

Aus dem Bereich der Anatomie  
Theoretische Medizin und Biowissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

# **Rolle von Neurotrophinrezeptoren bei der neuronalen Überlebensregulation nach Neurotrauma: p75<sup>NTR</sup> als Zelltodinduktor**

**Role of neurotrophin receptors for neuronal survival regulation after neurotrauma: p75<sup>NTR</sup> as a death-inductor**

*Dissertation zur Erlangung eines Grades eines Doktors der Medizin*  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2006

vorgelegt von Martin Gutjahr  
geb. am: 24.06.1975 in Saarbrücken

# I Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>2</b>
<b>II</b>	<b>Abstrakt.....</b>	<b>4</b>
<b>III</b>	<b>Abstract (englisch).....</b>	<b>7</b>
<b>IV</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>9</b>
IV.1	Regulation neuronalen Überlebens .....	9
IV.2	Neurotrophische Faktoren und ihre Rezeptoren.....	11
IV.2.1	Die Neurotrophine.....	11
IV.2.2	Die Neurotrophin-Rezeptoren .....	12
IV.2.3	$p75^{NTR}$ .....	12
IV.2.4	Trk-Rezeptoren .....	13
IV.2.5	Das corticospinale System.....	14
IV.3	Relevanz der Studien.....	16
IV.4	Corticospinales Läsionsmodell .....	16
IV.5	Fragestellungen .....	18
<b>V</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>19</b>
V.1	Operationen an Ratten.....	19
V.1.1.1	Tiere .....	19
V.1.1.2	Allgemeines zur Operation.....	19
V.1.2	Markierung.....	20
V.1.2.1	Material .....	20
V.1.2.2	Operation.....	20
V.1.3	Läsion und Pumpenapplikation.....	22
V.1.3.1	Material .....	22
V.1.3.2	Operation.....	22
V.1.4	Perfusion der Ratten und Präparation der Rattengehirne .....	25
V.2	Anfertigung der Kryostatschnitte .....	25
V.3	Zellzählungen.....	26
V.4	in situ Hybridisierung (ISH).....	27
V.4.1	Allgemeines .....	27
V.4.2	Auswahl der Schnitte.....	27
V.4.3	Sonden.....	27
V.4.4	Radioaktive Markierung, Aufreinigung und Aktivitätsmessung der Sonden .....	28
V.4.5	Schnittvorbehandlung für die in situ Hybridisierung .....	29
V.4.6	Prähybridisierung und Hybridisierung .....	29
V.4.7	Abschluss der Hybridisierung und Röntgenfilm-Autoradiographie .....	30
V.4.8	Emulsionsautographie.....	30
V.5	Auswertung der in situ Hybridisierung .....	31
V.5.1	Material.....	31
V.5.2	Datenerhebung.....	31
V.5.3	Datenverarbeitung .....	32
V.6	Biochemische Analysen zur TrkB-Phosphorylierung nach NT-3- Behandlung.....	33
V.6.1	Hochdosierte NT-3-Behandlung des Cortex in vivo.....	33
V.6.2	Western Blots an Immunpräzipitaten .....	34
<b>VI</b>	<b>Resultate .....</b>	<b>36</b>
VI.1	Überleben axotomierter CSN nach Behandlung mit unterschiedlichen NT-3-Dosierungen .....	36
VI.2	Untersuchung der TrkC- und $p75^{NTR}$ -mRNA-Expression in CSN .....	37
VI.2.1	Versuchsgruppen .....	37
VI.2.2	Unlädierte Tiere .....	38
VI.2.3	TrkC- und $p75^{NTR}$ -Expression unter Vehikel- und NT-3-Behandlung.....	38
VI.3	Hochdosierte intracorticale Gabe von NT-3 aktiviert corticales TrkB.....	41
VI.4	Neutralisierung von $p75^{NTR}$ führt zur Rettung der CSN vom axotomieinduzierten Zelltod.....	42

<b>VII</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>44</b>
VII.1	Dosis-Wirkungs-Kurve von NT-3.....	45
VII.2	p75 <sup>NTR</sup> -Expression .....	47
VII.3	TrkC-Expression .....	47
VII.4	Der Rezeptor p75 <sup>NTR</sup> induziert Zelltod axotomierter CSN.....	49
VII.5	Überlebensmodell .....	50
<b>VIII</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>53</b>
<b>IX</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>59</b>
<b>X</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>60</b>
<b>XI</b>	<b>Danksagungen.....</b>	<b>61</b>
<b>XII</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>62</b>

## II Abstrakt

Neuronaler Zelltod spielt während der Entwicklung des Nervensystems eine bedeutende Rolle. Im Laufe der Embryonalentwicklung werden mehr Neurone gebildet als später im reifen Organismus vorhanden sind. Man nimmt an, dass die Verringerung der ursprünglichen Neuronenzahl Vorgänge widerspiegelt, in denen das Nervensystem auf die Bedürfnisse des postnatalen Lebens angepasst wird. Neuronaler Zelltod spielt auch eine wichtige Rolle in der Pathogenese verschiedener neurologischer Erkrankungen wie den neurodegenerativen Krankheiten, amyotrophe Lateralsklerose und Morbus Alzheimer. Das Überleben sich entwickelnder Neurone wird unter anderem von Neurotrophinen reguliert.

In der vorliegenden Studie wird am Modell des corticospinalen Systems der Ratte untersucht, welche Neurotrophine und Neurotrophinrezeptoren am Absterben adulter Neurone nach Läsion beteiligt sind. Vorausgegangene Studien zeigten, dass intracortical infundiertes rekombinantes Neurotrophin 3 (NT-3) den axotomieinduzierten Tod corticospinaler Neurone (CSN) verhindert. Dagegen zeigen Versuche, in denen das gesamte endogene NT-3 im Cortex mit einem Antikörper neutralisiert wird, dass endogenes NT-3 den Zelltod axotomierter CSN fördert.

Um diesen Widerspruch zu klären wurde in dieser Studie untersucht, (1) ob NT-3 bei verschiedenen Dosierungen gegensätzliche Effekte auf das Überleben von CSN hat, (2) ob die Behandlung mit rekombinantem NT-3 die Expression von überlebensassoziierten Neurotrophinrezeptoren ändert, und (3) ob es durch diese Behandlung zur unspezifischen Aktivierung des überlebensfördernden brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Rezeptors TrkB kommt. Weiteres Ziel der Studie war zu zeigen, ob (4) die für die frühe Embryonalentwicklung beschriebene zelltodinduzierende Funktion des gemeinsamen Neurotrophinrezeptors  $p75^{\text{NTR}}$  auch im adulten Organismus relevant ist.

Ad (1). Um zu ermitteln, ob NT-3 bei bestimmten Dosierungen Überleben, bei anderen hingegen den Tod von CSN fördert, wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt. Diese zeigte, dass rekombinantes NT-3 in Dosierungen von 12,5  $\mu\text{g/ml}$  bis 500  $\mu\text{g/ml}$  das Überleben lädierter CSN fördert, und dass sich dieser Effekt bei niedrigeren Dosierungen verliert. Eine zelltodinduzierende Wirkung von rekombinantem NT-3 konnte nicht festgestellt werden. Inzwischen ist bekannt, dass die Zelltodinduktion von Neurotrophinen präferentiell durch die Precursorform eines Neurotrophins erfolgt. Dies könnte erklären, warum es nicht möglich war mit rekombinantem NT-3, welches die reife NT-3-Form darstellt, CSN-Tod zu induzieren. Es

bleibt allerdings die Frage bestehen, warum diese Behandlung das Überleben axotomierter CSN unterstützt.

Ad (2). Unsere Voruntersuchungen zeigten, dass der NT-3-Rezeptor TrkC für den axotomie-induzierten Zelltod der CSN notwendig ist. Die Funktion des gemeinsamen Neurotrophinrezeptor  $p75^{\text{NTR}}$  war in diesem Zusammenhang nicht bekannt. Während der Embryonalentwicklung kann er Zelltod induzieren. Um festzustellen, ob die überlebensfördernden Effekte hochdosierter NT-3-Gaben auf einer Supprimierung der TrkC- und/oder  $p75^{\text{NTR}}$ -Expression beruhen, wurde untersucht, in wieweit sich deren Expression unter NT-3-Infusion verändert. Es wird gezeigt, dass hochdosierte NT-3-Infusionen eine Reduktion der TrkC-Expression in axotomierten CSN verursachen, während die Expression von  $p75^{\text{NTR}}$  unbeeinflusst bleibt. Der überlebensfördernde Effekt von hochdosiertem NT-3 könnte also durch eine verringerte TrkC-Expression vermittelt sein.

Ad (3). *In vitro* wurde beschrieben, dass NT-3 in höheren Dosierungen den Neurotrophinrezeptor TrkB aktiviert, d.h. TrkB-Phosphorylierung induziert. TrkB ist physiologischer Rezeptor für BDNF und Neurotrophin 4. Unser Labor fand, dass endogenes BDNF das Überleben axotomierter CSN über TrkB fördert. Es wurde daher untersucht, ob eine hochdosierte NT-3-Behandlung das Überleben axotomierter CSN über eine unspezifische TrkB-Aktivierung *in vivo* stimulieren kann. Tatsächlich zeigen TrkB-Western Blots an Immunopräzipitaten für Phospho-Tyrosin-Residuen, dass hochdosierte NT-3-Infusionen zu einer Erhöhung der corticalen TrkB-Phosphorylierung führen. Der überlebensfördernde Effekt einer hochdosierten Behandlung mit rekombinantem NT-3 könnte also eine unspezifische TrkB-Stimulierung widerspiegeln, die die eigentliche physiologische Rolle von endogenem NT-3 maskiert.

Ad (4). Die Rezeptor-Expressionsstudien in (1) ergaben, dass  $p75^{\text{NTR}}$  in axotomierten CSN induziert wird. Die höchste  $p75^{\text{NTR}}$ -Expression wurde an Tag 3 nach der Axotomie, dem Zeitpunkt der Zelltodinduktion lädierter CSN, beobachtet. Dieses Expressionsmuster legt nahe, dass  $p75^{\text{NTR}}$  eine Rolle beim läSIONSbedingten Zelltod von CSN spielt. Um dies zu überprüfen, wurde  $p75^{\text{NTR}}$  im lädierten Cortex mit einem  $p75^{\text{NTR}}$ -Antikörper blockiert. Diese Behandlung verhindert das Absterben lädierter CSN. Dieser Befund und der Zeitverlauf der läSIONSbedingten  $p75^{\text{NTR}}$ -Induktion zeigen, dass  $p75^{\text{NTR}}$  den axotomieinduzierten Zelltod von CSN vermittelt und hierfür wahrscheinlich auch den zeitlichen Ablauf bestimmt.

Die Daten aus dieser Studie liefern zum einen einen Erklärungsansatz, warum hochdosierte Gaben von rekombinantem NT-3 eine gegensätzliche Wirkung zeigt als endogenes NT-3. Schließlich erlauben es die vorgelegten Daten - zusammen mit anderen Befunden des Labors -

ein Modell vorzuschlagen, wie Neurotrophine und ihre Rezeptoren das Überleben lädierter CSN regulieren.

### **III Abstract (englisch)**

Cell death plays an important role during development of the nervous system. More neurons are generated during embryonic development than survive to adulthood. It is assumed that this developmental neuronal death reflects adaptation processes to postnatal life. Neuronal cell death is also important for the pathogenesis of various neurological diseases, such as the neurodegenerative disorders amyotrophic lateral sclerosis and Alzheimer's disease. Neurotrophins play an important role for the survival regulation of developing neurons. This study was undertaken to investigate the role of neurotrophins and their receptors for the death-induction of adult neurons after lesion. We chose the adult rat corticospinal system as a model. Previous studies showed that high-dose intracortical infusions of recombinant NT-3 prevent the lesion-induced death of corticospinal neurons (CSN). Surprisingly, neutralization of endogenous NT-3 with function-blocking antibodies also prevents lesion-induced death of CSN. To identify possible explanations for these contradicting findings, we determined (1) if NT-3 has opposite effects on neuronal survival at different concentrations, (2) if high-dose NT-3 treatment alters the expression of survival regulating neurotrophin receptors, and (3) if high doses of NT-3 may unspecifically activate the survival-promoting brain-derived neurotrophic factor (BDNF) receptor TrkB. The study also aimed at determining (4) if the death-inducing function of p75 as it was shown during early embryonic development takes also place in the adult brain.

(1) To determine if NT-3 induces death at certain concentrations, but promotes survival at others, we generated a dose-response-curve of NT-3-mediated effects on survival. Our analyses show that NT-3 promotes survival of lesioned CSN at doses between 12,5 µg/ml and 500 µg/ml, and that it loses its effects at lower doses. A death-inducing effect of recombinant NT-3 could not be detected. In the meantime, it is known that neurotrophin-mediated death is preferentially caused by neurotrophin precursors. This could explain why we could not induce neuronal death with recombinant NT-3 because it is the mature form of NT-3. Still the question remains why treatment with high dose recombinant NT-3 promotes survival.

(2) We showed that the NT-3 receptor TrkC is required for the lesion induced death of CSN. The role of the common neurotrophin receptor p75<sup>NTR</sup> was unknown in this context. It was shown that this receptor can induce neuronal death during embryonic development. To determine if the survival promoting effects of high-dose infusions of recombinant NT-3 are based on a suppression of TrkC and/or p75<sup>NTR</sup> expression, we analysed the expression profiles

of TrkC and p75 in lesioned CSN under NT-3 treatment. These analyses show that high-dose NT-3 treatment reduces TrkC expression in lesioned CSN, while p75<sup>NTR</sup> expression is unaltered. Thus, the down-regulation of TrkC by a high NT-3 dose may contribute to the rescue effects observed after this treatment.

(3) *In vitro*, high-doses of NT3 can activate the neurotrophin receptor TrkB, i.e. induce TrkB phosphorylation. TrkB is the physiological receptor for BDNF and neurotrophin 4. We found that endogenous BDNF promotes the survival of intact CSN via TrkB. We therefore examined if high-dose treatment with recombinant NT-3 induces unspecific activation of TrkB *in vivo*. Indeed, TrkB Western Blot analyses on immunoprecipitates for phospho-tyrosin residues show that high-dose NT-3 infusions increase cortical TrkB phosphorylation. This suggests that the survival promoting effects of high-dose recombinant NT3 treatment reflect an unspecific stimulation of TrkB that masks the physiological function of endogenous NT-3.

(4) The analysis of neurotrophin receptor expression in (1) revealed that p75<sup>NTR</sup> is induced in lesioned CSN. The peak of p75<sup>NTR</sup> expression was on day 3 after axotomy which is the time point of their lesion-induced death. This expression pattern suggests that p75<sup>NTR</sup> is involved in the lesion-induced death of CSN. To address this possibility we blocked cortical p75<sup>NTR</sup> with a function-blocking p75<sup>NTR</sup> antibody infused to lesioned CSN. This treatment prevents lesion-induced death of CSN. Together with the p75<sup>NTR</sup> expression profile after lesion, this finding shows that p75<sup>NTR</sup> induces death of CSN after the lesion, and that p75<sup>NTR</sup> likely sets the timing of this death-induction.

The study provides a possible explanation as to why high-dose recombinant NT-3 treatment shows an opposite effect as it would be expected from the physiological function of endogenous NT-3 for the survival of lesioned CSN. The neurotrophin receptor profiling after lesion and the studies on the function of p75<sup>NTR</sup> for lesion-induced death *in vivo*, together with previous findings of our laboratory, allow proposing a model for neurotrophin/neurotrophin receptor mediated survival regulation of adult CSN after lesion.



## **IV Einleitung**

### ***IV.1 Regulation neuronalen Überlebens***

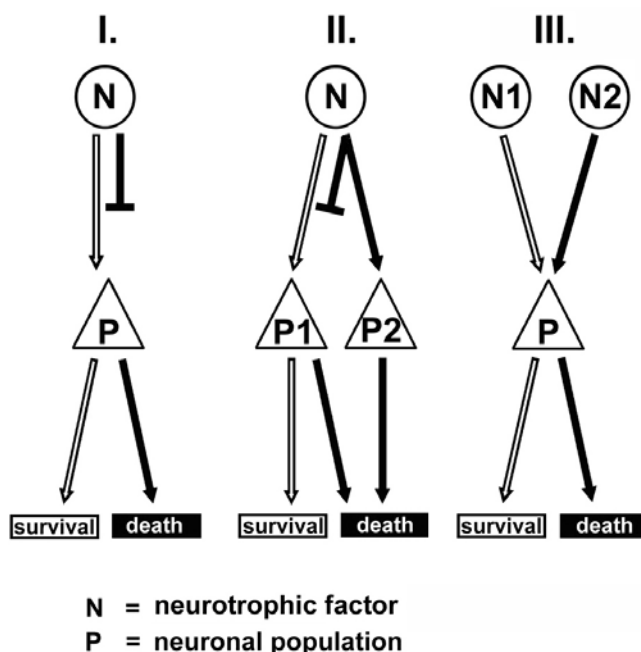
Zelltod spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung von neuronalem Gewebe. Wie seit einiger Zeit bekannt ist, wird das Überleben sich entwickelnder Neuronen von neuronalen Wachstumsfaktoren reguliert. Diese Erkenntnis basiert auf Beobachtungen aus den 1950er Jahren: Bei der Co-Kultivierung von Neuronen und ihren Zielgewebszellen wurde erkannt, dass die Größe einer neuronalen Population von der Größe des Innervationsgebietes abhängt (Hamburger 1993). Es wurde postuliert, dass die Zellen des Innervationsgebietes einen Stoff produzieren, der das Wachstum und Überleben von Neuronen positiv beeinflusst. Tatsächlich wurde in den 1950ern mit dem Neurotrophin Nerve Growth Factor (NGF) der erste Faktor identifiziert, der diese Eigenschaften besitzt (Cohen S 1956). In den Folgejahren konnte die klassische Neurotrophinhypothese etabliert werden: Neurone, die ihr Zielgewebe erfolgreich innervieren, werden durch aus dem Innervationsgebiet stammende Überlebensfaktoren am Leben gehalten, während alle anderen Neurone in Ermangelung solcher Überlebensfaktoren in der frühen Postnatalphase absterben (Barde 1989; Hamburger 1993) (Abbildung 1 I.). In der Nachfolgezeit wurden zwei Klassen von Neurotrophinrezeptoren entdeckt (Chao 2003) (siehe IV.2), der gemeinsame Neurotrophinrezeptor  $p75^{\text{NTR}}$  und die ligandenspezifischen Tyrosin-Kinase-Rezeptoren der *Trk*-Familie. *Trk*-Rezeptoren wurden schon relativ früh als überlebensfördernd etabliert. Die Bedeutung von  $p75^{\text{NTR}}$  hingegen war anfänglich weniger klar.

Spätere Studien zeigten, dass Neurotrophine nicht nur Überleben fördern, sondern diese auch Zelltod induzieren können. So wurde z.B. demonstriert, dass NGF über  $p75^{\text{NTR}}$  in Abwesenheit von *TrkA* während der Embryonalentwicklung in der Retinaanlage des Huhns Apoptose induziert (Frade, Rodriguez-Tebar et al. 1996; Frade and Barde 1998). Ferner wurde in anderen Studien gezeigt, dass NGF über  $p75^{\text{NTR}}$  in Abhängigkeit vom Entwicklungsstand sensorischer Neurone Überleben oder Absterben verursachen kann (Barrett and Bartlett 1994).

Die klassische Neurotrophinhypothese wurde entsprechend ergänzt (Abbildung 1 II.). Nach wie vor ging man davon aus, dass neuronales Überleben im Regelfall gemäß der klassischen Neurotrophinhypothese reguliert wird, wonach Neurotrophine Überleben über den entsprechenden *Trk*-Rezeptor fördern und solche Neurone, die nicht genügend überlebensfördernde *Trk*-Stimulation erhielten, absterben. Die aktive Zelltodinduktion über  $p75^{\text{NTR}}$  wurde als Ausnahmesituation der frühen Embryonalentwicklung betrachtet, wobei

NGF p75<sup>NTR</sup>-vermittelten Zelltod nur in solchen Neuronen induzieren könnte, die keinen Trk-Rezeptor exprimieren (Dechant und Barde, 1997).

Später wurde im adulten corticospinalen System (CSS) gezeigt, dass Neurotrophine neuronales Überleben antagonistisch regulieren können (Abbildung 1 III.). Nach Axotomie wird das Überleben corticospinaler Neurone (CSN) durch BDNF gefördert, während für die Zelltodinduktion der BDNF-abhängigen CSN NT-3 und NGF benötigt werden (Giehl, Rohrig et al. 2001; Harrington et al. 2004). Die entsprechenden überlebensfördernden Trk-Rezeptoren und der mutmaßlich zelltodinduzierende p75<sup>NTR</sup>-Rezeptor werden hierbei in ein und derselben Zelle exprimiert (Giehl, Schutte et al. 1998; Giehl, Rohrig et al. 2001). Dieses Regulationsprinzip ist inzwischen für die neurotrophinvermittelte Überlebensregulation während der Embryonalentwicklung und im adulten Nervensystem nach Läsionen etabliert (Dechant und Barde 2002; Chao 2003).



**ABBILDUNG 1 Regulationsmodelle für neuronales Überleben:** I. Die klassische Neurotrophin-hypothese besagt, dass die Verfügbarkeit eines Neurotrophins das Überleben einer Neuronenpopulation bedingt. Neurone die genügend Neurotrophin erhalten überleben, die anderen sterben ab. II. Die Ergebnisse späterer Studien modifizierten diese Vorstellung. Es wurde gezeigt, dass ein Neurotrophin bei der einen Neuronenpopulation Überleben fördern kann, während es bei einer anderen Neuronenpopulation Zelltod verursacht. III. Ergebnisse der Studie, in deren Kontext die vorliegende Dissertationsarbeit erstellt wurde, zeigen, dass das Überleben einer Neuronenpopulation durch verschiedene Neurotrophine antagonistisch reguliert werden kann.

