regenerativen Therapieansatz beim Menschen darstellen.

2.1 Neuroanatomische Grundlage

2.1.1 Steuerung der Willkürmotorik

Willkürlich gesteuerte Bewegungen nehmen ihren Ursprung im Motorkortex (MK). Dort liegen bestimmte Motoneurone, sogenannte (sog.) Betz'sche Riesenzellen (1. Motoneuron), deren Axone durch die Capsula interna, den Hirnstamm und das Rückenmark zu motorischen Vorderhornzellen (2. Motoneuron) auf segmentalem Niveau projizieren. Das 2. Motoneuron innerviert letztendlich das Effektororgan – die quergestreifte Skelettmuskulatur. Diese Axone sind im kortikobulbären Trakt (Projektion zu motorischen Hirnnervenkernen) und dem kortikospinalen Trakt (Projektion zu motorischen Vorderhornzellen im Rückenmark) zusammengefasst. Die dadurch gesteuerte Willkürmotorik wird durch das extrapyramidale System (Stammganglien, Nucleus ruber, Formatio Reticularis) moduliert (Brosamle and Schwab, 1997; Hermanns, 2001; Klapka, 2003; Trepel, 2004). Innerhalb des Rückenmarks sind unterschiedliche Rückenmarksegmente durch sog. propriospinale Axonprojektionen verschaltet.

2.1.2 Orte der Neurogenese

Im adulten Gehirn findet Neurogenese außer im Hippokampus vor allem (v.a.) im Bereich der Subventrikulärzone (SVZ), die an die lateralen Wände der Seitenventrikel grenzt, statt (Alvarez-Buylla et al., 2000; Conover and Allen, 2002). Hier entstehende unreife neuronale Vorläuferzellen, sog. Neuroblasten, wandern über den rostralen migratorischen Strom bis in den Bulbus olfactorius, um dort in reife Neurone zu differenzieren. In veröffentlichten Studien konnte gezeigt werden, dass neugeborene Neurone nicht nur zu einem entsprechenden Ersatz im Bulbus olfactorius beitragen. Nach experimentell und ischämisch bedingter Neuronendegeneration in La-

mina V und VI des MK differenzierten endogene neurale Vorläuferzellen zu Neuronen und wanderten in die geschädigten Areale (Magavi et al., 2000; Nakatomi et al., 2002). Nach selektiver Läsion von Betz'schen Riesenzellen mit konsekutivem Zelltod konnte gezeigt werden, dass in der SVZ neu entstandene Neurone über das Corpus Callosum (CC) in den MK migrieren und von dort Axonprojektionen in das zervikale Rückenmark aussenden (Chen et al., 2004). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass Neurone tatsächlich spezifisch ersetzt werden können.

2.2 Klinische Aspekte des spinalen Traumas

2.2.1 Epidemiologische und sozioökonomische Aspekte

Die Inzidenz akuter traumatischer Rückenmarkläsionen liegt in industrialisierten Staaten bei 10 bis 30 Fällen pro 1 Million Einwohner pro Jahr. Die Prävalenz in der Bundesrepublik Deutschland beträgt circa (ca.) 500 Fälle pro 1 Million Einwohner (Masuhr and Neumann, 2005; Dietz et al., 2008). Rückenmarkverletzungen betreffen v.a. junge Erwachsene (Durchschnittsalter 40 Jahre), in einem Verhältnis von drei zu eins zwischen Männern und Frauen. Rund die Hälfte aller spinalen Traumen ist durch Verkehrsunfälle bedingt, ein weiteres Viertel durch Stürze. Die übrigen 25 % sind hauptsächlich Sportverletzungen zuzuschreiben (Masuhr and Neumann, 2005). Die Konsequenzen einer Rückenmarkverletzung hängen von der Lage und Schwere der Verletzung ab, so dass in unterschiedlichem Ausmaß Tetra- oder Paraparese mit kompletter oder inkompletter Lähmung resultieren. Bedingt durch das überwiegend junge Durchschnittsalter der in der Regel voll erwerbsfähigen jungen Patienten sind neben der nicht unerheblichen psychosozialen Belastung der Verletzten und ihrer Familien beträchtliche volkswirtschaftliche Ausfälle zu beklagen. Die volkswirtschaftliche Auswirkung wird durch die nicht wesentlich eingeschränkte Lebenserwartung bei aufwendiger Rehabilitation noch verstärkt (Berkowitz, 1993). Die Kosten im Gesundheitswesen auf Grund spinaler Traumen (Krankenhausaufenthalte, ärztliche/medizinische Versorgung, häusliche/langfristige Pflege) werden unterschiedlich hoch angegeben. Im Mittel betragen sie pro Patient mit komplettem spinalen Trauma 309.320 US-Dollar (ca. 245.000 Euro) im ersten Jahr und in den Folgejahren jährlich 38.500 US-Dollar (ca. 30.500 Euro). Bei Patienten mit inkomplettem spinalen Trauma betragen die Kosten durchschnittlich 130.300 US-Dollar (ca. 103.220 Euro) im ersten

Jahr und 9060 US-Dollar (ca. 7.170 Euro) jährlich in den Folgejahren (Dryden et al., 2005; Priebe et al., 2007).

2.2.2 Pathophysiologie des Rückenmarktraumas

In den meisten Fällen verursacht ein stumpfes Trauma, zum Beispiel (z.B.) durch einen Verkehrsunfall, eine Wirbelfraktur mit Dislokation von Knochenfragmenten in den Wirbelkanal und damit eine Kompression des Rückenmarks. Zusätzlich zu dieser mechanischen Komponente führen sekundäre Mechanismen, z.B. ischämische oder hämorrhagische Prozesse, zu einer Durchtrennung langer ascendierender und descendierender Axonprojektionen im Rückenmark. Diese Prozesse führen zu einem sofortigen Absterben von Oligodendro- und Astroglia im Bereich der Läsion mit Ausbildung einer zystischen Läsion (Syrinx) (Grossman et al., 2001; Zai and Wrathall, 2005). In der chronischen Verletzungsphase kommt es zu einem anhaltenden Zelltod vorwiegend glialer Zellen (Astroglia, Oligodendroglia) in Bereichen des Rückenmarks, die rostral und kaudal an die Läsion angrenzen (Kao et al., 1977). Das Absterben der Oligodendrozyten im Verlauf führt zu einer Demyelinisierung, so dass selbst noch intakte Axone keine adäquate Nervenleitung mehr aufbauen können (Bunge et al., 1997; Dewar et al., 2003; Vroemen, 2006). Neben Veränderungen im Bereich des Rückenmarks finden auch in entfernten Arealen Umbauprozesse statt. So kommt es nach Durchtrennung des kortikospinalen Traktes auf Rückenmarksniveau zum Absterben der dazugehörigen Neurone (Pyramidenzellen) im MK. Dort sterben innerhalb von 14 Tagen nach Läsion bis zu 50 % der Neurone ab (Hains et al., 2003).

Auf molekularer Ebene tragen Entzündungsvorgänge, Aktivierung/Einwanderung von Mikroglia, Makrophagen und Leukozyten sowie fibrogliale Narbenbildung, die Anwesenheit myelin-assoziierten wachstumsinhibierender Moleküle und der Mangel an wachstumsfördernden Faktoren zur anhaltenden strukturellen und funktionellen Schädigung bei (Schwab and Bartholdi, 1996; Grill et al., 1997). Eine Hochregulation endogener Wachstumsinhibitoren (z.B. Nogo-A: Protein der Oligodendrozyten-Myelinscheide, Chondritinsulfat-Proteoglykan: Komponente der extrazellulären Matrix) limitiert die Plastizität und das Ausmaß funktioneller Erholung nach spinalem Trauma (Caroni and Schwab, 1988; Diaz-Martinez and Velasco, 2009).

2.2.3 Klinisches Erscheinungsbild

In Abhängigkeit von der Schädigungshöhe (zervikal, thorakal, lumbal, sakral) kommt es zu einer Tetraparese (in 46 % der Fälle) oder Paraparese (in 52 % der Fälle) mit entsprechenden sensiblen und vegetativen Ausfällen (Kraus et al., 1996; Dietz, 2001). Eine Verletzung im zervikalen Rückenmark unterbricht Axonprojektionen zu den oberen und unteren Extremitäten und führt zu sensiblen, motorischen und vegetativen Defiziten in allen vier Extremitäten. Eine Schädigung ab dem Thorakalmark kaudalwärts führt zu entsprechenden Ausfällen der Beine. Bei der kompletten Rückenmarkschädigung fallen sensible, motorische und vegetative Funktionen unterhalb der Läsion komplett aus. Eine funktionell relevante Erholung tritt hier in der Regel nicht auf. Im Gegensatz dazu sind sensible, motorische und vegetative Funktionen bei einem inkompletten Trauma unterhalb der Läsion zumindest teilweise noch erhalten (Schurch and Dietz, 2005; Vroemen, 2006; Dawodu, 2007). Diese Patienten zeigen oft eine partielle Erholung, das heißt (d.h.), durch intensive neurorehabilitative Maßnahmen (Physiotherapie, Ergotherapie, neurourologische Versorgung) kann der Patient motorische Funktionen (Gehen, Stehen), Sensibilität sowie Stuhl- und Harnkontinenz wiedererlangen.

2.2.4 Etablierte Therapieverfahren

Nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie wird zur Akutbehandlung der akuten traumatischen Rückenmarkschädigung durch Wirbelkörperfraktur, diskoligamentäre Instabilität oder eine traumatische Diskushernie mit Para-/Tetraparese folgendes Vorgehen empfohlen: Die akute traumatische und nicht-traumatische Querschnittlähmung erfordert initial eine intensivmedizinische Überwachung, da sie zu kardiovaskulären, pulmonalen und gastrointestinalen Komplikationen führen kann. Dazu zählen Kontrolle der Vitalkapazität, Schmerzmedikation, Thromboembolieprophylaxe, Kontrolle neurologischer Ausfälle, kontrollierte Blasen-drainage und Stuhlgangsentleerung sowie Dekubitusprophylaxe. Bei isolierter traumatischer Rückenmarkschädigung soll eine hochdosierte Kortikosteroidgabe dem medullärem Ödem entgegenwirken. Hierzu wird Methylprednisolon innerhalb von 8 Stunden nach dem Trauma verabreicht (Dietz et al., 2008). Auf Grund möglicher Nebenwirkungen der hochdosierten Kortikosteroidgabe (besonders pulmonal) und eventuell unzureichenden Effekts wird dieses Schema nur bei isolierten Rücken-

markverletzungen empfohlen, jedoch nicht bei Polytrauma-Patienten (Hurlbert, 2000).

Bei nachweisbarer Kompression des Rückenmarks soll eine rasche chirurgische Dekompression erfolgen. Ein absolutes Zeitfenster für diese therapeutische Maßnahme ist bisher nicht nachgewiesen. Bei Instabilität besteht die Wahl zwischen operativer Stabilisierung oder konservativer Lagerungsbehandlung (Extensionsbehandlung) (Dietz et al., 2008).

Der Schwerpunkt der Therapie liegt bisher auf rehabilitativen Maßnahmen. Durch passive und aktive physiotherapeutische Übungen sollen verbliebene motorische Fähigkeiten erhalten und Komplikationen wie z.B. Kontrakturen, Fehlhaltung und Fehlbelastung vermieden werden (Dietz, 2001).

2.3 Experimentelle Therapieansätze des spinalen Traumas

2.3.1 Applikation von Wachstumsfaktoren

Eine Substitution von Wachstumsfaktoren soll die spontane Plastizität unterstützen und zur strukturellen und funktionellen Erholung nach spinalem Trauma führen (Weidner and Tuszynski, 2002). Nach inkomplettem Rückenmarktrauma kompensieren die intakt gebliebenen absteigenden Axonprojektionen durch Kollateralbildung zu den unterbrochenen Axonen die funktionellen Defizite und tragen so zur spontanen funktionellen Erholung bei. Wachstumsfaktoren, d.h. Proteine, die neuronales Überleben, axonales Wachstum und synaptische Plastizität fördern, beeinflussen die Nervenregeneration sowohl während der Entwicklung als auch nach Läsionen. Beispielsweise sei der Wachstumsfaktor Neurotrophin-3 (NT-3) genannt. NT-3 fördert die kollaterale Aussprossung kortikospinaler Projektionen und in der Folge eine funktionelle Verbesserung nach Rückenmarkläsion bei Ratten (Grill et al., 1997). Die Applikation der Wachstumsfaktoren muss lokal erfolgen, da bei systemischer Verwendung das Nebenwirkungsspektrum zu groß ist.

2.3.2 Zellersatz und Biomaterialien

Der irreversible Verlust des Rückenmarkparenchyms (Neurone, Astroglia, Oligodendroglia) führt zur Ausbildung einer zystischen Läsion im unmittelbaren Bereich des Traumas sowie in weiter rostral gelegenen Arealen. Diese muss überbrückt werden, damit durchtrennte Axone wieder zu ihren Zielneuronen aussprossen können und

eine Remyelinisierung verletzter Axone geschehen kann. Verschiedene Zelltypen wie Fibroblasten, olfaktorische Hüllzellen, Schwannzellen und neurale Stammzellen können als Baugerüst zur Überbrückung des Defekts, als Leitstrukturen für regenerierende Axone oder als Ausgangssubstanz zur Differenzierung von Astro- und Oligodendroglia dienen (Tuszynski et al., 1994; Xu et al., 1995; Ramon-Cueto et al., 2000; Pfeifer et al., 2004). Astroglia sezerniert Wachstumsfaktoren, die das Auswachsen von Axonen und Synapsenbildung induzieren; Oligodendroglia vermag beschädigte Axone zu remyelinisieren (Pfeifer et al., 2006; Vroemen et al., 2007).

Biomaterialien wie Alginat oder Agarose sowie synthetisch hergestellte Polymere (Polyvinylchloride, Poly α -Hydroxy Säuren) können die axonale Regeneration fördern. Zum Beispiel beeinflussen Alginat das Ein- und Auswachsen läsionierter Axone und induzieren zudem eine hochspezifische Innervation zu deren ursprünglichen Zielneuronen (Friedman et al., 2002; Novikova et al., 2003; Prang et al., 2006). Inwieweit diese strukturellen Vorgänge auch die funktionelle Erholung beeinflussen, ist noch nicht bekannt.

2.3.3 Neutralisierung von Wachstumsinhibitoren

Die Neutralisierung von Wachstumsinhibitoren steigert die Axonaussprossung in vivo nach inkompletter Rückenmarkschädigung und bewirkt funktionelle Verbesserungen bei Ratten und Primaten (Schwab, 2004; Freund et al., 2009). Antikörper gegen Nogo werden aktuell im Rahmen einer europaweiten multizentrischen Phase-1-Studie bei Patienten mit sensomotorisch kompletter Rückenmarkverletzung erprobt. Die Applikation von Chondroitinase ABC zur enzymatischen Spaltung des Extrazellulärmatrix-Moleküls Chondroitinsulfatproteoglykan führt zu vermehrter axonaler Aussprossung und funktioneller Verbesserung (Bradbury et al., 2002; Garcia-Alias et al., 2009).

2.4 Spontane Erholung nach spinalem Trauma bei Mensch und Nager

Beim Menschen kann nach inkompletter Querschnittlähmung eine funktionelle Erholung stattfinden. Unterstützt durch rehabilitative Maßnahmen können Patienten Funktionen (Gehfähigkeit, Armfunktion) wiedererlangen (Bracken et al., 1992; Frankel, 1998). Spontane Erholung findet sich noch ausgeprägter bei Ratten mit inkompletten

spinalen Läsionen. Hier zeigt sich schon nach kurzer Zeit eine funktionelle Erholung der Lokomotion bis zu einem bestimmten Grad (Basso et al., 1996; Muir and Whishaw, 1999; Weidner et al., 2001; Ballermann and Fouad, 2006). Strukturelle Mechanismen, die möglicherweise zur spontanen Erholung beitragen, sollen im Folgenden erklärt werden.

