

Stimulation axonaler Regeneration im durchtrennten Rückenmark der adulten Ratte

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Susanne Hermanns

aus Düsseldorf

Düsseldorf 2001

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

Referent: Prof. Dr. Hans Werner Müller

Korreferent: Prof. Dr. Heinz Mehlhorn

Tag der mündlichen Prüfung: 05.07.2001

„IRGENDETWAS NICHT TUN ZU
KÖNNEN, IST KEIN GRUND, ES
NICHT ZU TUN“

GORDON SHUMWAY

Zusammenfassung	
Abkürzungen und Einheiten	4
1 Einleitung	8
1.1 Pathophysiologie von Rückenmarksverletzungen	8
1.2 Konsequenzen humaner Rückenmarksverletzungen	9
1.3 Klinische Therapiekonzepte zur Behandlung humaner Rückenmarksverletzungen zu Beginn des 21. Jahrhunderts	11
1.3.1 Lokomotorisches Training zur Wiederherstellung motorischer Funktionen	11
1.3.2 Funktionelle Elektrostimulation	11
1.3.3 Pharmakologische Therapie und Transplantation	12
1.4 Axonale Regeneration im peripheren- und im Zentralnervensystem	12
1.5 Die Läsionsstelle als regenerationsinhibierende Barriere	14
1.5.1 Die Glianarbe	14
1.5.2 Die läsionsinduzierte Basalmembran	16
1.6 Aufbau der Basalmembran	17
1.6.1 Kollagene	18
1.6.2 Aufbau und Biosynthese des Typ IV Kollagens	19
1.6.2.1 Intrazelluläre, post-translationale Modifikationen	20
1.6.2.2 Extrazelluläre, post-translationale Modifikationen	21
1.6.3 Inhibition der Kollagenbiosynthese durch Hemmung der Prolyl-4-Hydroxylase	21
1.6.4 Fibroblasten und leptomeningeale Zellen	23
1.6.4.1 Regulation der zytokininduzierten Kollagensynthese	24
1.7 Tiermodelle zur strukturellen und funktionellen Wiederherstellung des verletzten Rückenmarks	24
1.7.1 Motorische Kontrolle im Rückenmark der Ratte	24
1.7.2 Läsionsmodelle	26
1.7.3 Therapiestrategien im Tiermodell	27
2 Fragestellung und Zielsetzung	30
3 Material und Methoden	31
3.1 Versuchstiere	31
3.2 Puffer und Antikörper	31
3.2.1 Häufig verwendete Puffer und Lösungen	31
3.2.2 Antikörper	32
3.3 Transsektion des postkommissuralen Fornix	33
3.3.1 Stereotaktische Methoden	33
3.3.2 Stereotaktische Transsektion des postkommissuralen Fornix	34

3.4	Transsektion des dorsalen Kortikospinaltrakts	35
3.5	Experimentelle Gruppen	36
3.5.1	Gruppe 1 - Transsektion des postkommissuralen Fornix	36
3.5.2	Gruppe 2 - Transsektion des dorsalen Kortikospinaltraktes	36
3.5.3	Gruppe 3 - Einmalige 2,2'-Dipyridyl-Injektionen	37
3.5.4	Gruppe 4 - Kontinuierliche 2,2'-Dipyridyl-Applikation	37
3.5.5	Gruppe 5 - Kombinationsbehandelte Tiere	38
3.6	Elvax-Präparation	39
3.7	Tracing	40
3.7.1	Stereotaktische Methoden	40
3.7.2	Injektion von biotinyliertem Dextranamin in den sensorimotorischen Kortex	41
3.8	Gewebeaufarbeitung	42
3.8.1	Perfusion	42
3.8.2	Gewebeentnahmen	42
3.8.2.1	Gewebeentnahme zur Herstellung frisch gefrorener Gewebeschnitte	42
3.8.2.2	Gewebeentnahme zur Herstellung perfundierter Kryostatschnitte	43
3.8.2.3	Gewebeentnahme zur Herstellung von Paraffinschnitten	43
3.8.3	Paraffineinbettung	43
3.8.4	Anfertigung histologischer Schnittpräparate	44
3.8.4.1	Frisch gefrorenes Gewebe	44
3.8.4.2	Perfundierte Kryostatschnitte	44
3.8.4.3	Paraffinschnitte	44
3.9	Immunhistochemische Färbemethoden	45
3.9.1	Färbeprotokolle	46
3.9.1.1	Frisch gefrorenes Gewebe	46
3.9.1.2	Perfundierte Kryostatschnitte	46
3.9.1.3	Paraffinschnitte	47
3.9.2	Antigendemaskierung in der Mikrowelle	49
3.10	Auswertung und Dokumentation	49
4	Ergebnisse	50
4.1	Detektion der Basalmembran in unterschiedlich prozessiertem Rückenmarksgewebe	50
4.2	Expression basalmembran-spezifischer Proteine in der läsionsinduzierten Narbe	51
4.3	Zeitlicher Verlauf der Kollagen Typ IV-Expression in der Läsionsstelle	53
4.4	Extension der läsionsinduzierten Basalmembran im lädierten postkommissuralen Fornix und im verletzten Rückenmark der Ratte	54
4.5	Kollagen Typ IV-Expression in der Läsionsstelle nach 2,2'-Dipyridyl-Applikation	55
4.5.1	Kollagen Typ IV-Expression nach einmaliger 2,2'-Dipyridyl-Injektion	55
4.5.2	Kollagen Typ IV-Expression nach kontinuierlicher 2,2'-Dipyridyl-Applikation	56

4.6	Kollagen Typ IV-Expression in der Läsionsstelle nach Kombinationsbehandlung	58
4.7	Zeitverlauf der Basalmembran-Reduktion nach Kombinationsbehandlung	60
4.8	Auswirkungen der Basalmembran-Reduktion auf den verletzten Kortikospinaltrakt	62
5	Diskussion	67
5.1	Detektion der Basalmembranexpression im verletzten Rückenmark der Ratte	67
5.2	Expression basalmembran-spezifischer Proteine in der Narbe	68
5.3	Zeitlicher Verlauf der Narbenbildung im traumatisch lädierten Rückenmark der Ratte	69
5.4	Räumliche Ausdehnung der läsionsinduzierten Narbe im durchtrennten Rückenmark der Ratte	70
5.5	Kollagen Typ IV-Expression in der Läsionsstelle nach 2,2'-Dipyridyl-Applikation	70
5.6	Kollagen Typ IV-Expression in der Läsionsstelle nach Kombinationsbehandlung	71
5.7	Zeitverlauf der Basalmembran-Reduktion nach Kombinationsbehandlung	72
5.8	Auswirkungen der Basalmembran-Reduktion auf den verletzten Kortikospinaltrakt	73
5.8.1	Proteoglykane als wachstumshemmende Proteine	76
5.9	Ausblick	77
6	Literatur	79

Zusammenfassung

Nach Verletzungen des Zentralnervensystems (ZNS) kommt es, anders als im peripheren Nervensystem, nicht zur Regeneration der verletzten Faserbahnen. Da die aussprossenden Fasern an der Läsionsstelle stoppen, wird vermutet, daß dort lokalisierte Faktoren, für das Versagen zentralnervöser Neurone zu regenerieren, verantwortlich sind. Die im Läsionsgebiet entstehende, kollagenhaltige Wundheilungsnarbe, die zum großen Teil aus Basalmembran (BM) besteht, stellt einen solchen Faktor dar.

Unsere Arbeitsgruppe hat im durchtrennten postkommissuralen Fornix gezeigt, daß axonale Regeneration im ZNS möglich wird, wenn die Ausbildung der läsionsinduzierten BM in der Läsionsstelle pharmakologisch verhindert wird. Diese Arbeit sollte zeigen, ob dieser therapeutische Ansatz auch im klinisch relevanten Modell des traumatisch lädierten Rückenmarks der adulten Ratte zu axonaler Regeneration führt.

Die läsionsinduzierte BM kann im verletzten Rückenmark der Ratte nur unter Verwendung spezieller immunhistochemischer Färbeprotokolle dargestellt werden. In der Läsionsstelle lassen sich BM-spezifische Proteine in der BM der Blutgefäße und in tuchartigen Strukturen, die nicht an Blutgefäße assoziiert sind nachweisen. Die ersten tuchartigen BM-Strukturen im Rückenmark bilden sich fünf Tage nach der initialen Verletzung. Durch die Nähe der Rückenmarksverletzungen zu den Hirnhäuten ist die Ausdehnung der Narbe im Rückenmark ca. 15x größer als im Läsionsmodell des postkommissuralen Fornix. Die im Fornix erfolgreich angewendete Applikation des Eisenchelators 2,2'-Dipyridyl führt im Rückenmark auch nach kontinuierlicher Gabe zu keiner Reduktion der läsionsinduzierten BM. Durch eine Kombinationsbehandlung, bestehend aus 6 Injektionen des Eisenchelators 5,5'-Dicarboxy-2,2'-Dipyridyl, kontinuierlicher Gabe des Chelators durch substanzbeladene Elvax-Polymere und Hemmung der Proliferation und Extrazellulärmatrixproduktion von Fibroblasten durch Gabe von 8-Br-cAMP, kann die Ausbildung der läsionsinduzierten BM im lädierten Rückenmark für einen Zeitraum von 12 Tagen transient unterdrückt werden. Dieser Zeitraum ist ausreichend, durchtrennten kortikospinalen Fasern das Einwachsen in die Läsionsstelle und eine Elongation im distalen Bereich des Rückenmarks über eine Distanz von mindestens 1,8 cm zu ermöglichen. Ein Teil der regenerierenden Fasern wächst entlang der Meningen.

Die in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse bestätigen die im Transsektionsmodell des postkommissuralen Fornix gewonnenen Daten, die besagen, daß die läsionsinduzierte BM eine wichtige Rolle im Bezug auf das regenerative Versagen zentralnervöser Fasertrakte spielt. Darüber hinaus wurde hier zum ersten Mal gezeigt, daß Regeneration in einem klinisch relevanten Modell, dem verletzten Rückenmark, möglich wird, wenn die Ausbildung der BM pharmakologisch unterdrückt wird. Diesem Beweis struktureller Erholung muß nun der Nachweis funktioneller Erholung folgen. Führt die hier vorgestellte axonale Regeneration zu einer funktionellen Verbesserung im Tier, ist die Weiterentwicklung des hier beschriebenen therapeutischen Ansatzes zu einer klinischen Anwendung der nächste Schritt.