## ***IV.2 Neurotrophische Faktoren und ihre Rezeptoren***

Im Folgenden werden die für diese Studie relevanten neurotrophischen Faktoren der Neurotrophinfamilie und ihre Rezeptoren beschrieben.

### **IV.2.1 Die Neurotrophine**

Von der Familie der Neurotrophine sind zur Zeit fünf Mitglieder bekannt: Nerve Growth Faktor (NGF), Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), Neurotrophin 3 (NT-3), Neurotrophin 4/5 (NT-4/5) und Neurotrophin 6 (NT-6) (Gotz, Koster et al. 1994). Es handelt sich um sezernierte Proteine, deren Hauptwirkungsort das Nervensystem ist. Sie regulieren das Überleben von Neuronen, neuronale und gliale Differenzierung, axonales Wachstum, neuronale Transmission, sowie Transmitterproduktion (Lewin and Barde 1996). Im adulten Organismus spielen Neurotrophine bei inflammatorischen Reaktionen, bei neuronaler Plastizität, bei neuronaler Transmission und bei der peripheren Nervenregeneration eine Rolle (Lewin and Barde 1996).

Neurotrophine haben sehr ähnliche biochemische Eigenschaften. NGF hat ein Molekulargewicht von ca. 12500 kDa. Es besteht eine hohe Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen, bei NGF und BDNF ca. 50%. Während der Reifung der Proteine bestimmen Bindungen von sechs Cysteinresten (1-4, 2-5, 3-6) die Quartärstruktur (Acklin, Stoney et al. 1993). Die Lokalisation der Cysteinreste ist bei allen Neurotrophinen gleich. Obwohl sich die Neurotrophine in der unreifen Form deutlich voneinander unterscheiden, zeigen sie in der reifen Form kaum Unterschiede. Es handelt sich um Dimere. Die Struktur des reifen NGF-Monomers zeigt drei antiparallele  $\beta$ -Stränge, die eine große, flache Oberfläche bilden. An diese lagert sich ein zweites Monomer an. Aufgrund der großen Ähnlichkeit der Neurotrophine könnte es auch zur Bildung von Heterodimeren kommen, bei denen sich zwei verschiedene Monomere, z.B. BDNF und NT-3, zusammen lagern können. Diese Möglichkeit wurde bei Denaturierungs-Renaturierungs-Experimenten gezeigt (Radziejewski and Robinson 1993; Arakawa, Haniu et al. 1994; Jungbluth, Bailey et al. 1994; Heymach and Shooter 1995; Robinson, Radziejewski et al. 1995). Neurotrophinheterodimere zeigen eine kombinierte biologische Aktivität. Dies wurde in Experimenten mit Neuronen, die sowohl BDNF- als auch NT-3-Rezeptoren exprimieren, gezeigt. Jedoch ist biologische Aktivität der Heterodimere niedriger als die der entsprechenden Homodimere (Jungbluth, Bailey et al. 1994). Ob solche Heterodimere eine physiologische Relevanz besitzen, ist nicht bekannt.

## IV.2.2 Die Neurotrophinrezeptoren

Es gibt zwei verschiedene Gruppen von Neurotrophinrezeptoren: Der gemeinsame Neurotrophinrezeptor  $p75^{\text{NTR}}$  und die ligandenspezifischen Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (Trk) TrkA, TrkB und TrkC.

## IV.2.3 $p75^{\text{NTR}}$

Der so genannte gemeinsame Neurotrophinrezeptor  $p75^{\text{NTR}}$  erfüllt verschiedene Funktionen (Dechant and Neumann 2002). Es wird diskutiert, ob  $p75^{\text{NTR}}$ -Aktivierung die Zelle für Trk-Aktivierung sensitiviert. Ferner wird die Affinität der Trk-Rezeptoren zu ihren Liganden erhöht (s.u.). Daneben hat  $p75^{\text{NTR}}$  auch eine eigenständige Funktion als Zelltodinduktor *in vitro*. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass  $p75^{\text{NTR}}$  für die Zelltodinduktion von CSN *in vivo* benötigt wird.

Der  $p75^{\text{NTR}}$ -Rezeptor ist ein Transmembranprotein (75kDa). Er zählt zu den Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren (TNF-R). Charakteristisch für diese Gruppe von Rezeptoren sind cysteinreiche Extrazellulärdomänen, die aus drei bis sechs über Disulfidbrücken verbundenen Untereinheiten bestehen. An  $p75^{\text{NTR}}$  binden alle Neurotrophine mit annähernd gleicher Affinität (Rodriguez-Tebar, Dechant et al. 1990; Rodriguez-Tebar, Dechant et al. 1992; Squinto, Stitt et al. 1991). Jedoch unterscheidet sich die Bindungskinetik. BDNF bindet am langsamsten an  $p75^{\text{NTR}}$ . Neurotrophine binden über positiv geladene Reste an  $p75^{\text{NTR}}$ . Die räumliche Anordnung dieser Reste ist spezifisch für jedes Neurotrophin (Ryden, Murray-Rust et al. 1995). Diese Tatsache ermöglicht es  $p75^{\text{NTR}}$  zwischen den verschiedenen Liganden zu differenzieren. Ferner wurde gezeigt, dass die zelluläre Antwort auf  $p75^{\text{NTR}}$ -Aktivierung abhängig vom Kontext ist, d.h. der Präsenz von Co-Rezeptoren, der Phase im Zellzyklus etc. Ursprünglich wurde  $p75^{\text{NTR}}$  als der niederaffine Neurotrophinrezeptor beschrieben, da Neurotrophine mit deutlich geringerer Affinität an ihn als an die Trk-Rezeptoren binden. Die Untersuchungen, die  $p75^{\text{NTR}}$  als niederaffinen Neurotrophinrezeptor charakterisieren, basierten auf Experimenten mit reifen Neurotrophinen. Inzwischen ist bekannt, dass auch Neurotrophinprecursoren biologische Effekte über Neurotrophinrezeptoren ausüben (Lee, Kermani et al. 2001). Es ergibt sich hier ein umgekehrtes Affinitätsmuster als es für reife Neurotrophine beschrieben wurde: Neurotrophinprecursoren binden hochaffin an  $p75^{\text{NTR}}$ , während sie kaum Affinität zu Trk-Rezeptoren aufweisen. Die Unterscheidung zwischen niederaffinen und hochaffinen Neurotrophinrezeptoren scheint insofern nicht mehr gerechtfertigt zu sein.

Die Aktivierung von p75<sup>NTR</sup> kann zur Hydrolyse von Sphingomyelin und zur Ceramidproduktion (Dobrowsky, Werner et al. 1994; Dobrowsky, Jenkins et al. 1995), zur Aktivierung des Rho-Signaltransduktionsweges, oder zur Assoziierung mit Rezeptoren anderer Genfamilien führen (Bibel and Barde 2000; Dechant 2002). In Oligodendrozyten wurde gezeigt, dass p75<sup>NTR</sup> über die Bindung von TNF receptor-associated factor (TRAF) NFκB aktiviert (Khursigara, Orlinick et al. 1999). Ferner fand man, dass NGF über p75<sup>NTR</sup> den c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Signalweg und Caspase 1, -2 und -3 aktiviert. Untersuchungen durch Blockade dieser Signalwege lassen vermuten, dass deren Aktivierung im Absterben der Zelle resultiert (Gu, Casaccia-Bonnel et al. 1999). Ebenso scheint p75<sup>NTR</sup> im Kontext der JNK-Signaltransduktionswege p53 zu aktivieren, was ebenfalls zur Induktion von Apoptose führt (Aloyz, Bamji et al. 1998). Entsprechend der oben beschriebenen Interaktionen wird p75<sup>NTR</sup> mit der Regulation neuronaler Differenzierung, Zelltodinduktion, Überlebensstimulierung, und axonaler Elongation in Verbindung gebracht.

#### IV.2.4 Trk-Rezeptoren

Tyrosin-Kinase-Rezeptoren der Trk-Familie sind Neurotrophinrezeptoren, die eine höhere Ligandenspezifität als p75<sup>NTR</sup> aufweisen. Über diese Rezeptoren werden die meisten bekannten Wirkungen der Neurotrophine vermittelt wie z.B. neuronale Überlebensförderung, axonale Elongation, Differenzierung, Plastizität und neuronale Transmission (Snider 1994; Barbacid 1995; Lewin and Barde 1996; Chao 2003). Es sind bis heute drei Trk-Rezeptoren bekannt: TrkA, TrkB und TrkC. TrkA bindet NGF, TrkB bindet BDNF und NT-4, und TrkC bindet NT-3. NT-3 bindet *in vitro* auch niederaffin an TrkB (Barbacid 1994). Die Aminosäuresequenzen der einzelnen Trk-Rezeptoren stimmen im paarweisen Vergleich zu 66-68% überein (Lamballe, Klein et al. 1991). Bei Trk-Rezeptoren wurden verschiedene Splicevarianten beschrieben, die ebenfalls gewebespezifisch auftreten (Chao 2003). Die Extrazellulärdomäne besteht bei allen Trk-Formen aus drei Repeats von Immunglobulinähnlichen Domänen. Die intrazellulär gelegene katalytische Tyrosin-Kinase-Domäne besitzt im Falle von TrkC eine Insertionsstelle, in die kurze Sequenzen eingebaut sein können (Barbacid 1995). Die genaue Funktion dieser Insertionen ist noch nicht bekannt; eine Einschränkung potentieller TrkC-Funktionen durch Insertionen wird diskutiert (Barbacid 1995). Darüber hinaus sind für TrkB und TrkC trunkierte Rezeptorformen beschrieben worden (Barbacid 1995), bei denen die Tyrosin-Kinase enthaltende Intrazellulärdomäne fehlt. Die Funktion dieser trunkierten Rezeptorformen ist bis heute weitgehend ungeklärt. Es wird

vermutet, dass diese z.B. die Signaltransduktion negativ beeinflussen indem sie inaktive Dimere mit der nicht-trunkierten Form bilden.

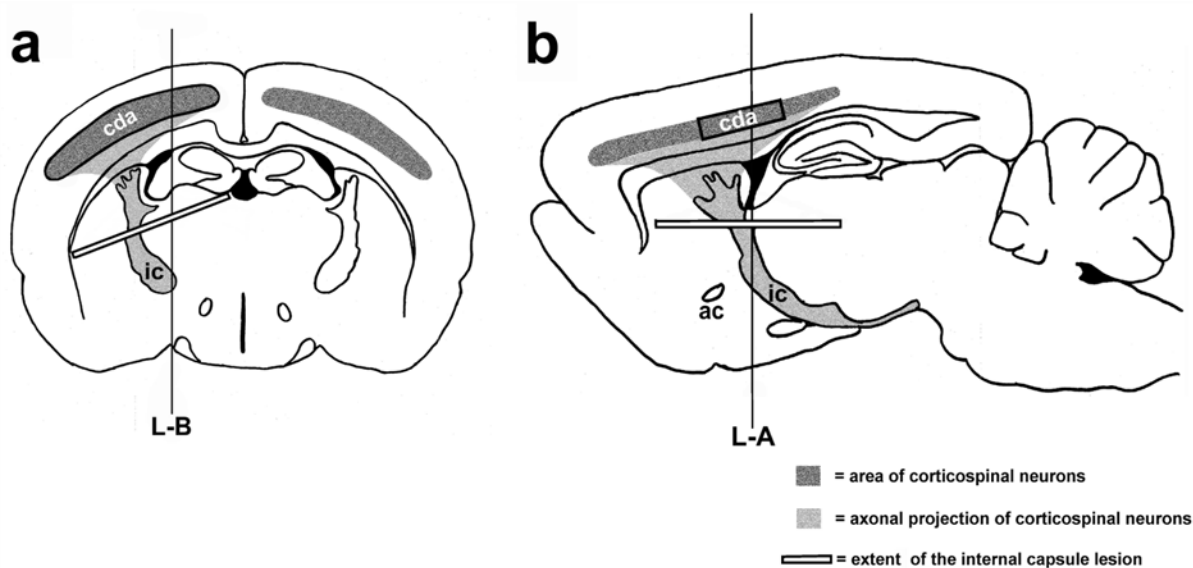
Die Bindung von Neurotrophinen an Trk-Rezeptoren erfolgt hauptsächlich an der IgG-ähnlichen Domäne, die der Zellmembran am nächsten ist (Jing, Tapley et al. 1992). Dies führt zu einer Dimerisierung der Trk-Rezeptoren. Darauf hin kommt es zuerst zu einer Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosin-Kinase-Domäne, welche die Phosphorylierung von Tyrosin-, Serin- und Threonin-Resten intrazellulärer Adapter Proteine initiiert. Hierdurch werden intrazelluläre Signaltransduktionswege aktiviert, wie z.B. der MAP-Kinase-Weg (Kaplan and Stephens 1994; Chao 2003).

Die Verteilung der Trk-Rezeptoren im neuronalen Gewebe ist sehr dynamisch und abhängig vom jeweiligen Entwicklungsstadium und der neuronalen Aktivität. TrkC und TrkB wird im Gegensatz zu p75<sup>NTR</sup> in den meisten corticalen Schichten exprimiert. Die Expressionsmuster variieren während der Embryonalentwicklung von Entwicklungsstadium zu Entwicklungsstadium beträchtlich, was die unterschiedliche und während verschiedener Entwicklungsphasen wechselnde Ansprechbarkeit der verschiedenen Neuronenpopulationen auf Neurotrophine erklärt (Lewin and Barde 1996). Auch der Funktionszustand neuronaler Systeme hat einen starken Einfluss auf die Trk-Rezeptorexpression. So haben z.B. Gedächtnisleistungen, körperliche Aktivität, aber auch pathologische Prozesse wie epileptische Anfälle einen erheblichen Einfluss auf die jeweiligen Expressionsniveaus (Chao 2003).

#### **IV.2.5 Das corticospinale System**

Die Neurone des corticospinalen Systems liegen in Schicht 5 des mit motorischen Funktionen assoziierten Cortex (Miller 1987; Nudo and Masterton 1990; Zilles K 1990). Das corticospinale System enthält Afferenzen aus verschiedenen subcorticalen Strukturen (Striatum, Thalamus, Stammhirn) aber auch aus anderen Cortexarealen (Miller 1987; Nudo and Masterton 1990; Zilles K 1990). Die Efferenzen corticospinaler Neurone (CSN) verlaufen durch die corticale Schicht 6, perforieren das Corpus callosum, und sammeln sich dann unterhalb dieser Struktur in der im Zwischenhirn gelegenen Capsula interna. Die Axone der CSN verlaufen dann weiter nach caudal durch die Crura cerebri, die Fasciculi longitudinales pontis und die Pyramide zum corticospinalen Trakt des Rückenmarks. Dieser liegt bei der Ratte - im Gegensatz zum Mensch - nicht im Vorderseitenstrang, sondern im Hinterstrang des Rückenmarks. Dort findet auf Segmentebene entweder direkt oder indirekt über Interneurone die Umschaltung auf die spinalen Motorneurone statt. Hauptaufgabe der CSN besteht in der

Regulierung der Motorik mit Schwerpunkt der Willkür- und der Feinmotorik (Armand 1982; Porter 1985).



**ABBILDUNG 2 Schematische Darstellung des corticospinalen Modells:** Schwarz umrandet ist das Gebiet, in dem Zelltod nach Läsion in der Capsula interna konstant beobachtet wird (cell death area (cda)). Die Überlebensdaten der vorliegenden Studie stammen von Zellzählungen in diesem Areal. Ferner gezeigt ist die Gesamtausbreitung der CSN im Cortex (dunkelgrau), die Projektionsbahnen zur Capsula interna (ic) (hellgrau) und die vordere Kommissur (ac). Letztere wird als Referenzmarke verwendet um den Beginn des Zelltodareales festzulegen. Der horizontale Balken über der Capsula interna markiert die Lage der Läsion. L-A bzw. L-B zeigen die Lage des jeweiligen Querschnitts von A in B bzw. von B in A an. Die CSN des sensorischen Motorcortex liegen im lateralen Cortex (Miller 1987; Bonatz, Rohrig et al. 2000). Sie sind hier nicht eingezeichnet.

In der Literatur werden bei Ratten und Mäusen drei Areale beschrieben, in denen CSN vorkommen (Miller 1987; Nudo and Masterton 1990; Bonatz, Rohrig et al. 2000):

Der sensomotorische, der medial präfrontale und der somatosensorische Cortex. Die beiden ersten Areale sind mediodorsal gelegen, der somatosensorische Cortex liegt lateral. Die Aussagen in dieser Studie beziehen sich auf den sensomotorischen Cortex.

Corticospinale Neurone der Ratte entwickelt sich nach dem dreizehnten Tag der Embryonalentwicklung aus corticalen Vorläuferzellen (O'Leary, Borngasser et al. 1995; Uylings 2000). Sie siedeln sich nach Verlassen des Zellzyklus in Schicht 5 des Cortex an, von wo sie dann Projektionsfasern ins Rückenmark ausbilden. In Gegensatz zu vielen peripheren Neuronensystemen findet im corticospinalen System kaum embryonaler/früh postnataler Zelltod zur Reifung neuronaler Verschaltungen statt. Die Reifung der neuronalen Verschaltung erfolgt bei CSN durch Eliminierung temporär angelegter Kollaterale (O'Leary and Koester 1993). Derartige temporäre Kollaterale ziehen z.B. ins optische Tectum. Übrig bleiben nach der Kollateraleliminierung überwiegend die Projektionen ins Rückenmark. Ein

ähnlicher aber reziproker Mechanismus findet sich z.B. bei Schicht 5-Neuronen des visuellen Cortex, die temporäre Kollateralen ins Rückenmark eliminieren und dafür ihre Projektionen ins optische Tectum behalten (Koester and O'Leary 1994).

### ***IV.3 Relevanz der Studien***

Untersuchungen über die Regulation neuronalen Überlebens spielen eine wichtige Rolle für die Entwicklung neuer Therapiekonzepte z.B. von neurodegenerativen Erkrankungen wie der amyotrophe Lateralsklerose (ALS). Erkenntnisse auf diesem Gebiet könnten helfen bei diesen Erkrankungen zelltodrelevante Mechanismen besser zu begreifen und neue Ansätze zur Prävention oder Therapie zu finden. Ebenso haben die Untersuchungen Bedeutung für ZNS-Traumen, wie sie z.B. nach Rückenmarksverletzungen beobachtet werden, oder die Folgen hämorrhagischer und ischämischer Insulte, da auch in deren Kontext die Folgen neuronalen Todes eine wesentliche Rolle spielen.

### ***IV.4 Corticospinales Läsionsmodell***

Um die trophischen Abhängigkeiten der CSN zu untersuchen, müssen sie zunächst retrograd vom Rückenmark aus mit einem Fluoreszenztracer markiert werden (Giehl and Tetzlaff 1996). Eine Woche nach der Markierung werden die Axone der CSN mit einem stereotaktischen Messer unilateral im Bereich der Capsula interna lädiert (Giehl and Tetzlaff 1996). Durch Applikation eines zweiten Tracers nach der Läsion zum Rückenmark wurde gezeigt, dass bei diesem Läsionstyp sämtliche CSN des sensomotorischen Cortex der Läsionsseite axotomiert werden (Giehl and Tetzlaff 1996; Bonatz, Rohrig et al. 2000). Etwa 50% der axotomierten CSN sterben im Verlauf der ersten 5 Tage nach der Läsion ab. Nach diesem Zeitpunkt findet kein weiterer axotomieinduzierter Tod mehr statt. Diese Form der mechanischen Zelltodinduktion wurde als Modellsystem für die Untersuchung der trophischen Abhängigkeiten der CSN verwendet. Zu diesem Zweck infundierte man über osmotische Minipumpen rekombinante Neurotrophine in den Cortex der Läsionsseite (Giehl and Tetzlaff 1996). Diese Versuche ergaben, dass eine intracorticale Behandlung mit rekombinantem BDNF oder NT-3 in Dosierungen von 12 µg/d den läsionsbedingten Tod der CSN verhindert (Giehl and Tetzlaff 1996). Infundiert man lediglich Vehikellösung konnte man interessanterweise auch einen geringfügigen überlebensfördernden Effekt beobachten. Dieser Vehikeffekt beruht wahrscheinlich auf der lokalen Freisetzung von Cytokinen im Bereich des Pumpenapplikators (Giehl and Tetzlaff 1996). Neben den Neurotrophinen konnte



auch glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) als Überlebensfaktor für lädierte CSN identifiziert werden. Dieser Faktor hat einen kompletten Rettungseffekt bei Dosierungen zwischen 0,3 und 6 µg GDNF pro Tag. Bei höheren Dosierungen verschwindet dieser Effekt allerdings (Giehl, Schacht et al. 1997). Es konnte kein cytotoxischer Effekt bei hohen GDNF Dosierungen nachgewiesen werden. Man erklärt daher den fehlenden überlebensfördernden Effekt hochdosierter GDNF Gaben damit, dass die Rezeptoren für GDNF desensitiviert werden (Giehl, Schacht et al. 1997).

Um zu klären, inwieweit die durch BDNF- und NT-3-Behandlung erzielten Rettungseffekte von physiologischer Relevanz sind, wurden in Folgeexperimenten endogene Neurotrophine in Ratten mit Antikörpern blockiert und die Reaktion von CSN auf Axotomie in dieser Situation untersucht. Die Bedeutung von endogenem BDNF und NT-3 für axotomierte CSN wurde im Folgenden in Knockout-Mäusen für die jeweiligen Neurotrophine untersucht. Insgesamt zeigten die Experimente beider Ansätze (Giehl, Schutte et al. 1998; Giehl, Rohrig et al. 2001), dass ca. 60% der axotomierten CSN von endogenem BDNF abhängen und dass endogenes NT-3 für den Zelltod der BDNF-abhängigen CSN benötigt wird. Während die Ergebnisse einer BDNF-Blockierung im Einklang zu den oben beschriebenen Befunden nach Infusion von rekombinantem BDNF stehen, widersprechen die Ergebnisse einer NT-3-Blockierung den Befunden nach hochdosierter Infusion von rekombinantem NT-3.