2.4.1 Plastizitätsphänomene durch axonale und / oder synaptische Reorganisation

Nach einem spinalen Trauma können unversehrte Axone die Grundlage für spontane funktionelle Erholung sein, indem sie an Stelle durchtrennter Axone Kollateralen kaudal der Läsion ausbilden. Diese neu gebildeten Axonkollateralen bilden neue Synapsen mit den deafferenzierten Neuronen und können so die Durchtrennung benachbarter Axone kompensieren (Weidner et al., 2001; Loy et al., 2002; Soares et al., 2007). So wurde bei der Ratte gezeigt, dass nach Durchtrennung des dorsalen Hauptanteils des kortikospinalen Traktes der verbliebene intakte ventrale Anteil des kortikospinalen Traktes neue Kollateralen ausbildet, die neue Synapsen mit Motoneuronen bilden und dadurch funktionelle Defizite kompensieren können (Weidner et al., 2001). Auf kortikaler Ebene können axotomierte Pyramidenzellen Kollateralen zu unversehrten Pyramidenzellen ausbilden sowie auf Hirnstamm-Ebene zu motorischen Kernen, dessen descendierende Projektionen intakt geblieben sind (Weidner and Tuszynski, 2002; Bareyre et al., 2004).

2.4.2 Spontaner Zellersatz im Rückenmark

Ein Rückenmarkstrauma führt innerhalb von 24 Stunden zu einem Absterben von Oligodendrozyten, Astrozyten, Neuronen und Vorläuferzellen im Läsionszentrum (Horky et al., 2006). Die Apoptose von v.a. Oligodendrozyten hält Tage bis Wochen an und findet auch in läsionsentfernten Rückenmarkarealen statt. Dies kann zu Demyelinisierung ursprünglich intakt gebliebener Axone führen (Shuman et al., 1997). Das Rückenmark einer adulten Ratte enthält einen Pool an proliferierenden Vorläuferzellen, die zu einem limitierten Zellersatz führen könnten (Zai and Wrathall, 2005). Nach 24 Stunden zeigt sich eine signifikant erhöhte Proliferationsrate von Stamm- und Gliazellen rostral und kaudal der Läsion in der grauen Substanz (gS) und am Zentralkanal (Horky et al., 2006). Neurogenese im Rückenmark – tatsächlicher Ersatz von Nervenzellen – findet weder im intakten Zustand noch nach spinalem Trauma statt (Frisen et al., 1995; Horner et al., 2000; Horky et al., 2006). Unter den ersetzten

Gliazellen im Rückenmarkparenchym dominiert die Oligodendroglia, die ca. 10 bis 14 Tage nach dem Trauma läionierte Axone remyelinisieren kann (McTigue et al., 2001; Zai and Wrathall, 2005; Horky et al., 2006). Remyelinisierung begünstigt sehr wahrscheinlich spontane Regeneration. Der Anteil an neugebildeten Astrozyten im Rückenmarkparenchym ist gering (Frisen et al., 1995; Meletis et al., 2008). Die Astrozyten sollen in der Frühphase nach Verletzung einen neuroprotektiven Effekt aufweisen und könnten als zelluläres Stützgerüst eine axonale Aussprossung begünstigen. Darüber hinaus tragen Astrozyten wahrscheinlich zur glialen Narbenbildung bei und behindern somit auch spontane axonale Regeneration (Frisen et al., 1995). Inwieweit sie zur funktionellen Erholung beitragen, ist bisher unklar.

2.4.3 Zellersatz im Gehirn

Spinale Traumen mit Schädigung des kortikospinalen Trakts führen zum Zelluntergang der zugehörigen Motoneurone in der Schicht V des MK (Hains et al., 2003). Im Gegensatz zum Rückenmark ist im Gehirn der Zellersatz von Neuronen, die sog. Neurogenese, möglich. Hierfür müssen (i) endogene neurale Stammzellen aktiviert werden, (ii) dann proliferieren, differenzieren und als unreife Neurone, den sog. Neuroblasten, zu ihrem Zielort wandern, (iii) dort überleben und in das bestehende neuronale Netzwerk integriert werden (Nakatomi et al., 2002; Okano et al., 2007). Die neugebildeten Nervenzellen stammen von neuronalen Vorläuferzellen ab, die neben den Neuronen auch Astrozyten und Oligodendrozyten generieren können (Gage, 2000; Kennea and Mehmet, 2002). Im adulten Gehirn von Tier und Mensch existieren zwei Regionen, in denen bis in das hohe Alter Neurogenese stattfindet (Eriksson et al., 1998; Lenington et al., 2003). Die SVZ funktioniert als größter Ort der Neurogenese im adulten Gehirn (Alvarez-Buylla et al., 2000; Conover and Allen, 2002). Sie liegt den lateralen Wänden der Seitenventrikel an. Neuroblasten der SVZ wandern durch den rostral migratorischen Strom in den Bulbus olfactorius, wo sie zu Interneuronen differenzieren (Okano et al., 2007). In der Subgranulärzone des Hippokampus werden aus unreifen neuronalen Vorläuferzellen ständig neue Neurone (sog. Körnerzellen) gebildet (Cameron et al., 1993; Seki and Arai, 1993; Gheusi and Rochefort, 2002). Eine Vielzahl an Faktoren wurde identifiziert, welche die Neurogenese beeinflussen. Reizreiche Umgebung, sog. enriched environment (Kempermann et al., 1997), körperliche Aktivität (van Praag et al., 1999) oder Antidepressiva-Einnahme, um nur einige wenige Faktoren zu nennen, steigern die Neurogenese. Stress, hohes Alter (Kuhn et al., 1996) oder bestimmte molekulare Faktoren wie z.B.

der transformierende Wachstumsfaktor beta 1 (vermehrt produziert bei neurodegenerativen Krankheiten wie Morbus (M.) Parkinson oder M. Alzheimer) (Wachs et al., 2006) inhibieren sie. Sie können neuronale Verluste, wie sie bei Gehirn- oder Rückenmarkverletzungen auftreten, kompensieren (Temple and Alvarez-Buylla, 1999; Gage, 2000; Temple, 2001). Wachstumsfaktoren, Krankheits- und Verletzungsmodelle modulieren die Migrationsrichtung der Neuroblasten, so dass sie zu den verletzten Arealen statt zum Bulbus olfactorius wandern (Goings et al., 2004). Nach einem ischämischen Insult des Gehirns sind in den geschädigten Regionen, z.B. im Striatum und cerebralen Kortex, neue Neurone nachweisbar (Nakatomi et al., 2002; Okano et al., 2007). Experimentell und ischämisch bedingte Neuronendegeneration in verschiedenen Hirnarealen (Lamina V, VI des MK) führt dazu, dass endogene neurale Vorläuferzellen zu Neuronen differenzieren, funktionale Synapsen ausbilden und in das bestehende Netzwerk integriert werden, obwohl primär in diesen Regionen keine Neurogenese stattfindet. Eine intraventrikuläre Gabe von Wachstumsfaktoren stimuliert zusätzlich die Neurogenese (Magavi et al., 2000; Nakatomi et al., 2002). Induzierte Apoptose kortikospinaler Motoneurone in Lamina V des MK bewirkt in der SVZ eine kompensatorische Neurogenese. Die neugebildeten Neuroblasten wandern von der SVZ durch den CC in die läionierte Lamina V des MK. Hier erfolgt die Ausreifung zu kortikospinalen Motoneuronen. Eine Differenzierung in Neurone findet nur in den Regionen statt, in denen gezielt Apoptose induziert wurde. Sehr beeindruckende Daten zeigen, dass diese Neurone ihre Axonprojektionen sogar bis in das zervikale Rückenmark aussprossen lassen (Chen et al., 2004).

2.5 Fragestellung

Der Mensch kann nach funktionell inkompletter Querschnittlähmung spontan regenerieren, d.h., er kann z.B. seine Gehfähigkeit zurückerlangen. Dasselbe Phänomen zeigt die Ratte, die nach zugefügtem Querschnitt mit initial paraplegischen Hinterläufen nach wenigen Wochen diese wieder funktionell einsetzen und normal laufen kann.

Nach einem spinalen Trauma gehen Nervenzellen im MK, deren Axone durchtrennt worden sind, zu Grunde. Neurogener Zellersatz im MK und dessen Aussprossen ins Rückenmark ist bei Läsionen in direkter Nachbarschaft prinzipiell möglich. In dieser Studie wird nun im Krankheitsmodell an der Ratte erforscht, ob nach thora-

kaler Rückenmarkläsion eine relevante Zellneubildung (Neurone, Glia) in verschiedenen Bereichen des Gehirns (SVZ, CC, MK) und im zervikalen Rückenmark, d.h. in räumlicher Distanz zu der experimentell beeinflussten Region, stattfindet. Daher wird ein thorakales Rückenmarkstrauma durch Kontusion induziert und im Anschluss die Zellproliferation und -differenzierung in der SVZ, im CC, im MK und im zervikalen Rückenmark analysiert.

Ziel der Studie ist, zu analysieren, ob in der SVZ eine erhöhte Neurogeneserate in Folge des spinalen Traumas auftritt, ob im CC, der Verbindung zwischen Neurogenesezone und Zielregion MK, die Zellproliferation erhöht ist und ob im MK tatsächlich ein Ersatz degenerierter Motoneurone stattfindet. Das Rückenmark wird auf zervikaler Ebene analysiert, um einen möglichen Zellersatz festzustellen, der für die spontane Regeneration funktionell relevant sein könnte.

Die Hypothese der vorliegenden Dissertation lautet daher:

„Glialer und neuronaler Zellersatz im Gehirn und zervikalen Rückenmark stellt einen möglichen Kompensationsmechanismus zur spontanen funktionellen Erholung nach thorakaler Rückenmarkschädigung dar.“

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Für diesen Versuch wurden 20 weibliche adulte Fischer-344-Ratten (Alter 4 – 6 Monate, Gewicht 160 – 180g) verwendet (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld, Deutschland). Die Tiere wurden in zwei Gruppen à 10 Tiere aufgeteilt (Haupt-/Kontrollgruppe) und in 5er Standardkäfigen gehalten. Die Tiere hatten während der gesamten Studie freien Zugang zu Nahrung und Wasser.

3.2 Experimentelles Design

Die folgende Abbildung (Abb.) 1 zeigt den zeitlichen Ablauf der Studie.

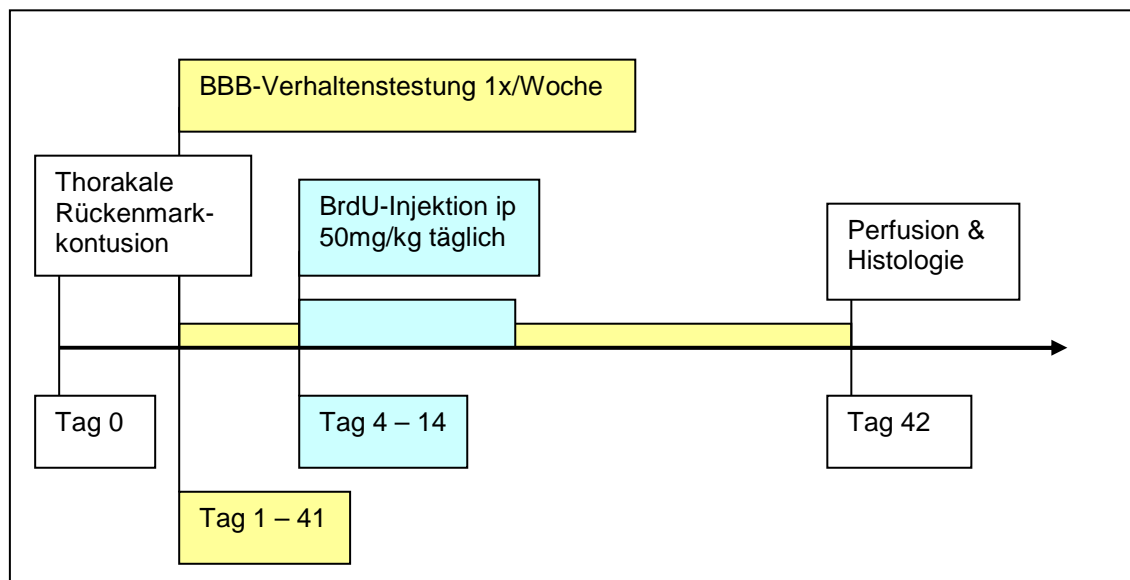


Abb. 1: Zeitlicher Ablauf des Tierexperiments

3.2.1 Spinale Kontusion

10 Tiere erhielten eine spinale Kontusion (Läs.), weitere 10, welche nicht läsiert wurden, dienten als Kontrolle (Kontr). Die Ratten wurden für die thorakale Rückenmarkskontusion mit einer Mischung aus Ketamin (62,5 mg/kg Körpergewicht (KG); 100 mg/l; WDT, Garbsen, Deutschland), Rompun (3,125 mg/kg KG; 20 mg/ml; Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) und Acepromazin (0,625 mg/kg KG; 13,56 mg/ml; Sanofi-Ceva GmbH, Düsseldorf, Deutschland) in 0,9%iger steriler Kochsalz (NaCl) - Lösung nach intramuskulärer Applikation narkotisiert. Der Hauptgruppe der Ratten wurde eine thorakale Rückenmarkskontusion zugefügt. Hierfür

wurden sie auf Höhe des 10. Thorakalsegments (Th 10) laminektomiert. Dabei wurde der Wirbelbogen mit dem Dornfortsatz dieses Wirbels entfernt. Die Kontusion erfolgte standardisiert mit dem Infinite Horizon Impactor (Precision Systems & Instrumentation LLC, Lexington, Kentucky, USA) und einer Kraft von 200 Kilodyne (Weber et al., 2006). Zur Minimierung von Bewegungsartefakten, v.a. atemabhängige Thoraxbewegungen, wurden die Tiere mittels Adson-Pinzetten, welche an den rostralen Th 9- und kaudalen Th 11-Wirbelkörpern fixiert wurden, suspendiert. Daraufhin wirkte ein Metallzylinder mit einer definierten Kraft (200 Kilodyne) auf die exponierte dorsale Oberfläche des Rückenmarks ein, was zu einer reproduzierbaren und gut definierten Kontusionsverletzung führt (Scheff et al., 2003). Anschließend wurden Muskel und Haut vernäht. Der Kontrollgruppe wurde keine Rückenmarkläsion zugefügt.

Von Tag 1 – 10 erfolgte eine manuelle Blasenentleerung 2x/Tag bei den läsierten Tieren. Eine subkutane Cotrimoxazol-Injektion von 0,2 ml (Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) erfolgte 1x/Tag zur Infektionsprophylaxe bei beiden Gruppen. Zwei der operierten Tiere sind nach der spinalen Kontusion verstorben.

Bromodeoxyuridin (BrdU) wurde bei allen Ratten (Läs. + Kontr.) ab dem 4. postoperativen Tag für die folgenden 10 Tage einmal täglich gewichtsabhängig intraperitoneal (ip) injiziert (50 mg/kg KG; 10 mg/ml, gelöst in 0,9%iger NaCl-Lösung).

3.2.3 Verhaltenstest

Der Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) - Test stellt einen standardisierten semiquantitativen lokomotorischen Verhaltenstest dar. Er dient der Erfassung der Beweglichkeit von Ratten, speziell der Beurteilung der Hinterläufe, nach spinalem Trauma (Basso et al., 1995; Ferguson et al., 2004). Zur Ermittlung und Auswertung der Ergebnisse wurde die von Ferguson modifizierte 12-Punkte-BBB-Skala verwendet, da dessen Fehlervarianzen reduziert und so die Effektgröße und statistische Aussagekraft verbessert sind (Ferguson et al., 2004). Die operierten Tiere wurden hierfür einzeln in eine ca. 1,5 m² große runde Kunststoffwanne mit glatter Oberfläche gesetzt; sie konnten sich darin frei bewegen. Für eine objektive Datenerhebung wurde der BBB-Test durch zwei Personen durchgeführt. In den folgenden sechs Wochen wurde dieser Test einmal wöchentlich (Tag 2, 9, 15, 22, 29, 37, 41) wiederholt. Die den Punktwerten zugeordneten Definitionen sind in der Tabelle (Tab.) 1 gelistet.