Abkürzungen

A	anterior
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
AG	Antigen
AK	Antikörper
1°/2°AK	primär/sekundär AK
Alexa 488	grün fluoreszierender Farbstoff
ASIA	American Spinal Injury Association
Asn	Asparagin
aq. bidest	zweifach destilliertes Wasser
BDA	biotinyliertes Dextranamin
BM	Basalmembran
BM-40	Synonym für SPARC
BPY	α, α' -Dipyridyl (2,2'-Dipyridyl)
BPY-DCA	5,5'-Dicarboxyl-2,2'-Dipyridyl
C ₁₋₈	zervikale Wirbel 1-8
ca.	zirka
Coll IV	Kollagen Typ IV
CSPGs	Chondroitinsulfat Proteoglykane
CST	Kortikospinaltrakt
CTGF	Bindegewebe-Wachstumsfaktor
Cy3	rot fluoreszierender Karbozyanin-Farbstoff
d	Tag(e)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
d.h.	das heißt
DIC	differentieller Interferenzkontrast
EZM	Extrazellulärmatrix
evtl.	eventuell
FACIT	fibrillen-assoziierte Kollagene mit unterbrochener Tripelhelixstruktur
Fe ²⁺	zweiwertiges Eisen-Kation
Gal-transferase	Hydroxylsyl-Galaktosyltransferase

GFAP	gliales fibrilläres saures Protein
Glc-transferase	Galaktosylhydroxylysyl-Glukosyltransferase
Gly	Glyzin
GM1	klinische Gangliosidstudie
gt	Ziege
hs	Pferd
HSPGs	Heparansulfat Proteoglykane
IC ₅₀	Inhibitorische Konzentration, bei der 50% der Aktivität eines Enzyms blockiert wird
IgG	Immunglobulin Typ G
i.p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
K _m	Michaelis-Konstante
L	lateral
L ₁₋₆	lumbale Wirbel 1-6
LN	Laminin
m	Monat(e)
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MeOH	Methanol
ms	Maus
n	Anzahl
NASCIS III	klinische Methylprednisolonstudie
NC	nicht-kollagenös
NHS	Normalserum aus Pferd
NGS	Normalserum aus Ziege
NOGO-A	Myelin-assoziiierter Wachstumsinhibitor
O ₂	molekularer Sauerstoff
o.g.	oben genannt
ON	über Nacht
OT	Objektträger
P	posterior
PFA	Paraformaldehyd
PB	Phosphat-Puffer
PBS	Phosphat-gepufferte Saline

pH	dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Ionen Konzentration
PH	Prolyl-4-Hydroxylase
pL	post Läsion
PNS	peripheres Nervensystem
Pro	Prolin
rb	Kaninchen
rER	rauhes endoplasmatische Retikulum
RT	Raumtemperatur
S ₁₋₄	sakrale Wirbel 1-4
SC	Schwanzzelle(n)
Ser	Serin
SPARC	sekretiertes Protein, sauer und cysteinreich
SPF	spezifiziert pathogenfrei
Syn.	Synonym
T ₁₋₁₃	thorakale Rückenmarkssegmente 1-13
Tab.	Tabelle
TGFβ	transformierender Wachstumsfaktor beta
Th ₁₋₁₃	thorakale Wirbel 1-13
Thr	Threonin
Tr.	Tractus
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U.S.A.	Vereinigte Staaten von Amerika
V	ventral
vs.	versus
-X-	nicht näher definierte Aminosäure
-Y-	nicht näher definierte Aminosäure
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
?	unbekannt

Einheiten

°C	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde(n)
km	Kilometer
m	Meter
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
μM	Mikromolar
mM	Millimolar
m/s	Meter pro Sekunde
ms	Millisekunde(n)
nm	Nanometer

1 Einleitung

1.1 Pathophysiologie von Rückenmarksverletzungen

Das Rückenmark repräsentiert das Hauptleitungssystem des Nervensystems höherer Säuger, also auch des Menschen. Alle nicht-vegetativen motorischen (absteigende Faserbahnen) und sensorischen (aufsteigende Faserbahnen) Signale zwischen Gehirn und Körper werden hier fortgeleitet. Man unterscheidet im Rückenmark, wie auch im Gehirn, graue und weiße Substanz (siehe auch Abb. 6). Die weiße Substanz enthält die langen auf- und absteigenden Faserbahnen, die die Kommunikation zwischen Gehirn und Peripherie herstellen. Die graue Substanz enthält Interneurone, die der propriospinalen Verschaltung dienen. Eine Verletzung des Rückenmarks unterbricht jegliche Kommunikation und hat dramatische Motorische- und Sensibilitätsstörungen, oftmals auch den Tod, zur Folge. Durch sorgfältige Intensivpflege und fortgeschrittene medizinische Behandlungsmethoden gelingt es heutzutage, Patientinnen und Patienten, je nach Höhenlokalisierung der Verletzung, über das akute Stadium hinaus zu rehabilitieren, jedoch unter permanentem Kontrollverlust über die unterhalb der Verletzung liegenden nicht-vegetativen Körperfunktionen.

Nach einer Rückenmarksverletzung ist das endgültige pathologische Bild erheblich schwerwiegender, als die Läsion in den ersten Stunden nach dem traumatischen Ereignis vermuten ließe. Daß sich die Schädigungen ausweiten liegt an biochemischen Vorgängen, die zu apoptotischem, nekrotischem und exzitotoxischem Zelltod im geschädigten Areal führen. In Ratten wurde gezeigt, daß Neurone und Gliazellen nach Rückenmarksverletzungen apoptotisch sterben, und daß sich diese Prozesse über Wochen hinziehen können (Liu et al. 1997, Beattie et al. 1998). Einige dieser apoptotischen Vorgänge sind eng mit der Waller'schen Degeneration distaler Fasertraktabschnitte verbunden. Apoptotische Oligodendrozyten werden z.B. in Regionen degenerierender weißer Substanz beobachtet (Crowe et al. 1997). Waller'sche Degeneration geht einher mit der Aktivierung residenter Mikroglia, die stets eng mit apoptotischen Oligodendrozyten assoziiert sind (Shuman et al. 1997). Es wird vermutet, daß diese Mikroglia, die selbst apoptotisch sterben, entweder auf das Sterben der Oligodendrozyten reagieren, oder dieses sogar durch die Sekretion

von Zytokinen und anderen Faktoren induzieren (Beattie und Bresnahan 2000). Nekrotischer Zelltod tritt zunächst in Zellen auf, die direkt von der Verletzung betroffen sind. Inflammatorische Zellen, die aus dem Blut in Rückenmarksverletzungen eingespült werden oder einwandern sezernieren ebenfalls die verschiedensten Zytokine und Faktoren, die nekrotischen Zelltod auslösen können. Diese führen auch zu langanhaltender Nekrose im geschädigten Gebiet. Durch den Untergang von Zellen und deren Membranen, werden exzitotoxische Neurotransmitter freigesetzt, die in diesen unphysiologisch hohen Konzentrationen ebenfalls zu Zelltod führen können. (Beattie und Bresnahan 2000).

1.2 Konsequenzen humaner Rückenmarksverletzungen

Rückenmarksverletzungen stellen mit einer Inzidenz von 80/Mio. Personen pro Jahr in den Industrienationen (ca. 6.000 akute Fälle in Deutschland pro Jahr, ca. 150.000 chronische Fälle) zwar nicht eine der häufigsten, aber eine der ernsthaftesten Schädigungen des Nervensystems dar. Sie rufen bei Menschen unter 50 Jahren mehr Todesfälle und Behinderungen hervor, als jede andere neurologische Erkrankung. Nach einem kompletten Querschnittstrauma (im Bereich zwischen C₄ bis Th₁₂) kommt es (i) zu einer sofortigen und bestehenbleibenden Lähmung aller Willkürbewegungen derjenigen Muskeln, die von unterhalb der Verletzung liegenden Rückenmarkssegmenten versorgt wurden, sind (ii) bewußte Empfindungen aus dem Versorgungsgebiet der abgetrennten Rückenmarkssegmente für immer unmöglich und (iii), abhängig von den therapeutischen Maßnahmen eventuell vorübergehend, alle Reflexe in den betroffenen Körperabschnitten nach einer initialen spastischen Phase zunächst erloschen. Neben der Skelettmuskulatur sind immer auch die Funktionen von Mastdarm und Blase sowie die Sexualfunktionen betroffen. Die American Spinal Injury Association (ASIA) schlägt die folgende Einteilung der Schweregrade spinaler Läsionen vor (Tab.1):

ASIA - Score	Läsion	funktionelles Erscheinungsbild
A	komplett	keine sensorische oder motorische Restfunktion in den sakralen Segmenten S ₄ -S ₅ ist erhalten
B	inkomplett	sensorische, aber keine motorische Restfunktion, die die sakralen Segmente S ₄ -S ₅ einschließt, unterhalb der Läsion ist erhalten
C	inkomplett	motorische Restfunktion unterhalb der Läsion ist erhalten und mehr als die Hälfte der Schlüsselmuskulatur unterhalb der Läsion weist einen Muskelgrad < 3 auf
D	inkomplett	motorische Restfunktion unterhalb der Läsion und wenigstens die Hälfte der Schlüsselmuskulatur unterhalb der Läsion weist einen Muskelgrad ≥ 3 auf
E	normal	normale sensorische und motorische Funktionen

Tab. 1: Schweregrade spinaler Läsionen nach ASIA-Einteilung (modifiziert nach Maynard et al., 1996)

Die Ursache für die oben genannten, verheerenden Schäden liegt in der Unfähigkeit zentralnervöser Nervenzellen zur Regeneration. Basierend auf dem erstmals 1914 von Ramón y Cajal formulierten Dogma, welches besagt, daß zentralnervöse Neurone nicht regenerieren können, glaubte man lange Zeit, daß auf Rückenmarksverletzungen basierende Funktionsausfälle unumkehrbar seien. Die fortschreitende Forschung auf diesem Gebiet zeigt jedoch, daß (i) auch adulte Nervenzellen eine intrinsische Kapazität zur Regeneration besitzen, die spontan, oder durch therapeutische Eingriffe stimuliert werden kann, und daß (ii) durch Modifikation des molekularen Milieus der Verletzungsstelle selbst eine Regeneration der verletzten Neurone ermöglicht werden kann. Bis zum heutigen Tage ist die moderne Medizin jedoch nicht in der Lage, Rückenmarksverletzungen beim Menschen zu heilen.