Ziel der vorliegenden Studie war es einen Erklärungsansatz dafür zu finden, warum hochdosierte Gaben von rekombinantem NT-3 zur Rettung lädierter CSN führen, wenngleich endogenes NT-3 Zelltod nach der Läsion fördert. Wir fokussierten hierbei auf folgende Möglichkeiten:

Analog zu hochdosierter rekombinanter GDNF-Behandlung könnte die hochdosierte NT-3 Gabe einen Desensitisierungseffekt bewirken. In diesem Sinne könnte ein zelltodinduzierender Rezeptor durch "überdosiertes" NT-3 herunterreguliert und eine effektive Zelltodinduktion hierdurch unmöglich gemacht werden. Diese Möglichkeit wurde in den Fragestellungen 1 und 2 untersucht. Die Untersuchungen zur Fragestellung 1 zielten hierbei auf den biologischen Effekt ab, also einen möglicherweise unterschiedlichen Überlebenseffekt hoher und niedriger NT-3 Dosierungen. Die Untersuchungen zur Fragestellung 2 zielten auf die Beeinflussung der für eine solche Desensitivierung in Betracht kommenden Rezeptoren. Wir untersuchten hier eine mögliche Supprimierung des NT-3 Rezeptors TrkC und des gemeinsamen Neurotrophinrezeptors p75<sup>NTR</sup>. TrkC ist nämlich notwendig für den axotomieinduzierten CSN-Tod (Giehl, Rohrig et al. 2001) und p75<sup>NTR</sup> wurde als zelltodinduzierender Rezeptor während der Embryonalentwicklung beschrieben

(Dechant and Barde 2002). Schließlich wurde in Fragestellung 3 die Möglichkeit untersucht, dass hochdosiertes NT-3 die unspezifische Aktivierung eines überlebensfördernden Rezeptors bewirkt. Die unspezifische Aktivierung des BDNF-Rezeptors TrkB wäre hier nahe liegend. *In vitro* konnte nachgewiesen werden, dass NT-3 in hohen Dosierungen auch TrkB aktivieren kann (Barbacid 1994), und TrkB ist notwendig für die Überlebensförderung lädierter CSN (Abbildung 10).

#### ***IV.5 Fragestellungen***

Aus dem einleitend Dargestellten ergeben sich für die Arbeit folgende Fragestellungen:

- (1) Hat rekombinantes NT-3 bei verschiedenen Dosierungen gegensätzliche Effekte auf das Überleben von axotomierten CSN? Zur Beantwortung der Frage wurde das Überleben axotomierter CSN unter der Behandlung mit verschiedenen NT-3-Dosierungen ermittelt.
- (2) Verändert die Gabe von rekombinatem NT-3 die Expression seines Rezeptors TrkC und/oder des gemeinsamen Neurotrophinrezeptors  $p75^{NTR}$  in axotomierten CSN? Hierzu wurde mit semiquantitativen *in situ* Hybridisierungen die Expression von TrkC- und  $p75^{NTR}$ -mRNA unter NT-3-Behandlung untersucht.
- (3) Kommt es durch die hochdosierte Gabe von rekombinatem NT-3 zur unspezifischen Aktivierung des überlebensfördernden BDNF-Rezeptors TrkB? Zur Beantwortung dieser Frage wurden mit hochdosiertem NT-3 behandelte Cortices einer biochemischen Analyse der TrkB-Phosphorylierung unterzogen.
- (4) Die Untersuchungen im Rahmen der Fragestellung (2) ergaben, dass  $p75^{NTR}$  in axotomierten CSN zum Zeitpunkt der Zelltodinduktion induziert wird. Wie oben dargestellt wurde in Zellsystem und für die frühe Embryonalentwicklung gezeigt, dass  $p75^{NTR}$  neuronalen Zelltod induzieren kann. Die Befunde der Rezeptorexpressionsstudie in (2) legen nahe, dass  $p75^{NTR}$  auch im adulten Organismus nach Läsion eine derartige zelltodinduzierende Funktion hat. Als vierte Fragestellung wurde daher formuliert, ob  $p75^{NTR}$  den Zelltod axotomierter CSN induziert. Zur Beantwortung dieser Frage wurde das Überleben axotomierter CSN nach Behandlung mit  $p75^{NTR}$ -blockierenden Antikörpern untersucht.

## **V Material und Methoden**

Die Verfahren zur Markierung und Läsion der CSN (Giehl and Tetzlaff 1996; Bonatz, Rohrig et al. 2000), der intracorticalen Substanzapplikation (Giehl and Tetzlaff 1996), der Quantifizierung von CSN (Giehl and Tetzlaff 1996; Bonatz, Rohrig et al. 2000), der *in situ* Hybridisierung (ISH) (Giehl and Mestres 1995; Giehl and Tetzlaff 1996), und der Quantifizierung von ISH Signalen (Giehl, Schutte et al. 1998; Schutte, Yan et al. 2000) sind im Labor etabliert. Im Folgenden werden diese Verfahren und relevante Modifikationen dargestellt.

### ***V.1 Operationen an Ratten***

Ausgangspunkt für die Untersuchungen am corticospinalen System sind Operationen an Ratten, die in drei Schritten vorgenommen werden:

- a) Markierung der CSN,
- b) Läsion des corticospinalen Traktes in der Capsula interna und Implantation einer osmotischen Minipumpe zur Applikation eines neurotrophischen Faktors oder Antikörpers,
- c) Perfusion der Ratte und Präparation des Rattengehirns.

#### ***V.1.1.1 Tiere***

Es werden fünf bis neun Wochen alte, 190-330 g schwere, männliche Spargue-Dawley Ratten verwendet. Drei bis sechs Tiere teilen sich einen Käfig (MAKROLON Typ 4), der mit ALTROMIN Standard® Tierstreu ausgelegt ist. Im Tierstall wird ein Tag-Nacht-Rhythmus (12 Stunden Licht, 12 Stunden Dunkelheit) simuliert. Gefüttert werden die Tiere ad libitum mit ALTROMIN Standard® Trockenfutter. Sämtliche Tierversuche werden durch die zuständige Tierschutzkommission genehmigt und nach entsprechenden Auflagen ausgeführt.

#### ***V.1.1.2 Allgemeines zur Operation***

Für die Operationen werden die Tiere zunächst durch intraperitoneale Injektion einer Kombination von Chloralhydrat (150 mg/kg) und Natriumpentobarbital (32 mg/kg) anästhesiert. Sollte diese Dosis nicht ausreichen, wird Chloralhydrat (bis zu 150 mg/kg) nachgespritzt. Nach Einsetzen der Wirkung werden die Ratten im Operationsbereich rasiert, dann in einen Stereotakt (KOPF®) eingespannt und folgendermaßen fixiert:

Einmal durch Metallstifte in die knöchernen Gehörgänge. Der Oberkiefer wird auf einen Schneidezahnbolzen gelegt, zuletzt wird die gesamte Wirbelsäule durch ein Klebeband am Schwanz gespannt. Diese Fixierung gewährleistet eine weitgehend reproduzierbare Lagerung der Ratte während der Operationen und die Ruhigstellung des Rückenmarks, welches für die Tracerinjektion erforderlich ist. Das Operationsfeld wird mit 70% Alkohol desinfiziert. Die Mikromanipulationen erfolgen unter einem ZEISS® Stereo-Operationsmikroskop. Für die Tracerinjektion, für die Capsula interna Läsion (ICL = “internal capsule lesion”) und die Pumpenapplikatorimplantation wird ein KOPF® Stereotakt verwendet. Die stereotaktischen Koordinaten (s.u.) für Markierung, Läsion und Pumpenimplantation wurden nach dem stereotaktischen Atlas von PAXINOS und WATSON (1982) festgelegt.

Postoperativ werden die noch schlafenden Tiere in mit Zellstoff ausgepolsterte Käfige gelegt und ca. ½ bis ¾ Stunde postoperativ beobachtet um bei eventuellen Komplikationen (z.B. Verlegung der Atemwege) schnell eingreifen zu können. Es wird auf eine ausgeglichene Flüssigkeitsbilanz geachtet. Bei Bedarf werden bis zu 10 ml 0,9% NaCl intraperitoneal gegeben.

## **V.1.2 Markierung**

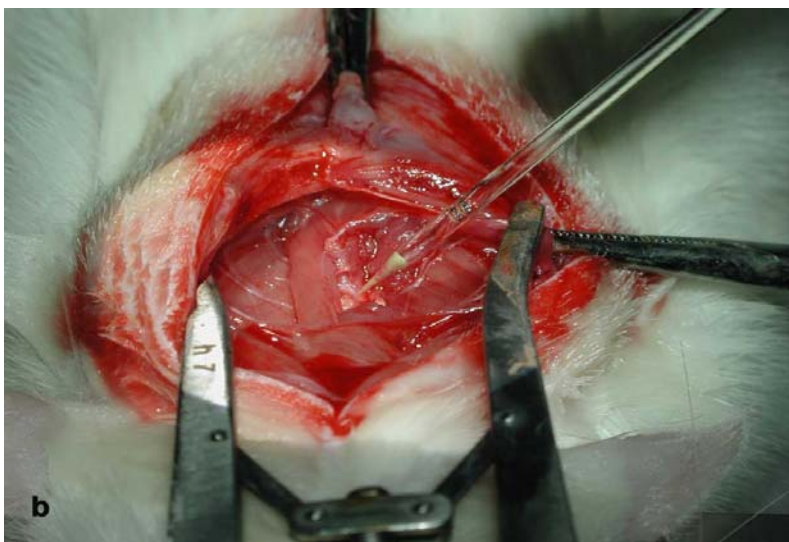
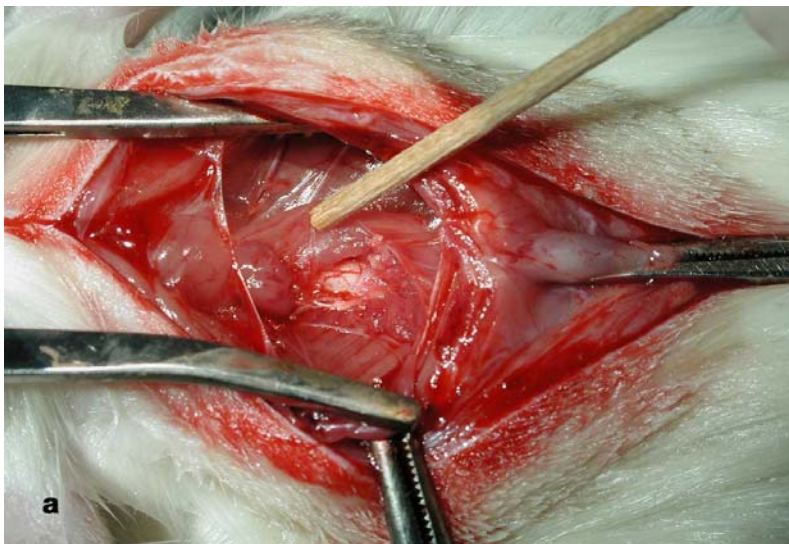
### ***V.1.2.1 Material***

Um die corticospinalen Neurone später identifizieren zu können ist es notwendig diese durch einen Farbstoff zu markieren. Verwendet wird hierfür der Fluoreszenztracer Fast Blue (FB) (2% in 0,2% Dimethylsulfoxid (DMSO)), der im Rückenmark auf Höhe von C4/C5 in den corticospinalen Trakt injiziert wird. Für die Injektion wird eine gläserne Mikroinjektionspipette mit einem Spitzendurchmesser von 30-60 µm benutzt, die in den stereotaktischen Mikromanipulator eingespannt wird. Diese Pipette ist über einen Parafinöl gefüllten Schlauch mit einer HAMILTON Mikroliter® Spritze verbunden.

### ***V.1.2.2 Operation***

Mit einem Skalpell wird die rasierte Haut über dem Segment C4/C5 auf einer Strecke von 2-3 cm aufgeschnitten. Dann wird die obere Schicht der Nackenmuskulatur entlang des Ligamentum nuchae getrennt und mit einem Muskelspanner auseinander gespreizt. Man erhält so ein Operationsfeld, in dem die tiefe Nackenmuskulatur sichtbar ist. Diese wird nun paramedian in Höhe C3/4 reseziert und so die Lamina arcus vertebrae der Halswirbelkörper erkennbar. Nun wird die Lamina des ausgewählten Wirbels mit einer kleinen Knochenzange entfernt.

Man hat nun direkten Blick auf die Dura (Abbildung 3a), die zur Injektion des Tracers eröffnet wird. Der austretende Liquor wird mit einem NEOLAB® Wattetupfer abgesaugt. Der stereotaktische Mikromanipulator mit der Injektionspipette wird nun aufgebaut. Man zieht ca. 1-1,5 µl FB in die Injektionspipette auf und richtet die Pipette aus. Um den rechten corticospinalen Trakt (CST) zu markieren, wählt man die Einstichstelle 0,75 mm links paramedian, für den linken CST 0,92 mm links paramedian. Die Pipette wird jeweils unter einem Winkel von 38° 1 mm an den entsprechenden Stellen ins Rückenmark eingeführt. Dann wird der Tracer appliziert (Abbildung 3b). Nachdem beide Injektionen durchgeführt sind, werden die Injektionspipette, Klemmen und Muskelspreizer entfernt. Die Muskeln werden mit einem ETHICON Prolene® 3-0 Faden mit einem Stich adaptiert, die Haut mit Wundklammern verschlossen. Schließlich wird die Ratte in den mit Zellstoff ausgelegten Käfig zum Aufwachen gelegt.



### ABBILDUNG 3

**Markierungs-OP:** a. Aufsicht auf das freigelegte Rückenmark nachdem der linke Wirbelbogen entfernt wurde. Für den Zugang wurde lediglich die tiefe Nackenmuskulatur in diesem Segment unilateral entfernt. Die restlichen Strukturen bleiben erhalten. Die Koordinaten für die Tracerapplikation wurden aufgrund eines stereotaktischen Atlas für Ratten bestimmt (Paxinos, Watson et al. 1985). Entsprechend den Gefäßverhältnissen kann die Punktionsstelle modifiziert werden, um Blutungen zu vermeiden.

b. Einführen der Mikropipette: Bei der Ratte liegen die corticospinalen Bahnen im Hinterstrang. Zur Markierung der Bahnen muss nicht das Rückenmark bilateral freigelegt werden, es genügt vielmehr ein unilateraler Zugang, bei dem die Tractus jeweils über schräge Injektionen von einer Seite aus vorgenommen werden. (Injektions-Koordinaten, siehe Text)

Der Tracer wird nun durch den corticospinalen Trakt retrograd über die Axone in die Zellkörper der CSN transportiert. Um ein möglichst optimales Anfärben der CSN zu gewährleisten, werden die nächsten Operationen frühestens sechs bis sieben Tage später durchgeführt.

### **V.1.3 Läsion und Pumpenapplikation**

Diese Operation stellt das eigentliche Experiment dar. Abhängig von der Fragestellung wird während dieser Operation die Läsion in der Capsula interna (ICL = "internal capsule lesion") durchgeführt und eine osmotische Minipumpe implantiert. Über diese kann entweder ein neurotrophischer Faktor, ein Antikörper oder eine Kontrolllösung appliziert werden. Für Kontrollzwecke wird bei einigen Tieren nur die Läsion durchgeführt, ohne jedoch eine Pumpe zu implantieren.

#### **V.1.3.1 Material**

Zu Einsatz kommen osmotische Minipumpen des Typs ALZET® 2001. Diese haben ein Füllungsvolumen von 230 µl und pumpen 1 µl pro Stunde. Als Applikator benutzt man eine modifizierte MICROLANCE® 3-Kanüle, bei der die Spitze abgeflacht wird und an deren anderem Ende der Plastikadapter für die Spritze entfernt wird. Das so erhaltene Metallrohr wird rechtwinklig unter Beibehaltung des Lumens gebogen. Am das Ende, an welchem der Plastikadapter war, wird ein Silikonschlauch (KRONLAB®, Durchmesser 0,5 mm) aufgesteckt und mit der Minipumpe verbunden. Abhängig vom Experiment werden die Minipumpen mit 20 mM phosphatgepufferte NaCl-Lösung, pH 7,4 (Vehikel), humanem rekombinanten NT-3 (REGENERON PHARMACEUTICALS; 500 µg in Vehikel-Lösung) oder humanem rekombinanten BDNF (REGENERON PHARMACEUTICALS, 500 µg in Vehikel-Lösung), oder p75<sup>NTR</sup>-blockierenden monovalenten FAB-Fragmenten eines funktionell blockierenden p75<sup>NTR</sup>-Antikörpers (150 µg/ml bzw. 300 µg/ml in PBS (= phosphate-buffered saline)) (Weskamp and Reichardt 1991; Giehl, Rohrig et al. 2001) gefüllt. Zusätzlich wurde allen Lösungen eine Mischung aus Penicillin und Streptomycin in einer Endkonzentration von 50 Einheiten pro ml beigemischt.

#### **V.1.3.2 Operation**

Das Operationsfeld über dem Schädel wird rasiert und desinfiziert. Mit einem Skalpell eröffnet man die Haut über dem Schädeldach und spreizt sie mit zwei Klemmen auseinander. Das Periost wird zur Seite präpariert. Dann präpariert man stumpf caudal eine subkutane Tasche die später die Minipumpe aufnimmt. Nun werden mit einem feinen Bohrer (EWL®

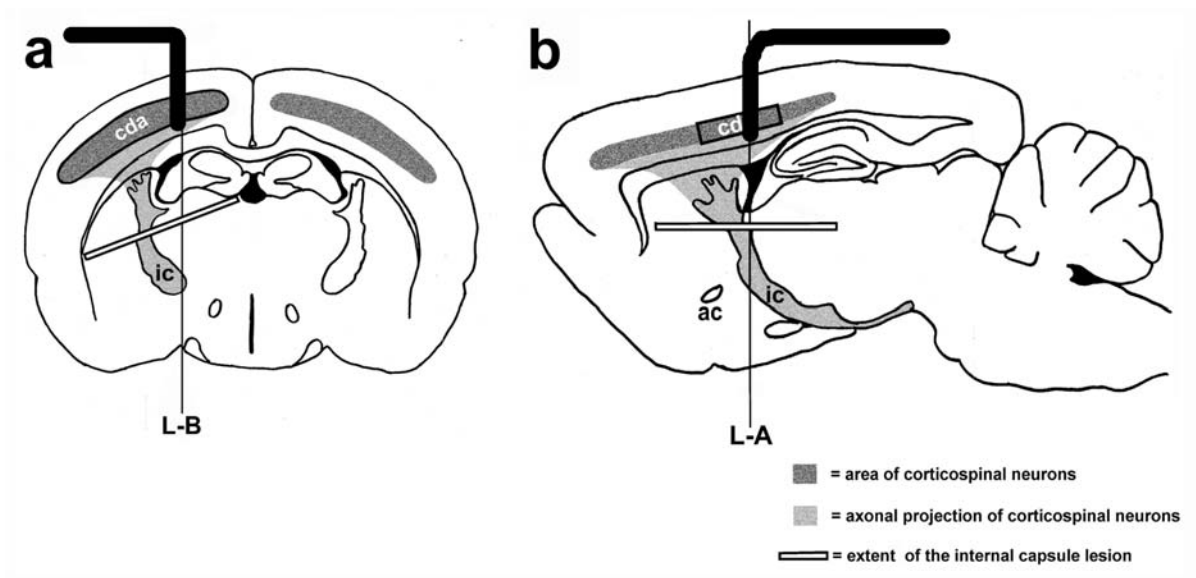
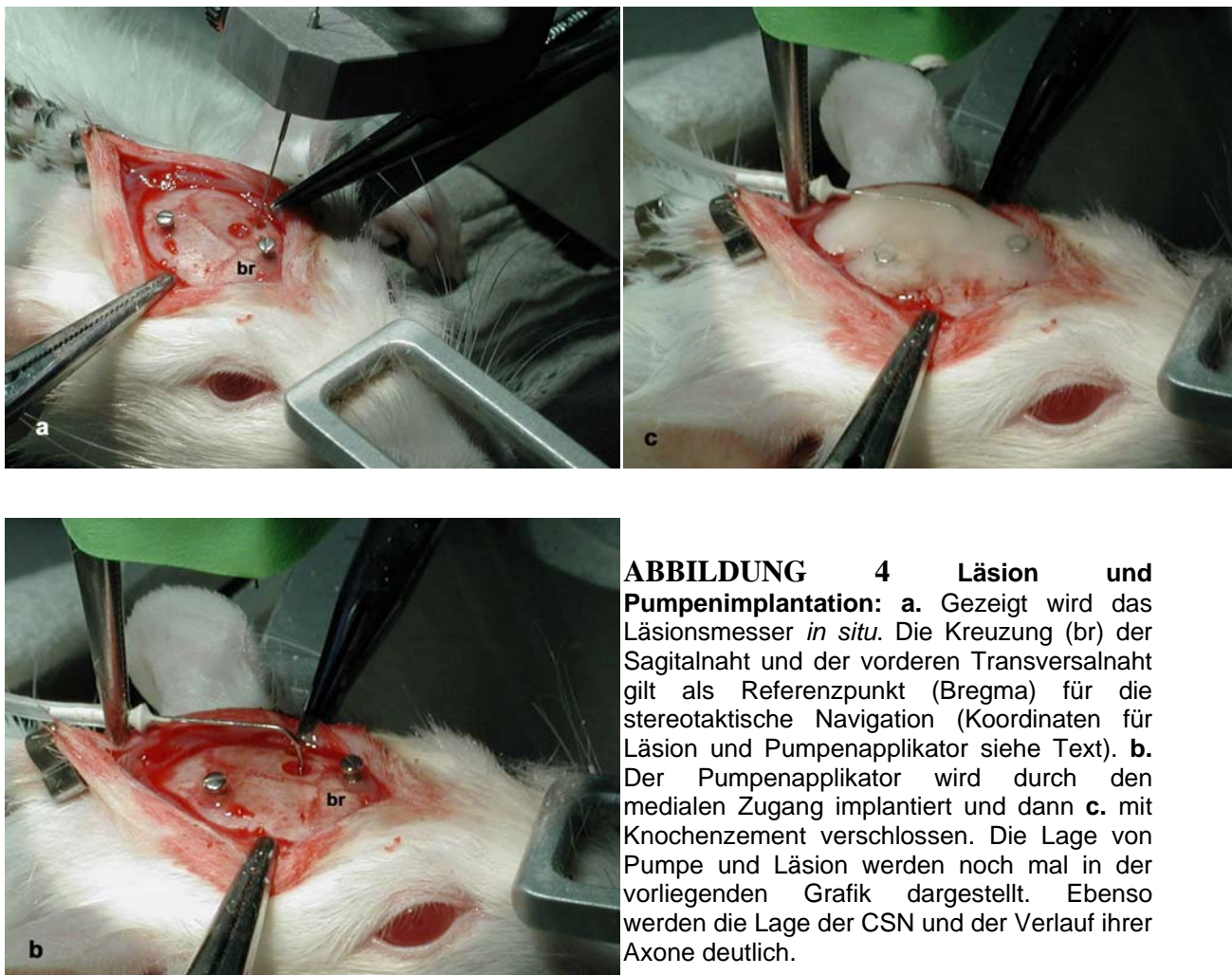
Typ 260) vier Löcher in die Schädelkalotte gebohrt (Abbildung 4): Ein Zugang für das Läsionsmesser (KOPF® Drahtmesser, Modell 120), ein anderer um den Pumpenapplikator in den Cortex zu führen, und zwei weitere für Verankerungsschrauben zur Fixierung des Pumpenapplikators mit Knochenzement (ALLOPRO Sulfix®-60). Die Koordinaten für die Läsion sind (Abbildung 4a):

BREGMA	-2,0 mm
LATERAL	4,5 mm
VENTRAL	2,2 mm
EINFÜHRUNGSWINKEL	20° nach medial

Für die Läsion wird der Läsionsdraht 3,2 mm ausgefahren und zweimal 360° um die Achse des Läsionsmessers rotiert. Nach der Läsion wird der Mikromanipulator in einen Winkel von 90° gebracht und eine kleine Klemme an ihm befestigt. Die Klemme hält den Applikator der Pumpe, der durch den Mikromanipulator exakt bewegt werden kann. Für die Applikator-Implantation wurden folgende Koordinaten gewählt (Abbildung 4b):

BREGMA	-2,0
LATERAL	2,0
VENTRAL	1,1

Nachdem der Applikator in Position gebracht ist, wird er mit Knochenzement fixiert. Da dieser nicht am Knochen haftet, ist darauf zu achten, dass der Knochenzement die beiden Verankerungsschrauben umschließt (Abbildung 4c). Die Klemme, die den Applikator in Position hält wird erst entfernt, wenn der Knochenzement fest ist. Anschließend wird die Pumpe in der vorher nuchal präparierten subkutanen Tasche verstaut. Die Wunde wird durch Wundklammern geschlossen.