Tab. 1: BBB Locomotor Rating Scale für moderate und schwere Rückenmarkkontusionen

Score	Description
0	No observable hindlimb (HL) movement
1	Slight movement of one or two joints, usually the hip and/or knee
2	Extensive movement of one or two joints or Extensive movement of one joint <i>and</i> slight movement of one other joint or Slight movement of all three joints
3	Slight movement of two joints <i>and</i> extensive movement of the third
4	Extensive movement of two joints and slight movement of the third
5	Extensive movement of all three joints of the HL
6	Sweeping with no weight support or Plantar placement of the paw with no weight support
7	Plantar placement of the paw with weight support in stance only (i.e., when stationary) or occasional, frequent, or consistent weight supported dorsal stepping and no plantar stepping
8	Occasional weight supported plantar steps, no forelimb (FL)-HL coordination
9	Frequent to consistent weight supported plantar steps and no FL-HL coordination
10	Frequent to consistent weight supported plantar steps and occasional FL-HL coordination
11	Frequent to consistent weight supported plantar steps and frequent FL-HL coordination
12	Consistent weight supported plantar steps, consistent FL-HL coordination or frequent plantar stepping, consistent FL-HL coordination, and occasional dorsal stepping

Definitions

Slight: Partial joint movement through less than half the range of joint motion

Extensive: Movement through more than half of the range of joint motion

Sweeping: Rhythmic movement of HL in which all three joints are extended, then fully flex and extend again; animal is usually sidelying, the plantar surface may or may not contact the ground; no weight support across the HL is evident

No weight support: No contraction of the extensor muscle of the HL during plantar placement of the paw; or no elevation of the hindquarter

Weight support: Contraction of the extensor muscle of the HL during plantar placement of the paw; or elevation of the hindquarter

Plantar stepping: The paw is in plantar contact with weight support then the HL is advanced forward and plantar contact with weight support is re-established

Dorsal stepping: Weight is supported thorough the dorsal surface of the paw at some point in the step cycle

FL-HL coordination: For every FL step an HL step is taken and the HLs alternate

Occasional: Less than or equal to half; 50%

Frequent: More than half, but not always: 51-94%

Consistent: Nearly always or always; 95-100%

(Ferguson et al, 2004)

3.3 Gewebepräparation

Sechs Wochen nach der Kontusion wurden alle Tiere in tiefer Narkose mit 1 ml einer Mischung aus 10 ml 0,9%igem NaCl, 3,75 ml Ketamin (62,5 mg/kg KG; 100 mg/ml), 4,25 ml Rompun (3,125mg/kg KG; 20 mg/ml) und 0,4 ml Acepromazin (0,625 mg/kg KG; 13,56 mg/ml) transkardial perfundiert. Nach 100 ml 0,9%igem NaCl wurde mit 400 ml 4%iges Paraformaldehyd (gelöst in 0,1 molarem (M) Phosphatpuffer, pH = 7,4) 15 Minuten lang perfundiert. Gehirn und Rückenmark wurden nach der Entfernung des umgebenden Knochens zunächst 24 Stunden in 4%igem Paraformaldehyd fixiert und danach bei 4 Grad Celsius (°C) für mindestens 24 Stunden in 30%iger Sucroslösung (gelöst in 0,1 M Phosphatpuffer, pH = 7,4) nachfixiert.

Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms wurden von den Gehirnen 40 µm dicke koronare Schnitte angefertigt und bei - 20 °C in einer Kryoprotektionslösung (Glycerin, Ethylenglycol, 0,1 M Phosphatpuffer pH = 7,4, im Verhältnis 1:1:2) bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Vom Rückenmark wurden 35 µm dicke koronare Schnitte aus einem Block auf Höhe des 4. Zervikalsegments (C 4), der in OCT (Agens zur Sicherung einer optimalen Schnitttemperatur, Optimal Cutting Temperature) eingelegt und tiefgefroren wurde, mit einem Kryostat (Leica) angefertigt und bei - 20 °C in einer Kryoprotektionslösung (Glycerin, Ethylenglycol, 0,1 M Phosphatpuffer pH = 7,4, im Verhältnis 1:1:2) bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.4 Immunhistochemische Untersuchungen

Der Nachweis neu entstandener Zellen sowie die Zelldifferenzierung erfolgten mittels Immunhistochemie. Folgende Antikörper wurden verwendet:

Tab. 2: Primärantikörper

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Nachweis von
BrdU Bromodeoxyuridin	Ratte	1:500	Harlan SeraLab, Loughborough, UK	Neugeborenen Zellen
DCX Doublecortin	Ziege	1:1000	Santa Cruz Bio- technology, Hei- delberg, Deutsch- land	Neuroblasten (un- reife Neurone)
GFAP Glial fibrillary acidic protein	Hase	1:1000	Dako, Hamburg, Deutschland	Astroglia
APC Adenomatous poly- posis coli	Maus (IgG2)	1:500	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland	Oligodendroglia

Tab. 3: Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Spezies	Fluoreszenzmarkierung	Verdünnung	Hersteller
Anti-Ratte	Esel	Rhodamin	1:500	Dianova, Hamburg, Deutschland
Anti-Ziege	Esel	Alexa 488	1:1000	Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland
Anti-Hase	Esel	Cyanin 5	1:500	Dianova, Hamburg, Deutschland
Anti-Maus (IgG2)	Esel	Alexa 488	1:1000	Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland

Alle Schnitte wurden aus der Kryoprotektionslösung in eine Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) umgesetzt und drei Waschschritten unterzogen. Darauf folgte eine 30-minütige Inkubation in 0,6%igem H_2O_2 bei Raumtemperatur, um die gewebeigene Peroxidase zu blockieren. Ziel folgender Schritte war die DNA-Denaturierung, damit BrdU-markierte Zellkerne für den spezifischen Antikörper detektierbar wurden. Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte 2 Stunden lang bei 65 °C in 50% Formamid inkubiert. Ein Waschschrift in 2x Standard Saline Citrate (0,3 M NaCl, 0,03 M Sodium Citrate) über 5 Minuten folgte. Nach Inkubation über 30 Minuten bei 37 °C in 2 M HCL-Lösung erfolgte ein Neutralisierungsschritt (Inkubation bei Raumtemperatur in 0,1 M Boratpuffer-Lösung über 10 Minuten). Nach einem weiteren Waschschrift in TBS folgte die Inkubation für 2 Stunden in einer Fischhaut-Gelatine-Puffer- und 0,1%iger Tritonlösung (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Alle folgenden Antikörperschritte wurden ebenfalls in dieser Lösung durchgeführt. Zunächst wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper gegen BrdU (Spezies Ratte, Verdünnung 1:500) über Nacht bei 5 °C auf einem Schüttler inkubiert. Am zweiten Tag wurde das Gewebe nach einem weiteren Waschschrift mit TBS 1 Stunde lang mit dem entsprechenden Sekundärantikörper gegen BrdU (Anti-Ratte, Spezies Esel, Verdünnung 1:500) inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte mit einem Avidin-Biotin-Peroxidase-Kit für 1 Stunde inkubiert. Für die Visualisierung mittels Peroxidasereaktion und Quantifizierung von antikörpermarkierten Zellkernen (BrdU) mittels lichtmikroskopischer Untersuchung wurde Diaminobenzotetrahydrochlorid (DAB) (gelöst in TBS mit 30%igem H_2O_2 und 8%igem Nickelchlorid) verwendet. Anschließend wurden die Schnitte nach erneutem

Waschen in Leitungswasser mit Neo-Clear® (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gespült, auf beschichtete Objektträger gezogen und mit Neo-Mount® (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingedeckelt.

Zur Untersuchung der Zelldifferenzierung wurde für Zweifach-/Dreifachfärbungen die Fluoreszenz-Immunhistochemie herangezogen. Hierzu wurden die aufgelisteten Antikörper verwendet: BrdU als Marker für neugeborene Zellen, DCX als Marker für unreife Neurone, sog. Neuroblasten, GFAP für Astroglia und APC für Oligodendroglia. Der immunfluoreszente Antikörper APC markiert nicht nur Oligodendrozyten, sondern im geringen Maße auch Astrozyten (McTigue et al., 2001). Um diesen Anteil auszuschließen, wurden nur die Zellen als Oligodendroglia gewertet, die APC-positiv und gleichzeitig GFAP-negativ waren.

Die einzelnen Färbeschritte sind der oben ausführlich beschriebenen Immunhistochemie mit DAB-Visualisierung sehr ähnlich mit folgenden Ausnahmen: Die Blockierung der endogenen Peroxidase fällt weg. Für die Zweifach- und Dreifachfärbungen wurden die Schnitte zeitgleich mit jeweils zwei bzw. drei primären Antikörpern (Tab. 2) über Nacht bei 5 °C auf einem Schüttler inkubiert. Am zweiten Tag wurden die Schnitte mit den jeweils korrespondierenden Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern (Tab. 3) für 2 Stunden lichtgeschützt inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurden die Schnitte auf beschichtete Glasobjektträger aufgezogen und mit ProLong® Antifade (Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckelt.

3.5 Quantitative Analyse

Die Gesamtzahl an BrdU-markierten Zellen im MK, CC und in der SVZ wurde stereologisch bestimmt (Leica DMR Mikroskop, Spot CCD Camera Model 2.2.1, Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, Michigan, USA). Stereologie dient der räumlichen Interpretation von zweidimensionalen Schnitten und kann daher optimal zur Quantifizierung von Zellen in Schnittpräparaten verwendet werden. Nicht nur bei Zellteilung, sondern auch bei Reparaturvorgängen an der DNA wird der Zellkern punktuell mit BrdU markiert (Cooper-Kuhn and Kuhn, 2002). Findet der BrdU-Einbau in die DNA während der Zellteilung statt, so zeigt sich der Zellkern dicht und uniform gefärbt. Nur Zellkerne mit letzterem morphologischem Erscheinungsbild wurden für die Auswertung herangezogen.

Von jedem Tier wurde jeder 12. Schnitt (= 480 μm Intervall) aus den jeweiligen Regionen angefärbt. Die Anzahl neu entstandener Zellen (BrdU-positiv) wurde in 3 verschiedenen Gehirnregionen ausgewertet: im MK (jeweils 7 Schnitte), in der SVZ (jeweils 3 Schnitte) und im CC (jeweils 5 Schnitte). Ausgewertet wurden die Schnitte mit Hilfe des oben genannten halbautomatischen Stereologie-Mikroskops (Confocal Software Leica Lite, Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Deutschland; Leica DMR Mikroskop, Spot CCD Camera Model 2.2.1). Das Referenzvolumen (Abb. 2) wurde mit dem Cursor am Bildschirm umfahren. Um positive Zellen in der z-Achse nicht zu übersehen, wurden die Schnitte jeweils durchfokussiert. Da der MK strukturell nicht eindeutig von den angrenzenden kortikalen Arealen abgrenzbar ist, wurde wie folgt verfahren: Am Knie des CC wurde eine horizontale Linie ausgerichtet, das davon apikal liegende Areal wurde zur Auswertung des MK herangezogen (Abb. 2 A). Das Referenzvolumen für die SVZ und das CC konnte an den jeweiligen anatomischen Grenzen festgelegt werden (Abb. 2 B & C).

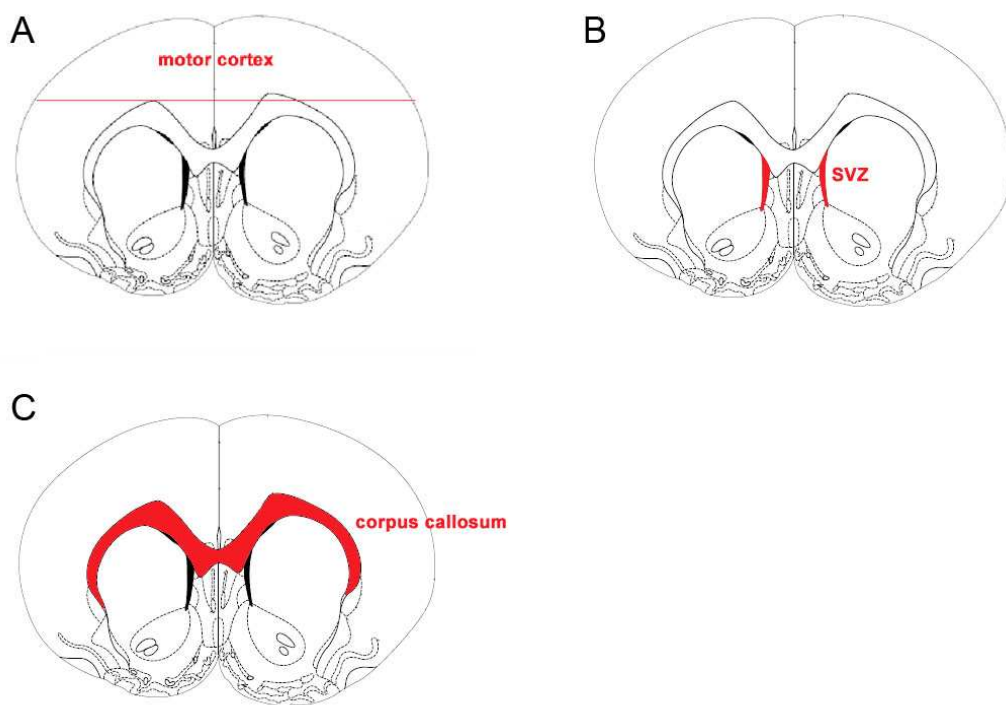


Abb. 2: Referenzareale (Gehirn). (A) MK (B) SVZ (C) CC

Die Gesamtzahl der BrdU-positiven Zellen in den einzelnen untersuchten Regionen wurde jeweils mit dem Faktor 12 multipliziert, da zuvor nur jeder 12. Schnitt ausgewertet wurde und somit das Ergebnis extrapoliert werden musste. Angegeben wird die absolute Anzahl BrdU-positiver Zellen in den genannten Strukturen.

Im zervikalen Rückenmark (C 4) wurde die Anzahl der BrdU-positiven Zellen im Zentralkanal und in der umgebenden weißen Substanz (wS) bzw. grauen Substanz (gS) quantifiziert (Abb. 3). Dabei wurden jeweils 14 Schnitte, die 560 µm voneinander entfernt waren, ausgewertet.

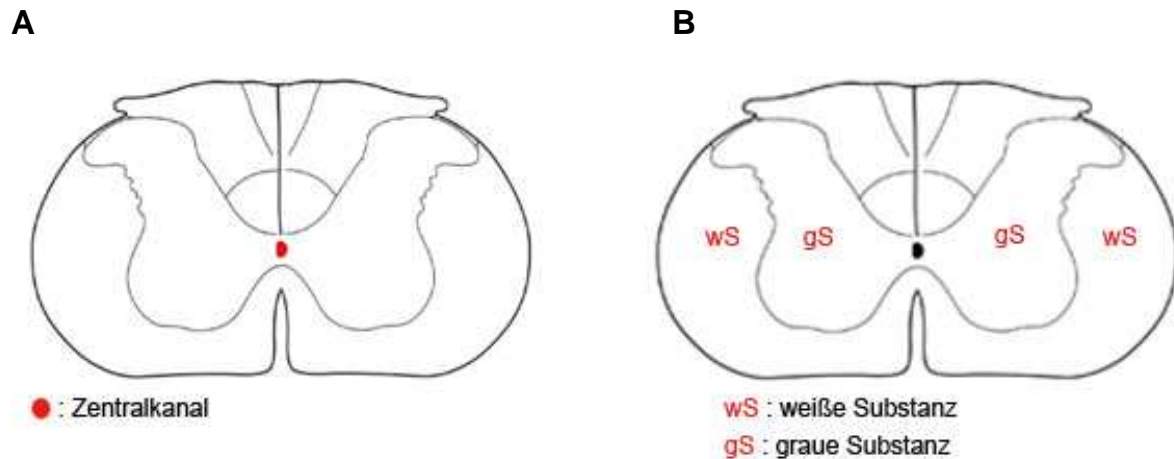


Abb. 3: Referenzareale (zervikales Rückenmark). (A) Zentralkanal (B) weiße (wS) / graue (gS) Substanz

3.6 Analyse der Zelldifferenzierung

Die Zelldifferenzierung wurde immunfluoreszenzhistochemisch an einem Laser-Konfokal-Mikroskop wie oben beschrieben in der SVZ, im CC und im MK quantifiziert. Die neuronale Differenzierung wurde durch DCX-Immunreaktivität analysiert. Da DCX neugeborene Neurone im Neuroblasten-Stadium transient darstellt, war in diesem Fall keine Kolokalisation mit BrdU notwendig. Astrogliale Differenzierung wurde durch Kolokalisation von BrdU mit GFAP, oligodendrogliale Differenzierung durch Kolokalisation von BrdU mit APC, welche gleichzeitig GFAP-negativ waren, identifiziert.