1.3 Klinische Therapiekonzepte zur Behandlung humaner Rückenmarksverletzungen zu Beginn des 21. Jahrhunderts

1.3.1 Lokomotorisches Training zur Wiederherstellung motorischer Funktionen

Edgerton et al. berichteten bereits 1991, daß Plastizität und motorisches Lernen im Rückenmark einerseits mit spezifischen, mit der motorischen Funktion assoziierten, sensorischen Reizen und zusätzlich mit der repetitiven Übung der jeweiligen motorischen Aufgabe zusammenhängt (Edgerton et al., 1991). In Patienten/innen mit thorakalen Läsionen der ASIA-Schweregrade B-D kann versucht werden, motorische Aktivität auf diese Weise wiederherzustellen. Diese Patienten/innen werden einem passiven Laufbandtraining mit Gewichtunterstützung unter den Achselhöhlen unterzogen. Sensorische Reize, die zur Restoration des Gehprozesses benötigt werden sind z.B.: Generierung einer Schrittgeschwindigkeit auf dem Laufband, die der normalen entspricht (0,75-1,25 m/s), maximales Gewicht auf das Standbein zu legen, eine aufrechte Körper- und Kopfhaltung, annähernd normale Hüft- Knie- und Fußknöchelhaltung beim Gehen, keine Gewichtunterstützung durch die Arme, die reziprok schwingen sollen, symmetrische Koordination beider Beine und sensorische Reizung durch die Fußsohlen (Patienten/innen sollen barfuß laufen, oder nur dünne Wildledersohlen tragen). Durch diese physikalische Therapie können verbliebene sensorische oder motorische Restfunktionen zum Teil verbessert werden (Behrman und Harkema, 2000).

1.3.2 Funktionelle Elektrostimulation

Hierbei werden 2 Elektroden im proximalen, bzw. distalen Drittel des Musculus Quadrizeps befestigt, eine Rundelektrode stimuliert den Nervus peronaeus. Für die Oberflächenstimulation werden spannungskonstante, biphasische Impulse von 0,25 ms Dauer und einer Stromstärke bis zu 150 mA verwandt. Zunächst wird durch diese Stimulation das Aufstehen trainiert und je nach Schwere und Lokalisation der Läsion anschließend das Gehen mit einer Hilfsapparatur (Rollator). Diese Therapie ist jedoch nicht erfolgreich bei komplett tetraplegischen Patienten/innen (ASIA-Einteilung A). Bei motorisch kompletten Patienten/innen mit thorakalen Läsionen

(ASIA-Einteilung A-D) kann so die Steh- und Gehfähigkeit bis zu Strecken zwischen 4 m und 2 km wiederhergestellt werden (Hesse et al., 1998).

1.3.3 Pharmakologische Therapie und Transplantation

Diese Behandlungsstrategie beinhaltet die Gabe von Steroiden (Methylprednisolon, klinische Studie, U.S.A.: NASCIS III) und Gangliosiden (GM1, klinische Studie U.S.A.: GM1 Gangliosid Studie I bei akuten Rückenmarksverletzungen) (Übersichtsartikel: (Bracken, 2000)), wobei erstere von Wissenschaftler/innen in Bezug auf funktionelle Erholung der Patienten/innen und das therapeutische Fenster (8 Stunden nach Trauma) stark kritisiert werden (Hurlbert, 2000, Coleman et al., 2000), letztere im Hinblick auf Placebo-Effekte bei wenig beeinträchtigten Personen und die angewandten statistischen Methoden (Geisler et al., 2000). Diese Behandlungsstrategien sind heute noch nicht als zufriedenstellend anzusehen. Ein weiterer Therapieansatz beinhaltet Gewebeersatz durch Transplantation embryonalen Gewebes (Klinische Pilotstudie, U.S.A., (Wirth et al., 2000). Abgesehen von den ethischen Problemen, die diese Behandlungsmethode mit sich bringt, ist eine funktionelle Erholung bisher nur in Personen mit minimalen traumatischen Verletzungen des Rückenmarks zu beobachten.

1.4 Axonale Regeneration im peripheren- und im Zentralnervensystem

Nach traumatischen Verletzungen die eine Axotomie zur Folge haben, kommt es im peripheren Nervensystem (PNS) zu anderen axonalen Reaktionen als im Zentralnervensystem (ZNS). Im PNS untergeht der vom Zellkörper abgetrennte Teil der Nervenfasern, der distale Stumpf, komplett Waller'scher Degeneration. Der mit dem Zellkörper verbundene Teil, der proximale Stumpf, sproßt aber wieder aus, die Nervenfasern sind in der Lage zu regenerieren, und ihr früheres Zielgebiet wieder zu innervieren (Lee und Wolfe, 2000). Im ZNS geht der distale Stumpf, wie im PNS, zugrunde. Der proximale Stumpf retrahiert zunächst, sproßt anschließend aber wieder aus. Hier kommt es aber nicht zur Regeneration der verletzten Axone, sondern vielmehr zum Wachstumsstopp der aussprossenden Fasern an der Läsionsstelle (Ramon y Cajal, 1928, Stichel und Muller, 1994) (Abb. 1).

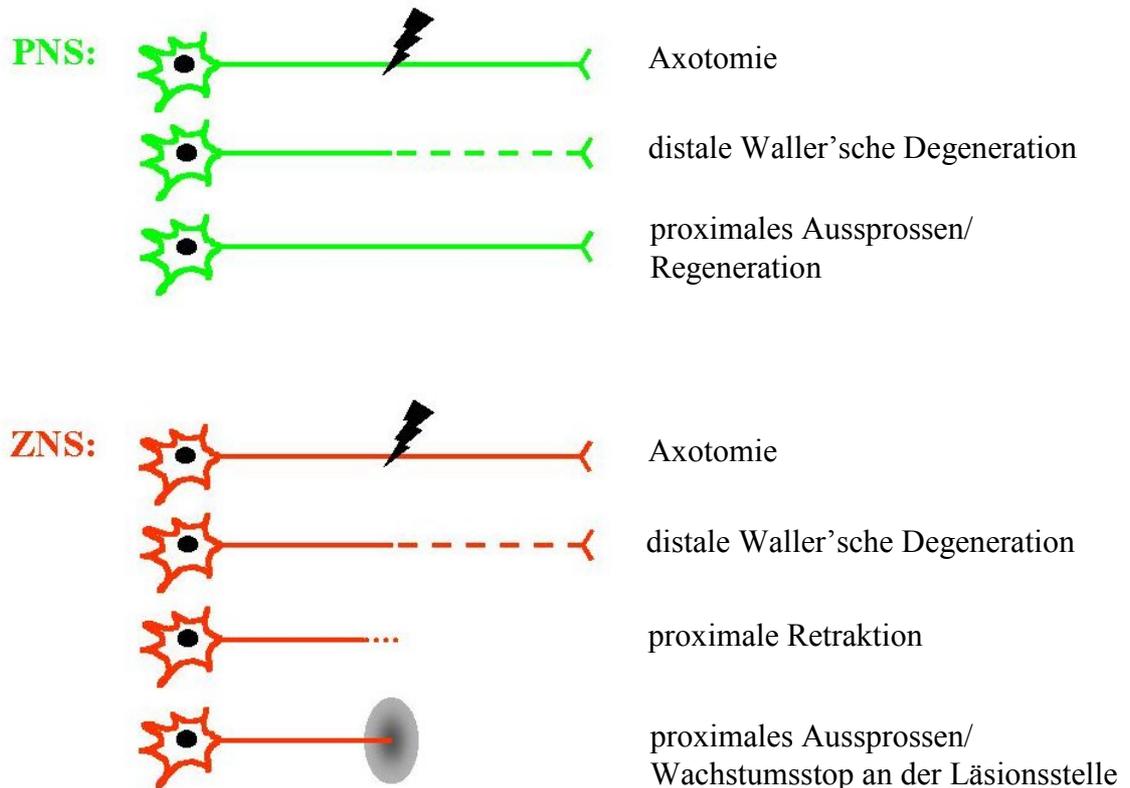


Abb. 1: Schematische Darstellung der axonalen Reaktionen nach Axotomie im PNS und im ZNS.

Zentralnervöse Neurone scheinen also die intrinsische Kapazität zur Regeneration zu besitzen. Bewiesen wurde diese Annahme durch die Experimente von Aguayo, der zeigen konnte, daß zentralnervöse Neurone aus dem zerebralen Kortex bzw. aus Basalganglien in ein Ischiasnervimplantat einwachsen können (Benfey und Aguayo, 1982). Offenbar stellt aber die Läsionsstelle ein für die auswachsenden Axone unüberwindbares Hindernis dar. Diskutiert werden in diesem Zusammenhang zwei Hypothesen.

Die erste betrachtet die Läsionsstelle als physikalische Barriere. Nach Läsionen des ZNS bildet sich um die Läsionsstelle eine Region reaktiver Astrozyten aus, die den Zytoskelettbestandteil gliales fibrilläres saures Protein (GFAP) besonders stark exprimieren. Diese Reaktion wird als Gliose bezeichnet und als Hindernis für regenerierende Axone betrachtet (Reier et al., 1983). In diesem Zusammenhang wird auch diskutiert, daß die Basalmembran (BM), die sich nach ZNS-Verletzungen ausbildet, ein mechanisches Hindernis für auswachsende Axone darstellen könnte (Feringa et al., 1985).

Die zweite Hypothese nimmt die Existenz einer molekularen Barriere im Läsionsgebiet an. Diese Barriere kann einerseits durch das Fehlen

wachstumsfördernder Moleküle an der Läsionsstelle, (Liesi, 1985, Houweling et al., 1998), andererseits aber auch durch die Präsenz myelinassoziierter Wachstumsinhibitoren wie z.B. NOGO-A (Bandtlow und Schwab, 2000), oder Myelin-assoziiertem Glykoprotein (MAG) (Shen et al., 1998) oder aber die verstärkte Expression wachstumsinhibierender Faktoren, wie z.B. Tenascin-R (Becker et al., 2000), Chondroitinsulfat Proteoglykanen (CSPGs) (Zuo et al., 1998), (Fitch und Silver, 1999, Fidler et al., 1999) oder Heparansulfat Proteoglykanen (HSPGs) (Fernaund-Espinosa et al., 1998) bedingt sein. Die genannten Proteoglykane sind wiederum an BM assoziiert (Aumailley und Gayraud, 1998).