**Abbildung 5:** gezeigt wird die ungefähre Lage der Pumpe in transversaler (a) und sagittaler (b) Ebene



#### V.1.4 Perfusion der Ratten und Präparation der Rattengehirne

Nach der jeweiligen Überlebenszeit werden die Ratten transkardial mit zwei Lösungen perfundiert: (1) eine Waschlösung nach GONZALES-AGUILAR und DE ROBERTS, 1963, (0,8% Saccharose, 0,8% NaCl, 0,4% Dextrose und 1% Na-Nitrit in 0,06 M Na-K-Phosphatpuffer, pH 7,4, 5° C, 480 mOsmol), (2) eine Paraformaldehydlösung (4% Paraformaldehyd in Na-K-Phosphatpufferlösung, pH 7,4, 5° C, 1420 mOsmol) für ca. 10 min.

Abhängig von der Fragestellung werden die Ratten nach 1, 3 oder 7 Tagen nach der Läsion und der Pumpimplantation durch eine Überdosis Chloralhydrat (350 mg/kg KG) getötet, und mit den oben genannten Lösungen transkardial perfundiert: mit Lösung (1) für ca. 90 sec, dann mit Lösung (2) für ca. 10 min.

Danach werden die osmotischen Minipumpen entnommen und auf Durchgängigkeit und entleerte Pumpreservoirs hin überprüft. Schließlich wird das Gehirn entnommen. Hiervon werden ein Cortexblock für die eigentlichen Untersuchungen und ein Stammhirnblock für eventuelle weitere Fragestellungen präpariert. Beide Blöcke werden über Nacht ca. 12 Stunden in einer 4%igen Paraformaldehydlösung (Lösung (2)) nachfixiert. Die Paraformaldehydlösung wird dann gegen eine Kryoprotektionslösung (20% Saccharose in Na-K-Phosphatpuffer) ausgetauscht. Nach 24 Stunden werden die Gehirne auf einem Fließ aufgeblockt, in Trockeneis gekühltem Isopentan eingefroren und bei -80° C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

#### V.2 Anfertigung der Kryostatschnitte

Das Material wird abhängig von der Fragestellung mit zwei Methoden untersucht: Der Zellzählung und der *in situ* Hybridisierung. Bei der Zellzählung ist es erforderlich, dass auf einer Serie von Objektträgern die Schnitte von anterior nach posterior gesammelt werden. Hierzu sammelt man jeden fünften Schnitt. Für die *in situ* Hybridisierung dagegen werden die Schnitte so gesammelt, dass sich auf jedem Objektträger vier Schnitte befinden. Diese liegen in antero-posteriorer (a-p) Richtung jeweils 1 mm voneinander entfernt. Hierdurch wird erreicht, dass sich auf jedem Objektträger auf jeden Fall ein Schnitt befindet, in dem sich der Pumpenapplikator der osmotischen Minipumpe befand.

Die Schnitte werden an einem Kryostat der Firma LEITZ<sup>®</sup> angefertigt. Dazu werden die Cortex-Blöcke in der Kühlkammer des Kryostaten bei -20° C mittels Gefriermedium (JUNG Tissue Freezing Medium<sup>®</sup>) auf dem Schneideblock fixiert. Die Schnittdicke beträgt 20 µm. Die Schnitte werden dabei direkt vom Messer auf Super Frost Plus<sup>®</sup>-Objektträger (MENZEL-

GLÄSER) aufgezogen. Nach dem Schneidevorgang werden die Objektträger mit den Schnitten bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### ***V.3 Zellzählungen***

Die Zellzählungen werden an einem OLYMPUS Vanox-S<sup>®</sup> Mikroskop durchgeführt. Vor den Zählungen werden die Schnitte nach Entwässerung mit ~99%igem Alkohol (2 min.) und Xylol (2-10 min.) in DPX (SERVA) eingedeckt. Gezählt wird jeder zweite Schnitt (d.h. der Abstand zwischen zwei gezählten Schnitten ist ca. 200  $\mu\text{m}$  in a-p Richtung). Ob eine Zelle als CSN betrachtet wird oder nicht, hängt von vier Kriterien ab:

1. Die Zellen müssen FB-positiv sein
2. Die Zellen müssen eine pyramidenförmiges Profil haben
3. Die Zellen müssen an der längsten Stelle mindestens 4  $\mu\text{m}$  groß sein
4. Die Zellen müssen Fortsätze aufweisen

Die ermittelten Zellzahlen werden getrennt nach Schnitt und Cortexhälfte in einer Tabelle notiert. Ferner wird jeder Schnitt begutachtet und nach Zustand, Vorhandensein von Pump- und/oder Läsionskanal, Atrophie und Identifizierbarkeit der Läsion dokumentiert. In einer andern Studie wurde beschrieben, dass die ICL zur Axotomie aller CSN des sensorischen Cortex führt. In den zentralen 2,8 mm dieses Areal stirbt ca. die Hälfte der CSN regelmäßig nach ICL ab (Giehl and Tetzlaff 1996; Bonatz, Rohrig et al. 2000). Nach diesen Kriterien wurde ein so genanntes Zelltod-Areal definiert, welches als anatomische Maske dient um den für die Überlebensdaten relevanten Bereich festzulegen. Das anteriore Ende des Zelltod-Areal ist durch den Beginn der vorderen Kommissur markiert (Bonatz, Rohrig et al. 2000). Das prozentuale Überleben wird angegeben als  $[(\text{Anzahl der CSN auf der Läsionsseite} / \text{Anzahl der CSN auf der Kontrollseite}) \times 100\%]$ . Die ermittelten Zellzahlen werden in eine Maske des Tabellenkalkulationsprogramm MICROSOFT EXCEL<sup>®</sup> Version 97 eingetragen, welche die Überlebensdaten der CSN nach der oben angegebenen Formel berechnet. Statistisch aufgearbeitet werden die Überlebensdaten mit SIGMA STAT von JANDELL SCIENTIFIC<sup>®</sup>. Den Daten dieser Studie liegen Zellzählungen von durchschnittlich 4000 Zellen pro Tier zu Grunde. Die statistische Signifikanz der Überlebensdaten zwischen den experimentellen Gruppen wurde mit Hilfe einer Varianzanalyse (one-way analysis of variance-ANOVA) und dem *post hoc* Newman-Keuls-Test ermittelt.

Um eventuelle subtile lokale Veränderungen des Überlebens zu untersuchen wurde im Rahmen von VI.1 (NT-3 Dosis-Wirkungs-Kurve) eine Feinrasterauswertung durchgeführt (Abbildung 15). Dafür wurde ein optisches Raster ins Sichtfeld eingeblendet, das auf dem Schnitt eine Seitenlänge von 100 µm besitzt. Es wurden nun die CSN getrennt in vertikalen 100 µm Säulen ausgezählt und in eine dafür angefertigte Maske von MICROSOFT EXCEL® eingetragen. Die Maske generiert eine Verteilung der Überlebensratios der Läsionsseite (LS) zur Kontrollseite (KS) für ein 100x100 µm Raster in der Aufsicht auf den Cortex.

## ***V.4 in situ Hybridisierung (ISH)***

### **V.4.1 Allgemeines**

Für das ISH Procedere ist bis zum Waschen nach der Hybridisierung auf strenge RNase-Freiheit zu achten.

### **V.4.2 Auswahl der Schnitte**

Den ISH-Untersuchungen liegen Tiere zu Grunde, die zum einen innerhalb der vorgelegten Promotionsarbeit operiert wurden, zum andern aber auch im Rahmen vorangegangener Studien generiert wurden (Giehl, Schacht et al. 1997; Giehl, Schutte et al. 1998). Die Lokalisation des Pumpenapplikators wird von vorne herein so gewählt, dass er ungefähr im Zentrum des Läsionsareals liegt. Für die ISH-Quantifizierungen werden nur Schnitte in einem Abstand  $\pm 0,5$  mm in antero-posteriorer Richtung vom Pumpenapplikator verwendet, da CSN dieser Frontalebene noch im Infusionsareal der applizierten Neurotrophine und Antikörper liegen. Dies wurde im Vorfeld durch immunhistochemische Untersuchungen gezeigt: die applizierten neurotrophischen Faktoren (NT-3 und BDNF) diffundieren 2-5 mm, die Antikörper ca. 8 mm im corticalen Parenchym (Giehl, Schacht et al. 1997; Giehl, Schutte et al. 1998). Die axotomierten CSN auf den für die ISH ausgewählten Schnitten befinden sich daher im Diffusionsareal der applizierten Faktoren.

### **V.4.3 Sonden**

Zum semiquantitativen Nachweis der mRNA-Expression der untersuchten Rezeptoren werden die folgenden Sonden benutzt:

1. **TrkC-ni** detektiert **TrkC-mRNA** ohne Insertion an der Tyrosin-Kinase-Domäne (überbrückt Basenpaare 2134-2250) und ist komplementär zu Basenpaaren 2272-2109 (ohne 2134-2250) (Valenzuela, Maisonpierre et al. 1993; Giehl and Tetzlaff 1996)
2. **p75<sup>NTR</sup>-932** ist komplementär zu Basenpaaren 932-971 (Radeke, Misko et al. 1987; Giehl, Rohrig et al. 2001)

Die Spezifität aller Proben wurde zum einen durch Northern Blots bestätigt. Zum anderen wurden Konkurrenztests durchgeführt, bei denen im 10:1 Überschuss nicht radioaktiv markierte Proben zu den radioaktiv markierten Proben gegeben wurden. In diesem Test verteilte sich die Graindichte (Grains= durch Radioaktivität induzierte Silberpartikel der Fotoemulsion) unspezifisch, d.h. ähnlich wie auf dem Objektträger. Ferner wurde jeder auszuwertende Schnitt auf spezifische, in der Literatur beschriebene, Expressionsmuster hin untersucht (Neuroanatomischer Spezifitätstest). Bei intakten Tieren wird TrkC hauptsächlich im Cortex außer in Schicht 1 exprimiert. p75<sup>NTR</sup> dagegen wird im Cortex kaum exprimiert. Wichtigstes Referenzareal für p75<sup>NTR</sup> ist der Nucleus basalis Meynert.

#### **V.4.4 Radioaktive Markierung, Aufreinigung und Aktivitätsmessung der Sonden**

Die Markierung der Oligonukleotidproben erfolgt durch das 3'-End-, „tailing“-Verfahren mit  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-dATP (NenDupont) (Lewis, Rogers et al. 1989). Benutzt wird hierfür die terminale Desoxynukleotid-Transferase (GIBCO BRL). Mit dieser Methode wird durch mehrfachen Einbau radioaktiver Nukleotide die Sensitivität erhöht, ohne dass dies die Spezifität beeinflusst (Collins and Hunsaker 1985; Lewis, Sherman et al. 1985; Lewis, Arentzen et al. 1986).

Zum Verfahren: In ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß werden 7  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 5  $\mu$ l 5x Co-Reaktionspuffer, 10  $\mu$ l <sup>35</sup>S-dATP, 1  $\mu$ l Oligonukleotid und 2  $\mu$ l terminale Transferase (GIBCO BRL) pipettiert. Dies wird dann vermischt und über 2-3 h bei 37° C inkubiert. Die Reaktion wird nach der Inkubation mit 75  $\mu$ l 1x STE (= Natrium-Tris-EDTA-Puffer) gestoppt. Die Aufreinigung erfolgt mit einer STRATGENE Aufreinigungs-Säule, die zuvor mit 80  $\mu$ l 1x STE gefüllt wird. Dann wird die Oligonukleotidlösung in 6 Durchgängen mit je 100  $\mu$ l 1x STE pro Fraktion durch die Aufreinigungs-Säule in 6 Eppendorf-Gefäße gepresst. Von jeder Fraktion werden dann 3  $\mu$ l in 10 ml Szintillationscocktail gegeben und in einen Flüssig-Szintillator (Rotiszint eco plus<sup>®</sup>, ROTH) gegeben. Für eine gelungene Markierung ist eine Mindestaktivität von 500000 cpm/ $\mu$ l anzustreben. Sollte eine niedrigere Aktivität gemessen werden, kann das Volumen einer Fraktion mit einem Speed-Vac verringert werden, um so eine höhere Aktivität pro Volumen zu erreichen. Danach erfolgt eine Kontrollmessung.

Reicht die Aktivität aus, so wird 5 µl 3 M DTT (Dithiothreitol) als Reduktionsmittel zur Oligolösung hinzu gegeben und bewahrt diese bis zur weiteren Verarbeitung bei -20° C auf.

#### **V.4.5 Schnittvorbehandlung für die *in situ* Hybridisierung**

Die Objektträger (OT) mit den Schnitten für die *in situ* Hybridisierung (ISH) werden aufgetaut und ca. 1 Stunde luftgetrocknet. Dann werden sie in ein gläsernes OT-Rack eingelegt. Die Schnittvorbehandlung beginnt mit einem 20-minütigen Bad in 4% Paraformaldehyd gefolgt von dreimaliger Behandlung von jeweils 5 Minuten mit 1x PBS. Danach werden die Schnitte mit einer Proteinase K-Lösung für 8 Minuten angedaut. Die Schnitte werden wieder mit 1 x PBS gewaschen und erneut mit 4% Paraformaldehyd behandelt. Nochmals werden dann die Schnitte mit 1 x PBS zweimal, dann einmal mit ddH<sub>2</sub>O und einmal mit 90%igem und 100%igem Ethanol gewaschen. Schließlich werden die Schnitte zum Trocknen flach auf den Tisch gelegt. Die Behandlung mit Alkohol greift den Tracer an, deshalb ist darauf zu achten, dass die gesamte Verweilzeit der OTs im Alkohol während der gesamten ISH fünf Minuten nicht überschreitet.

#### **V.4.6 Prähybridisierung und Hybridisierung**

Zunächst bereitet man sich ein Medium (→ PRÄHYB-MIX [= Prähybridisierungs-Mixtur]), in das später die radioaktiv markierte Probe eingegeben wird (→ HYB-MIX [= Hybridisierungs-Mixtur]). Das Medium besteht aus 50% deionisiertem Formamide, 5x PIPES, 2,5 x modifizierter Denhard's Lösung, 30% Natrium Dodecylsulfate (SDS), 10% Dextran Sulfat, 30 mM DTT, ca. 5 µl/1 ml DSS-DNA (DSS = denaturated salmon sperm) und ca. 5 µl Hefe-tRNA.

Für die Prähybridisierung werden die OTs eben in Hybridisierungsboxen gelagert und auf jeden OT ca. 500 µl PRÄHYB-MIX pipettiert. In den Hybridisierungsboxen ist der Boden mit ddH<sub>2</sub>O bedeckt (Prinzip der feuchten Kammer). Nach Aufbringen des PRÄHYB-MIX werden die Hybridisierungsboxen verschlossen und bei 42 °C für 2-3 h prähybridisiert.

Für die Hybridisierung wird dem Hybridisierungsmedium die <sup>35</sup>S-markierte Oligonukleotid-lösung in der Menge zugegeben, um ca. 500000 cpm/100 µl zu erhalten (→ HYB-MIX). Die Hybridisierungsboxen werden aus dem Inkubator genommen, der PRÄHYB-MIX abgossen, und der HYB-MIX auf die OTs pipettiert (100 µl/OT). Dies hybridisiert nun über Nacht im Inkubator bei 42° C. Damit der HYB-MIX nicht vom OT fließt, werden Deckgläschen mit Parafilm-„Füßchen“ auf die OTs gelegt und durch einen Klebepunkt fixiert.

#### **V.4.7 Abschluss der Hybridisierung und Röntgenfilm-Autoradiographie**

Am nächsten Morgen werden die OTs mit einer in der Konzentration abfallenden Reihe SSC (NaCl-Natriumcitrat-Puffer) gewaschen. Man beginnt mit zweimal 2x SSC á 10 und 30 Minuten. Dann 1x SSC (30 Minuten), 0,5x SSC (45 Minuten bei 55 °C), 0,25x SSC (30 Minuten), 0,125x SSC (15 Minuten) zweimal ddH<sub>2</sub>O á 10 und 5 Minuten. Schließlich werden die Schnitte kurz in Ethanol eingetaucht und danach luftgetrocknet.

Nach dem Lufttrocknen werden die Schnitte zur Röntgenfilm-Autoradiographie aufgelegt. Zu diesem Zweck werden die OTs in einer Röntgenfilm-Kassette so angeordnet, dass möglichst viele auf einen Röntgenfilm (KODAK® X-OMAT, XAR-5, 13x18 cm) passen. Der Film wird dann in der Dunkelkammer aufgelegt und die Kassette verschlossen. Nach 5-7 Tagen Exposition werden die Röntgenfilme entwickelt. Anhand dieser Filme wird die optimale Expositionszeit für Emulsionsautographie geschätzt.