Für die Analyse der Zelldifferenzierung wurden aus jeder Gruppe die 5 Tiere mit der höchsten Anzahl BrdU-positiver Zellen verwendet. Die Zelldifferenzierung wurde für jeden einzelnen Marker in der SVZ, im CC und im MK quantifiziert (in jeder Region jeweils drei 40 µm dicke koronare Schnitte, 480 µm voneinander entfernt), indem jeweils ein Gesichtsfeld (40-fache Vergrößerung) der linken und rechten Hemisphäre mit den meist enthaltenden BrdU-positiven Zellen ausgewählt wurde. Jede im Gesichtsfeld befindliche BrdU-positive Zelle wurde mit dem jeweils gefärbten glialen Differenzierungsmarker im Fall der Kolokalisierung als neu entstandener Astrozyt oder Oligodendrozyt gewertet. DCX-positive Zellen wurden in absoluten Zahlen aus-

gewertet. Die gliale Differenzierung im Rückenmark wurde an insgesamt 40 BrdU-positiven Zellen in der wS und gS pro Tier untersucht. Außerdem wurden jeweils 4 BrdU-positive Zellen aus dem Zentralkanal mit den zugehörigen Differenzierungsmarkern korreliert.

3.7 Statistik

Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler präsentiert. Vergleiche zwischen der Kontrollgruppe und den läsionierten Tieren bzgl. der Analysen der Hirnareale sowie des Rückenmarks wurden anhand des Mann-Whitney-Tests erhoben. $P < 0,05$ wurde als einfache Signifikanz angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Spontane Erholung der Lokomotion nach spinaler Kontusion am Tiermodell der Ratte

Vor der spinalen Kontusion zeigte kein Tier Auffälligkeiten des Gangbildes. Die Contusio spinalis resultierte in einer unmittelbaren Paraplegie der Hinterläufe. Innerhalb einer Woche nach der Kontusion zeigte sich bereits eine deutliche Rückbildung der Paresen. Bereits am 8. postoperativen Tag wurde ein BBB-Score von $5,9 \pm 1,6$ Punkten (Skala: 0 – 12 Punkte) erreicht (Abb. 4), d.h., die läsierten Tiere waren bereits zu diesem frühen Zeitpunkt in der Lage, ihre Hinterläufe rhythmisch mit abwechselnder Beugung und Streckung der Gelenke zu bewegen. Das Körpergewicht kann dabei noch nicht unterstützt werden. Am 15. postoperativen Tag zeigten die läsierten Ratten einen Score von $9,3 \pm 0,8$ (BBB-Score von 9: in > 50 % zeigen die Tiere korrektes plantares gewichtsunterstütztes Aufsetzen der Pfote ohne Koordination zwischen Vorder- und Hinterläufen). Innerhalb von 36 Tagen wurde eine fast normale Lokomotion (BBB-Score $11,1 \pm 0,5$) erreicht. Zusätzlich zum korrekten plantaren gewichtsunterstützten Aufsetzen der Pfote fand nun auch eine Koordination zwischen Vorder- und Hinterläufen statt. Damit war im Vergleich zum 8. postoperativen Tag der BBB-Score nach 36 Tagen hoch signifikant ($P < 0,0001$) verbessert.

Spontane Erholung der Lokomotion

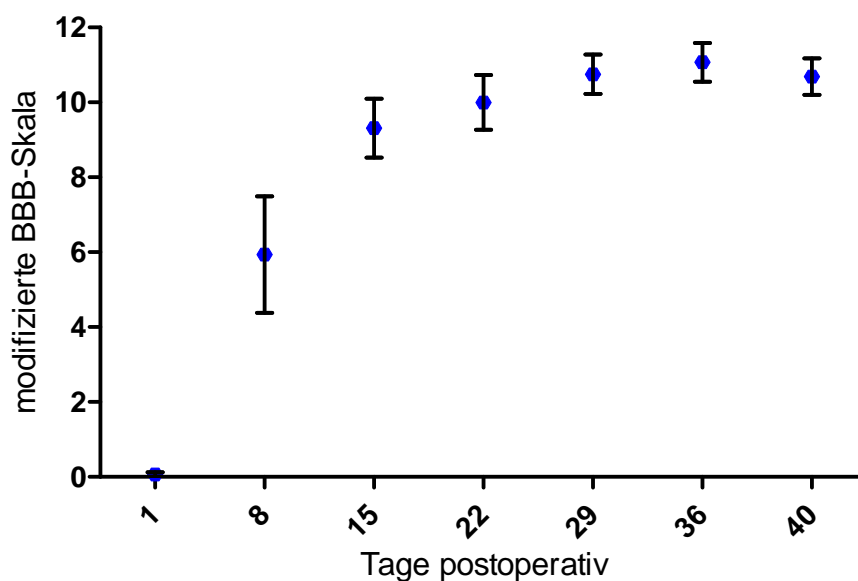


Abb. 4: Spontane Erholung der Lokomotion untersucht über einen Zeitraum von 40 Tagen mit der modifizierten BBB-Skala.

4.2 Zellersatz im Gehirn nach spinalem Trauma

In der SVZ, im CC und im MK wurden BrdU-DAB-positive Zellen quantifiziert. Darüber hinaus erfolgte die Analyse der Zelldifferenzierung mittels der Kolokalisation von BrdU mit den jeweiligen glialen Differenzierungsmarkern. Beispiele der Kolokalisation, welche astrogliale bzw. oligodendrogliale Differenzierung anzeigen, sind in Abb. 5 dargestellt.

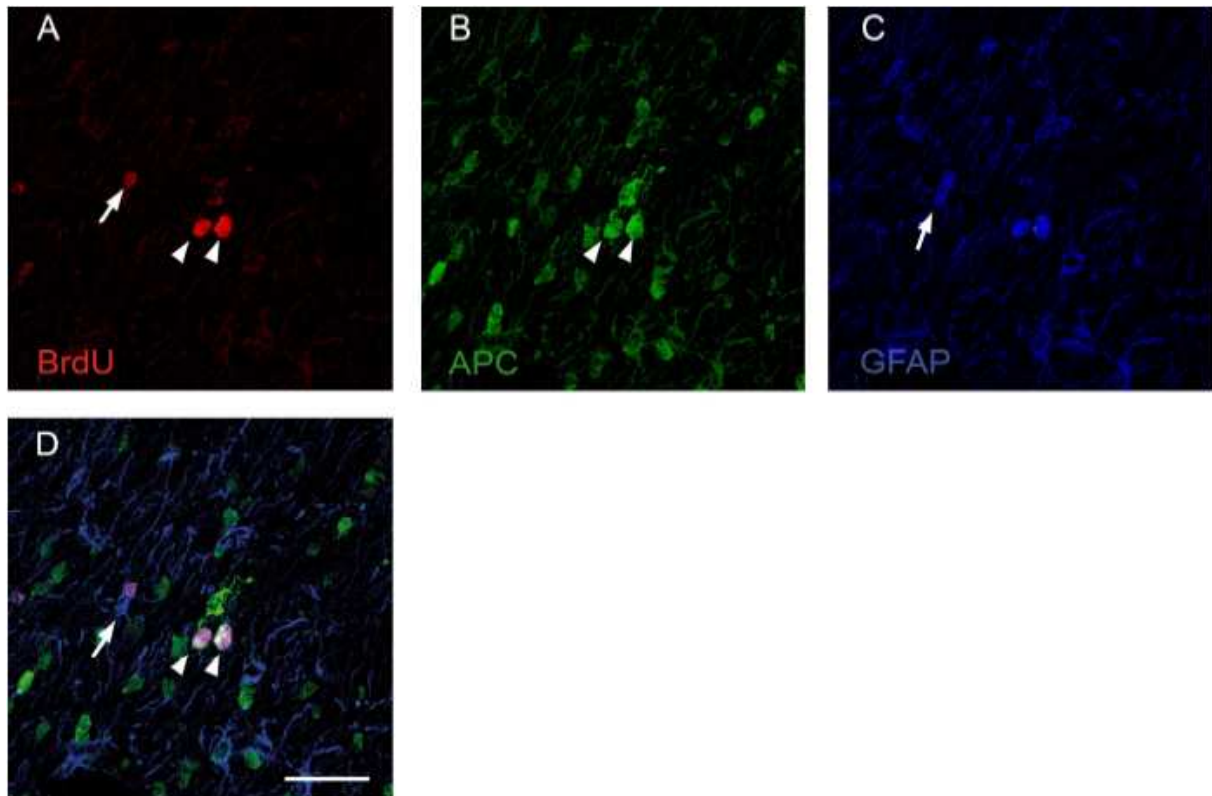


Abb. 5: Analyse der Zelldifferenzierung, exemplarisch dargestellt im CC. (A) BrdU (rot), (B) APC (grün), (C) GFAP (blau). (D) Überlagerung der Marker in A – C. Kolokalisation von BrdU und GFAP entspricht astroglialer Differenzierung (Pfeil), Kolokalisation von BrdU und APC entspricht oligodendroglialer Differenzierung (Pfeilspitzen). Maßstab = 32,4 μ m (A – D).

4.2.1 Zellüberleben und Zelldifferenzierung in der SVZ

Hinsichtlich der Anzahl BrdU-positiver Zellen in der SVZ zwischen intakten Tieren (799 ± 155 Zellen) und läsierten Tieren (556 ± 174 Zellen) fand sich kein signifikanter Unterschied nach spinalem Trauma (Abb. 6).

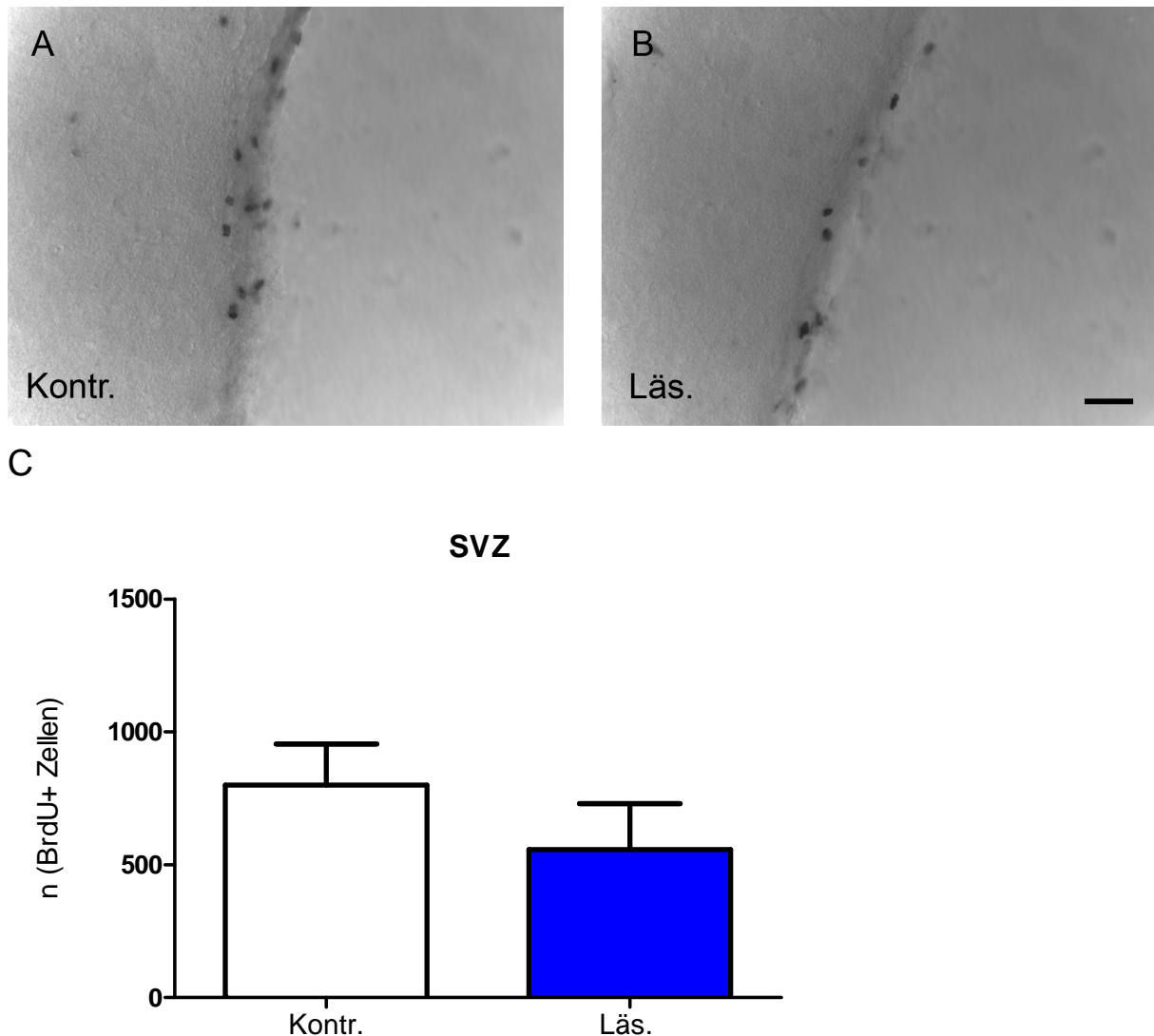
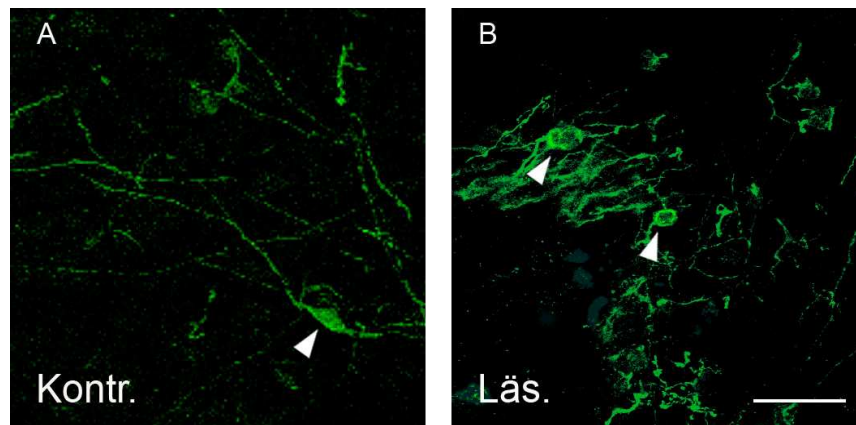


Abb. 6: BrdU-positive Zellen in der SVZ. Dargestellt ist der linke Seitenventrikel mit der angrenzenden SVZ eines (A) Kontrolltieres und (B) eines Tieres mit spinaler Läsion. (C) Quantifizierung BrdU-positiver Zellen. Maßstab = 37,5 μ m (A und B).

4.2.1.1 Neurogenese in der SVZ

Neugeborene Neurone wurden mit der immunhistochemischen Untersuchung von DCX detektiert. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Anzahl DCX-positiver Zellen in der SVZ in Kontrolltieren (178 ± 34 Zellen) versus läionierte Tiere (264 ± 36 Zellen), jedoch ein Trend in Richtung gesteigerter Neurogenese nach Rückenmarkläsion (42 Tage nach Läsion) (Abb. 7).



C

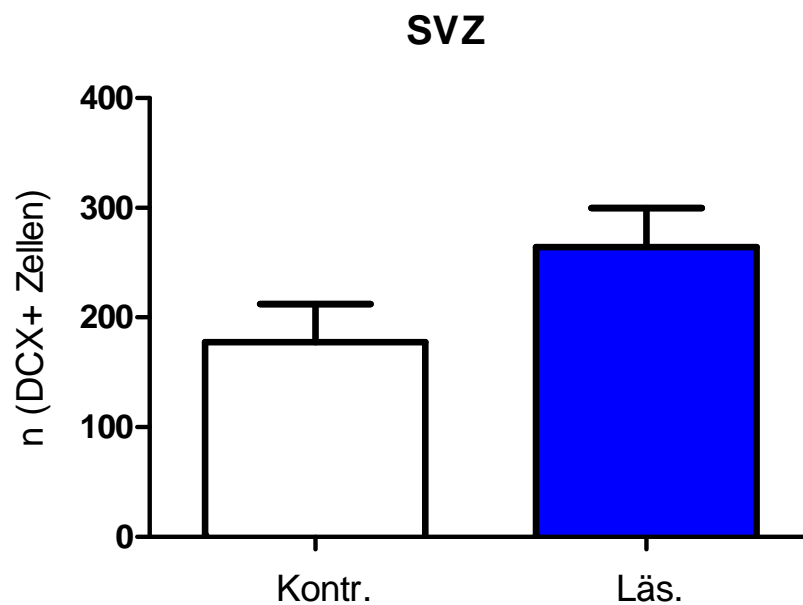


Abb. 7: DCX-positive Zellen in der SVZ. Dargestellt ist ein Ausschnitt der SVZ eines (A) Kontrolltieres und (B) eines Tieres mit spinaler Läsion. (C) Quantifizierung der Neuroblasten (DCX-positiv) in der SVZ. Maßstab = 32,4 μ m (A und B).