1.5 Die Läsionsstelle als regenerationsinhibierende Barriere

1.5.1 Die Glianarbe

Nach traumatischen Läsionen des ZNS exprimieren residente Astrozyten verstärkt GFAP. Die Immunreaktivität für GFAP wird innerhalb einer Stunde nach der Verletzung in Astrozyten, die sich nahe der Läsionsstelle befinden, heraufreguliert (Hadley und Goshgarian, 1997) und kann sich rostro-caudal bis zu 1 cm von der Läsionsstelle erstrecken (Fawcett und Asher, 1999). Dieses morphologische Phänomen wird als reaktive Astroglieose oder Glianarbe bezeichnet. Einige Autoren erweitern den letzteren Begriff auf die gesamte Läsionsstelle und alle hier vorkommenden Zelltypen, wie z.B. hämatogene Zellen, Oligodendrozyten und ihre Vorläuferzellen, Mikroglia/Makrophagen, meningeale Zellen, Fibroblasten und multipotente Vorläuferzellen (Stichel und Müller, 1998, Fawcett und Asher, 1999). GFAP ist das am häufigsten vorkommende 8-9 nm dicke Intermediärfilament in reifen Astrozyten, dessen Vorkommen mit dem Alterungsprozess steigt. Es wurde erstmalig 1970 von Eng et al. in Gehirnen von Patienten/Patientinnen mit multipler Sklerose gefunden (Eng et al., 2000). Die funktionelle Bedeutung der Glianarbe ist heute noch nicht vollständig verstanden. Sie trägt vermutlich zur Wiederherstellung der Homöostase bei (Fitch und Silver, 1997) und schützt das die Läsion umgebende Gewebe vor sekundären Schädigungen (Fitch und Silver, 1999) doch es gibt auch Hinweise, daß die reaktive Astroglieose etwas mit der ausbleibenden Regeneration verletzter zentralnervöser Axone zu tun hat. Astrozyten produzieren

basalmembranassoziierte Proteine nach Verletzungen (Liesi et al., 1984, Bernstein et al., 1985). Liesi et al. zeigten, daß sich regenerierende zentralnervöse Systeme, wie z.B. der bulbus olfaktorius oder die optischen Nerven von Frosch und Goldfisch von nicht-regenerierenden dadurch unterscheiden, daß regenerierende Systeme Laminin-immunopositive Astrozyten aufweisen. Diese wachstumsunterstützenden, Laminin-exprimierenden Astrozyten unterscheiden sich nicht von anderen astrozytären Subpopulationen im Hinblick auf ihre GFAP-Expression (Liesi, 1985). Andererseits wurde gezeigt, daß Astrozyten, die aus GFAP-Nullmutanten gewonnen wurden, *in vitro* eine bessere Umgebung für neuronales Überleben und Neuritenwachstum bieten als Wildtyp-Astrozyten (Menet et al., 2000). Das mag daran liegen, daß eventuell nur einige Subtypen Proteine der Extrazellulärmatrix (EZM) exprimieren, die unter besonderen Umständen inhibitorisch für axonale Regeneration sein können (Reier et al., 1983, Fawcett und Asher, 1999, Fitch und Silver, 1999). Eine wichtige Gruppe dieser EZM-Proteine sind CSPGs, die z.B. die wachstumsfördernden Eigenschaften des Laminins negativ beeinflussen können (Zuo et al., 1998). In dreidimensionalen Astrozytenkulturen konnten Smith-Thomas et al. zeigen, daß axonales Wachstum verbessert werden konnte, wenn dem Kulturmedium Inhibitoren der Proteoglykansynthese zugesetzt wurden (Smith-Thomas et al., 1995). NG2 und Neurocan, CSPGs die von Oligodendrozyten-Vorläufern und wachstumshemmenden Astrozyten exprimiert werden, stehen unter Verdacht, die hauptsächlich, inhibitorischen Proteoglykane zu sein (Fidler et al., 1999, Fawcett und Asher, 1999). Auch die Einwanderung meningealer Zellen nach Läsionen des ZNS verändert möglicherweise die wachstumsfördernden Eigenschaften von Astrozyten. Der Kontakt zwischen beiden Zelltypen führt zur Ausbildung astrozytärer Ausläufer, die die neue Glia limitans bilden sollen und zu erhöhter Expression von Tenascin-C und CSPGs (Ness und David, 1997). Die Rolle der Glianarbe und der reaktiven Astrozyten im Hinblick auf axonale Regeneration wird bis heute also konträr diskutiert. Es ist sehr wahrscheinlich, daß es unterschiedliche Subtypen von Astrozyten gibt, die unterschiedliche Axonwachstums-beeinflussende Eigenschaften aufweisen.

1.5.2 Die läsionsinduzierte Basalmembran

Bereits Anfang der 70er Jahre des vergangenen Jahrhunderts beobachteten russische Forscher, daß sich nach einer mechanischen Verletzung des Rückenmarks der Ratte eine BM, im Sinne einer Wundheilungsnarbe, an der Läsionsstelle ausbildet (Matinian und Andreasian, 1973). Sie versuchten, diese Narbe durch Behandlung mit proteolytischen Enzymen zu entfernen und berichteten von anschließender erheblicher funktioneller Erholung der behandelten Tiere. Anstrengungen westlicher Wissenschaftler und Wissenschaftlerinnen diese Ergebnisse zu reproduzieren blieben jedoch erfolglos, nicht zuletzt, da die Enzymbehandlung auch die BM von Blutgefäßen zerstörte, und Blutungen im Läsionsgebiet nach sich zog (Kowalski et al., 1979, Feringa et al., 1979).

Danach geriet die BM als möglicherweise regenerationsinhibierende Struktur des traumatisch lädierten ZNS zunächst in Vergessenheit.

Ende der 90er Jahre fand Christine Stichel, aus dem Labor für Molekulare Neurobiologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Professor Müller, daß sich im ZNS-Läsionsmodell des mechanisch transsektierten postkommissuralen Fornix, die Kollagen Typ IV- (Coll IV-) immunpositive Wundheilungsnarbe nach Implantation axonwachstumsfördernder Schwann'scher Zellen veränderte. In unbehandelten Tieren erschien die Narbe morphologisch als durchgehende Struktur, die sich an der Stelle der Transsektion an Tag 4 nach der Läsion auszubilden begann und 7 Tage nach Läsion voll ausgebildet war. Nach der Implantation von Schwannzellensuspensionen in die Läsionsstelle jedoch, war die BM an den Stellen unterbrochen, an denen Axone die Läsionsstelle überquerten.

Da die vorangegangenen Studien gezeigt hatten, daß Enzymbehandlungen kein Mittel zur Reduktion der Narbe sein können, unterdrückte die Kollegin die Ausbildung der BM durch die sofortige Injektion neutralisierender anti-Coll IV Antikörper, bzw. durch Gabe eines die Kollagenbiosynthese hemmenden Eisenchelators. Diese Behandlung hatte zur Folge, daß die transsektierten Axone des postkommissuralen Fornix, nach der initialen Phase des Aussprossens, in der Lage waren die Läsionsstelle zu überwinden. Die Fasern wuchsen bis zu ihrem alten Zielgebiet, dem Mammillarkörper, wo sie chemische Synapsen ausbildeten. Die regenerierten Axone waren leitfähig und wurden von den myelinbildenden Gliazellen des ZNS, den Oligodendrozyten, remyelinisiert (Stichel et al., 1999a).

Kollagen ist jedoch bekannt als gutes Substrat für auswachsende Axone (Chamberlain et al., 1998, Salgado-Ceballos et al., 1998). Dennoch spricht dieser Befund nicht zwangsläufig gegen die Beobachtung, daß axonale Regeneration des ZNS möglich wird, wenn die Ausbildung der Wundheilungsnarbe unterdrückt wird. An die läsionsinduzierte BM sind verschiedenste Proteine assoziiert. So konnten z.B. CSPGs bzw. HSPGs immunhistochemisch in der Narbe nachgewiesen werden (Stichel et al., 1999b), die, wie bereits unter 1.3. beschrieben, von verschiedenen Arbeitsgruppen als inhibitorisch für axonale Regeneration diskutiert werden. Die läsionsinduzierte BM stellt also möglicherweise eine Matrix für andere, axonale Regeneration inhibierende, Proteine dar.

1.6 Aufbau der Basalmembran

Das Grundgerüst von BM ist ein Coll IV-Netzwerk. Dabei handelt es sich um ein großes, unlösliches Polymer, das ein stabiles Gerüst für die BM bildet und es Zellen ermöglicht sich an dieser, über Interaktionen mit Integrinen, anzuheften. *In vivo* koexistiert das Coll IV-Netzwerk mit einem weiteren, morphologisch vom Kollagen unterschiedlichen, Netzwerk aus Laminin (LN). Die zwei Netzwerke sind durch Nidogen/Entactin quervernetzt und binden verschiedene, weitere Komponenten. An Basalmembranen sind z.B. die HSPGs Perlecan und Agrin, sowie weitere, größtenteils nicht näher charakterisierte HSPGs und CSPGs assoziiert (Abb. 2) (Yurchenco und Schittny, 1990, Aumailley und Gayraud, 1998 Stichel et al., 1999b).

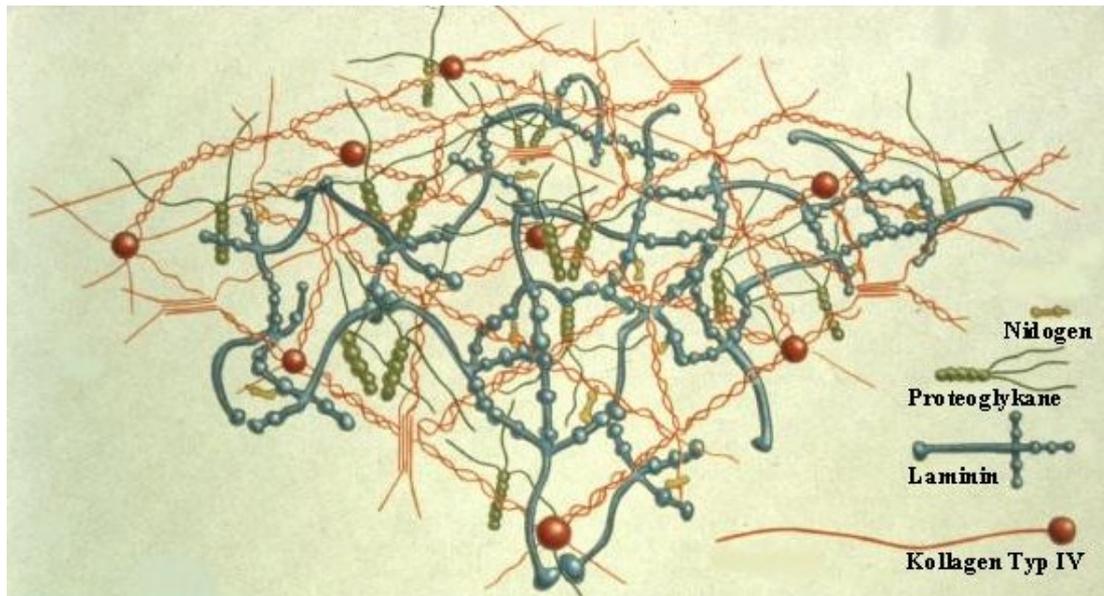


Abb. 2: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Basalmembran (modifiziert nach Yurchenco & Schittny 1990).