#### **V.4.8 Emulsionsautographie**

Die folgenden Arbeiten werden in der Dunkelkammer durchgeführt. Beleuchtet wird der Raum mit 15 W Birnen, deren Licht mit ILFORD F 902 gefiltert wird. Als Photoemulsion wird eine ILFORD K2-Emulsion verwendet. Diese wird in einem FALCON-Tube im Wasserbad bei 50° C geschmolzen und 1:1,5 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Sobald die Emulsion sich homogen gelöst hat, wird sie in ein Dipping Gefäß gefüllt. Dann wird mit dem „Dippen“ begonnen: Dazu wird der OT zügig, aber nicht zu schnell in das Dipping Gefäß eingetaucht und ebenso wieder herausgezogen. Dadurch legt sich ein dünner Emulsionsfilm auf die Schnitte. Die Rückseite des OT wird dann abgewischt und der OT in einem ventilierten Kasten zum Trocknen aufgestellt. Wenn die Emulsion angetrocknet ist, wird der Objektträger zum Durchtrocknen flach hingelegt. Dieses Procedere reduziert die Gefahr einer „Nasenbildung“ in der Emulsion, die das Auswerten der Schnitte wegen der unterschiedlichen Emulsionsdicke unmöglich machen würde. Nach einer Trockenzeit von ca. 3-4 h werden die OTs in OT-Boxen lichtdicht verpackt und für die Dauer der vorher ermittelten Expositionszeit (3-5 Wochen) im Kühlschrank aufbewahrt. Nach der Expositionszeit wird die Emulsion auf den OTs entwickelt: Zuerst werden die OTs für 3 Minuten in ddH<sub>2</sub>O bei 15° C eingetaucht. Dann wird die Emulsion für 2 Minuten mit KODAK D19 Entwickler bei 18° C entwickelt. Gestoppt wird dieser Prozess mit 1%iger Essigsäure (30 Sekunden bei 18° C). Fixiert wird die Emulsion mit Rapid-Fix (KODAK®) (8 Minuten bei Raumtemperatur) und anschließend mit Leitungswasser für 15 Minuten gespült. Nachfolgend können die Schnitte wieder Licht ex-

poniert werden. Zur Auswertung werden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (90%, 100% Ethanol, Xylol) entwässert, und dann mit Entellan eingedeckt. Die Schnitte können bis zur Auswertung bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

## ***V.5 Auswertung der in situ Hybridisierung***

### **V.5.1 Material**

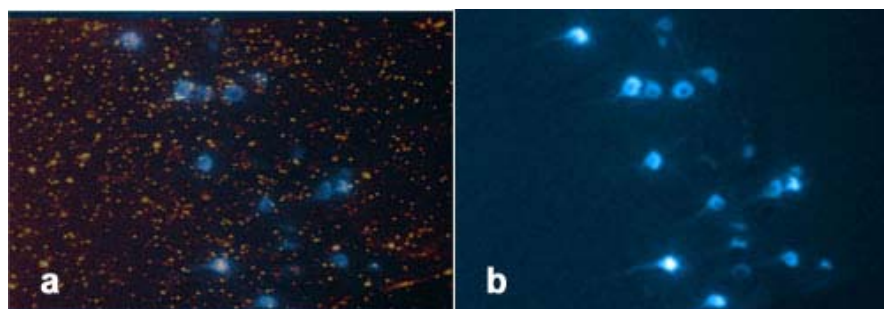
Die ISH-Behandlung liefert Schnitte, die bei Fluoreszenzbeleuchtung unter dem Mikroskop das bekannte Bild der FB-markierten CSN bieten. Betrachtet man die Schnitte unter Dunkelfeldbeleuchtung, so wird das Resultat der ISH-Behandlung sichtbar: Kleine, silberne bis gelbliche Punkte (silver grains), die von der radioaktiv markierten Sonde in der Emulsion induzierte Silberpartikel darstellen. Durch unspezifische Bindungen kommt es zu einem gewissen „Hintergrundrauschen“, d.h. zufällig verteilte Grains, die nicht über typischen Regionen zu finden sind, die die untersuchte mRNA exprimieren. Diesem Umstand wird dadurch Rechnung getragen, dass die über CSN ermittelten Expressionswerte gegen den Hintergrundwert korrigiert werden. Spezifische mRNA erkennt man (neben der neuroanatomisch korrekten Lokalisation) durch eine lokalisierte Anhäufung von Grains ("Grainwolke"), die sich deutlich vom Hintergrundrauschen abhebt.

Bevor das Material ausgewertet werden kann muss geprüft werden, ob die ISH-Behandlung erfolgreich war. Zu diesem Zweck wird jeder Schnitt darauf hin untersucht, ob die Verteilung positiver Signale ("Grainwolken") für eine Sonde spezifisch ist, d.h. von ihrer Verteilung her mit den publizierten neuroanatomischen Lokalisationen übereinstimmen.

### **V.5.2 Datenerhebung**

Für die Aufnahme der entsprechenden Präparate wird eine Sony Videokamera (über einen C-Mount an ein OLYMPUS Vanox-S<sup>®</sup> Mikroskop montiert) verwendet. Die erhaltenen digitalen Bilder (mit 20 x Objektiv) werden mit Hilfe des digitalen Bildanalyseprogramms DIGGER (Fa. MEDVIS<sup>®</sup>, 66424 Homburg) ausgewertet. Zuerst wird ein Blickfeld des Schnittes in Schicht 5 unter Fluoreszenzbeleuchtung aufgenommen und gespeichert (Abbildung 6b). Dann wird das gleiche Bildfeld mit Dunkelfeldbeleuchtung in den Computer eingelesen. Nun wird im fluoreszenzbeleuchteten Bild mit einer Zeichenfunktion von DIGGER von allen CSN die Kontur nachgezeichnet. Diese Matrize, die die Konturen aller CSN in einem Blickfeld enthält, wird nun automatisch auf das Bild mit der Dunkelfeldbeleuchtung übertragen. Mit einer

Messfunktion bestimmt DIGGER nun für jedes markierte CSN die über ihm liegende Graindichte. Die Graindichte wird als die prozentuale Fläche wiedergegeben, die innerhalb des entsprechenden CSN von Grains eingenommen wird. So wird für jedes CSN ein Wert ermittelt, der die entsprechende Graindichte wiedergibt. Auf diese Weise werden sukzessiv alle CSN eines Schnittes getrennt nach Kontroll- und Läsionsseite ausgewertet.



**Abbildung 6:** **a** gezeigt wird eine kombinierte Aufnahme des Blickfeldes unter Fluoreszenz- und Dunkelfeldbeleuchtung; **b** der gleiche Ausschnitt unter Fluoreszenzbeleuchtung

Um die Werte weiter verarbeiten und mit anderen Schnitten vergleichen zu können (unterschiedliches Hintergrundrauschen) werden die erhaltenen Werte normalisiert. Hierzu wird die Graindichte einer definierten Fläche auf dem OT außerhalb der Schnitte in der Nähe des Cortex gemessen (Hintergrundmessung). Die entsprechenden Graindichten der CSN werden dann jeweils als ein Vielfaches des Hintergrundes wiedergegeben.

### V.5.3 Datenverarbeitung

Die Rohdaten aus der Messung mit DIGGER liefern Datensätze mit Werten für jede einzelne Zelle getrennt nach Schnitten, Läsions- und Kontrollseite und einen Wert für den Hintergrund. Diese Daten werden mit Hilfe von MICROSOFT EXCEL<sup>®</sup> weiterverarbeitet.

Mit einer vorgefertigten und im Rahmen der Studie optimierten Maske werden die folgenden Parameter für jedes untersuchte Tier ermittelt:

1. Die mittleren hintergrundkorrigierten Expressionsniveaus, mit denen die mRNA des untersuchten Rezeptors im Mittel von den CSN der Kontrollseite und der Läsionsseite exprimiert wird.
2. Das Verhältnis der Expressionsniveaus von Läsionsseite zu Kontrollseite in Prozent.
3. Wie viel Prozent der CSN einer Seite die mRNA eines bestimmten Rezeptors exprimieren (d.h. mindestens 3-fache Graindichte des Hintergrund (Giehl, Schutte et al. 1998)).



4. Ferner wird ein Diagramm von der kumulativen Häufigkeit erstellt.

Die Daten werden nun mit dem Programm SIGMA STAT von JANDEL SCIENTIFIC® weiter statistisch ausgewertet. Die statistische Signifikanz der Expressions-Werte der jeweiligen mRNA's zwischen den experimentellen Gruppen wird durch eine Varianzanalyse (one-way analysis of variance - ANOVA), einem *post hoc* Newman-Keuls-Test sowie einem *post hoc* Fisher's Least Significance Difference Test ermittelt.

## ***V.6 Biochemische Analysen zur TrkB-Phosphorylierung nach NT-3-Behandlung***

Um zu ermitteln, ob eine hochdosierte Behandlung mit rekombinantem NT-3 zu einer Aktivierung des BDNF-Rezeptors TrkB *in vivo* führt, wurden Ratten-Cortices einer hochdosierten NT-3-Behandlung *in vivo* unterzogen und danach die entsprechend behandelten Cortexareale einer biochemischen Untersuchung zur Ermittlung des Niveaus der TrkB Phosphorylierung zugeleitet.

### **V.6.1 Hochdosierte NT-3-Behandlung des Cortex *in vivo***

Die Narkose der Tiere, ihre Fixierung im Stereotaxen, sowie die Eröffnung der Schädelhöhle erfolgt wie oben beschrieben. Einziger Unterschied zum obigen Verfahren bestand aus der Freilegung des Cortex auf einer größeren Fläche. So kann eine schnelle Entfernung des behandelten Cortex nach Abschluss der Behandlungsperiode gewährleistet werden. Jeweils 10 µl rekombinantes NT-3 in einer Konzentration von 0,5 mg/ml wird mit einer an ein Pumpsystem angeschlossenen Glasmikropipette in den Cortex einer Ratte injiziert. Als Kontrolllösung wird PBS verwendet. Als Koordinaten der Injektion werden die oben beschriebenen Koordinaten der Pumpenappikator Implantation verwendet. Mit der Injektion der jeweiligen Lösung wird erst 10 Minuten nach dem Einführen der Pipette begonnen, damit sich das Gehirngewebe dem Pipettenschaft fest anschließen kann. Dies verhindert, dass es zu einem retrograden Ausströmen der Lösung aus dem Injektionskanal kommt. Die Injektion wird über einen Zeitraum von 5 Minuten durchgeführt. Nach Abschluss der Injektion wird noch 10 Minuten bis zum Entfernen der Pipette gewartet um eine Verteilung der Injektionslösung im Gehirnparenchym zu gewährleisten. Dies verhindert das Austreten der injizierten Lösung aus dem Injektionskanal beim Entfernen der Pipette. Nach dem Entfernen der Pipette wird dann nach 30, 60, 120 oder 360 Minuten das Tier mit einer Chloralhydrat Überdosis getötet. Unmittelbar im Anschluss an die Tötung des Tieres wird das corticale

Gewebe in einem Radius von 1 mm um den Injektionskanal auf eine Tiefe von 1,5 mm schnell aus dem Cortex herauspräpariert und auf Trockeneis eingefroren. Die entsprechend präparierten Gehirnproben werden bis zur weiteren biochemischen Analyse bei -80° C aufbewahrt.

### **V.6.2 Western Blots an Immunopräzipitaten**

Die oben beschriebenen Gehirnproben werden dann einer biochemischen Untersuchung zur Bestimmung der TrkB-Phosphorylierung zugeführt. Hierzu werden Gewebelysate einer Immunopräzipitierung mit phosphotyrosinspezifischem Antikörper unterzogen, die erhaltenen Immunopräzipitate elektrophoretisch aufgetrennt, und einem Western Blot für TrkB unterzogen (Giehl, Rohrig et al. 2001). Die Verfahren zur Immunopräzipitierung für Phosphotyrosin-Residuen (Stephens, Loeb et al. 1994) und den sich anschließenden TrkB-Western Blots an elektrophoretisch aufgetrennten Immunopräzipitaten sind an anderer Stelle beschrieben (Offenhäuser, Böhm-Matthaei et al. 1995). Im Einzelnen wird wie folgt verfahren:

Zur Immunopräzipitierung wird das Gehirngewebe in Lysispuffer (NP-40) (137 mM NaCl, 20 mM Tris, 1% Nonidet P-40, 10% Glycerol, 1mM Phenylmethylsulphonylfluorid, 10mg/ml Aprotinin, 1mg/ml Leupeptin, 0,5 mM EDTA, 1 mM Natrium Vanadat, pH 8,0) bei 4° C für 20 Minuten homogenisiert, unlösliches Material durch Zentrifugation (10 Minuten bei 10000x g, 4° C) pelletiert und der Überstand weiter bearbeitet. Vor der Immunopräzipitierung werden die Lysate gemäß ihres Proteingehaltes normalisiert. Ein Milliliter der erhaltenen Lysate wird dann über Nacht bei 4° C mit dem tyrosinphosphatspezifischen Antikörper 4G10 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) inkubiert. Hiernach werden Protein A-Sepharose Beads (Sigma) hinzugegeben um die Immunopräzipitate zu binden und abzuzentrifugieren. Nach Zugabe der Sepharose Beads wird die Lösung für weitere drei Stunden bei 4° C inkubiert. Die nach der Zentrifugation erhaltenen Pellets werden dreimal mit NP-40-Lysispuffer und anschließend einmal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Danach erfolgt eine Resuspension auf 1 ml Laemmli Puffer (50 mM Tris-Cl pH 6,8; 2% w/v SDS; 0,1%, Bromphenolblau; 10% v/v Glycerol, 10% v/v β-Mercaptoethanol). Die erhaltene Lösung wird gekocht und auf einem 6% Acrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele werden dann auf eine PVDF Membran (Immobilon P, Millipore, Bedford, MA) elektrogeblottet. Die Membranen werden dann in PVP-Waschpuffer (50 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 2,2% Polyvinylpyrrolidon (PVP)) für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Die Inkubation mit einem polyklonalem TrkB-Primärantikörper aus Kaninchen (Offenhäuser, Böhm-Matthaei et al. 1995) erfolgt bei einer

Antikörperverdünnung von 1:10000 über Nacht bei 4° C. Die Membranen werden danach 3 Mal in PVP Puffer gewaschen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit einem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper (Boehringer Mannheim Biochemicals) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PVP-Puffer erfolgt die Detektion der gebundenen Sekundärantikörper mit einem ECL Chemiluminiscenz System (Amersham, Braunschweig).

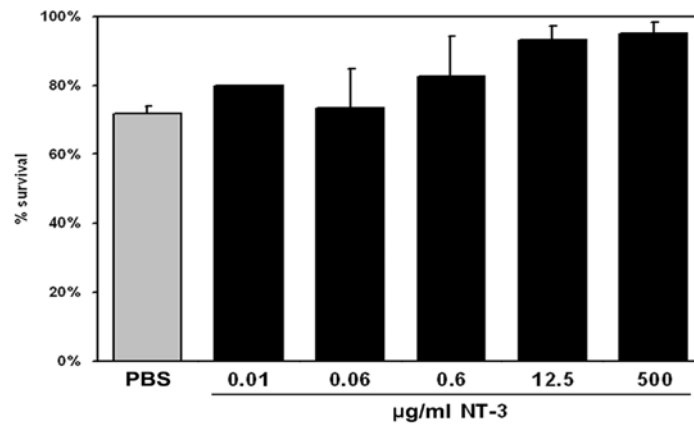
## **VI Resultate**

In einer früheren Studie (Giehl and Tetzlaff 1996) wurde gezeigt, dass exogenes NT-3, wenn es in hohen Dosierungen appliziert wird (500 µg/ml in PBS), einen positiven Effekt auf das Überleben von CSN nach Axotomie hat. Versuche in Ratten, in denen corticales NT-3 mit NT-3-Antikörpern neutralisiert wurde und Versuche in NT-3-Knockout Mäusen (Giehl, Rohrig et al. 2001) zeigten allerdings, dass endogenes NT-3 die Zelltodinduktion axotomierter CSN fördert. Um diese auf den ersten Blick widersprüchlichen Effekte von exogen appliziertem rekombinanten NT-3 und endogenem NT-3 zu klären, wurde im Rahmen dieser Studie untersucht, ob (VI.1) in niedriger Konzentration infundiertes rekombinantes NT-3 ähnlich dem endogenen NT-3 CSN-Tod verursacht, ob (VI.2) hochdosierte Gabe von rekombinatem NT-3 die Expression von TrkC und/oder p75<sup>NTR</sup> beeinflusst, und ob (VI.3) die hochdosierte Gabe von rekombinatem NT-3 zu einer unspezifischen Phosphorylierung des überlebensfördernden BDNF-Rezeptors TrkB führt.

Die Untersuchung der Rezeptorexpressionsmuster in (VI.2) zeigte, dass die Expression des mit der Zelltod Induktion in Verbindung gebrachten p75<sup>NTR</sup> in axotomierten CSN zum Zeitpunkt der Zelltodinduktion induziert wird. Es sollte daher weiterhin geklärt werden, ob (VI.4) p75<sup>NTR</sup> für den axotomieinduzierten Zelltod von CSN verantwortlich ist.

### ***VI.1 Überleben axotomierter CSN nach Behandlung mit unterschiedlichen NT-3-Dosierungen***

Zuerst wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt, um zu ermitteln, ob mit niedrigen NT-3-Dosierungen der Zelltod axotomierter CSN induziert werden kann (Abbildung 7). Die Untersuchungen ergaben, dass NT-3-Dosierungen zwischen 12,5 µg/ml und 500 µg/ml den axotomieinduzierten CSN-Tod verhindern. Bei niedrigeren Dosierungen (0,6 µg/ml, 0,06 µg/ml und 0,01 µg/ml) verlor sich der überlebensfördernde Effekt. Es wurden jedoch bei keiner Dosis niedrigere Überlebenswerte als in der Vehikelgruppe beobachtet. Rekombinantes NT-3 kann also bei keiner der hier verwendeten Dosierungen den Zelltod von CSN induzieren.



**Abbildung 7: NT-3 Dosis-Wirkungs-Kurve:** Die Abbildung zeigt die verschiedenen Überlebensquoten axotomierter CSN nach Behandlung mit unterschiedlich dosiertem rekombinanten NT-3. Die Tiere wurden unmittelbar nach der Läsion beginnend über einen Zeitraum von 7 Tagen behandelt. Die Infusionsrate war 1 µl/h. Es wurden folgende Dosierungen verwendet: 0,01 µg/ml (N=2), 0,06 µg/ml (N=5), 0,6 µg/ml (N=3), 12,5 µg/ml (N=3), 500 µg/ml (N=4). PBS ist die Vehikellösung (N=3). Angegeben ist der Mittelwert ± s.e.m.

## VI.2 Untersuchung der *TrkC*- und *p75<sup>NTR</sup>*-mRNA-Expression in CSN

Im Folgenden wurde der Einfluss hochdosierte NT-3-Infusion (500 µg/ml) auf die mRNA-Expression der Neurotrophinrezeptoren *TrkC* und *p75<sup>NTR</sup>* in axotomierten CSN untersucht. In einer vorangegangenen Studie (Schutte, Yan et al. 2000) wurde gezeigt, dass alle CSN *TrkB*-mRNA exprimieren und die *TrkB*-Expressionsniveaus weder durch Axotomie noch durch hochdosierte NT-3 Gaben beeinflusst werden.

### VI.2.1 Versuchsgruppen

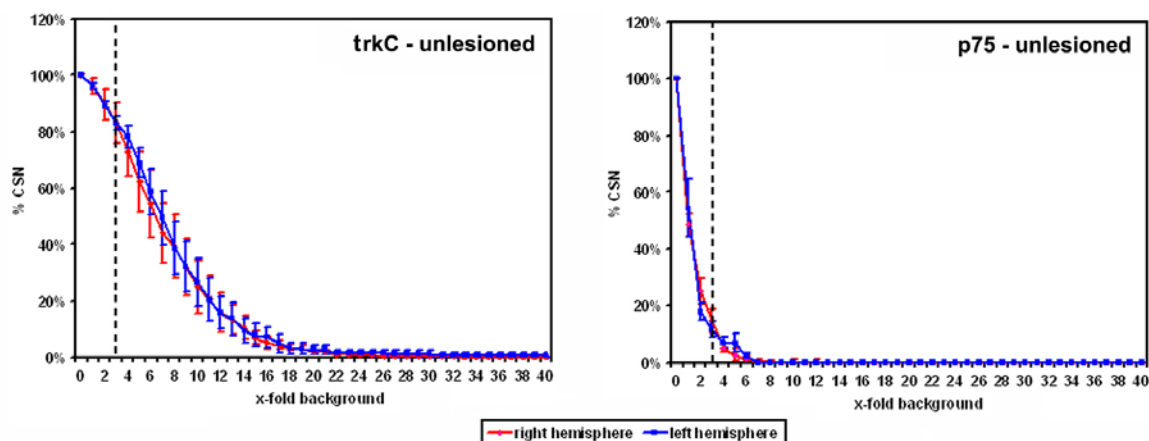
Die CSN wurden 1, 3 und 7 Tage nach der Läsion untersucht. Die Behandlung mit NT-3 bzw. Vehikellösungen erfolgte während der gesamten Überlebenszeit nach der Läsion. Folgende Versuchsgruppen wurden untersucht:

- Unlädierte Tiere → In dieser Gruppe wurden lediglich die CSN retrograd markiert und die Tiere daran anschliessend nach 7 Tagen perfundiert und fixiert.
- Vehikel → Intracorticale PBS-Puffer Infusion bei einer Überlebenszeit von 1, 3 und 7 Tagen nach Läsion.
- NT-3 → Intracorticale NT-3-Infusion (500 µg/ml in PBS) bei einer Überlebenszeit von 1, 3 und 7 Tagen nach Läsion.

Von jeder Versuchsgruppe wurden ISHs zur Detektion von *p75<sup>NTR</sup>* und *TrkC* durchgeführt.

## VI.2.2 Unlädierte Tiere

Zunächst wurde die Rezeptorexpression von p75<sup>NTR</sup> und TrkC in unlädierten Tieren untersucht (Abbildung 8). In Abbildung 8 werden die ermittelten Daten in einem kumulativen Histogramm dargestellt. Hier wird gezeigt, wieviel Prozent der CSN die jeweilige mRNA zu welchem Vielfachen des Hintergrundes exprimieren. Die dreifache Expression des Hintergrundwertes wurde als Schwellenwert festgelegt, ab dem ein CSN als die entsprechende mRNA exprimierend betrachtet wird (McCabe, Desharnais et al. 1989; Giehl, Schutte et al. 1998). Dieser Schwellenwert ist in der Literatur als der geeignetste angesehen, um sowohl falsch positive als auch falsch negative Befunde zu minimieren (McCabe, Desharnais et al. 1989; Giehl, Schutte et al. 1998). In dieser Darstellung erkennt man, dass nur sehr wenige intakte CSN p75<sup>NTR</sup> exprimieren ( $14 \pm 3\%$ ), aber fast alle TrkC mRNA ( $83 \pm 4\%$ ).



**Abbildung 8: Kumulatives Histogramm der p75<sup>NTR</sup>- und TrkC-Expression in CSN:** Als Expressionsklassen wurden ganze Vielfache des Hintergrundes gewählt. Die eingezeichnete Hilfslinie kennzeichnet den vorher ermittelten Schwellenwert ("größer 3x Hintergrund" (Giehl, Schutte et al. 1998)), der überschritten sein muss, damit ein CSN als für die betreffende mRNA positiv (exprimierend) angesehen werden kann. Bei diesem Schwellenwert exprimieren  $14 \pm 2\%$  ( $n=3$ ) der CSN p75<sup>NTR</sup> mRNA und  $83 \pm 2\%$  ( $n=4$ ) TrkC mRNA.