4.2.1.2 Gliogenese in der SVZ

Die Differenzierung neugeborener Zellen in Astro- bzw. Oligodendroglia in der SVZ zeigt keine signifikanten Unterschiede in den beiden untersuchten Gruppen (Abb. 8). In der SVZ liegt der Mittelwert des astroglialen Anteils an allen BrdU-positiven Zellen bei Kontrolltieren bei $20,1 \pm 4,3$ %, bei läsionierten Tieren bei $19,8 \pm 3,6$ %. Der Mittelwert des oligodendroglialen Anteils in dieser Region liegt bei Kontrolltieren bei $3,2 \pm 1,1$ %, bei läsionierten Tieren bei $4,1 \pm 0,8$ %.

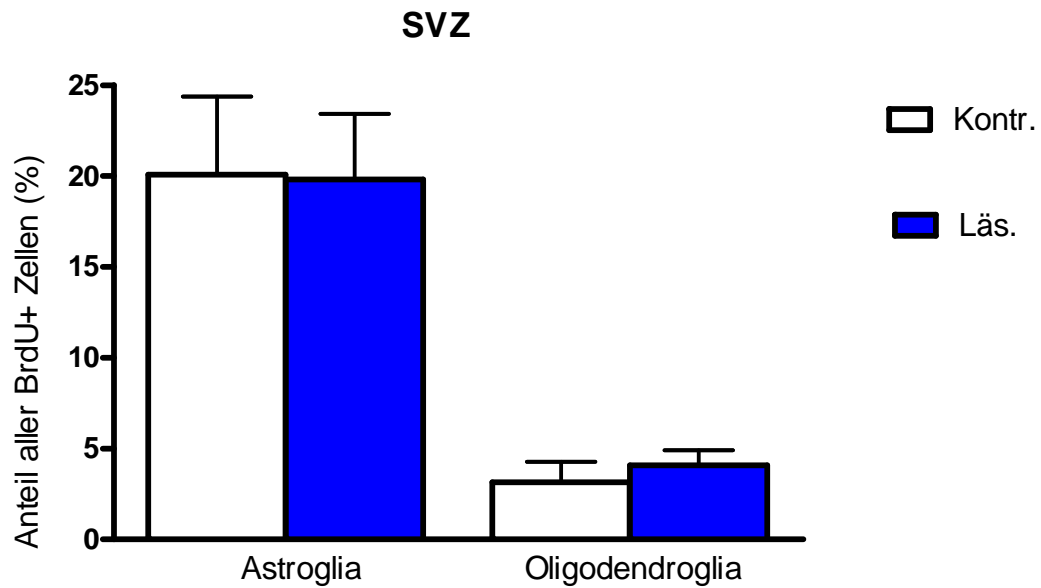
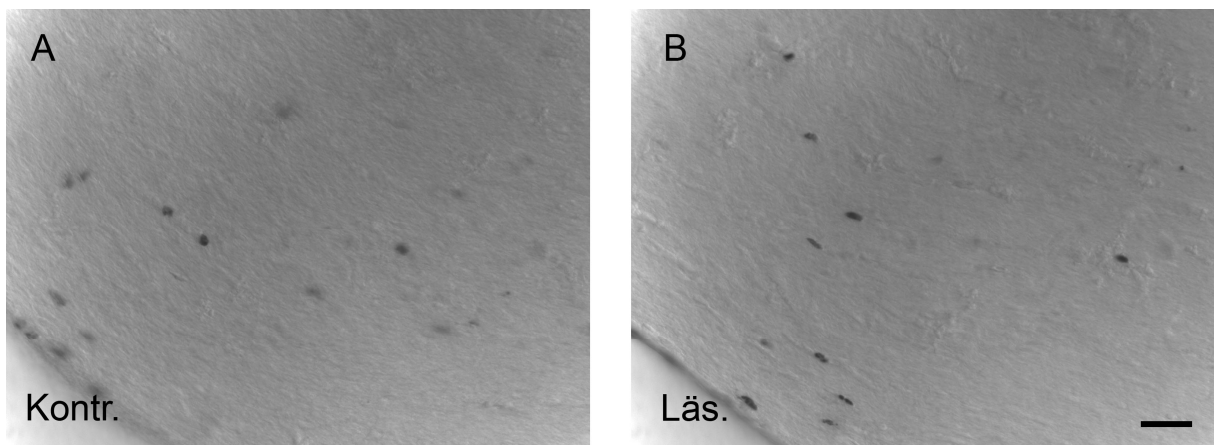


Abb. 8: Zelldifferenzierung in Astro- und Oligodendroglia in der SVZ. Verteilung von Astro- und Oligodendroglia in der SVZ.

4.2.2 Zellüberleben und Zelldifferenzierung im CC

Auch im CC zeigt sich kein Unterschied hinsichtlich der Anzahl BrdU-positiver Zellen zwischen Kontrolltieren (1279 ± 285) und läsierten Tieren (1266 ± 973 ; Abb. 9).



C

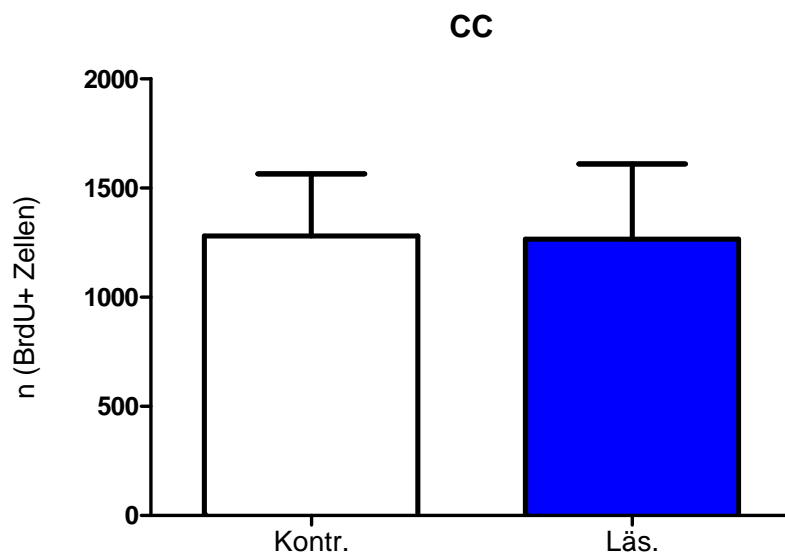


Abb. 9: BrdU-positive Zellen im CC. Dargestellt ist ein Ausschnitt des CC eines (A) Kontrolltieres und (B) eines läsionierten Tieres. (C) Quantifizierung BrdU-positiver Zellen im CC. Maßstab = 37,5 μ m (A und B).

4.2.2.1 Neurogenese im CC

Im CC der Kontrollgruppe sowie in dem der läsionierten Gruppe konnten keine DCX-immunreaktiven Zellen detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

4.2.2.2 Gliogenese im CC

Im CC hat die Rückenmarkläsion keinen Einfluss auf die Anzahl neugeborener astro- bzw. oligodendroglial differenzierter Zellen (Abb. 10). GFAP-positive Astroglia macht bei den Kontrolltieren einen Anteil von $10,5 \pm 0,6$ %, bei den läsionierten Tieren von $10,0 \pm 2,2$ % aller BrdU-positiven Zellen aus. Hinsichtlich oligodendroglialer Differenzierung sind $21,5 \pm 1,3$ % aller BrdU-positiven Zellen bei den Kontrolltieren und $24,4 \pm 3,2$ % bei den läsionierten Tieren APC-positiv.

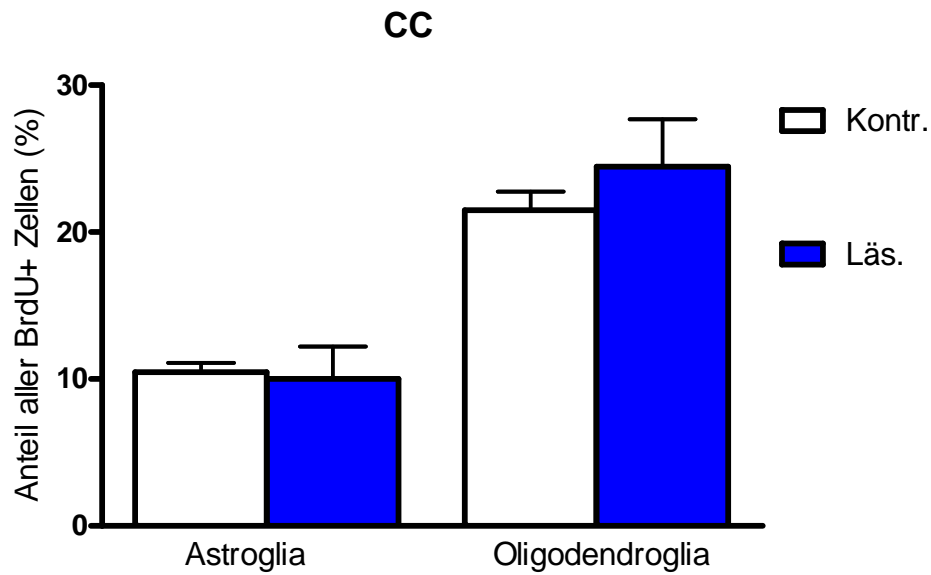
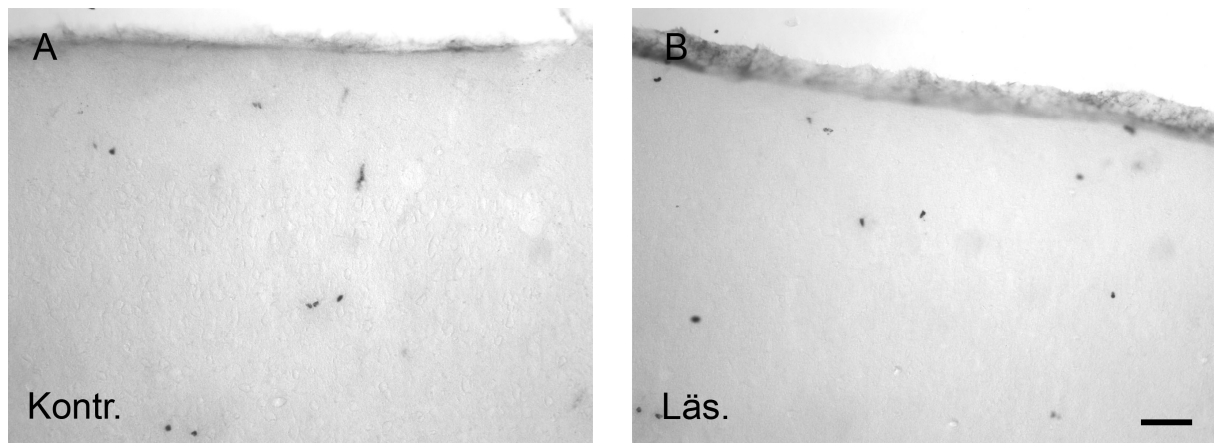


Abb. 10: Gliale Differenzierung im CC. Verteilung von Astro- und Oligodendroglia im CC.

4.2.3 Zellüberleben und Zelldifferenzierung im MK

Es besteht kein signifikanter Unterschied bezüglich des Überlebens neugeborener Zellen zwischen den untersuchten Gruppen. Im MK der Kontrolltiere finden sich durchschnittlich 1858 ± 421 BrdU-positive Zellen, in dem läsionierter Tiere 1646 ± 443 BrdU-positive Zellen (Abb. 11).



C

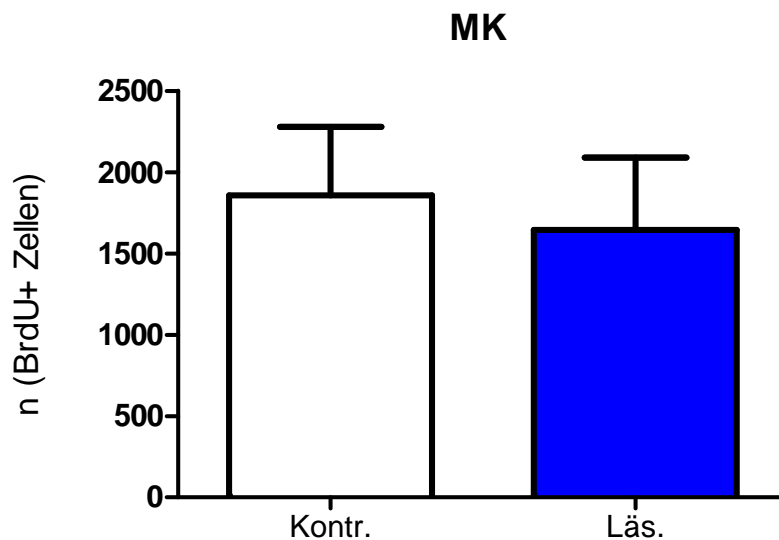


Abb. 11: BrdU-positive Zellen im MK. Dargestellt ist ein Ausschnitt des MK eines (A) Kontrolltieres und (B) eines läsionierten Tieres. (C) Quantifizierung BrdU-positiver Zellen im MK. Maßstab = 37,5 μ m (A und B).

4.2.3.1 Neurogenese im MK

Im MK der untersuchten Gruppen konnten keine DCX-immunreaktiven Zellen gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

4.2.3.2 Gliogenese im MK

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Gliogenese zwischen Haupt- und Kontrollgruppe (Abb. 12). Im MK liegt der astrogliale Anteil aller BrdU-positiven Zellen bei den Kontrolltieren bei $3,0 \pm 1,6$ % und bei den läsionierten Tieren bei $2,4 \pm 1,9$ %. Der Anteil der Oligodendroglia in dieser Region liegt bei den Kontrolltieren bei $7,7 \pm 2,7$ % und bei den läsionierten Tieren bei $6,9 \pm 3,0$ %.