Darüber hinaus können die EZM-Proteine Fibulin und SPARC (Syn.: Osteonectin, BM-40) an die BM binden (Yurchenco und O'Rear, 1994). Über die Funktion des Fibulins ist bisher wenig bekannt, SPARC moduliert zelluläre Interaktionen mit der EZM, im Besonderen bei der Erneuerung oder Reorganisation von Geweben, also auch bei der Wundheilung (Brekken und Sage, 2000).

1.6.1 Kollagene

Bei den Kollagenen handelt es sich um eine Familie strukturell verwandter EZM-Proteine, die supramolekulare Strukturen bilden, welche die Stabilität und die Elastizität der verschiedensten Gewebe unterstützen. Darüber hinaus spielen die Kollagene eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung und der Wundheilung. Bis heute wurden 19 verschiedene Kollagene identifiziert. Charakteristika, die alle Kollagene gemeinsam haben sind:

1. daß sie ausschließlich in der EZM vorkommen,
2. daß sie aus 3 Polypeptidketten bestehen, die sich zu einer Tripelhelix zusammenlagern,
3. daß ihre individuellen Untereinheiten, die α -Ketten, Glyzin- (Gly) und Prolin- (Pro) reich sind, wobei bestimmte Prolinreste vornehmlich am 4. C-Atom hydroxyliert sind und

4. wiederkehrende -Gly-X-Y- Motive (Brown und Timpl, 1995, Kagan, 2000).

Man unterscheidet die fibrillenformenden Kollagene, zu denen Kollagen Typ I, II, III und V gehören und die nicht-fibrillären Kollagene, die unterschiedliche Strukturen bilden. Hierunter fallen mikrofibrilläre Netzwerke (Kollagen Typ VI), kurze Filamente (Kollagen Typ VII), sogenannte fibrillen-assoziierte Kollagene mit unterbrochener Tripelhelixstruktur (FACIT; Kollagen Typ IX, XII, XIV, XVI, XIX), die Multiplexine (multiple Tripelhelix-Domäne mit Unterbrechungen; Kollagen Typ XV und XVIII) oder tuchartige Netzwerke (Kollagen Typ IV, VIII und X) (Brown und Timpl, 1995, Aumailley und Gayraud, 1998). Kollagen Typ XVIII ist gleichzeitig ein in BM vorkommendes Heparansulfatproteoglykan (Halfter et al., 1998). Auch Coll IV ist ein nur in BM vorkommendes Kollagen.

1.6.2 Aufbau und Biosynthese des Typ IV Kollagens

Sechs verschiedene Gene sind bisher als zur Coll IV-Familie gehörend identifiziert worden. Diese codieren für die sechs verschiedenen Untereinheiten $\alpha 1-6$, die sich im Genom zu 3 verschiedenen Zusammenstellungen (COL4A1/COL4A2; COL4A3/COL4A4; COL4A5/COL4A6) gruppieren und beim Menschen auf den Chromosomen 13, 2 und X lokalisiert sind. Die genaue Zusammensetzung der Untereinheiten, ist bisher nur für die aus $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Ketten bestehenden Coll IV Moleküle bekannt. Diese bilden Heterotrimere, bestehend aus zwei $\alpha 1$ - und einer $\alpha 2$ -Untereinheit ($[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$) (Aumailley und Gayraud, 1998, Sado et al., 1998). Coll IV besteht aus einer C-terminalen nicht-kollagenösen (NC) Domäne, NC1 und einer ca. 400 nm langen tripelhelikalen Domäne, die einige kleine Unterbrechungen aufweist, was die Struktur besonders flexibel macht (Aumailley und Gayraud, 1998).

Neu synthetisierte Coll IV α -Ketten werden ins rauhe, endoplasmatische Retikulum (rER) transportiert. Die tripelhelikalen Segmente des Coll IV sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht gefaltet und Protease-labil (Brown und Timpl, 1995). Man unterscheidet intra- und extrazelluläre Modifikationen des Kollagens. Alle intrazellulären Modifikationen finden im rER statt (Kivirikko und Myllyla, 1985) (Tab.2):

1.6.2.1 Intrazelluläre, post-translationale Modifikationen

Modifikation	zur/zum	Enzym
Entfernung des Signalpeptids	Transportstopp	?
4-Hydroxylierung von Prolin	Tripelhelixformation	Prolyl-4-Hydroxylase
3-Hydroxylierung von Prolin	?	Prolyl-3-Hydroxylase
Hydroxylierung von Lysin	Glykosylierung von Hydroxylysin; Stabilisierung von Quervernetzungen	Lysyl-Hydroxylase
Glykosylierung von Hydroxylysin	?	Gal-Transferase; Glc-Transferase
Glykosylierung von Asparaginresten der Propeptide	?	?
Zusammenlagerung der pro- α - Ketten; Disulfidbrückenbindung	Tripelhelixformation	Protein- Disulfidisomerase
Tripelhelixformation	Formation des funktionellen Proteins	-

Tab.2: Intrazelluläre, post-translationale Modifikationen während der Kollagenbiosynthese (modifiziert nach Kivirikko und Myllylä, 1985)

Die Hydroxylierung von Prolyl- und Lysylresten werden von 3 verschiedenen Enzymen, der Prolyl-4-Hydroxylase, der Prolyl-3-Hydroxylase und der Lysyl-Hydroxylase, katalysiert (Tab.2). Ein -X-Pro-Gly-Triplett stellt die Minimalsequenz dar, die zur Interaktion mit einer Vertebraten-Prolyl-4-Hydroxylase vorliegen muß. Alle 3 Hydroxylierungsreaktionen sind notwendig zur Tripelhelixformation des Prokollagens. Die o.g. Enzyme benötigen alle Fe^{2+} , 2-Oxoglutarat, O_2 und Ascorbat als Koenzyme.

Die Glykosylierung der Hydroxylysinreste wird von 2 spezifischen Enzymen katalysiert, der Gal-Transferase und der Glc-Transferase. Die Ertere überträgt Galaktose auf einige Hydroxylysinreste, die Letztere Glukose auf die Galaktosylhydroxylysinreste. Beide Enzyme benötigen ein zweiwertiges Kation als Kofaktor, bevorzugt Mangan.

Prokollagen-Propeptide besitzen an Asparagin gebundene Karbohydrateinheiten, die aus verschiedenen Glykoproteinen bestehen und an –Asn-X-Ser/Thr- Sequenzen gebunden werden. Die Propeptide des Prokollagens besitzen Disulfidbrücken

innerhalb der pro- α -Ketten und zwischen denselben. Wahrscheinlich werden beide Reaktionen von der Protein-Disulfidisomerase katalysiert, zum Zweck der kovalenten Stabilisierung der Strukturen. Darüber hinaus beschleunigt die Disulfidbrückenbindung zwischen den pro- α -Ketten die Tripelhelixformation. Diese kann jedoch nur stattfinden, wenn nahezu alle Prolylreste der pro- α -Ketten hydroxyliert wurden (Kivirikko und Myllyla, 1985).

1.6.2.2 Extrazelluläre, post-translationale Modifikationen

Bei allen Kollagenen außer beim Coll IV werden die Propeptide zunächst durch Prokollagen-Proteinasen abgespalten. Bei diesen Enzymen handelt es sich um Endopeptidasen, die bei neutralem pH arbeiten und zweiwertige Kationen, vorzugsweise Ca^{2+} , als Kofaktor benötigen. Coll IV wird *in vitro* nicht von diesen Endopeptidasen gespalten.

Die Aggregation zu (im Fall des Coll IVs) einem Netzwerk erfolgt nicht durch enzymatische Katalyse sondern spontan (Kivirikko und Myllyla, 1985). Nach der Dimerisation über die C-terminale, globuläre Domäne NC1, formen sich Tetramere, die sich parallel und antiparallel entlang eines N-terminalen tripelhelikalen Segmentes ausrichten. Die Dimere sind durch Disulfidbrücken, und die Tetramere durch aus Lyslyresten hervorgegangen Aldehyden, kovalent verknüpft (Aumailley und Gayraud, 1998).

1.6.3 Inhibition der Kollagenbiosynthese durch Hemmung der Prolyl-4-Hydroxylase

Die Prolyl-4-Hydroxylase (PH) gehört zu einer Familie Fe^{2+} -abhängiger Dioxygenasen, welche die oxidative Decarboxylierung von 2-Oxoglutarat mit der Hydroxylierung des Substrates, im Fall der PH also Prolylreste innerhalb einer -X-Pro-Gly-Sequenz, koppeln. Die Dioxygenasen benutzen O_2 als weiteres Substrat und benötigen Ascorbat als Kofaktor (Franklin et al., 1991). Alle bisher untersuchten Vertebraten PHs bilden $\alpha_2\beta_2$ Heterotetramere, wobei die β -Untereinheit identisch mit der Protein-Disulfidisomerase ist (Pihlajaniemi et al., 1987). Es existieren 2 Isoformen der PH, die sich im Aufbau der α -Untereinheiten unterscheiden und als Typ I und -II PH bezeichnet werden (Annunen et al., 1998). Aufgrund der

katalytischen Mechanismen der PH gibt es verschiedene Möglichkeiten, diese zu inhibieren:

1. Konkurrenz mit dem primären Substrat der PH, Prokollagen. Da Prokollagen eine sehr niedrige K_m aufweist (0,2 μM), ist diese Art der PH-Inhibition nicht empfehlenswert.
2. Konkurrenz mit Ascorbat. Da es sich bei Ascorbat um ein weitverbreitetes Substrat handelt, ist die Möglichkeit unspezifischer Nebenwirkungen schwer abzuschätzen.
3. Chelation des Kofaktors Fe^{2+} . Auch hier besteht die Möglichkeit, daß ungewollte Nebeneffekte auftreten, was aber vernachlässigt werden kann, wenn man den/die Chelatoren lokal appliziert.
4. Konkurrenz mit 2-Oxoglutarat. N-Oxalglycinderivate können die PH *in vitro* sehr effektiv hemmen, verlieren *in vivo* aber, aus nicht bekannten Gründen, große Teile der hemmenden Aktivität (Franklin et al., 1991).