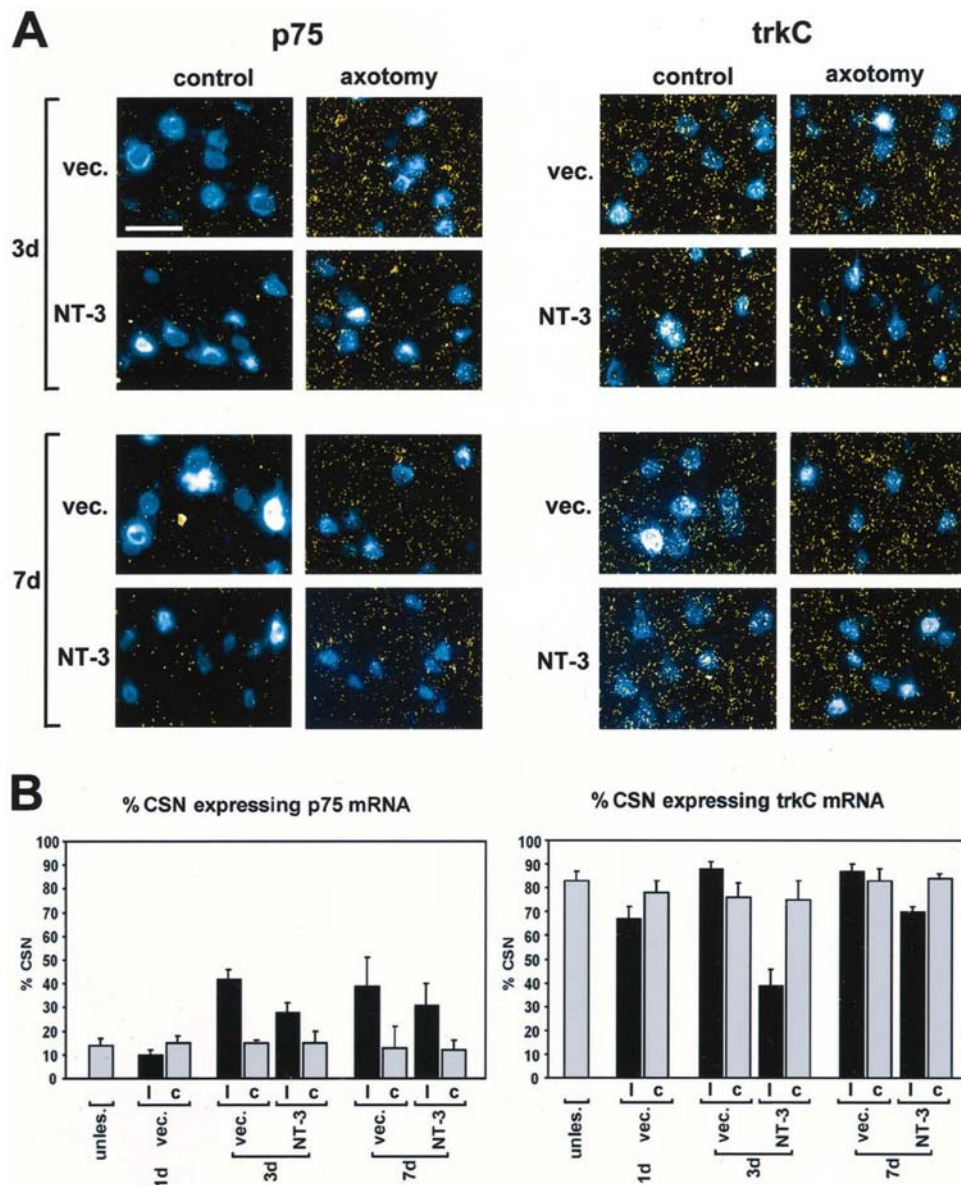
## VI.2.3 TrkC- und p75<sup>NTR</sup>-Expression unter Vehikel- und NT-3-Behandlung

Die Analyse der TrkC-mRNA- und p75<sup>NTR</sup>-mRNA-Expression in axotomierten vehikel-behandelten Tieren zeigte, dass sich der Anteil TrkC-exprimierender CSN nach der Läsion nicht signifikant ändert. Allerdings stieg der Anteil p75<sup>NTR</sup>-exprimierender CSN am dritten Tag nach der Läsion deutlich an (Abbildung 9). Der läsionsbedingte Anstieg der p75<sup>NTR</sup>-Expression hielt zumindest bis zum siebten Tag nach der Axotomie, wenn auch abgeschwächt, an. Spätere Zeitpunkte wurden nicht untersucht.

Wie die Untersuchungen der Expression von TrkC-mRNA und p75<sup>NTR</sup>-mRNA in axotomierten NT-3-behandelten Tieren zeigten, hat NT-3 keinen signifikanten Einfluss auf die p75<sup>NTR</sup>-Expression. Die TrkC-Expression sankt unter NT-3-Behandlung am dritten Tag nach der Axotomie deutlich ab. Die leichte Reduzierung der p75<sup>NTR</sup>-Expression am dritten und siebten Tag nach Axotomie hatte ebenso wie die leichte Reduktion der TrkC-Expression am siebten Tag nach Axotomie nicht das Niveau statistischer Signifikanz erreicht. Die entsprechenden statistischen Tests der Expressionsanalysen sind in der Legende der Abbildung 9 dargestellt.

Bezüglich der primären Fragestellung dieses Abschnittes ergaben die Untersuchungen also: Hochdosierte NT-3-Behandlung reduziert die Expression von TrkC, nicht aber die Expression von p75<sup>NTR</sup>. Da die zur Rettung axotomierter CSN führende NT-3-Dosis die TrkC-Expression erniedrigte (Abbildung 9), und TrkC für den axotomieinduzierten CSN-Tod benötigt wird, könnte es sein, dass eine Supprimierung von TrkC zum Rettungseffekt der NT-3-Behandlung beiträgt.

Die Untersuchungen hatten des Weiteren ergeben, dass es nach der Axotomie zu einer Induktion von p75<sup>NTR</sup> in lädierten CSN kommt. Wie in der Einleitung dargestellt wird p75<sup>NTR</sup> während der frühen Embryonalentwicklung mit neuronaler Zelltodinduktion in Verbindung gebracht. Auch deuten Experimente an kultivierten embryonalen Neuronen darauf hin, dass dieser Rezeptor in der Zelltodinduktion involviert ist. Zum Zeitpunkt der hier vorliegenden Studie ging man aber, wie dargestellt, davon aus, dass neurotrophinvermittelte Zelltodinduktion nur in Zellen stattfinden kann, die p75<sup>NTR</sup> aber keinen Trk-Rezeptor exprimieren. Vorangegangene Untersuchungen unseres Labors zeigten, wie BDNF (Giehl, Schutte et al. 1998) über TrkB (Abbildung 10) das Überleben axotomierter CSN fördert, während NT-3 für die Zelltodinduktion benötigt wird (Giehl, Rohrig et al. 2001). Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass die läsionsbedingte p75<sup>NTR</sup>-mRNA Induktion in lädierten CSN exakt zum Zeitpunkt des axotomieinduzierte CSN-Todes (Giehl and Tetzlaff 1996) stattfindet. Wir haben daher die Hypothese aufgestellt, dass p75<sup>NTR</sup> auch in der Anwesenheit von Trk-Rezeptoren neuronalen Zelltod induzieren kann. Um diese Hypothese zu überprüfen und um zu zeigen, ob p75<sup>NTR</sup> auch im adulten Gehirn neuronalen Tod induzieren kann, haben wir die ursprüngliche Fragestellung erweitert und in Punkt VI.4 untersucht, ob die durch Antikörper vermittelte Blockade von p75<sup>NTR</sup> den axotomieinduzierten Zelltod von CSN verhindert.

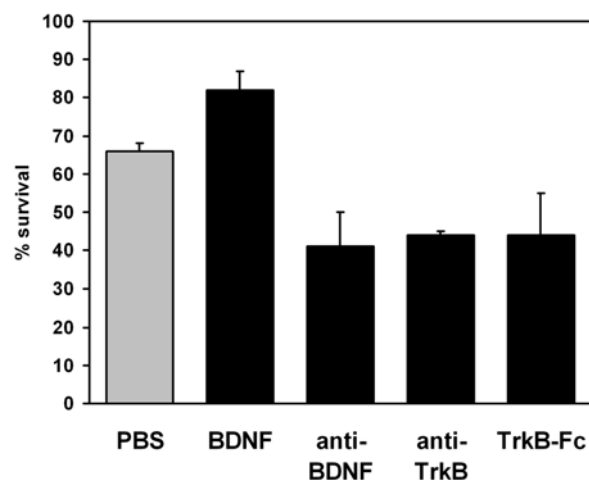


**Abbildung 9: TrkC- und p75<sup>NTR</sup>-mRNA-Expression in CSN im intakten Stadium und nach Läsion unter Vehikel- und NT-3-Behandlung.** **A.** Repräsentative Beispiele der TrkC- und p75<sup>NTR</sup>-mRNA-Expression im Cortex und in CSN. Dargestellt sind jeweils Ausschnitte aus der corticalen Schicht 5 der Kontroll- (control) und Läsionsseiten (axotomy). Die Fast-Blue-markierten CSN werden zum Teil von Grainwolken überlagert, was eine Expression der entsprechenden mRNA bedeutet. Grainwolken außerhalb der CSN repräsentieren andere mRNA exprimierende Zellen des Cortex. **B.** Quantifizierung der jeweiligen mRNA-Expression in CSN an Tag 1, 3 und 7 nach der Läsion und in intakten Tieren. Abkürzungen: "unles."=unlädiert, "vec."=Vehikellösung, "l"=Läsionsseite des Cortex, "c"=Kontrollseite des Cortex. Dargestellt ist der Anteil der CSN, die die jeweilige mRNA exprimieren. **p75<sup>NTR</sup>-Expression:** 14 ± 3% (unles., n=6), 10 ± 2% (1d vec. l, n=4), 15 ± 3% (1d vec. c, n=4), 42 ± 4% (3d vec. l, n=6), 15 ± 1% (3d vec. c, n=6), 28 ± 4% (3d NT-3 l, n=4), 15 ± 5% (3d NT-3 c, n=4), 39 ± 12% (7d vec. l, n=4), 13 ± 9% (7d vec. c, n=4), 31 ± 9% (7d NT-3 l, n=4), 12 ± 4% (7d NT-3 c, n=4). **TrkC-Expression:** 83 ± 4% (unles., n=6), 67 ± 5% (1d vec. l, n=3), 78 ± 5% (1d vec. c, n=3), 88 ± 3% (3d vec. l, n=5), 76 ± 6% (3d vec. c, n=5), 39 ± 7% (3d NT-3 l, n=4), 75 ± 8% (3d NT-3 c, n=4), 87 ± 3% (7d vec. l, n=5), 83 ± 5% (7d vec. c, n=5), 70 ± 2% (7d NT-3 l, n=5), 84 ± 2% (7d NT-3 c, n=5). **Statistik:** Die p75-Expression steigt auf der Läsionsseite am dritten Tag nach der Läsion an (p<0,01 vs. alle Kontrollen nach post hoc Newman Keuls Test [Anova: P=0,0001]). Dieser Anstieg hält bis zum siebten Tag nach der Läsion an (p<0,05 vs. alle Kontrollen nach post hoc Newman Keuls Test [Anova: P=0,0001]). NT-3 hat keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die p75-Expression. Die TrkC-Expression bleibt durch die Läsion unbeeinflusst. NT-3-Behandlung erniedrigt die TrkC-Expression auf der Läsions-/Behandlungseite an Tag 3 nach der Läsion (p<0,05 vs. alle Kontrollen nach post hoc Newman Keuls Test [Anova: P=0,0001]).



### VI.3 Hochdosierte intracorticale Gabe von NT-3 aktiviert corticales TrkB

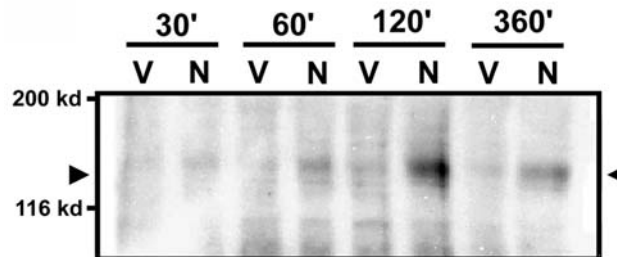
Endogenes BDNF ist für das Überleben eines Großteils der axotomierten CSN erforderlich (Giehl, Schutte et al. 1998) (Abbildung 10). Entsprechend wird auch der BDNF-Rezeptor TrkB zur Überlebensförderung lädierter CSN benötigt (Abbildung 10). Da TrkB bei entsprechend hoher Dosierung auch von NT-3 *in vitro* aktiviert werden kann (Barbacid 1994) haben wir hier untersucht, ob die initial geschilderten hohen NT-3-Dosierungen (Giehl and Tetzlaff 1996) zu einer Phosphorylierung von TrkB *in vivo* führen.



**Abbildung 10: BDNF fördert über seinen Rezeptor TrkB das Überleben axotomierter CSN.** Gezeigt sind die Quantifizierungen des CSN-Überlebens nach Vehikel (PBS)- ( $66 \pm 2\%$ ,  $n=12$ ), BDNF- ( $82 \pm 5\%$ ,  $n=6$ ), anti-BDNF- ( $41 \pm 9\%$ ,  $n=11$ ), anti-TrkB- ( $44 \pm 1\%$ ,  $n=4$ ) und TrkB-Fc-Behandlung ( $44 \pm 11\%$ ,  $n=3$ ). Die BDNF- (Giehl and Tetzlaff 1996) und anti-BDNF-Daten (Giehl, Schutte, et al. 1998) sind bereits publiziert. Überlebenszeit nach der Axotomie war eine Woche. Bei anti-TrkB handelt es sich um einen funktionell blockierenden polyklonalen TrkB-Antikörper (Kang, H., A. Welcher, et al. 1997). Bei TrkB-Fc handelt es sich um ein TrkB-Fusionsprotein mit dem Fc-Fragment von IgG. Hierdurch erhält man eine lösliche TrkB-Extrazellulärdomäne, die extrazelluläres BDNF und NT-4 sequestriert. Die Wirkung des TrkB-Fc entspricht also im Prinzip der Wirkung eines Antikörpers, der gleichzeitig beide Neurotrophine neutralisiert (Cabelli, R., D. Shelton, et al. 1997).

Um zu testen ob hochdosierte NT-3-Behandlung zu einer Phosphorylierung von corticalem TrkB führt, wurde jeweils 10 µl rekombinantes NT-3 (0,5 mg/ml) in den Cortex einer Ratte injiziert und das corticale Gewebe in der unmittelbaren Umgebung der Injektion (1 mm Radius um den Injektionskanal; 1,5 mm Tiefe) einer biochemischen Untersuchung zur Bestimmung der TrkB-Phosphorylierung zugeführt. Hierzu wurde das Lysate des Gewebes einer Immunopräzipitierung mit einem phosphotyrosinspezifischem Antikörper unterzogen, an die sich ein Western Blot für TrkB anschloss. Diese Untersuchungen ergaben, dass NT-3-Behandlung bereits nach 60 Minuten zu einer leichten Erhöhung phosphorylierten TrkB's führt, welche 120 Minuten nach der Injektion ihr Maximum erreicht hat und nach 360

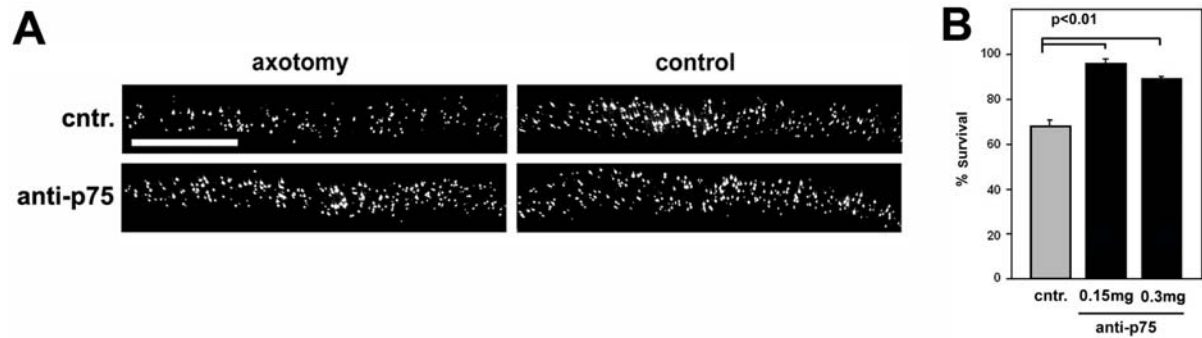
Minuten immer noch feststellbar ist (Abbildung 11). Die Befunde zeigen, wie hochdosierte intracorticale NT-3-Behandlung zu einer Erhöhung der corticalen TrkB-Aktivierung *in vivo* führt.



**Abbildung 11: Intracorticale Behandlung mit hochdosiertem rekombinanten NT-3 induziert TrkB-Phosphorylierung.** Gezeigt ist ein TrkB-Western Blot einer elektrophoretisch aufgetrennten anti-Phosphotyrosin Immunopräzipitierung von Homogenisaten Vehikel (V) oder 0,5 mg/ml NT-3 behandelter Ratten Cortices 30, 60, 120 und 360 Minuten nach der Injektion der jeweiligen Lösung. Der Pfeil zeigt die Position der katalytisch aktiven, d.h. "full-length", TrkB Form an.

#### ***VI.4 Neutralisierung von p75<sup>NTR</sup> führt zur Rettung der CSN vom axotomieinduzierten Zelltod***

Im vorangegangenen Teil wurde gezeigt, dass p75<sup>NTR</sup> mRNA in axotomierten CSN zu einem Zeitpunkt vermehrt exprimiert wird (42% der lädierten CSN an Tag 3 nach der Axotomie p75<sup>NTR</sup> positiv), der mit dem Beginn des durch Axotomie induzierten CSN-Todes zusammenfällt. Dies legt nahe, dass p75<sup>NTR</sup> bei der Zelltodinduktion eine Rolle spielt. Um die Funktion von p75<sup>NTR</sup> in diesem Zusammenhang zu klären, wurden lädierte CSN mit einem funktionsblockierenden p75<sup>NTR</sup>-Antikörper behandelt (Weskamp and Reichardt 1991). Es wurden die Fab-Fragmente dieses Antikörpers appliziert, weil das Gesamt-IgG teilweise agonistische Wirkungen auf p75<sup>NTR</sup> hat, während die Fab-Fragmente die Rezeptorfunktion komplett blockieren (Weskamp and Reichardt 1991). Es wurden zwei verschiedene Dosierungen (150 µg/ml bzw. 300 µg/ml in PBS) appliziert. Beide Dosierungen führen zu einer fast kompletten Rettung der CSN vor dem axotomieinduzierten Zelltod (Abbildung 12). Die Wirkung beider anti-p75<sup>NTR</sup> Dosierungen unterscheidet sich nicht signifikant voneinander. Dieses Ergebnis zeigt, dass p75<sup>NTR</sup> für Zelltodinduktion von axotomierten CSN notwendig ist.



**Abbildung 12: Der Neurotrophinrezeptor p75<sup>NTR</sup> induziert den Tod axotomierter CSN.**  
**A.** Repräsentative Beispiele lädierter Tiere, die mit Kontrolllösung (cntr.) oder anti-p75-Antikörper behandelt wurden. Zu sehen ist jeweils der Cortex der Axotomieseite (axotomy) und der Kontrollseite (control) mit den Fast-Blue-markierten CSN. Man erkennt, dass der läsionsinduzierte Zelltod der CSN durch anti-p75-Behandlung nahezu vollständig verhindert wird. **B.** Quantifizierung des Überlebens lädierter CSN nach Vehikel und anti-p75-Behandlung. Der Antikörper wurde jeweils zu zwei unterschiedlichen Konzentrationen verabreicht (0,15 mg und 0,3 mg). Die hier gezeigte Kontrollgruppe war RFab 0,3 mg/ml (69 ± 1% CSN-Überleben, n=3). Angegeben ist das prozentuale Überleben lädierter CSN im Verhältnis zur unlädierten Kontrollseite. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Dosierungen von anti-p75. Beide unterscheiden sich jedoch signifikant von den Kontrollgruppen [0,15 mg/ml (96 ± 5%, n=5,  $p < 0,01$  vs. cntr.), 0,3 mg/ml (89 ± 2%, n=3,  $p < 0,05$  vs. cntr.)]. Als Kontrollgruppen wurden Vehikel (66 ± 2, n=12), RFab-0,15 (67 ± 6%, n=3) und RFab-0,3 verwendet.

## VII Diskussion

Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführten Experimente geben starke Hinweise auf einen aktiven Regulationsmechanismus, dem axotomieinduzierter Tod von CSN zu Grunde liegt. Obwohl die Frage noch nicht hinreichend geklärt ist, welche Art von Zelltod durch Axotomie verursacht wird, legen morphologische Daten (Giehl and Tetzlaff 1996) und noch unveröffentlichte Tunnel-Experimente nahe, dass es sich um ein apoptotisches Geschehen handelt. Auch kann der läsionsbedingte Zelltod durch die Gabe von Neurotrophinen oder, wie hier gezeigt, durch die Blockierung des zum Zeitpunkt der Zelltodinduktion hochregulierten Neurotrophinrezeptors  $p75^{\text{NTR}}$  verhindert werden. Es liegt also nahe, dass der Zelltod der CSN nach Axotomie ein aktiver Prozess ist, in den regulativ eingegriffen werden kann.