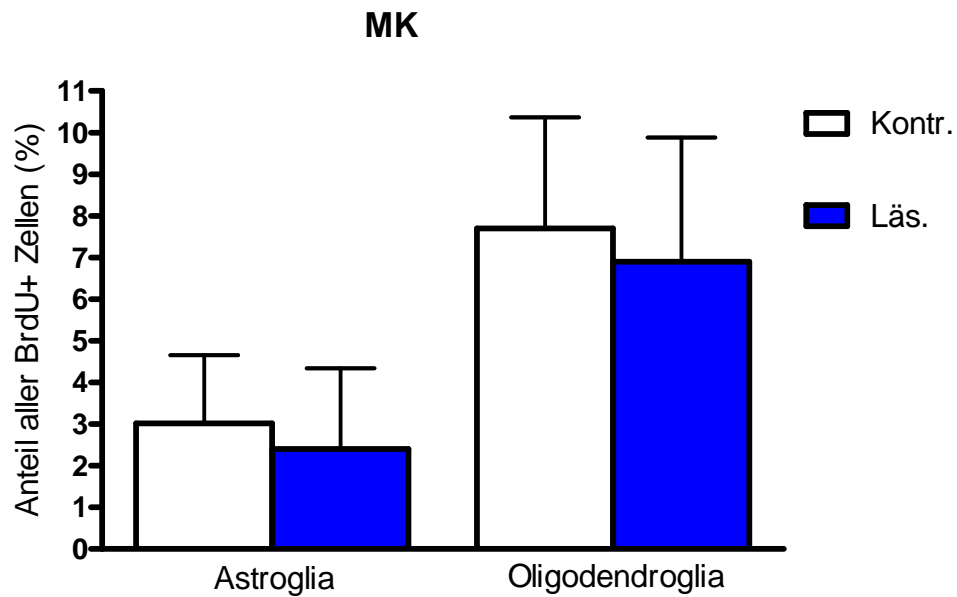
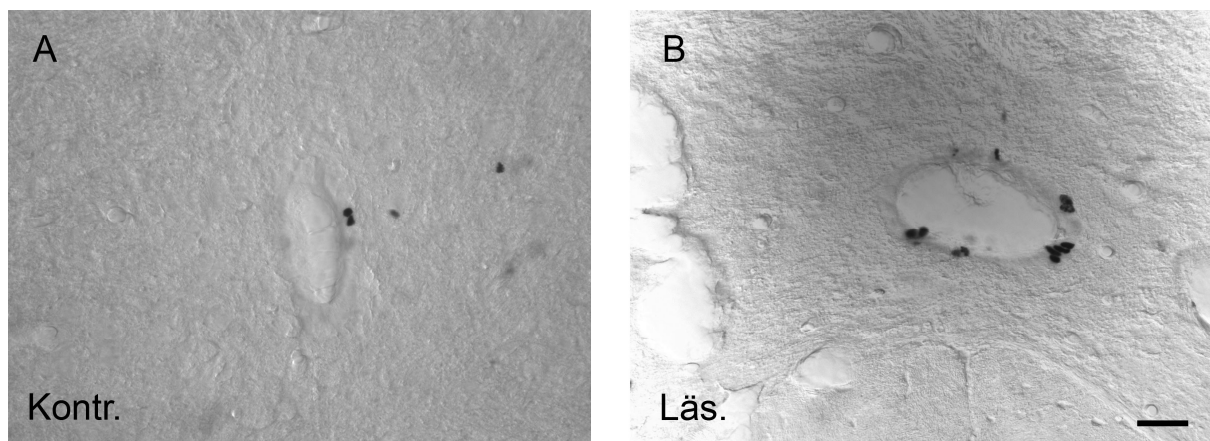


Abb. 12: Zelldifferenzierung in Astro- und Oligodendroglia im MK. Verteilung von Astro- und Oligodendroglia im MK.

4.3 Zellersatz im zervikalen Rückenmark nach thorakalem Trauma

4.3.1 Zellüberleben im Zentralkanal des zervikalen Rückenmarks

Die Quantifizierung BrdU-positiver Zellen im Bereich des Zentralkanals zeigt, dass sich nach thorakaler Kontusion signifikant mehr neugeborene Zellen im Zentralkanal des zervikalen Rückenmarks befinden ($14,4 \pm 2,9$ nach Kontusion versus $4,7 \pm 1,3$ BrdU-positive Zellen in intakten Tieren; $p = 0,01$; Abb. 13).



C

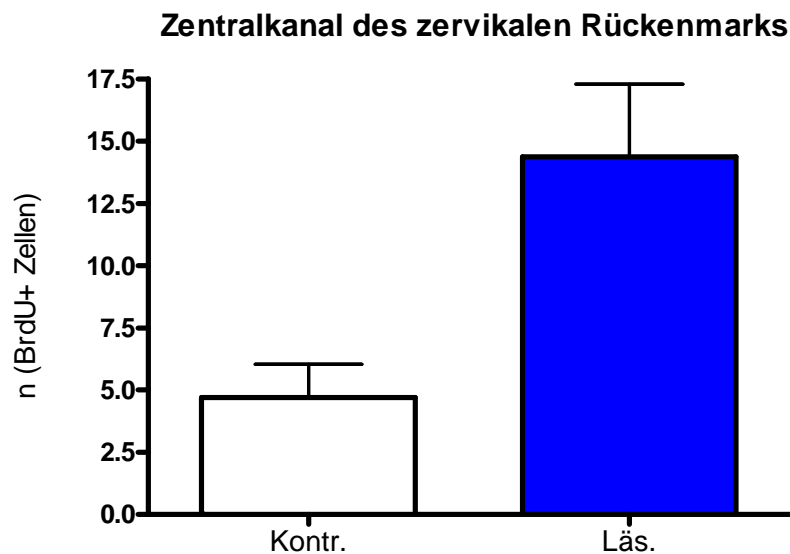


Abb. 13: BrdU-positive Zellen im Zentralkanal des zervikalen Rückenmarks. Dargestellt ist der Zentralkanal eines (A) Kontrolltieres und (B) eines läsierten Tieres. (C) Quantifizierung BrdU-positiver Zellen im Bereich des Zentralkanals. Maßstab = 37,5 μ m (A und B).

4.3.1.1 Gliogenese im Zentralkanal des zervikalen Rückenmarks

Innerhalb des Zentralkanals des zervikalen Rückenmarks wurde nach thorakaler Läsion keine gliale Differenzierung der neugeborenen Zellen detektiert (Abb. 14).

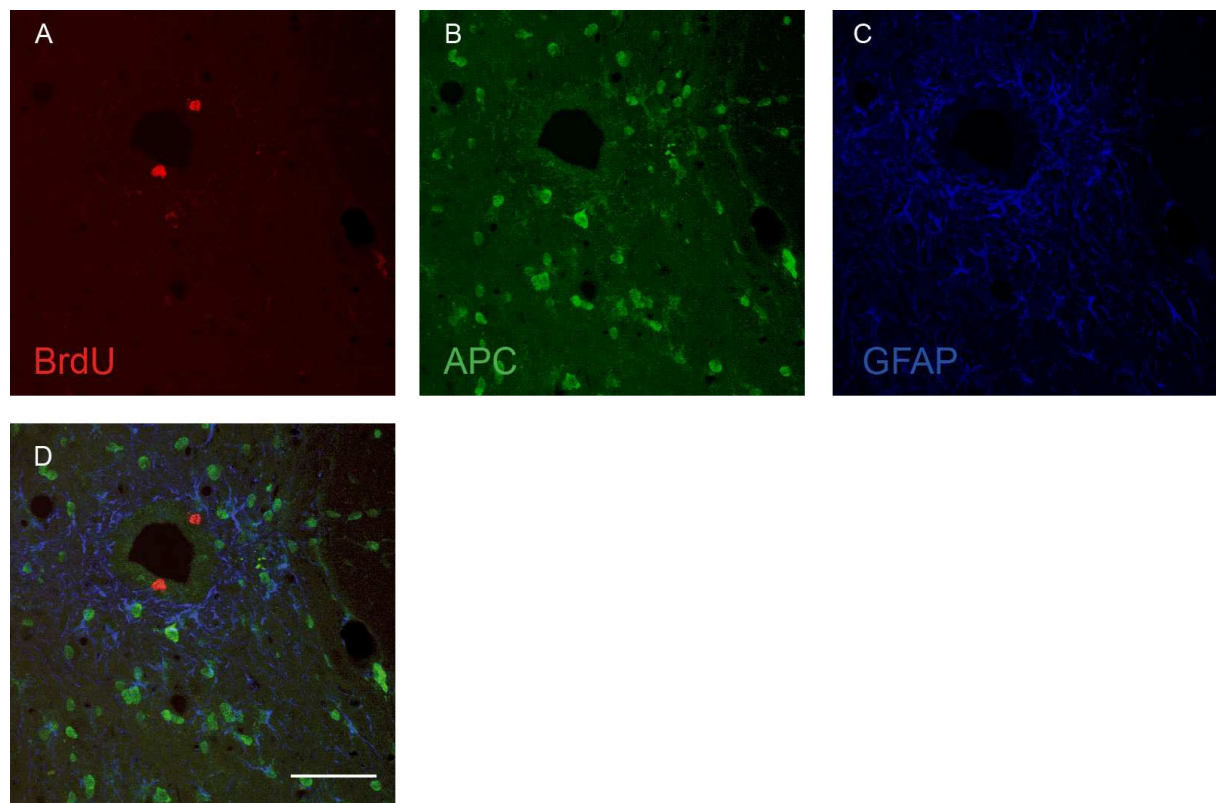


Abb. 14: Differenzierungsfärbung für Astro- und Oligodendroglia im Zentralkanal des zervikalen Rückenmarks. (A) BrdU (rot), (B) APC (grün), (C) GFAP (blau). (D) Überlagerung der Marker in A – C, keine Kolokalisation. Maßstab = 32,4 μ m (A – D).

4.3.2 Zellüberleben in der wS / gS des zervikalen Rückenmarks

Die Anzahl BrdU-positiver Zellen in der wS und gS des zervikalen Rückenmarks (C 4) ist ebenfalls signifikant gesteigert bei Tieren mit Kontusion des thorakalen Rückenmarks im Vergleich zu intakten Tieren ($101,5 \pm 24,1$ versus $37,8 \pm 3,6$ BrdU-positive Zellen; $p = 0,005$; Abb. 15).

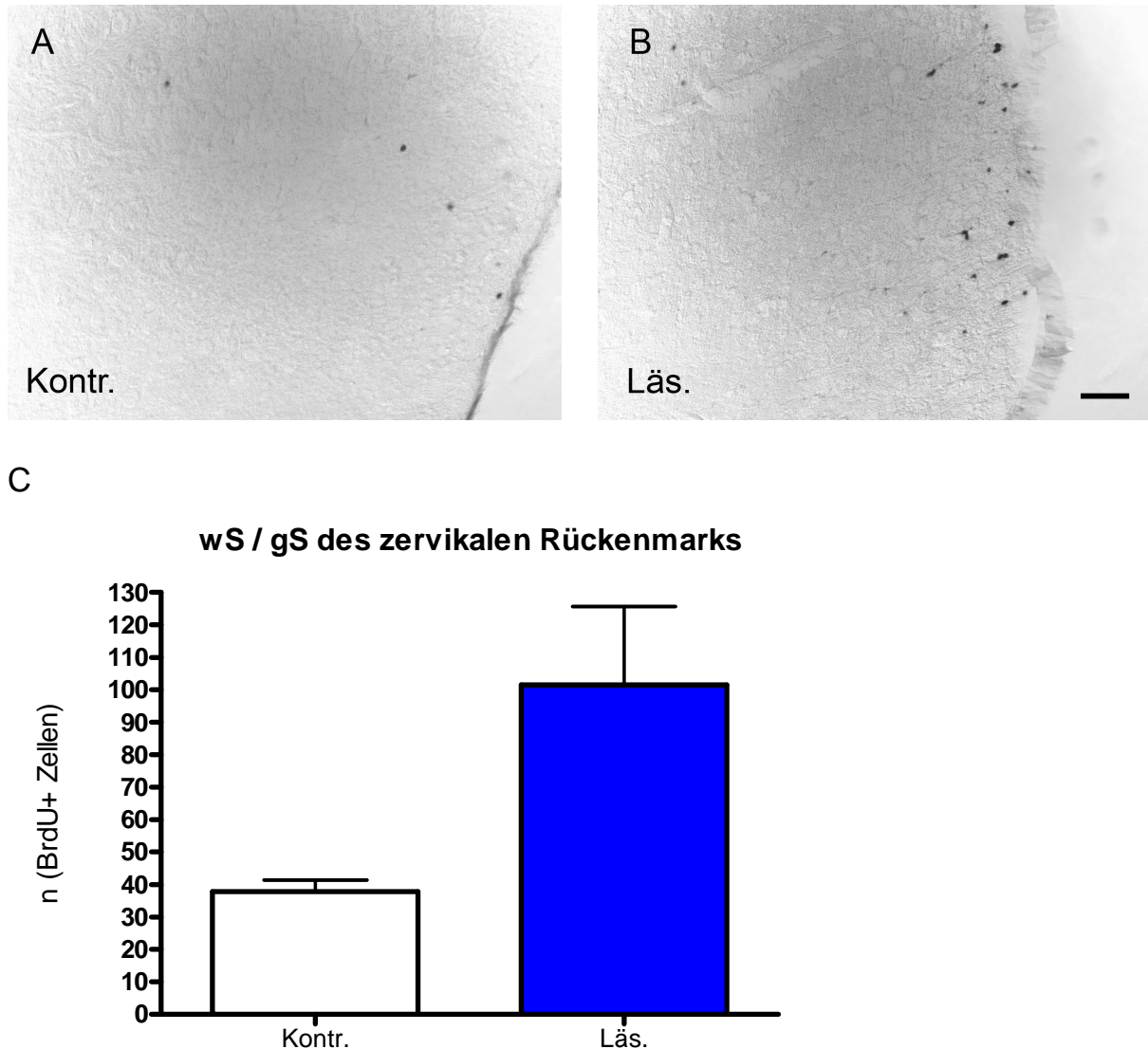
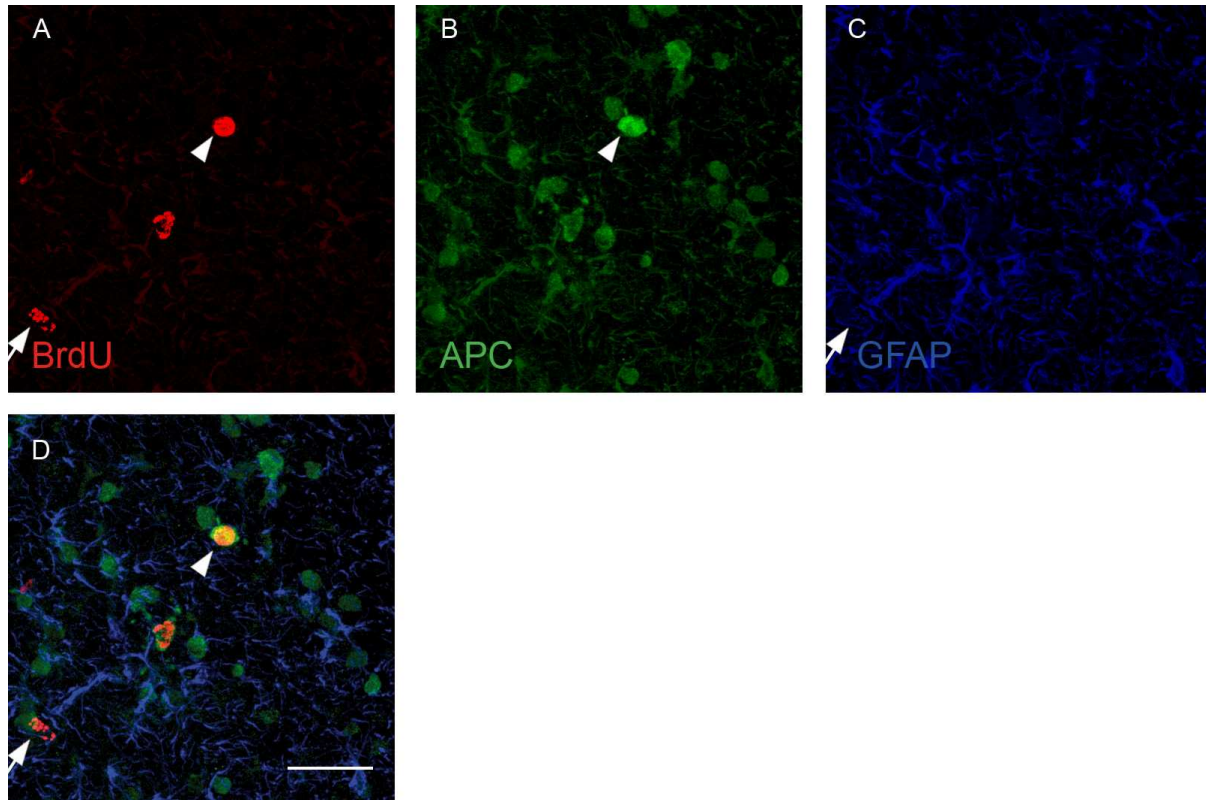


Abb. 15: BrdU-positive Zellen in der wS / gS des zervikalen Rückenmarks. Dargestellt ist die wS / gS im zervikalen Rückenmark eines (A) Kontrolltieres und (B) eines läsierten Tieres. (C) Quantifizierung BrdU-positiver Zellen in diesem Bereich. Maßstab = 37,5 μ m (A und B).

4.3.2.1 Gliogenese in der wS / gS des zervikalen Rückenmarks

Durch die thorakale Rückenmarkläsion kommt es zu keiner Verschiebung des glialen Differenzierungsmusters im zervikalen Bereich (Abb. 16). Bei den Kontrolltieren differenzieren $36 \pm 2,2$ % aller BrdU-positiven Zellen in Astroglia, bei den läsierten Tie-

ren sind es $36,5 \pm 3 \%$. Oligodendrogliale Differenzierung findet bei den Kontrolltieren bei $8 \pm 1,5 \%$ aller BrdU-positiven Zellen, bei den läsionierten Tieren bei $7,5 \pm 0,8 \%$ statt.