Inhibition der PH resultiert in einer verminderten thermalen Stabilität der Prokollagen-Tripelhelizes. Dadurch sind diese bereits bei Körpertemperatur instabil, was zu inkorrektur Faltung der Prokollagen-Ketten führt, und somit zu deren proteolytischer Degradation (Kagan, 2000). Von Ikeda et al. wurde gezeigt, daß nach Inhibition der PH durch den Eisenchelator α, α' -Dipyridyl (BPY) in Konzentrationen $>1 \text{ mM}$ auch die Stabilität der Prokollagen mRNA reduziert wird (Ikeda et al., 1992).

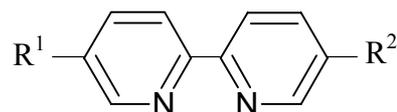


Abb. 3: Chemische Strukturformel des 2,2'-Dipyridyl (R^1 und $R^2 = \text{H}$, BPY), bzw. des 5,5'-Dicarboxy-2,2'-Dipyridyl (R^1 und $R^2 = \text{COOH}$, BPY-DCA).

Im Modell der Fornixläsion reichten einmalige Injektionen von 10mM BPY aus, um die läsionsinduzierte BM für einen Zeitraum von 14 Tagen zu unterdrücken (Stichel et al., 1999a).

1.6.4 Fibroblasten und leptomeningeale Zellen

Bei Wundheilungsprozessen spielen Fibroblasten eine große Rolle. Migrierende Fibroblasten sezernieren verschiedenste EZM-Proteine, wie z.B. Fibronectin, Tenascin, Laminin, Nidogen, HSPGs und CSPGs (Halfter et al., 1990). Darüber hinaus exprimieren Fibroblasten nach Verletzungen große Mengen Coll IV und die Kollagene Typ III, V und VI (Eckes et al., 2000). Es ist bekannt, daß Fibroblasten und leptomeningeale Zellen nach ZNS Traumata mit einer Verletzung der Meningen in das Läsionsgebiet einwandern und dort BM-Proteine sezernieren (Carbonell et al., 1988). Die Anwesenheit von Fibroblasten selbst hat vermutlich keine negativen Auswirkungen auf das Auswachsen von Axonen, da gezeigt wurde, daß regenerierende kortikospinale Axone entlang der Hirnhäute, die zum großen Teil aus Fibroblasten bestehen, wachsen (Ramon-Cueto et al., 2000). *In vitro* benötigen Schwannzellen (SC), die myelinisierenden Zellen des PNS, die auch für das regenerative Potential des PNS mitverantwortlich gemacht werden, Kontakt zu EZM-Komponenten, wie auch von Fibroblasten sezernierte Faktoren um zu myelinisierenden Zellen auszudifferenzieren (Bunge, 1983). Da aber verschiedene inhibitorische Proteine an Kollagen-Matrizes assoziiert sein können, ist es dennoch möglich, daß die läsionsinduzierte Wundheilungsnarbe im ZNS ein Hindernis für auswachsende Axone darstellen kann (siehe 1.4). Darüber hinaus wurde gezeigt, daß Fibroblasten, die in traumatische ZNS-Läsionen einwandern Sema III A exprimieren, ein chemorepulsives Protein, das zum kollabieren von Wachstumskegeln verschiedener neuronaler Populationen führt. ZNS-Läsionen in neugeborenen Tieren, bei denen axonale Regeneration möglich ist, unterscheiden sich von denen in adulten Tieren, durch die Abwesenheit Sema III A exprimierender Fibroblasten (Pasterkamp et al., 1998). Und Sema III A ist nicht das einzige chemorepulsive Molekül, daß in Fibroblasten nach ZNS-Läsionen exprimiert wird. Die Eph-Tyrosinkinase Familie und ihre Liganden, die Ephrine, sind ebenfalls Kandidaten, die axonale Regeneration negativ beeinflussen können. Während der Entwicklung werden kontaktvermittelt inhibitorische Signale zwischen Eph-Rezeptor und Ephrin exprimierenden Zellen ausgetauscht, die die axonale Wegfindung beeinflussen. Sechs bis acht Tage nach Rückenmarksläsionen in der Ratte finden sich EphB2 exprimierende Zellen in der Läsionsstelle, bei denen es sich aufgrund ihrer Morphologie vermutlich um Fibroblasten handelt (Bundesen et al., 2000). Auch wenn die dahinterstehenden

funktionellen Mechanismen noch ungeklärt sind, so korreliert dieser Zeitpunkt doch mit dem Auftauchen der ersten tuchartigen BM-Strukturen in der Läsionsstelle. Die Rolle der Fibroblasten in traumatischen Läsionen des ZNS bietet also nach wie vor ein weites Feld für wissenschaftliche Untersuchungen.

1.6.4.1 Regulation der zytokininduzierten Kollagensynthese

Die Proliferation und die EZM-Produktion von Fibroblasten wird von den verschiedensten Einflüssen gesteuert. Nach Traumata und inflammatorischen Prozessen kommt es zu einer zytokininduzierten Kollagensynthese und Proliferationssteigerung in Fibroblasten. Der transformierende Wachstumsfaktor beta (Transforming growth factor β , TGF β) gilt als primärer regulatorischer Faktor bei der Bildung von Bindegewebe in Wundheilungsprozessen. Er bewirkt z.B. (i) eine Proliferationssteigerung in Fibroblasten, (ii) eine vermehrte EZM Produktion und (iii) eine verminderte EZM Degradation, durch direkte Inhibition von Protease-Aktivitäten und Stimulation der Synthese von Protease-Inhibitoren (Grotendorst, 1997, Logan et al., 1999). Ein Protein, das durch TGF β beeinflusst wird ist der Bindegewebe-Wachstumsfaktor (Connective Tissue Growth Factor, CTGF). CTGF wirkt mitogen und chemotaktisch auf Fibroblasten (Bradham et al., 1991) und stimuliert deren Kollagen- und Fibronectin- Synthese (Frazier et al., 1996). Eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels in Fibroblasten resultiert in einer Inhibition der TGF β -stimulierten Proliferation, welche in der späten G1-Phase erfolgt (Kothapalli et al., 1998) und in einer Inhibition der TGF β -medierten Kollagensynthese (Duncan et al., 1999). Die Mechanismen, die diesen Effekten zugrunde liegen sind bisher ungeklärt.

1.7 Tiermodelle zur strukturellen und funktionellen Wiederherstellung des verletzten Rückenmarks

1.7.1 Motorische Kontrolle im Rückenmark der Ratte

Verschiedene im Rückenmark verlaufende Trakte dienen der motorischen Kontrolle. Man unterscheidet pyramidale und extrapyramidale Motorik. Der Kortikospinaltrakt

(CST) stellt die anatomische Grundlage des pyramidalen motorischen Systems dar, die subkortikalen Basalganglien das Kernstück der extrapyramidalen Motorik. Der CST projiziert vom Neuronen der Schicht V des Motorkortex (und bei der Ratte zu einem geringen Anteil vom sensorischen Kortex) ins Rückenmark. Die Zielzellen des CST sind α -Motoneurone in den Ventralhörnern, von wo aus die Informationen in die Peripherie weitergeleitet werden. Teile des CST kreuzen die Mittellinie auf Höhe der Medulla oblongata an der Pyramidenbahnkreuzung (Dekussatio pyramidum). Die Anatomie des Rückenmarks der Ratte unterscheidet sich von der, der meisten anderen Vertebraten durch die Lage des CST. In den meisten höheren Säugetieren verläuft der CST in den lateralen Kolumnen, bei der Ratte liegt der hauptsächliche Anteil des kreuzenden CST zwischen den Dorsalhörnern. Wenige Fasern des CST ziehen durch die lateralen Kolumnen. Zusätzlich besitzt die Ratte, wie auch der Mensch, einen ungekreuzten, ventralen Teil des CST (Abb. 4-A).

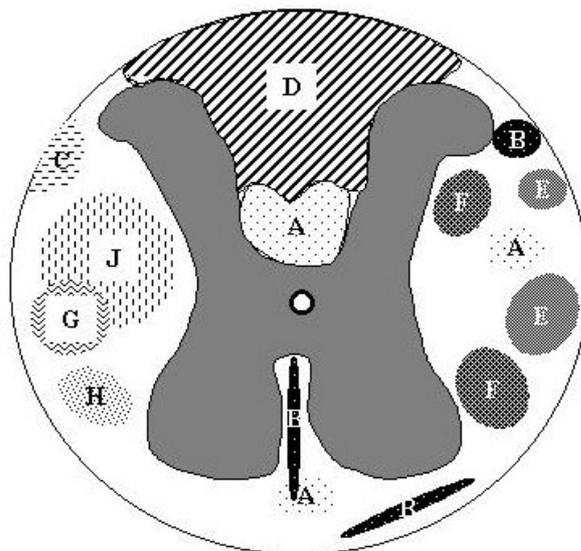


Abb. 4: Anatomische Verteilung auf- und absteigender Faserbahnen im Rückenmark der adulten Ratte (Querschnitt; alle Faserbahnen in den lateralen Kolumnen sind bilateral angelegt).

- | | |
|----------|---|
| A | Tractus (Tr.) Kortikospinalis (absteigend) |
| B | Tr. Spinothalamikus (aufsteigend) |
| C | Tr. Rubrospinalis (absteigend) |
| D | Dorsalsäulen (Funikulus gracilis + kuneatus; aufsteigend) |
| E | Serotonerge Projektionen des Hirnstamms (absteigend) |
| F | Tr. Spinotektalis (aufsteigend) |
| G | Tr. Spinoretikularis (aufsteigend) |
| H | Projektionen zur zentralen grauen Substanz (aufsteigend) |
| J | Tr. Spinozerebellaris (aufsteigend) |

Einen Trakt des extrapyramidalen, motorischen Systems, der parallel zum kortikospinalen System verläuft, stellt der Tr. Rubrospinalis dar. Der Tr. Kortikorubralis projiziert zum Nukleus ruber, der im mesenzephalen Abschnitt des Tegmentums gelegen ist. Dort beginnt der Tr. rubrospinalis in der Pars magnozellularis, und verläuft im dorsolateralen Bereich des Rückenmarks (Abb. 4-C). Dort wird er in der Substantia intermedia der grauen Substanz auf Interneurone umgeschaltet, die dann die α -Motoneurone innervieren (Zilles und Rehkämper, 1993), d.h. der Tr. Rubrospinalis projiziert zu denselben Zielzellen wie der CST.

1.7.2 Läsionsmodelle

Die Ansprüche, die an Tiermodelle von Rückenmarksläsionen gestellt werden sind vielfältig. Sie müssen zuverlässig, gleichmäßig und in verschiedenen Laboratorien reproduzierbar sein. Sie sollten Aspekte humaner Rückenmarksläsionen widerspiegeln und die Einschätzung struktureller Eigenschaften der Gewebeerstörung und funktioneller Erholung nach Verletzung ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Läsionsmodelle entwickelt.