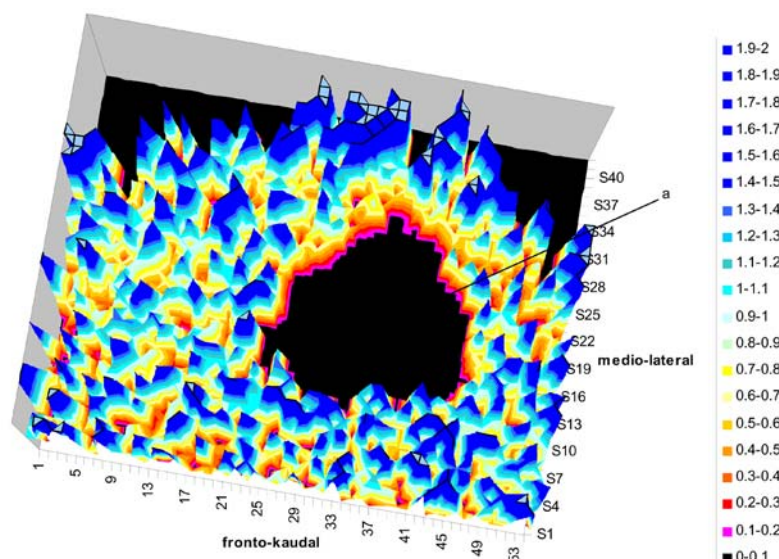
Zusammenfassend wurden in der vorliegenden Dissertation folgende Befunde erhoben:

1. Mit rekombinantem NT-3 lässt sich kein Zelltod der CSN induzieren, wenngleich Zelltodinduktion der physiologischen Funktion von endogenem NT-3 für axotomierte CSN entsprochen hätte. Mögliche Ursache hierfür ist, dass rekombinantes NT-3 der reifen Form dieses Neurotrophins entspricht, während inzwischen die Pro-Form der Neurotrophine als die präferentiell Apoptose induzierende Form identifiziert wurde.
2. Der überlebensfördernde Effekt einer hochdosierten NT-3-Behandlung auf lädierte CSN resultiert wahrscheinlich aus einer unspezifischen Aktivierung des überlebensfördernden BDNF-Rezeptors TrkB.
3. Etwa 80% der CSN exprimieren TrkC. Axotomie hat keinen Einfluss auf die TrkC-Expression.
4. Der  $p75^{\text{NTR}}$ -Rezeptor wird nur von sehr wenigen intakten CSN exprimiert (ca. 14%). Nach Axotomie steigt die Expression von  $p75^{\text{NTR}}$  deutlich an, so dass zum Zeitpunkt der Zelltodinduktion nach Axotomie ca. 42% der lädieren CSN den Rezeptor exprimieren.
5. Durch Blockierung von  $p75^{\text{NTR}}$  mit einem anti- $p75^{\text{NTR}}$ -Antikörper wurde gezeigt, dass  $p75^{\text{NTR}}$  für die Zelltodinduktion axotomierter CSN benötigt wird.

### VII.1 Dosis-Wirkungs-Kurve von NT-3

Die Dosis-Wirkungs-Kurve von NT-3 wurde unter anderem vor dem Hintergrund erstellt, die gegensätzliche Wirkung von exogenem und endogenem NT-3 zu klären. Es bestand die Arbeitshypothese, dass die ursprünglich applizierten Dosierungen, die zum Überleben der CSN führen, weit über der physiologischen Konzentration liegen und deshalb zu Wechselwirkungen zu unphysiologischen Wechselwirkungen mit überlebensregulierenden Rezeptoren (z.B. TrkB) führen. Hierdurch könnte die eigentliche Funktion von endogenem NT-3 maskiert werden. In diese Richtung deutende Befunde wären zum Beispiel, dass hohe NT-3 Dosierungen *in vitro* (Barbacid 1995) und *in vivo* (Abbildung 11) die Effekte von BDNF imitieren, indem sie TrkB als nicht-physiologischen Rezeptor aktivieren. Unterstützt würde ein derartiger Effekt noch dadurch, dass hochdosiertes NT-3 die Expression von corticalem BDNF erhöht (Schutte, Yan et al. 2000).

Um eventuelle differentielle Dosiseffekte von NT-3 zu untersuchen, wurden Experimente durchgeführt, bei denen NT-3 in einem weiten Dosisspektrum bis hin zu sehr geringen Dosierungen von 0,01 µg/ml infundiert wurde. Hierbei wurde jedoch lediglich beobachtet, dass sich das Überleben bei niedrigeren Dosierungen der Überlebenssituation nach Vehikelbehandlung annähert. Eine Verschlechterung des Überlebens unter Vehikelwerte konnte nicht festgestellt werden. Um eventuelle subtile dosisabhängige Änderungen des Überlebens zu erfassen wurde eine "Einzelrasterauswertungen" durchgeführt (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Einzelrasterauswertung (Erklärung siehe Text):** Dargestellt ist exemplarisch die Einzelrasterauswertung eines mit einer niedrigen NT-3 Dosis (0,06 µg/ml) behandelten Tieres. Das Fronto-kaudale und medio-laterale Ausdehnung in 100 µm Schritten ("Raster"). Die rötlichen Farbtöne zeigen Areale, in denen das CSN Überleben deutlich unterhalb des Vehikelwertes lag (<0,5). Die Blauen Farbtöne zeigen Areale, in denen das CSN Überleben deutlich oberhalb des Vehikelwertes lag (>1). Die Gelbtöne (0,5 - 0,8) zeigen Überlebensratios auf Vehikelniveau. Deutlich zu sehen ist die Lokalisation des Pumpapplikators (schwarzes Areal (a)) und des ihn umgebenden Randsaums, der erhöhten Zelltod zeigt. Der erhöhte Zelltod innerhalb dieses "Randsaumes" reflektiert wahrscheinlich einen durch die mechanische Manipulation des Applikators verursachten Zelltod.

Hierbei wurden die Überlebens-Ratios NT-3 behandelter CSN jeweils in regelmäßigen, gleichgroßen und in ihrer Gesamtheit das gesamte CSN Ausbreitungsareal erfassenden Raumeinheiten ("Raster") ermittelt. Der Versuch wurde auf der Annahme basierend durchgeführt, dass sich die Konzentration des infundierten rekombinanten NT-3 kontinuierlich mit größerem Abstand zum Infusionsapplikator innerhalb des corticalen Parenchyms erniedrigen müsste. Wir erhofften durch diese Art der Auswertung einen Bereich innerhalb des Infusionsareals zu finden, in dem die Konzentration des infundierten NT-3's der zur Zelltodinduktion erforderlichen Konzentration entspräche. Ein derartiger Bereich konnte jedoch nicht identifiziert werden. Insgesamt liegt also der Schluss nahe, dass in diesem experimentellen Setting mit exogen appliziertem NT-3 kein Zelltod induziert werden kann.

Es gibt mehrere Möglichkeiten zu erklären, warum es nicht möglich war CSN-Tod mit rekombinantem NT-3 zu induzieren, obwohl die physiologische Funktion von endogenem NT-3 die Förderung des axotomieinduzierten Todes von CSN ist. Erstens spielt die Art der Neurotrophinpräsentation eine Rolle. So konnte zum Beispiel für die frühe embryonale Zelltodinduktion von Retinaganglienzellen durch NGF nachgewiesen werden, dass nur mikroglia gebundenes NGF nicht aber lösliches NGF den Zelltod induzieren kann (Frade and Barde 1998). Dies legt nahe, dass entweder eine spezifische räumliche Orientierung des Neurotrophins zur Zelltodinduktion erforderlich ist, oder dass zellgebundene Co-Faktoren in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen. In diesem Sinne hat unsere experimentelle Manipulation offensichtlich nicht die Notwendigkeiten für eine NT-3-vermittelte Zelltodinduktion axotomierter CSN erfüllt. Eine weitere, inzwischen wohl wahrscheinlichere, Möglichkeit liegt im Prozessierungsgrad des Neurotrophins. So wurde für NGF gezeigt, dass es in verschiedenen neuronalen Zelllinien (Lee, Kermani et al. 2001) und in axotomierten CSN (Giehl and Tetzlaff 1996; Harrington, Leiner et al. 2004) lediglich in seiner Precursorform, nicht aber in der reifen Form Zelltod induzieren kann. Die von uns durchgeführten Antikörperblockaden von NT-3 und die CSN-Überlebensanalysen in NT-3-Knockout Mäusen (Giehl, Rohrig et al. 2001) konnten lediglich die physiologische Funktion eines NT-3 Genproduktes zeigen, nämlich Zelltodinduktion axotomierter CSN. Diese Untersuchungen konnten jedoch nicht differenzieren, ob der Zelltod nun durch die reife oder die Precursorform von NT-3 verursacht wird. Das zur Überlebensförderung führende rekombinante NT-3 entspricht der reifen Form von NT-3. Insgesamt ist es nach heutigem Wissensstand also wahrscheinlich, dass die endogene zelltodinduzierende Wirkung von NT-3 durch den NT-3-Precursor (also proNT-3) verursacht wird, und wir daher mit Gaben von reifem, rekombinantem NT-3 keine Zelltodinduktion erzielen konnten. Inzwischen sind

proNT-3 spezifische Antikörper verfügbar. Unser Labor plant mit diesen Antikörpern diese Frage erneut anzugehen.

### ***VII.2 p75<sup>NTR</sup>-Expression***

Es wurde gezeigt, dass nur ein kleiner Anteil der intakten CSN p75<sup>NTR</sup> exprimiert. 3 Tage nach Axotomie stieg in der Population der lädierten CSN der Anteil p75<sup>NTR</sup>-exprimierender Neurone signifikant an. Dieser Anstieg hielt sich abgeschwächt bis zum Tag 7 nach der Läsion, dem spätesten untersuchten Zeitpunkt. Frühere Untersuchungen zur Überlebensdynamik von CSN nach Axotomie zeigten, dass Tag 3 nach Axotomie der kritische Zeitpunkt für die Entscheidung ist, ob ein CSN abstirbt oder überlebt. Durch Axotomie induzierter CSN-Tod findet zwischen dem dritten und fünften Tag nach der Läsion statt (Giehl and Tetzlaff 1996). Diese zeitliche Koinzidenz mit dem Anstieg der p75<sup>NTR</sup>-Expression kann bedeuten, dass p75<sup>NTR</sup> eine Art Triggersignal darstellt, mit dem der zeitliche Verlauf des CSN-Überlebens reguliert wird.

In Kombination mit den Überlebensdaten nach antikörpervermittelter p75<sup>NTR</sup>-Blockade (Weskamp and Reichardt 1991) wird diese Annahme bestätigt. Wie oben bereits erwähnt wurde inzwischen gezeigt, dass proNGF ein Ligand ist, der über p75<sup>NTR</sup> den axotomieinduzierten Zelltod von CSN verursacht (Harrington, Leiner et al. 2004). Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob proNT-3 eine ähnliche Rolle spielt.

### ***VII.3 TrkC-Expression***

Die Expressionsanalysen von TrkC haben ergeben, dass nahezu alle CSN TrkC exprimieren. Dieses hohe Expressionsniveau wird durch die Infusion von NT-3 signifikant am dritten Tag nach der Läsion gesenkt. Wir haben gezeigt, dass eine antikörpervermittelte Blockade von corticalem TrkC zu einem Schutz lädierter CSN vor axotomieinduziertem Zelltod führt (Giehl, Rohrig et al. 2001). Die NT-3-induzierte Erniedrigung der TrkC-Expression könnte also mit dazu beitragen, dass hochdosierte NT-3-Behandlung zu einer Verhinderung des axotomieinduzierten Todes der CSN führt.

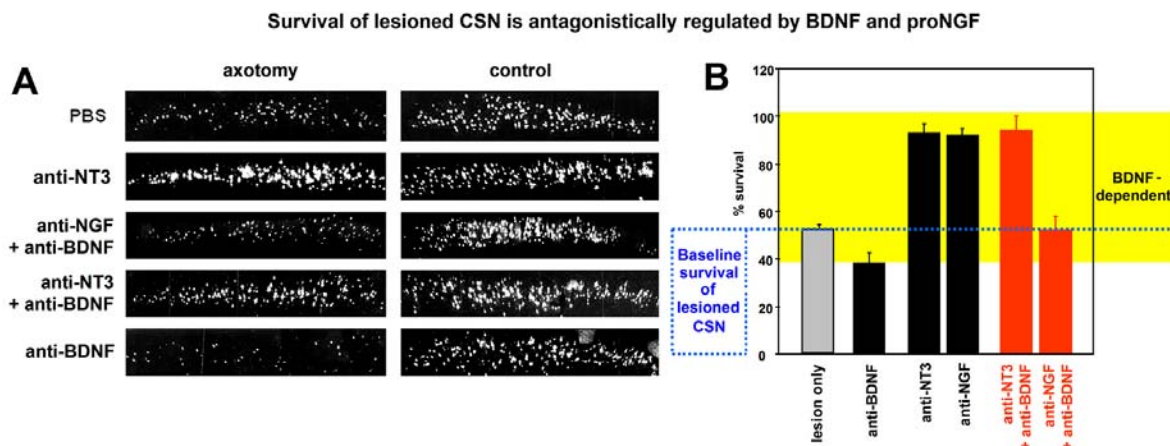
Die genaue Rolle von TrkC im Zusammenhang der Überlebensregulation axotomierter CSN ist noch nicht hinreichend geklärt. Da die Neutralisierung von TrkC in komplettem Überleben axotomierter CSN resultiert, ist anzunehmen, dass der Rezeptor bei der Zelltodförderung nach

Axotomie eine Rolle spielt. Da bislang keine Intrazellulärdomänen in TrkC identifiziert wurden, die apoptotische Signaltransduktionswege aktivieren können, ist es allerdings unwahrscheinlich, dass TrkC als direkter Zelltodinduktor agiert.

Wie sonst ist TrkC in diesem Zusammenhang einzuordnen? Die bisher erhobenen funktionellen Daten und die Neurotrophinrezeptor Expressionsmuster legen nahe (Abbildung 10), (Giehl and Tetzlaff 1996; Giehl, Schutte et al. 1998; Giehl, Rohrig et al. 2001; Harrington, Leiner et al. 2004), dass im Rahmen der Überlebensregulation axotomierter CSN BDNF über TrkB, NT-3 über TrkC, und proNGF über  $p75^{\text{NTR}}$  agiert. Entsprechend sind auf der überlebensfördernden Seite ein Liganden-/Rezeptor-Paar (BDNF/TrkB) und auf der zelltodfördernden Seite zwei Liganden-/Rezeptor-Paare (NT-3/TrkC und proNGF/ $p75^{\text{NTR}}$ ) anzunehmen. Um zu untersuchen ob sich die beiden zelltodfördernden Signale qualitativ voneinander unterscheiden, haben wir kombinierte Ligandenblockaden durchgeführt und das Überleben axotomierter CSN in dieser Situation ermittelt. Hierzu wurde entweder gleichzeitig BDNF und NT-3 oder gleichzeitig BDNF und proNGF neutralisiert. Die Untersuchungen zeigten, dass eine simultane Neutralisierung von BDNF und NT-3 zu einer kompletten Rettung der CSN vom axotomieinduzierten Zelltod führt, während die gleichzeitige Neutralisierung von BDNF und proNGF eine Zelltodrate verursacht, die auf dem Niveau der Zelltodinduktion ohne zusätzlicher experimenteller Manipulation liegt (Abbildung 16). Die Ergebnisse der kombinierten BDNF-/proNGF-Neutralisierung sprechen für eine dynamische antagonistische Regulation des CSN-Überlebens durch diese Liganden. Die Ergebnisse der kombinierten BDNF-/NT-3-Neutralisierung sprechen dafür, dass ohne die Anwesenheit von NT-3 keine Abhängigkeit der CSN von BDNF gegeben ist. NT-3 würde dementsprechend weniger als direkter Zelltodinduktor denn als konditionales Signal für eine BDNF-Abhängigkeit der CSN agieren. Eine solche Funktion als konditionales Signal erinnert an die Rolle, die NT-3 während der Embryonalentwicklung des Cortex spielt (Ghosh, Carnahan et al. 1994; Ghosh and Greenberg 1995). Hier bewirkt NT-3 die Differenzierung corticaler Präkursoren in BDNF-abhängige Neurone. Dies und die Tatsache, dass intakte CSN nicht von BDNF abhängen (Giehl, Schutte et al. 1998) spricht dafür, dass die Axotomie zumindest zum Teil einen embryonalen Mechanismus der Überlebensregulation reaktiviert. Die Möglichkeit einer Reaktivierung embryonaler Überlebensregulation nach Läsion wird weiterhin durch den Befund der vorliegenden Studie unterstützt, dass  $p75^{\text{NTR}}$  nach Axotomie induziert wird. Der  $p75^{\text{NTR}}$ -Rezeptor hat seine höchsten Expressionsniveaus während der Embryonalentwicklung. Er wird im adulten Nervensystem kaum noch exprimiert (Dechant and Barde



2002). Um die Rolle von NT-3 und TrkC in der adulten Läsionssituation für CSN zu entschlüsseln, bedarf es allerdings noch weiterer Untersuchungen.



**Abbildung 16:** (A) CSN repräsentativer Tiere der entsprechend in der Abbildung angegebenen experimentellen Gruppen. (B) Quantifizierung des Überlebens axotomierter CSN in den jeweiligen experimentellen Konstellationen. Die anti-NT-3, anti-BDNF/anti-NT-3 und anti-NGF (d.h. anti-proNGF) Daten sind bereits publiziert (Giehl, Schutte et al. 1998; Giehl, Rohrig et al. 2001; Harrington, Leiner et al. 2004). In der "lesion only" Gruppe erhielten die Tiere lediglich eine Axotomie und keine weitere Behandlung. Die BDNF-Abhängigkeit der gelb unterlegten CSN Population ("BDNF-dependent") wurde dadurch gezeigt, dass der komplette Rettungseffekt einer glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) Behandlung durch gleichzeitige Applikation eines neutralisierenden BDNF-Antikörpers aufgehoben wird (Giehl, Schutte et al. 1998). Dieses Ergebnis zeigt zum einen, dass der GDNF-Effekt von endogenem BDNF abhängt. Zum anderen zeigt dieses Ergebnis, dass alle CSN die nach der Axotomie absterben BDNF abhängig sind. Die Deutung der kombinierten Liganden-Blockaden ist im Text diskutiert.

#### VII.4 Der Rezeptor $p75^{NTR}$ induziert Zelltod axotomierter CSN

Bei dem verwendeten funktionsblockierenden  $p75^{NTR}$ -Antikörper handelt es sich um affinitätsaufgereinigte monovalente Fab-Fragmente, die spezifisch  $p75^{NTR}$  erkennen und die Interaktion von Neurotrophinen mit  $p75^{NTR}$  verhindern. Hierdurch wird die Initiierung der  $p75^{NTR}$ -vermittelten Signaltransduktion blockiert ohne agonistenähnliche Effekte zu verursachen (Weskamp and Reichardt 1991). Da die intracorticale Applikation des Antikörpers zu einem Überleben der CSN nach Axotomie führt, kann  $p75^{NTR}$  als ein Rezeptor angesehen werden, der zur Induktion läsionsbedingten Todes der CSN notwendig ist. In diesem Zusammenhang stellt sich jedoch die Frage, ob die Rettung axotomierter CSN direkt auf die Blockierung des von CSN exprimierten  $p75^{NTR}$  zurückzuführen ist oder ob andere Zelltypen des Cortex involviert sind. Um diese Frage zu klären müsste man CSN spezifisch mit dominant negativen  $p75^{NTR}$ -Mutanten transfizieren. Würde in solchen CSN axotomie-

induzierter Tod durch p75<sup>NTR</sup>-Antikörper verhindert wäre ein indirekter Effekt anzunehmen. Im umgekehrten Falle wäre ein direkter Effekt anzunehmen. Derartige Experimente befinden sich derzeit in Planung. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt kann jedoch konstatiert werden, dass die zeitliche Koinzidenz der p75<sup>NTR</sup>- und Zelltodinduktionen in CSN nach Axotomie für ein direktes Geschehen sprechen.

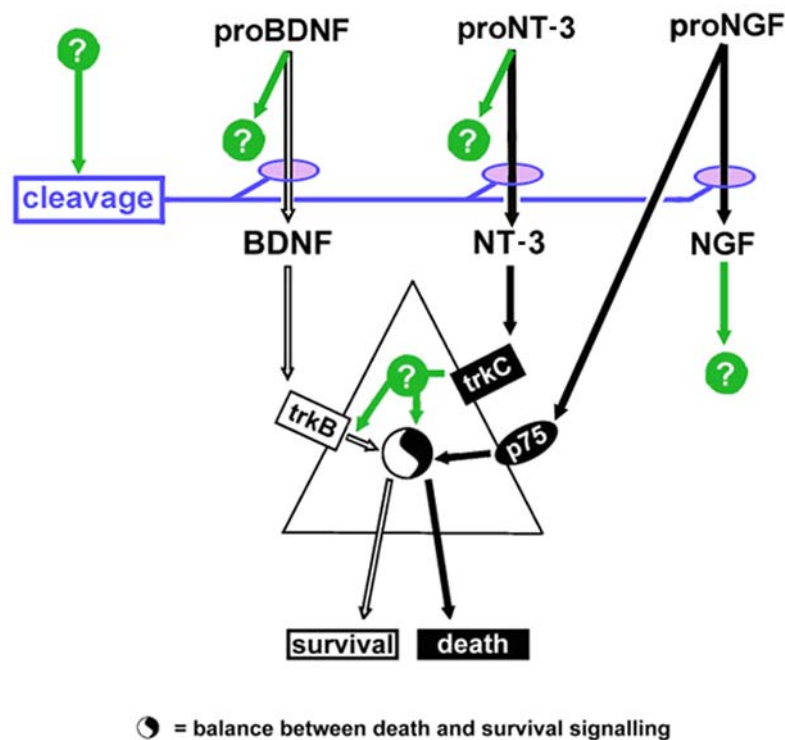
Ferner stellt sich die Frage, ob der zelltodinduzierende Effekt von p75<sup>NTR</sup> tatsächlich durch Liganden induziert wird oder von diesen unabhängig ist. Es wurde für Motoneurone des Nervus facialis beschrieben, dass von ligandenunabhängige Signaltransduktion der Intrazellulärdomäne von p75<sup>NTR</sup> auch zur Induktion von neuronalem Tod führen kann (Bamji, Majdan et al. 1998). Inzwischen konnte jedoch gezeigt werden, dass durch proNGF vermittelter Zelltod axotomierter CSN von einer Interaktion des proNGF mit p75<sup>NTR</sup> abhängt (Harrington, Leiner et al. 2004). Eine Interaktion von Ligand mit p75<sup>NTR</sup> scheint also für die Zelltodinduktion lädierter CSN essentiell zu sein.