E

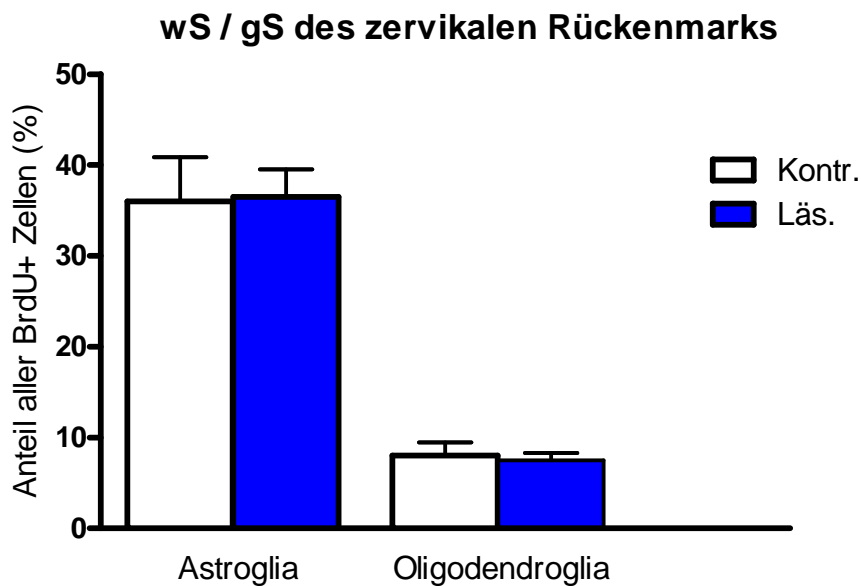


Abb. 16: Analyse der glialen Zelldifferenzierung in der wS / gS des zervikalen Rückenmarks. (A) BrdU (rot), (B) APC (grün), (C) GFAP (blau). (D) Überlagerung der Marker in A – C. Kolokalisation von BrdU und GFAP entspricht astroglialer Differenzierung (Pfeil), Kolokalisation von BrdU und APC entspricht oligodendroglialer Differenzierung (Pfeilspitze). (E) Zelldifferenzierung in Astro- und Oligodendroglia in der wS / gS des zervikalen Rückenmarks. Maßstab = $34,1 \mu\text{m}$ (A – D).

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war, zu untersuchen, ob entfernt von einer thorakalen Rückenmarkläsion auf Höhe des zervikalen Rückenmarks und/oder subkortikal/kortikal endogener Ersatz neuraler Zellen (Astro-, Oligodendroglia, Neurone) stattfindet. Nach histologischer Untersuchung der Regionen zervikales Rückenmark, SVZ, CC und MK zeigt sich, dass 42 Tage nach thorakaler Kontusion eine deutlich gesteigerte Gliogenese im zervikalen Rückenmark nachweisbar ist, die sowohl Astrozyten als auch Oligodendrozyten betrifft. In allen anderen untersuchten Regionen ist, abgesehen von der SVZ, keine gesteigerte Neubildung von Neuronen und Gliazellen zu beobachten. In der SVZ zeigt sich lediglich ein Trend in Richtung gesteigerter Neurogenese nach Rückenmarkläsion im Vergleich zu intakten Kontrolltieren.

Nach experimenteller Rückenmarkverletzung wurde bereits in mehreren Studien der Zellersatz im Läsionsbereich und unmittelbar um die Rückenmarkläsion untersucht. Hier zeigte sich eine deutlich gesteigerte Gliogenese mit Neubildung von Astro- und Oligodendroglia (McTigue et al., 2001; Zai and Wrathall, 2005; Horky et al., 2006). Neu entstandene Oligodendrozyten tragen mit großer Wahrscheinlichkeit zur Remyelinisierung bei. Bezüglich des neuronalen Ersatzes im Rückenmark muss nach der Datenlage davon ausgegangen werden, dass es im Bereich der Rückenmarkverletzung zu keiner bzw. keiner nennenswerten Neurogenese kommt (Frisen et al., 1995; Horner et al., 2000; Horky et al., 2006). Keine Studie hat jedoch bisher den Zellersatz in Bereichen des Rückenmarks, die sich weit entfernt von der eigentlichen Läsion befinden, analysiert. In dieser Studie war der Zellersatz unabhängig von der Differenzierung im Bereich der wS und gS des zervikalen Rückenmarks mehr als verdoppelt, im Bereich des Zentralkanals sogar verdreifacht. Die Differenzierungsanalyse zeigt, dass innerhalb des Zentralkanals keine gliale Differenzierung der neugeborenen Zellen stattgefunden hat. Jedoch betrifft der gesteigerte Zellersatz in der wS und gS sowohl Astroglia als auch Oligodendroglia. Nun stellt sich die Frage, warum es zu diesem Zellersatz entfernt von der eigentlichen Rückenmarkverletzung kommt. Untersuchungen zum apoptotischen Zelltod nach Rückenmarkverletzung bei Ratten und Affen konnten zeigen, dass es auch in – von der Läsion entfernten – Regionen des Rückenmarks zu einem erheblichen Zelluntergang kommt. Dieser betrifft sowohl

die astrogliale als auch insbesondere die oligodendrogliale Zellreihe (Crowe et al., 1997). Durch den Verlust von Oligodendroglia kommt es in der Folge auch zur Demyelinisierung (Crowe et al., 1997; Siegenthaler et al., 2007). Der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Ersatz von Oligodendroglia legt damit nahe, dass auf diesem Weg Remyelinisierung ermöglicht werden kann. Die Remyelinisierung stellt wiederum einen möglichen Mechanismus dar, wodurch zumindest partiell die beobachtete funktionelle Erholung zu erklären wäre. Nach partieller Transsektion des zervikalen Rückenmarks von Affen konnte ebenfalls der Nachweis neugeborener oligodendroglial differenzierter Gliazellen erbracht werden (Yang et al., 2006). Morphologische Untersuchungen dieser Studie lassen vermuten, dass die neu entstandenen Oligodendrozyten benachbarte Axone tatsächlich remyelinisieren. Einschränkend ist festzuhalten, dass in der vorliegenden Studie Remyelinisierung bisher noch nicht nachgewiesen werden konnte. Welche Rolle der Ersatz von Astroglia in Regionen entfernt von der Rückenmarkläsion spielt, ist unklar. Es ist denkbar, dass Astrozyten nach Rückenmarkverletzung de-differenzieren und – analog zu GFAP-immunreaktiven Zellen im Gehirn – im Rückenmark Stamm-/Progenitorzell-Charakter annehmen (Lang et al., 2004; Yang et al., 2009). Danach wären diese Zellen möglicherweise auch die Ursprungszellen für die neu entstandenen Oligodendrozyten.

In einer zurückliegenden Arbeit konnte auf beeindruckende Art und Weise gezeigt werden, dass nach einer hochselektiven kortikalen Läsion bei adulten Mäusen untergegangene Neurone über den Zeitraum von 56 Wochen tatsächlich ersetzt werden (Chen et al., 2004). Diese neu entstandenen Neurone haben zum Teil Axonprojektionen bis in das zervikale Rückenmark auswachsen lassen. In einer weiteren Studie konnte nach Induktion einer transienten globalen zerebralen Hypoxie ebenfalls der gezielte neuronale Zellersatz abgestorbener kortikaler Neurone durch Neurogenese im Bereich der SVZ nachgewiesen werden (Nakatomi et al., 2002).

In der vorliegenden Studie fand sich weder im MK noch im CC ein gesteigerter Zellersatz. Insbesondere gab es keinen Hinweis auf neugeborene Neurone im untersuchten Zeitraum. Im Vergleich dieser Arbeit mit der von Chen et al. findet man mehrere mögliche Erklärungsansätze für die unterschiedlichen Ergebnisse. Zunächst wurden die Untersuchungen der vorliegenden Studie am Tiermodell der Ratte durchgeführt. Darüber hinaus war der Überlebenszeitraum aktuell viel kürzer (6

Wochen versus 56 Wochen in der Arbeit von Chen et al.). In der Arbeit von Chen starben durch eine hochselektive Läsionstechnik gezielt Neurone ab. Die vorliegende Arbeit setzt voraus, dass – analog zur gezielten Zelltod-Induktion in der Arbeit von Chen – tatsächlich auch nach spinaler Läsion Neurone des kortikospinalen Traktes absterben. Die Erfüllung dieser Bedingung wurde zumindest in einer Studie nachgewiesen, in der 1 Woche nach Durchtrennung des kortikospinalen Traktes auf Rückenmark-Niveau ein signifikanter Anteil der motorischen Nervenzellen (Betz'sche Zellen der Lamina V des MK) per Apoptose abstirbt (Hains et al., 2003). Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass kein relevanter neuronaler Zelltod in dieser Region stattfindet. Analysiert man das Ausmaß der Wallerschen Degeneration nach Rückenmarkstrauma im Bereich des Hirnstamms, findet sich kein Unterschied zu nicht läsierten Ratten (Nielson et al., 2010). Diese Befunde widersprechen einem signifikanten neuronalen Zelluntergang in dem Ausmaß, wie es in der Arbeit von Hains gefunden wurde.

Wenngleich kein signifikanter Befund, so fand sich zumindest ein Hinweis, dass Neurogenese im Gehirn nach spinalem Trauma gesteigert ist. In der SVZ zeigte sich ein Trend in Richtung gesteigerter DCX-positiver Neuroblasten nach Rückenmarkläsion. Hier war möglicherweise die untersuchte Tierzahl ($n = 5$ pro Gruppe) nicht ausreichend, um Signifikanz-Niveau zu erreichen. Selbst wenn die Neurogenese in der SVZ signifikant gesteigert ist, hat dies offensichtlich nicht zu einem nachweisbaren Neuronen-Ersatz im Bereich des MK geführt. Dies weist auf ein Phänomen hin, welches bereits mehrfach beobachtet wurde. So kommt es beispielsweise bei einem experimentellen Parkinson-Modell bei Ratten (sog. 6-Hydroxy-Dopamin Läsionen) nach intracerebroventrikulärer Infusion der Wachstumsfaktoren Fibroblast Growth Factor-2 und Epidermal Growth Factor zu einer massiv gesteigerten Proliferation inklusive Neubildung DCX-positiver Neuroblasten (Winner et al., 2008). Diese wandern auch in das Striatum aus. Jedoch können dort keine differenzierten Neurone jeglicher Art nachgewiesen werden. Das heißt, relevante Neurogenese ist zwar nachweisbar, die terminale Differenzierung bleibt allerdings aus.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es zu einem deutlich gesteigerten glialen Zellersatz in Regionen des Rückenmarks weit entfernt von der eigentlichen Rückenmarkschädigung kommt. Inwieweit der gesteigerte Oligo-

dendroglia-Ersatz tatsächlich zur Remyelinisierung und möglicherweise zur beobachteten spontanen Erholung nach thorakaler Rückenmarkkontusion beiträgt, muss in zukünftigen Studien untersucht werden. Im untersuchten Zeitraum (6 Wochen nach Rückenmarktrauma) konnte am Tiermodell der Ratte kein Nachweis eines spezifischen neuronalen Zellersatzes in der Lamina V des MK bzw. nachgeschalteten subkortikalen Strukturen geführt werden.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AG	Aktiengesellschaft
APC	Adenomatous polyposis coli
BBB-Test	Basso Beattie Bresnahan – Test
BrdU	Bromodeoxyuridin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C 4	4. Zervikalsegment
ca.	circa
CC	Corpus Callosum
CCD	Charge-coupled device
DAB	Diaminobenzotetrahydrochlorid
DCX	Doublecortin
d.h.	das heißt
DMR	Digital-Modul-R
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FL	Frontlimb
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
gS	graue Substanz
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCL	Chlorwasserstoff
HL	Hindlimb
Inc.	Incorporated
ip	intraperitoneal
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
Kontr.	Kontrolle / Kontrollgruppe
l	Liter
Läs.	Spinale Kontusion / Läsionsgruppe

LLC	Limited Liability Company
µm	Mikrometer
m ²	Quadratmeter
M	molar
M.	Morbus
mg	Milligramm
MK	Motorkortex
ml	Milliliter
NaCl	Kochsalz (Natriumchlorid)
NT-3	Neurotrophin-3
OCT	Optimal Cutting Temperature
sog.	sogenannte/-n
SVZ	Subventrikulärzone
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
Th	Thorakalsegment
v.a.	vor allem
WDT	Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte
wS	weiße Substanz
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Zeitlicher Ablauf des Tierexperiments
- Abbildung 2: Referenzareale (Gehirn)
- Abbildung 3: Referenzareale (zervikales Rückenmark)
- Abbildung 4: Spontane Erholung der Lokomotion
- Abbildung 5: Analyse der Zelldifferenzierung, exemplarisch dargestellt im CC
- Abbildung 6: BrdU-positive Zellen in der SVZ
- Abbildung 7: DCX-positive Zellen in der SVZ
- Abbildung 8: Zelldifferenzierung in Astro- und Oligodendroglia in der SVZ
- Abbildung 9: BrdU-positive Zellen im CC
- Abbildung 10: Gliale Differenzierung im CC
- Abbildung 11: BrdU-positive Zellen im MK
- Abbildung 12: Zelldifferenzierung in Astro- und Oligodendroglia im MK
- Abbildung 13: BrdU-positive Zellen im Zentralkanal des zervikalen Rückenmarks
- Abbildung 14: Differenzierungsfärbung für Astro- und Oligodendroglia im Zentralkanal des zervikalen Rückenmarks
- Abbildung 15: BrdU-positive Zellen in der wS / gS des zervikalen Rückenmarks
- Abbildung 16: Analyse der glialen Zelldifferenzierung in der wS / gS des zervikalen Rückenmarks

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: BBB Locomotor Rating Scale für moderate und schwere Rückenmark-
kontusionen
- Tabelle 2: Primärantikörper
- Tabelle 3: Sekundärantikörper

Literaturverzeichnis

- Alvarez-Buylla A, Herrera DG, Wichterle H (2000) The subventricular zone: source of neuronal precursors for brain repair. *Prog Brain Res* 127:1-11.
- Ballermann M, Fouad K (2006) Spontaneous locomotor recovery in spinal cord injured rats is accompanied by anatomical plasticity of reticulospinal fibers. *Eur J Neurosci* 23:1988-1996.
- Bareyre FM, Kerschensteiner M, Raineteau O, Mettenleiter TC, Weinmann O, Schwab ME (2004) The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats. *Nat Neurosci* 7:269-277.
- Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC (1995) A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 12:1-21.
- Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC (1996) Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol* 139:244-256.
- Berkowitz M (1993) Assessing the socioeconomic impact of improved treatment of head and spinal cord injuries. *J Emerg Med* 22 Suppl 1:63-67.
- Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF Jr., Holford TR, Baskin DS, Eisenberg HM, Flamm E, Leo-Summers L, Maroon JC, Marshall LF (1992) Methylprednisolone or naloxone treatment after acute spinal cord injury: 1-year follow-up data. Results of the second National Acute Spinal Cord Injury Study. *J. Neurosurg.* 76, 23-31.
- Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, Fawcett JW, McMahon SB (2002) Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 416:636-640.
- Brosamle C, Schwab ME (1997) Cells of origin, course, and termination patterns of the ventral, uncrossed component of the mature rat corticospinal tract. *J Comp Neurol* 386:293-303.
- Bunge RP, Pucket WR, Hiester ED (1997) Observations on the pathology of several types of human spinal cord injury, with emphasis on the astrocyte response to penetrating injuries. *Adv Neurol* 72:305-315.
- Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E (1993) Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56:337-344.
- Caroni P, Schwab ME (1988) Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *J Cell Biol* 106:1281-1288.
- Chen J, Magavi SS, Macklis JD (2004) Neurogenesis of corticospinal motor neurons extending spinal projections in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16357-16362.
- Conover JC, Allen RL (2002) The subventricular zone: new molecular and cellular developments. *Cell Mol Life Sci* 59:2128-2135.
- Cooper-Kuhn CM, Kuhn HG (2002) Is it all DNA repair? Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain. *Brain Res Dev Brain Res* 134:13-21.

- Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, Masters JN, Beattie MS (1997) Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med* 3:73-76.
- Dawodu ST (2007) Spinal Cord Injury: Definition, Epidemiology, Pathophysiology URL <http://emedicine.medscape.com/article/322480-overview>. Abrufdatum: 03.03.2008.
- Dewar D, Underhill SM, Goldberg MP (2003) Oligodendrocytes and ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:263-274.
- Diaz-Martinez NE, Velasco I (2009) Axonal growth inhibition by chondroitin sulfate proteoglycans in the central nervous system. *Rev Invest Clin* 61:140-149.
- Dietz V (2001) Klinik der Rückenmarkschädigung, Diagnose-Therapie-Rehabilitation. Stuttgart: Kohlhammer.
- Dietz V, Curt A, Meinck HM, Hesse S, Gillsbach J (2008, Oktober) URL http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-070_S1_Querschnittlaehmung_10-2008_10-2013.pdf. Abrufdatum: 10.10.2008.
- Dryden DM, Saunders LD, Jacobs P, Schopflocher DP, Rowe BH, May LA, Yiannakoulias N, Svenson LW, Voaklander DC (2005) Direct health care costs after traumatic spinal cord injury. *J Trauma* 59:443-449.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313-1317.
- Ferguson AR, Hook MA, Garcia G, Bresnahan JC, Beattie MS, Grau JW (2004) A simple post hoc transformation that improves the metric properties of the BBB scale for rats with moderate to severe spinal cord injury. *J Neurotrauma* 21:1601-1613.
- Frankel HK (1998) Outcomes in Neurological and Surgical Disorders, ed. Swash, M. (Cambridge Univ. Press, Cambridge), pp. 181-194.
- Freund P, Schmidlin E, Wannier T, Bloch J, Mir A, Schwab ME, Rouiller EM (2009) Anti-Nogo-A antibody treatment promotes recovery of manual dexterity after unilateral cervical lesion in adult primates--re-examination and extension of behavioral data. *Eur J Neurosci* 29:983-996.
- Friedman JA, Windebank AJ, Moore MJ, Spinner RJ, Currier BL, Yaszemski MJ (2002) Biodegradable polymer grafts for surgical repair of the injured spinal cord. *Neurosurgery* 51:742-751; discussion 751-742.
- Frisen J, Johansson CB, Torok C, Risling M, Lendahl U (1995) Rapid, widespread, and long-lasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. *J Cell Biol* 131:453-464.
- Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433-1438.
- Garcia-Alias G, Barkhuysen S, Buckle M, Fawcett JW (2009) Chondroitinase ABC treatment opens a window of opportunity for task-specific rehabilitation. *Nat Neurosci* 12:1145-1151.
- Gheusi G, Rochefort C (2002) Neurogenesis in the adult brain. Functional consequences. *J Soc Biol* 196:67-76.
- Goings GE, Sahni V, Szele FG (2004) Migration patterns of subventricular zone cells in adult mice change after cerebral cortex injury. *Brain Res* 996:213-226.

- Grill R, Murai K, Blesch A, Gage FH, Tuszynski MH (1997) Cellular delivery of neurotrophin-3 promotes corticospinal axonal growth and partial functional recovery after spinal cord injury. *J Neurosci* 17:5560-5572.
- Grossman SD, Rosenberg LJ, Wrathall JR (2001) Temporal-spatial pattern of acute neuronal and glial loss after spinal cord contusion. *Exp Neurol* 168:273-282.
- Hains BC, Black JA, Waxman SG (2003) Primary cortical motor neurons undergo apoptosis after axotomizing spinal cord injury. *J Comp Neurol* 462:328-341.
- Hermanns S (2001) Stimulation axonaler Regeneration im durchtrennten Rückenmark der adulten Ratte. Düsseldorf, Univ., Diss., S. 91.
- Horky LL, Galimi F, Gage FH, Horner PJ (2006) Fate of endogenous stem/progenitor cells following spinal cord injury. *J Comp Neurol* 498:525-538.
- Horner PJ, Power AE, Kempermann G, Kuhn HG, Palmer TD, Winkler J, Thal LJ, Gage FH (2000) Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *J Neurosci* 20:2218-2228.
- Hurlbert R (2000) Methylprednisolone for acute spinal cord injury: An inappropriate standard of care. *Journal of Neurosurgery (Spine1)* 93:1-7.
- Kao CC, Chang LW (1977) The mechanism of spinal cord cavitation following spinal cord transection. Part 1. A correlated histochemical study. *J Neurosurg* 46, 197-209.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493-495.
- Kennea NL, Mehmet H (2002) Neural stem cells. *J Pathol* 197:536-550.
- Klapka N (2003) Axonale Regeneration und funktionelle Erholung nach Läsion im Rückenmark der adulten Ratte. Düsseldorf, Univ., Diss., S. 112.
- Kraus JF, Silbermann TA, McArthur DL (1996) In: *Principles of Spine Surgery* (Menezes AH SV, Benzel EC, Cahill SW, McCormack P, ed), pp 41-58. New York: McGraw-Hill.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16:2027-2033.
- Lang B, Liu HL, Liu R, Feng GD, Jiao XY, Ju G (2004) Astrocytes in injured adult rat spinal cord may acquire the potential of neural stem cells. *Neuroscience* 128:775-783.
- Lenington JB, Yang Z, Conover JC (2003) Neural stem cells and the regulation of adult neurogenesis. *Reprod Biol Endocrinol* 1:99.
- Loy DN, Magnuson DS, Zhang YP, Onifer SM, Mills MD, Cao QL, Darnall JB, Fajardo LC, Burke DA, Whittemore SR (2002) Functional redundancy of ventral spinal locomotor pathways. *J Neurosci* 22:315-323.
- Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD (2000) Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 405:951-955.
- Masuhr KF, Neumann M (2005) Rückenmarkverletzungen. *Neurologie*, 5 Edition (Reihe D, ed), Stuttgart: Georg Thieme Verlag, S. 382-386.

- McTigue DM, Wei P, Stokes BT (2001) Proliferation of NG2-positive cells and altered oligodendrocyte numbers in the contused rat spinal cord. *J Neurosci* 21:3392-3400.
- Meletis K, Barnabe-Heider F, Carlen M, Evergren E, Tomilin N, Shupliakov O, Frisen J (2008) Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biol* 6:e182.
- Muir GD, Whishaw IQ (1999) Complete locomotor recovery following corticospinal tract lesions: measurement of ground reaction forces during overground locomotion in rats. *Behav Brain Res* 103:45-53.
- Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M (2002) Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 110:429-441.
- Nielson JL, Sears-Kraxberger I, Strong MK, Wong JK, Willenberg R, Steward O (2010) Unexpected survival of neurons of origin of the pyramidal tract after spinal cord injury. *J Neurosci* 30:11516-11528.
- Novikova LN, Novikov LN, Kellerth JO (2003) Biopolymers and biodegradable smart implants for tissue regeneration after spinal cord injury. *Curr Opin Neurol* 16:711-715.
- Okano H, Sakaguchi M, Ohki K, Suzuki N, Sawamoto K (2007) Regeneration of the central nervous system using endogenous repair mechanisms. *J Neurochem* 102:1459-1465.
- Pfeifer K, Vroemen M, Blesch A, Weidner N (2004) Adult neural progenitor cells provide a permissive guiding substrate for corticospinal axon growth following spinal cord injury. *Eur J Neurosci* 20:1695-1704.
- Pfeifer K, Vroemen M, Caioni M, Aigner L, Bogdahn U, Weidner N (2006) Autologous adult rodent neural progenitor cell transplantation represents a feasible strategy to promote structural repair in the chronically injured spinal cord. *Regen Med* 1:255-266.
- Prang P, Muller R, Eljaouhari A, Heckmann K, Kunz W, Weber T, Faber C, Vroemen M, Bogdahn U, Weidner N (2006) The promotion of oriented axonal regrowth in the injured spinal cord by alginate-based anisotropic capillary hydrogels. *Biomaterials* 27:3560-3569.
- Priebe MM, Chiodo AE, Scelza WM, Kirshblum SC, Wuermser LA, Ho CH (2007) Spinal cord injury medicine. 6. Economic and societal issues in spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 88:S84-88.
- Ramon-Cueto A, Cordero MI, Santos-Benito FF, Avila J (2000) Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron* 25:425-435.
- Scheff SW, Rabchevsky AG, Fugaccia I, Main JA, Lumpp JE, Jr. (2003) Experimental modeling of spinal cord injury: characterization of a force-defined injury device. *J Neurotrauma* 20:179-193.
- Schurch B, Dietz V (2005) Akutversorgung und Therapie des Rückenmarktraumas: Georg Thieme Verlag KG.
- Schwab ME (2004) Nogo and axon regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 14:118-124.

- Schwab ME, Bartholdi D (1996) Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev* 76:319-370.
- Seki T, Arai Y (1993) Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat. *J Neurosci* 13:2351-2358.
- Shuman SL, Bresnahan JC, Beattie MS (1997) Apoptosis of microglia and oligodendrocytes after spinal cord contusion in rats. *J Neurosci Res* 50:798-808.
- Siegenthaler MM, Tu MK, Keirstead HS (2007) The extent of myelin pathology differs following contusion and transection spinal cord injury. *J Neurotrauma* 24:1631-1646.
- Soares S, Barnat M, Salim C, von Boxberg Y, Ravaille-Veron M, Nothias F (2007) Extensive structural remodeling of the injured spinal cord revealed by phosphorylated MAP1B in sprouting axons and degenerating neurons. *Eur J Neurosci* 26:1446-1461.
- Temple S, Alvarez-Buylla A (1999) Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 9:135-141.
- Temple S (2001) The development of neural stem cells. *Nature* 414:112-117.
- Trepel (2004) *Neuroanatomie Struktur und Funktion*. 3. Auflage, München: Elsevier GmbH. S.132 und S.200f.
- Tuszynski MH, Peterson DA, Ray J, Baird A, Nakahara Y, Gage FH (1994) Fibroblasts genetically modified to produce nerve growth factor induce robust neuritic ingrowth after grafting to the spinal cord. *Exp Neurol* 126:1-14.
- Tuszynski MH, Kordower JH (1999) *CNS Regeneration*. San Diego: Academic Press.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH (1999) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2:266-270.
- Vroemen M (2006) *Cellular Therapy after Spinal Cord Injury using Neural Progenitor Cells*. Leiden, Univ., Diss.
- Vroemen M, Caioni M, Bogdahn U, Weidner N (2007) Failure of Schwann cells as supporting cells for adult neural progenitor cell grafts in the acutely injured spinal cord. *Cell Tissue Res* 327:1-13.
- Wachs FP, Winner B, Couillard-Despres S, Schiller T, Aigner R, Winkler J, Bogdahn U, Aigner L (2006) Transforming growth factor-beta1 is a negative modulator of adult neurogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:358-370.
- Weber T, Vroemen M, Behr V, Neuberger T, Jakob P, Haase A, Schuierer G, Bogdahn U, Faber C, Weidner N (2006) In vivo high-resolution MR imaging of neuropathologic changes in the injured rat spinal cord. *AJNR Am J Neuroradiol* 27:598-604.
- Weidner N, Ner A, Salimi N, Tuszynski MH (2001) Spontaneous corticospinal axonal plasticity and functional recovery after adult central nervous system injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3513-3518.
- Weidner N, Tuszynski MH (2002) Spontaneous plasticity in the injured spinal cord - implications for repair strategies. *Molecular Psychiatry* 7:9-11.

- Winner B, Couillard-Despres S, Geyer M, Aigner R, Bogdahn U, Aigner L, Kuhn HG, Winkler J (2008) Dopaminergic lesion enhances growth factor-induced striatal neuroblast migration. *J Neuropathol Exp Neurol* 67:105-116.
- Xu XM, Guenard V, Kleitman N, Bunge MB (1995) Axonal regeneration into Schwann cell-seeded guidance channels grafted into transected adult rat spinal cord. *J Comp Neurol* 351:145-160.
- Yang H, Lu P, McKay HM, Bernot T, Keirstead H, Steward O, Gage FH, Edgerton VR, Tuszynski MH (2006) Endogenous neurogenesis replaces oligodendrocytes and astrocytes after primate spinal cord injury. *J Neurosci* 26:2157-2166.
- Yang H, Cheng XP, Li JW, Yao Q, Ju G (2009) De-differentiation response of cultured astrocytes to injury induced by scratch or conditioned culture medium of scratch-insulted astrocytes. *Cell Mol Neurobiol.* 29:455-473.
- Zai LJ, Wrathall JR (2005) Cell proliferation and replacement following contusive spinal cord injury. *Glia* 50:247-257.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Norbert Weidner für die Vergabe des Promotionsthemas und seine Unterstützung bei der Durchführung und Ausarbeitung dieser Dissertation. In vielen Gesprächen und E-Mails stand er mir immer offen und freundlich mit hilfreichen Anregungen zur Seite.

Danken möchte ich auch Frau Dr. Katharina Pfeifer für die stets hilfsbereite Betreuung meiner Arbeit. Bei jeglichen Fragen zur praktischen und theoretischen Bearbeitung des Themas gab sie mir wertvolle Erklärungen und Ratschläge.

Ebenfalls danken möchte ich Herrn Massimiliano Caioni für seine äußerst wertvolle Unterstützung bei der Arbeit im Labor. Er brachte mir, einer zuvor laborunerfahrenen Medizindoktorandin, das nötige Know-How labortechnischer Arbeit bei und ermöglichte mir so die Durchführung und Anfertigung des praktischen Teils der Dissertation.

Veit, vielen Dank für deine liebevolle Geduld, die du mir entgegengebracht hast, wenn ich ungeduldig wurde. Du warst immer verständnis- und rücksichtsvoll, wenn diese Arbeit Vorrang gegenüber gemeinsamen Freizeitaktivitäten hatte. Danke für deine Mitfreude, wenn wieder ein Schritt getan war. Danke, dass du mit Herz, Ohr und Schulter stets für mich da warst und bist!

Mama und Papa, euch möchte ich ganz besonders danken. Ihr wart stets diejenigen, die mir zuhörten und die mich aufbauten. Ihr brachtet mir bei, Aufgaben immer Schritt für Schritt anzugehen und nahmt mir so die Angst vor dem „Riesenberg“. Ihr habt mir Kraft gespendet und euch mit mir immer über jeden Erfolg gefreut. Ihr habt mich in jeder Situation in jeglicher Art unterstützt. Vielen Dank dafür!

CURRICULUM VITAE

ANGABEN ZUR PERSON:

Geburtsdatum/-ort	8. Mai 1984 in Siegburg
Nationalität	Deutsch

AUSBILDUNG UND ÄRZTLICHE TÄTIGKEIT:

Seit Feb 2010	Assistenzärztin in der Klinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin im Klinikum Weiden
Okt 2003 – Nov 2009	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg Nov 2009: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Sep 2005: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Aug 1994 – Juni 2003	Anno-Gymnasium Siegburg
Okt 2001 – Juli 2002	Moorhead High School in Moorhead, MN, USA

FAMULATUREN UND PRAKTISCHES JAHR:

Apr 2009 – Aug 2009	Kinderklinik St. Hedwig der Barmherzigen Brüder in Regensburg Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Feb 2009 – Apr 2009	Royal Hallamshire Hospital in Sheffield, Großbritannien Department of Surgery
Dez 2008 – Feb 2009	Universitätsklinikum Regensburg Klinik und Poliklinik für Chirurgie
Okt 2008 – Dez 2008	Universitätsklinikum Regensburg Klinik und Poliklinik für Innere Medizin
Aug 2008 – Okt 2008	Tulane University Hospital and Clinic in New Orleans, LA, USA Department of Internal Medicine
März 2008 – Apr 2008	Dr. von Haunersches Kinderspital der Universität München Allgemeinpädiatrische Station der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
Sep 2007 – Okt 2007	Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Ludwig-Maximilians-Universität München Geschützte allgemeinpsychiatrische Station
Feb 2007 – März 2007	Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie der Universität Regensburg Geschlossene allgemeinpsychiatrische Aufnahmestation
Apr 2006	Internal Medicine Associates, Fargo, ND, USA In- and Outpatients in Internal Medicine
Feb 2006 – März 2006	Neuropsychology Associates, P.A., Fargo, ND, USA In- and Outpatients in Neuropsychology

Betreuung der Dissertation

Diese Arbeit wurde von Herrn Prof. Dr. Norbert Weidner angeregt und ihre Ausarbeitung überwacht.

Eigenständigkeitserklärung

“Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt”.

Weiden in der Oberpfalz, den 4. April 2011

Birthe Kierdorf