Beim **Kontusionsmodell** handelt es sich um eine traumatische Läsion des Rückenmarks, hervorgerufen durch ein standardisiertes Gewicht, das aus einer definierten Höhe auf das Rückenmark des Tieres herabfällt. Durch Variation von Höhe und Gewicht können so verschiedene Schweregrade der Verletzungen erzielt werden (Basso et al., 1996).

Die traumatische **Kompressionsläsion** wird durch einen Ballon hervorgerufen, der in den Subduralraum der Tiere geschoben und mit einem definierten Flüssigkeitsvolumen gefüllt wird. Dadurch wird Druck auf das Rückenmark ausgeübt, was, je nach Volumen, zu unterschiedlich schweren Verletzungen des spinalen Gewebes führt (Theriault et al., 1997, Brook et al., 1998).

Diese Läsionsmodelle spiegeln sehr realistisch Aspekte humaner Rückenmarksläsionen wider. Ein Nachteil dieser Läsionen ist jedoch, daß selbst nach schweren Verletzungen Gewebebrücken verbleiben, in denen auch Axone verlaufen. So ist es nicht möglich axonale Regeneration verlässlich zu überprüfen, da es immer möglich ist, daß Axone von der Läsion verschont bleiben. Gerade im thorakalen Rückenmark ist verbleibendes Gewebe stark mit lokomotorischer Funktion korreliert (Beattie und Bresnahan, 2000).

Um funktionelle Erholung und axonale Regeneration bestimmten Fasertrakten zuordnen zu können bedient man sich verschiedener Transsektionsmodelle, die es ermöglichen lokale, reproduzierbare Verletzungen zu produzieren, die spezifische, spinale Trakte durchtrennen.

In Studien, die Effekte einer geringen Zahl regenerierender Fasern zeigen wollen, bietet sich die Möglichkeit der **kompletten Transsektion** des Rückenmarks (Xu et al., 1997, Cheng et al., 1996, Ramon-Cueto et al., 2000). Hierbei wird die Dura eröffnet und das Rückenmark, in der Regel mit einer feinen Schere, komplett durchtrennt. Bei dieser Methode kann man sehr sicher sein, nach therapeutischen Interventionen nur regenerierende Fasern zu erfassen und diese evtl. funktioneller Erholung zuordnen zu können.

Für Studien, die sich mit der Regeneration spezieller Trakte befassen (wie z.B. dem dorsalen CST der Ratte) bieten sich **partielle Transsektionen** an. Hier unterscheidet man im wesentlichen die **dorsale Hemisektion** bei der die obere Hälfte des Rückenmarks mit einer feinen Schere durchtrennt wird (Schnell und Schwab, 1990, Grill et al., 1997) und die **Drahtmesser-Transsektion** mit welcher mechanische Durchtrennungen noch spezifischer durchgeführt werden können (Hermanns et al., 2000b).

Der CST der Ratte ist für die sogenannten „geschickten“ Bewegungen der Tiere zuständig. Er gilt als besonders schwer und langsam regenerierender Trakt (Brosamle et al. 2000). Wegen seiner günstigen anatomischen Lokalisation ist er leicht durch dorsale Hemisektionen oder Drahtmessertranssektionen zu durchtrennen. Diese partiellen Transsektionsmodelle produzieren auf thorakaler Höhe nur schwache motorische Defizite, können aber zur Evaluation funktioneller Erholung herangezogen werden, wenn besonders feine motorische Verhaltenstest durchgeführt werden (Metz et al. 2000a) oder sie auf zervikaler Höhe durchgeführt werden (Metz et al. 2000b). Grundsätzlich dienen diese Modelle zur Beurteilung struktureller Erholung des geschädigten Gewebes.

1.7.3 Therapiestrategien im Tiermodell

Eine Reihe internationaler Arbeitsgruppen befassen sich unter dem Gesichtspunkt der Neuroprotektion mit der Gabe trophischer Faktoren, die das Überleben verbleibender Neurone verbessern sollen (Hammond et al., 1999, Kermer et al.,

2000, Novikova et al., 2000). Diese Ansätze lösen aber nicht das Problem axonaler Regeneration in Verletzungen, bei denen Fasertrakte zerstört wurden. Daher wird in anderen Modellen eine Modifikation läSIONSINDUZIERTER, regenerations-inhibierender Strukturen oder Moleküle am Läsionsort angestrebt. Letztere scheinen für das Fehlen regenerativer Prozesse im Zentralnervensystem verantwortlich zu sein und führen zum Abbruch des axonalen Wachstums an der Läsionsstelle. Bisherige Ansätze zur Verbesserung axonaler Regeneration beinhalten:

1. Die **Implantation wachstumsfördernder Zellen**, (Rapalino et al., 1998, McDonald et al., 1999, Ramon-Cueto et al., 2000) die zum Teil in wachstumsfördernde Leitschienen eingebracht sind (Xu et al., 1999), oder genetisch modifiziert wurden um neurotrophe Faktoren zu produzieren (Weidner et al., 1999, Liu et al., 1999). Zu diesen Zellen zählen Gliazellen aus regenerierenden Systemen, im Besonderen Schwannzellen, die myelinisierenden Zellen des PNS, und olfaktorische Gliazellen, die die Myelinschicht der Neurone des Bulbus olfactorius bilden. Diese Zellen tragen ins ZNS implantiert zu axonaler Regeneration bei, jedoch konnten bisher immer nur wenige regenerierende Fasern detektiert werden. Diese Therapiestrategie war bisher nur nach sofortiger Behandlung nach Trauma erfolgreich und führte in subakuten oder chronischen Verletzungsstadien nicht zum gewünschten Erfolg (Stichel et al. 1996, Stichel et al. 1999d, Ramon-Cueto et al. 2000)
2. **Röntgenbestrahlung** (Kalderon und Fuks, 1996, Ridet et al., 2000). Durch Röntgenbestrahlung sollen proliferierende Zellen abgetötet werden, um sekundäre Zellschädigungen zu verhindern. Dadurch kommt es auch zum Tod proliferierender Oligodendrozyten und so zu einer Demyelinisierung von Fasertrakten.
3. **Transplantation** peripherer Nerven (Benfey und Aguayo, 1982, Cheng et al., 1996). Nachdem Benfey und Aguayo gezeigt hatten, daß ZNS-Neurone in der Lage waren, in einen transplantierten peripheren Nerven einzuwachsen, wurde dieser Ansatz weiterverfolgt. Die Problematik dieser Therapiestrategie liegt darin, daß die regenerierenden Fasern ohne weitere therapeutische Eingriffe nicht wieder aus dem Implantat in das Gewebe des ZNS einwachsen.
4. Die **Gabe neurotropher Faktoren** (Grill et al., 1997, Jakeman et al., 1998, Bradbury et al., 1999). Neurotrophe Faktoren verbessern zum Einen das Überleben von Neuronen (Hammond et al., 1999, Kermer et al., 2000, Novikova

et al., 2000), erhöhen aber auch die Wachstumsgeschwindigkeit regenerierender Axone.

5. Die **Gabe von Antikörpern bzw. Enzymen und deren Inhibitoren**, die hemmende oder toxische Komponenten am Läsionsort neutralisieren.. Hierunter fallen die z.B. die Unterdrückung von oxidativen Prozessen (Koeberle und Ball, 1999), die Blockierung inhibitorischer Myelinkomponenten (NoGo-A) durch Infusion neutralisierender Antikörper (Brosamle et al., 2000) oder die Inhibition pathogeneseassoziiierter Enzyme (Schumacher et al., 2000). Zu dieser Gruppe experimenteller Therapien gehört auch der in unserem Labor entwickelte Ansatz zur Reduktion der sich an der Läsionsstelle entwickelnden, kollagenhaltigen Narbe (Stichel et al., 1999a).

2 Fragestellung und Zielsetzung

Diese Arbeit befaßte sich mit der Frage, ob die läsionsinduzierte Basalmembran ein Hindernis für regenerierende Axone des durchtrennten Rückenmarks der Ratte darstellt. Es wurde versucht, die Ausbildung der kollagenösen Wundheilungsnarbe im traumatisch lädierten Rückenmark durch die lokale Applikation von Prolyl-4-Hydroxylase Inhibitoren zu unterdrücken. Anschließend wurden die axonalen Reaktionen auf diese Behandlung analysiert.

Folgende Arbeitsschwerpunkte wurden bearbeitet:

- **Charakterisierung der läsionsinduzierten Basalmembran im Rückenmark der Ratte**

Unter diesem Aspekt sollten BM spezifische Proteine in der Narbe nachgewiesen werden, der zeitliche Verlauf der Ausbildung, und die räumliche Ausdehnung einer kollagenösen Basalmembran nach einer Drahtmesser-Transsektion des dorsalen Kortikospinaltraktes des Ratte untersucht werden.

- **Einfluß von 2,2'-Dipyridyl auf die Bildung der Basalmembran**

Es sollte gezeigt werden ob die Applikation des Eisenchelators 2,2'-Dipyridyl zu einer reduzierten Ausbildung der Basalmembran nach Verletzung des Rückenmarks führt.

- **Unterdrückung der Basalmembranbiosynthese durch Kombination eines Eisenchelators mit zyklischem AMP**

Dieser Teil der Arbeit ergab sich aus den negativen Ergebnissen des Punktes 2. Hier sollte gezeigt werden, ob die Ausbildung der läsionsinduzierten Basalmembran durch gleichzeitige Inhibition der Kollagenbiosynthese und der Proliferation der kollagenbildenden Zellen zu erreichen ist.