Wie fügen sich die Befunde der vorliegenden Studie in den aktuellen Wissensstand ein? Bisher wurde *in vivo* kein zelltodinduzierender Effekt von p75<sup>NTR</sup> im adulten Nervensystem beschrieben. Aktive Zelltodinduktion über p75<sup>NTR</sup> wurde bisher nur im Rahmen der Embryonalentwicklung und früher postnataler Stadien im Kontext des programmierten ontogenetischen Zelltodes beschrieben (Dechant and Barde 2002). Inzwischen konnten die Befunde der vorliegenden Studie an p75<sup>NTR</sup>-Knockout Mäusen bestätigt werden (Harrington, Leiner et al. 2004). Insgesamt etablieren diese Studien p75<sup>NTR</sup> als einen Rezeptor, der im adulten Nervensystem nach pathologischen Schädigungen Zelltod induziert (Dechant and Barde 2002).

### ***VII.5 Überlebensmodell***

Zusammen mit anderen Arbeiten des Labors (Giehl, Schutte et al. 1998; Giehl, Rohrig et al. 2001; Harrington, Leiner et al. 2004) legen die Befunde dieser Studie eine antagonistische Überlebensregulation lädierter CSN durch Neurotrophine via zelltodfördernden p75<sup>NTR</sup>- und überlebensfördernden Trk-Rezeptor nahe. In diesen Studien wurde gezeigt, dass BDNF über TrkB einen axotomieinduzierten Zelltod von CSN verhindert, während proNGF über p75<sup>NTR</sup> den axotomieinduzierten Zelltod fördert. Wie oben angesprochen ist die präzise Funktion von NT-3 und TrkC in diesem Zusammenhang noch nicht geklärt. Zusammengenommen kann aufgrund dieser Studien das bisherige Modell neurotrophinvermittelter Überlebensregulation erweitert werden (Abbildung 17).

Ursprünglich wurde die Meinung vertreten, dass Neurotrophine ausschließlich Überleben von Neuronen fördern (Barde 1989). Hiernach sterben Neurone ab, wenn man ihnen diesen



**Abbildung 17: Modell der Überlebensregulation von CSN:** Gezeigt wird der postulierte antagonistische Effekt von TrkB und p75<sup>NTR</sup> auf die Überlebensregulation von CSN. Während BDNF über TrkB CSN-Überleben fördert, fördert proNGF über p75 den Zelltod von CSN. Sowohl NT-3 als auch TrkC haben auch eine zelltodfördernde Wirkung deren Mechanismus allerdings noch nicht geklärt ist. Einzelheiten des Modells werden im Text erörtert.

trophischen Support entzieht. Dieses Modell wurde später dahingehend modifiziert, dass ein Neurotrophin bei Trk exprimierenden Neuronen Überleben fördert, bei exklusiv p75<sup>NTR</sup>-exprimierenden Neuronen jedoch Apoptose induziert (Dechant and Barde 1997).

Die vorliegenden Daten im Zusammenhang mit den genannten parallelen und nachfolgenden Studien erlauben eine Modifizierung dieses Modells dahingehend, dass eine antagonistische Überlebensregulation durch Neurotrophine stattfindet. Hierbei kann in einer Zelle durch ein reifes Neurotrophin (BDNF) via Trk-Rezeptor (TrkB) Überleben gefördert werden, während ein anderes Neurotrophin in seiner Vorläuferform (proNGF) in der gleichen Zelle via p75<sup>NTR</sup> den Zelltod fördert. Von der Balance zwischen zelltod- und überlebensfördernden Signalen hängt es ab, ob das Neuron überlebt oder stirbt. Innerhalb dieses Modells sind 3 regulatorische Ebenen erkennbar. Zum einen besteht eine Regulationsmöglichkeit auf Rezeptorebene. So kann die Präsenz und/oder das Expressionsniveau der überlebens- und

zelltodfördernden Rezeptoren reguliert werden. In dieser Studie wurde dies für p75<sup>NTR</sup> nachgewiesen. Die zweite Regulationsmöglichkeit besteht auf Ligandenebene. So kann die Präsenz und/oder das Expressionsniveau der überlebens- und zelltodfördernden Liganden moduliert werden. Die Expression von corticalem proNGF wird zum Beispiel durch die Axotomie induziert (Harrington, Leiner et al. 2004). Schließlich besteht eine Regulationsmöglichkeit auf der Ebene der Ligandenprozessierung (Lee, Kermani et al. 2001). Eine Hemmung des Neurotrophinprecursoren-Processings wird p75<sup>NTR</sup> vermittelte Zelltodinduktion durch pro-Neurotrophine fördern, während eine Erhöhung des Neurotrophinprecursoren-Processings die Aktivierung überlebensfördernder Trk-Rezeptoren durch reife Neurotrophine favorisieren wird. Die Rolle eines möglicherweise konditionierenden Trk-Signals (siehe NT-3/TrkC Wirkungen) zur Initiierung dieses antagonistischen Regulationsmechanismus wurde oben diskutiert.

## VIII Literaturverzeichnis

- Acklin, C., K. Stoney, et al. (1993). "Recombinant human brain-derived neurotrophic factor (rHuBDNF). Disulfide structure and characterization of BDNF expressed in CHO cells." Int J Pept Protein Res **41**(6): 548-52.
- Aloyz, R., S. Bamji, et al. (1998). "p53 is essential for developmental neuron death as regulated by the TrkA and p75 neurotrophin receptors." J Cell Biol **143**(6): 1691-703.
- Arakawa, T., M. Haniu, et al. (1994). "Formation of heterodimers from three neurotrophins, nerve growth factor, neurotrophin-3, and brain-derived neurotrophic factor." J Biol Chem **269**(45): 27833-9.
- Armand, J. (1982). "The origin, course and terminations of corticospinal fibers in various mammals." Prog Brain Res **57**: 329-60.
- Bamji, S., M. Majdan, et al. (1998). "The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death." J Cell Biol **140**(4): 911-23.
- Barbacid, M. (1994). "The Trk family of neurotrophin receptors." J Neurobiol **25**(11): 1386-403.
- Barbacid, M. (1995). "Structural and functional properties of the TRK family of neurotrophin receptors." Ann N Y Acad Sci **766**: 442-58.
- Barde, Y. (1989). "Trophic factors and neuronal survival." Neuron **2**(6): 1525-34.
- Barrett, G. and P. Bartlett (1994). "The p75 nerve growth factor receptor mediates survival or death depending on the stage of sensory neuron development." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(14): 6501-5.
- Bibel, M. and Y. Barde (2000). "Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system." Genes Dev **14**(23): 2919-37.
- Bonatz, H., S. Rohrig, et al. (2000). "An axotomy model for the induction of death of rat and mouse corticospinal neurons in vivo." J Neurosci Methods **100**(1-2): 105-15.
- Chao, M. (2003). "Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways." Nat Rev Neurosci **4**(4): 299-309.
- Cabelli, R., D. Shelton, et al. (1997). "Blockade of endogenous ligands of trkB inhibits formation of ocular dominance columns." Neuron **19**(1): 63-76

- Cohen S, L.-M. R. (1956). "A nerve growth stimulating factor, isolated from snake venom." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America(42): 571-574.
- Collins, M. and W. Hunsaker (1985). "Improved hybridization assays employing tailed oligonucleotide probes: a direct comparison with 5'-end-labeled oligonucleotide probes and nick-translated plasmid probes." Anal Biochem **151**(2): 211-24.
- Dechant, G. (2002). "Chat in the trophic web: NGF activates Ret by inter-RTK signaling." Neuron **33**(2): 156-8.
- Dechant, G. and Y. Barde (1997). "Signalling through the neurotrophin receptor p75NTR." Curr Opin Neurobiol **7**(3): 413-8.
- Dechant, G. and Y. Barde (2002). "The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system." Nat Neurosci **5**(11): 1131-6.
- Dechant, G. and H. Neumann (2002). "Neurotrophins." Adv Exp Med Biol **513**: 303-34.
- Dobrowsky, R., G. Jenkins, et al. (1995). "Neurotrophins induce sphingomyelin hydrolysis. Modulation by co-expression of p75NTR with Trk receptors." J Biol Chem **270**(38): 22135-42.
- Dobrowsky, R., M. Werner, et al. (1994). "Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor." Science **265**(5178): 1596-9.
- Frade, J. and Y. Barde (1998). "Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina." Neuron **20**(1): 35-41.
- Frade, J., A. Rodriguez-Tebar, et al. (1996). "Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor." Nature **383**(6596): 166-8.
- Ghosh, A., J. Carnahan, et al. (1994). "Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons." Science **263**(5153): 1618-23.
- Ghosh, A. and M. Greenberg (1995). "Distinct roles for bFGF and NT-3 in the regulation of cortical neurogenesis." Neuron **15**(1): 89-103.
- Giehl, K. and P. Mestres (1995). "Somatostatin-mRNA expression in brainstem projections into the medial preoptic nucleus." Exp Brain Res **103**(3): 344-54.
- Giehl, K., S. Rohrig, et al. (2001). "Endogenous brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 antagonistically regulate survival of axotomized corticospinal neurons in vivo." J Neurosci **21**(10): 3492-502.

- Giehl, K., C. Schacht, et al. (1997). "GDNF is a trophic factor for adult rat corticospinal neurons and promotes their long-term survival after axotomy in vivo." Eur J Neurosci **9**(11): 2479-88.
- Giehl, K., A. Schutte, et al. (1998). "The survival-promoting effect of glial cell line-derived neurotrophic factor on axotomized corticospinal neurons in vivo is mediated by an endogenous brain-derived neurotrophic factor mechanism." J Neurosci **18**(18): 7351-60.
- Giehl, K. and W. Tetzlaff (1996). "BDNF and NT-3, but not NGF, prevent axotomy-induced death of rat corticospinal neurons in vivo." Eur J Neurosci **8**(6): 1167-75.
- Gotz, R., R. Koster, et al. (1994). "Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family." Nature **372**(6503): 266-9.
- Gu, C., P. Casaccia-Bonnel, et al. (1999). "Oligodendrocyte apoptosis mediated by caspase activation." J Neurosci **19**(8): 3043-9.
- Hamburger, V. (1993). "The history of the discovery of the nerve growth factor." J Neurobiol **24**(7): 893-7.
- Harrington, A., B. Leiner, et al. (2004). "Secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(16): 6226-30.
- Heymach, J. and E. Shooter (1995). "The biosynthesis of neurotrophin heterodimers by transfected mammalian cells." J Biol Chem **270**(20): 12297-304.
- Jing, S., P. Tapley, et al. (1992). "Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors." Neuron **9**(6): 1067-79.
- Jungbluth, S., K. Bailey, et al. (1994). "Purification and characterisation of a brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin-3 (BDNF/NT-3) heterodimer." Eur J Biochem **221**(2): 677-85.
- Kang, H., A. Welcher, et al. (1997). "Neurotrophins and time: different roles for TrkB signaling in hippocampal long-term potentiation." Neuron **19**(3): 653-64.
- Kaplan, D. and R. Stephens (1994). "Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor." J Neurobiol **25**(11): 1404-17.
- Khursigara, G., J. Orlinick, et al. (1999). "Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6." J Biol Chem **274**(5): 2597-600.
- Koester, S. and D. O'Leary (1994). "Development of projection neurons of the mammalian cerebral cortex." Prog Brain Res **102**: 207-15.

- Lamballe, F., R. Klein, et al. (1991). "The trk family of oncogenes and neurotrophin receptors." Princess Takamatsu Symp **22**: 153-70.
- Lee, R., P. Kermani, et al. (2001). "Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins." Science **294**(5548): 1945-8.
- Lewin, G. and Y. Barde (1996). "Physiology of the neurotrophins." Annu Rev Neurosci **19**: 289-317.
- Lewis, M., R. Arentzen, et al. (1986). "Rapid, high-resolution in situ hybridization histochemistry with radioiodinated synthetic oligonucleotides." J Neurosci Res **16**(1): 117-24.
- Lewis, M., W. Rogers, et al. (1989). "Quantitation and digital representation of in situ hybridization histochemistry." Methods Enzymol **168**: 808-21.
- Lewis, M., T. Sherman, et al. (1985). "In situ hybridization histochemistry with synthetic oligonucleotides: strategies and methods." Peptides **6 Suppl 2**: 75-87.
- McCabe, J., R. Desharnais, et al. (1989). "Graphical and statistical approaches to data analysis for in situ hybridization." Methods Enzymol **168**: 822-48.
- Miller, M. (1987). "The origin of corticospinal projection neurons in rat." Exp Brain Res **67**(2): 339-51.
- Nudo, R. and R. Masterton (1990). "Descending pathways to the spinal cord, III: Sites of origin of the corticospinal tract." J Comp Neurol **296**(4): 559-83.
- Offenhäuser, N., R. Böhm-Matthaei, et al. (1995). "Developmental regulation of full-length trkC in the rat sciatic nerve." Eur J Neurosci **7**(5): 917-25.
- O'Leary, D., D. Borngasser, et al. (1995). "Plasticity in the development of neocortical areas." Ciba Found Symp **193**: 214-30; discussion 251-7.
- O'Leary, D. and S. Koester (1993). "Development of projection neuron types, axon pathways, and patterned connections of the mammalian cortex." Neuron **10**(6): 991-1006.
- Paxinos, G., C. Watson, et al. (1985). "Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight." J Neurosci Methods **13**(2): 139-43.
- Porter, R. (1985). "The corticomotoneuronal component of the pyramidal tract: corticomotoneuronal connections and functions in primates." Brain Res **357**(1): 1-26.



- Radeke, M., T. Misko, et al. (1987). "Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor." Nature **325**(6105): 593-7.
- Radziejewski, C. and R. Robinson (1993). "Heterodimers of the neurotrophic factors: formation, isolation, and differential stability." Biochemistry **32**(48): 13350-6.
- Robinson, R., C. Radziejewski, et al. (1995). "Structure of the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 3 heterodimer." Biochemistry **34**(13): 4139-46.
- Rodriguez-Tebar, A., G. Dechant, et al. (1990). "Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor." Neuron **4**(4): 487-92.
- Rodriguez-Tebar, A., G. Dechant, et al. (1992). "Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor." EMBO J **11**(3): 917-22.
- Ryden, M., J. Murray-Rust, et al. (1995). "Functional analysis of mutant neurotrophins deficient in low-affinity binding reveals a role for p75LNGFR in NT-4 signalling." EMBO J **14**(9): 1979-90.
- Schutte, A., Q. Yan, et al. (2000). "The endogenous survival promotion of axotomized rat corticospinal neurons by brain-derived neurotrophic factor is mediated via paracrine, rather than autocrine mechanisms." Neurosci Lett **290**(3): 185-8.
- Snider, W. (1994). "Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us." Cell **77**(5): 627-38.
- Squinto, S., T. Stitt, et al. (1991). "trkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor." Cell **65**(5): 885-93.
- Stephens, R., D. Loeb, et al. (1994). "Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses." Neuron **12**(3): 691-705.
- Uylings, H. (2000). "Development of the cerebral cortex in rodents and man." Eur J Morphol **38**(5): 309-12.
- Valenzuela, D., P. Maisonpierre, et al. (1993). "Alternative forms of rat TrkC with different functional capabilities." Neuron **10**(5): 963-74.
- Weskamp, G. and L. Reichardt (1991). "Evidence that biological activity of NGF is mediated through a novel subclass of high affinity receptors." Neuron **6**(4): 649-63.

Zilles K (1990). Anatomy of the neocortex: cytoarchitecture and myeloarchitecture. The Cerebral Cortex of the Rat. T. R. Kolb B, eds. Boston, MA, MIT Press: 77-119.

## **IX Abkürzungen**

### **Neurotrophine:**

BDNF	brain-derived neurotrophic factor
GDNF	glial-derived neurotrophic factor
NGF	nerve growth factor
NT-3/4	Neurotrophin-3/4

### **Neurotrophinrezeptoren:**

p75 <sup>NTR</sup>	p75 Neurotrophinrezeptor
Trk A/B/C	Tyrosinkinase-Receptor A/B/C

### **Labor:**

DMSO	Dimethylsulfoxid
DSS	denaturated salmon sperm
DTT	Dithiothreitol
FB	fast-blue Tracer
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
OT	Objektträger
PBS	phosphate-buffered saline
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVP	Polyvinylpyrolidon
SDS	Sodium Dodecylsulfate
SSC	NaCl-Natriumcitrat-Puffer
STE	Sodium-Tris-EDTA-Puffer

### **Sonstiges:**

CSN	corticospinale Neurone
CSS	corticospinales System
CST	corticospinaler Trakt
ICL	internal capsule lesion
KS	Kontrollseite
LS	Läsionsseite

## **X Publikationen**

M. Gutjahr\*, Q. Yan, A. Welcher, P. Mestres, M. Meyer, and K.M. Giehl, “A rabbit polyclonal antibody raised against the extracellular domain of TrkC rescues rat corticospinal neurons from axotomy induced death *in vivo*”, veröffentlicht 1999 auf dem 29th annual meeting of the Society for Neuroscience

Giehl KM, Rohrig S, Bonatz H, Gutjahr M, Leiner B, Bartke I, Yan Q, Reichardt LF, Backus C, Welcher AA, Dethleffsen K, Mestres P, Meyer M. „Endogenous brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 antagonistically regulate survival of axotomized corticospinal neurons *in vivo*”. J Neurosci. 2001 May 15;21(10):3492-502

## **XI Danksagungen**

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD. Dr. Klaus Giehl für seine ausgezeichnete Betreuung und Anregungen für Experimente und Deutungsmöglichkeiten der Ergebnisse bedanken. Die langen Sitzungen, in denen neue Ergebnisse diskutiert und neue Versuche geplant wurden, waren nicht nur sehr hilfreich, sondern haben auch ganz besonders viel Spaß gemacht. Ebenso danken möchte ich Prof. Dr. Pedro Mestres für die umfangreiche Unterstützung im Labor und zusätzliche Ideen. Für außerordentlich viel Hilfe und Tipps bei der mir anfangs unbekanntem Laborarbeit danke ich auch Britta Leiner. Danken möchte ich auch dem Sekretariat von Prof. Dr. Bock für die Bereitstellung der Digitalkamera für die in der Arbeit gezeigten Makroaufnahmen. Danken möchte ich auch Norbert Pütz, der in technischen Fragen mit Rat und Tat zur Verfügung stand und dem Institut für Virologie, dessen S II Labor mir für die radioaktiven Markierungen zu Verfügung gestellt wurden. Zuletzt will ich auch meinem Vater für die Anregungen und Sichtweisen eines „Fachfremden“ und das Gegenlesen der Arbeit danken.

## **XII Lebenslauf**

### PERSÖNLICHE ANGABEN

---

- Geburtsdatum: 24.06.1975
- Geburtsort: Saarbrücken
- Eltern: Prof. Dr. Jörg Gutjahr, Hana Gutjahr, geb. Pavkova
- Familienstand: ledig

### BERUFLICHE ERFAHRUNG

---

Seit 1.11.03      AiP im Institut für Anaesthesiologie und Intensivmedizin der SLK  
Kliniken Heilbronn, ab 1.10.2004 Assistenzarzt

### AUSBILDUNG

---

1982 – 1986      Gemeinschaftsgrundschule Marienberghausen

1986 – 1995      Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium Wiehl

- Abitur 1995

1996-2003      Universität des Saarlandes Homburg

- Physikum Sommer 1998
- Staatsexamen Frühjahr 2001
- Staatsexamen Herbst 2002
- Staatsexamen Herbst 2003

seit 02.1999      experimentelle Doktorarbeit an der Anatomie Homburg unter der  
Betreuung von PD Dr. Klaus Giehl und Prof. Dr. Pedro Mestres  
Projekt: Trophische Abhängigkeit corticospinaler Neurone am Modell  
der Ratte, dafür das Studium im WS 99/00 und SS 00 pausiert

### SPRACHKENNTNISSE

---

Englisch/ Französisch

### WEHR-/ERSATZDIENST

---

Juli 1995 - Juli 1996      Kuratorium für Dialyse und Nierentransplantation  
Köln-Merheim

- Dialyseassistent, Betreuung von Heimdialysepatienten

### PRAKTIKA/FAMULATUREN/NEBENTÄTIGKEITEN

---

Für das Pflegepraktikum im Rahmen der medizinischen Ausbildung  
wurde meine Tätigkeit während des Wehersatzdienstes und im  
St. Josef Krankenhaus anerkannt

## Famulaturen:

08/2000 anästhesiologische Praxis Dr. Andre / Dr. Bommert  
 09/2000 internistische Notaufnahme, Uniklinik Homburg  
 09/2001 Kardiologie, Uniklinik Graz  
 03/2002 Anästhesie, Krankenhaus Landstuhl

## Nebentätigkeiten:

Wintersemester 1998/99: Moniteur in der Anatomie Homburg

Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Anatomie Homburg von 11/99 bis 06/00

#### SONSTIGE KRANKENHAUSERFAHRUNG

---

März 1997 St. Josef Krankenhaus Engelskirchen

- Tätigkeit als Aushilfskraft auf der unfallchirurgischen Station

03/99-10/04 DRK Krankenhaus Saarlouis

- Tätigkeit als Aushilfskraft auf internistischen und chirurgischen Stationen

#### AUSLANDSAUFENTHALTE

---

01-06/1993 High School Dublin, Irland

10/1999 Besuch eines Kongresses der „Society for Neuroscience“ in Miami im Rahmen der Dissertation mit Präsentation eines Posters