- **Untersuchung der Regeneration verletzter Axone nach Unterdrückung der läsionsinduzierten Basalmembran**

Unter diesem Punkt sollte die axonale Reaktion der durchtrennten Kortikospinalen Fasern auf die Unterdrückung der Ausbildung der kollagenösen Basalmembran untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die Axone mit einer anterograden Tracersubstanz markiert und ihr Verlauf nach der Behandlung analysiert.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden adulte Wistar-Ratten (Auszuchtstamm) beiderlei Geschlechts mit einem Körpergewicht von 180-300g verwendet. Die Tiere wurden unter spezifiziert pathogenfreien Bedingungen (SPF) bei einer Temperatur von 21°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 +/- 5% gezüchtet und konventionell unter denselben Umweltbedingungen gehalten. Sie erhielten pelletiertes Trockenfutter (Altromin) und angesäuertes, keimfreies Wasser (pH 2) ad libitum. Alle Tiere stammten aus der Eigenzucht des Zentralen Tierlabors der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

3.2 Puffer und Antikörper

3.2.1 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

PB (Phosphat-Puffer nach Sörensen; 0,2M; pH 7,4):

28,8 g Na_2HPO_4
 5,2 g NaH_2PO_4
 ad 1000 ml aq. bidest

PB (0,1M; pH 7,4):

500 ml 0,2M PB
 ad 1000 ml aq. bidest

PBS (0,01M; pH 7,4):

50 ml 0,2M PB
 9 mg NaCl
 ad 1000 ml aq. bidest

Tris (20mM, pH 8,1):

2,1 g $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$
 ad 1000 ml aq. bidest
 pH-Einstellung mit HCl

NHS (3%):

300 μl NHS
 ad 10 ml PBS

NGS (3%):

300 µl NGS
ad 10 ml PBS

2,2'-Dipyridyl (10mM, 20mM, 40mM, Sigma):

15,62 mg (BPY, 10mM)
31,42 mg (BPY, 20mM)
62,48 mg (BPY, 40mM)
ad 10 ml PBS

5,5'-Dicarboxy-2,2'-Dipyridyl (30mM, synthetisiert von M. Wehner, Institut für Organische Chemie II, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf):

14,7 mg (BPY-DCA, 30mM)
ad 2 ml Tris

3.2.2 Antikörper

Primärantikörper:

Antikörper/ Klasse	Antigen	Spezifität	Hersteller	Verdünnung
Coll IV rb IgG	Kollagen Typ IV	BM	BioGenex	1:100
LN rb IgG	Laminin	BM	BioGenex	1:100
Nidogen rb Antiserum	Nidogen	BM	Geschenk von Dr. Rupert Timpl	1:500
PAM ms IgG	Neurofilament 210 kD	Axone	Affinity	1:800
vWF rb IgG	von Willebrandt Faktor	Endothelzellen	Dako	1:500
GFAP ms IgG ₁	gliales fibrilläres saurer Protein	Astrozyten SC	Boehringer Mannheim	1:40

Tab. 3: Primärantikörper zur Identifizierung von BM-Proteinen und zellulären Bestandteilen der Läsionsnarbe

Sekundärantikörper, Avidinreagenzien, Tracersubstanzen:

Antikörper/Klasse	Hersteller	Verdünnung
anti-Maus IgG hs IgG (biotinyliert)	Vector/Camon	1:150
anti-Kaninchen IgG gt IgG (biotinyliert)	Vector/Camon	1:150
anti-Kaninchen Cy3 gt IgG (fluoreszenzmarkiert)	Dianova	1:1000
Neutravidin-gekoppeltes Alexa-488 Konjugat	Molecular Probes	1:500
Avidin-Biotin-Peroxidase- Komplex (ABC)-Elite	Vector/Camon	1:100
Biotinyliertes Dextranamin	Molecular Probes	10%

Tab. 4: Indirekte Immunfluoreszenz und Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode

3.3 Transsektion des postkommissuralen Fornix

3.3.1 Stereotaktische Methoden

Siehe auch Hermanns et al. 1997. Bei dem verwendeten Stereotaxiegerät handelte es sich um einen Small animal adaptor (David Kopf Instruments). Der Schädel der Ratte wurde darin an 3 Punkten fixiert:

- durch zwei in den Meatus akustikus externus eingeführte Ohrstecker
- durch einen Bügel, in den der Oberkiefer hinter den vorderen Schneidezähnen eingehängt wurde.

Diese Methode machte es möglich, die gewünschte anatomische Struktur im Gehirn durch Einstellung entsprechender Koordinaten aufzusuchen. Die Koordinaten zur Durchtrennung des postkommissuralen Fornix wurden mit Hilfe des stereotaktischen Atlas‘ von Paxinos und Watson (1982) ermittelt, und der Fornixtrakt in einem Abstand von ca. 1200µm proximal des Mammillarkörpers durchtrennt.

Koordinaten:

A/P	V tiefster Punkt	V höchster Punkt	L links
+5,8 mm	-8,8 mm	-6,3 mm	+2,1 mm

Um die Lage des Schädels im Stereotaxiegerät zu überprüfen, wurde bei jedem Eingriff die Differenz zwischen Schädeldach und der Linea interauralis gemessen.

3.3.2 Stereotaktische Transsektion des postkommissuralen Fornix

Den Tieren wurde nach initialer Enfluran-Inhalationsnarkose (Ethrane, Abbott) Chloralhydrat (400 mg/kg KG) i.p. injiziert. Anschließend wurde den Tieren der Schädel geschoren und im Stereotaxiegerät arretiert. Dann wurde die Schädeldecke freipräpariert, die Nullpunkteinstellung am Tier überprüft und gegebenenfalls korrigiert. (Differenz Schädeldach – Linea interauralis; Sollwert: 10 mm). Die Läsionskoordinaten (siehe 3.3.1) wurden eingestellt, die Schädeldecke markiert und mit einem Zahnbohrer (Fine Science Tools, Ø 1,4 mm) an der markierten Stelle punktförmig eröffnet.

Die Läsion wurde mit einem Wolframdrahtmesser (Syn.: Scouten-/Tungsten wire knife, Bilaney) durchgeführt. Dieses bestand aus einer Kanüle einer Mikroliterspritze, in der sich ein vorgekrümmter, beweglicher Wolframdraht (Ø 0,127 mm) befand. Wurde dieser ausgefahren, krümmte er sich halbkreisförmig, so daß er als Messer dienen konnte (siehe auch Abb. 6).

Die Kanüle wurde in das Bohrloch eingeführt und mit eingezogenem Draht bis unter die Läsionsstelle, ca. 1,2 mm proximal des Zielgebietes des Fornix, des Mammillarkörpers, abgesenkt (V: -8,8 mm). Dann wurde der Wolframdraht in situ ausgefahren, bis er einen Halbkreis von ca. 1,9 mm Ø beschrieb. Anschließend wurde das Messer 2,5 mm angehoben und durchtrennte so den Trakt (Abb. 5). Es ergab sich ein flächiges Läsionsareal von ca. 7,5 mm², das den Trakt sicher einschloß.

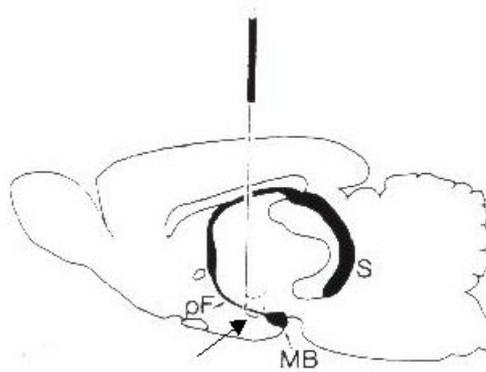


Abb. 5: Transsektion des postkommissuralen Fornix mit einem Drahtmesser (S: Subikulum, pF: postkommissuraler Fornix, MB: Mammillarkörper; der Pfeil bezeichnet die Läsionsstelle).

Nach einer 5-minütigen Wartezeit, damit sich das Gewebe absenken konnte, wurde das Messer eingefahren, und die Kanüle aus dem Schädel des Tieres zurückgezogen. Am Ende der Operation wurde die Schädeldecke des Tieres mit physiologischer Kochsalzlösung gereinigt und die Kopfhaut mit Metallklips (Michel) geklammert.

3.4 Transsektion des dorsalen Kortikospinaltrakts

Die Transsektion des dorsalen CST der Ratte wurde in dem unter 3.3.1 beschriebenen stereotaktischen Rahmen (small animal adaptor) unter einem Operationsmikroskop (SM33SL, Hundt), mit einem Wolframdrahtmesser unter Sicht, jedoch nicht stereotaktisch, durchgeführt. Den Versuchstieren wurde nach initialer Enfluran-Inhalationsnarkose Chloralhydrat (400 mg/kg KG) i.p. injiziert. Anschließend wurde den Tieren der Rücken rasiert und mit 70%igem Alkohol desinfiziert.

Bei den vollnarkotisierten Tieren wurde ein dorsaler Hautschnitt entlang der Brustwirbel 6-11 vorgenommen, das Muskelgewebe freigelegt und bis zur Höhe der Wirbel-Querfortsätze stumpf durchtrennt. Anschließend wurden die Ligamenti supraspinale, interspinale und intertransversarium zwischen diesen Brustwirbeln entfernt. Der Dornfortsatz des Brustwirbels 8 und der Wirbelbogen des 8. Brustwirbels wurden mit einer feinen Knochenzange abgetragen. Danach wurde die Dura mater spinalis mit einer Nadel eröffnet und ein Scouten-wire knife (Halbkreis-Ø 1,9 mm) 1 mm seitlich des Sulcus medianus dorsalis stereotaktisch 1 mm in das 9. thorakale Rückenmarkssegment eingefahren. Der Wolframdraht des Messers wurde

zur rechten Rückenmarksseite ausgefahren und das ganze Messer angehoben. Damit das Rückenmarksgewebe nicht zerrissen, sondern sauber durchtrennt wurde, wurde mit einem feinen Spatel leichter Gegendruck gegen das Messer ausgeübt. Dadurch wurden Teile des linken und rechten Hinterhorns (Kornu dorsale), die dorsalen Pyramidenbahnen (CST) und die sensiblen Hinterstrangbahnen (Faszikuli gracilis und kuneatus) durchtrennt. Dann wurde der Wolframdraht wieder eingezogen und das Messer herausgezogen (Abb. 6).

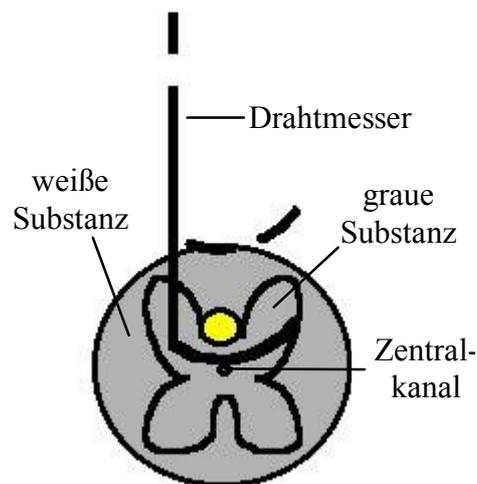


Abb. 6: Transsektion des dorsalen CST (gelb) mit einem Drahtmesser

3.5 Experimentelle Gruppen

3.5.1 Gruppe 1 - Transsektion des postkommissuralen Fornix

Tiere dieser Gruppe dienten dem Vergleich der läsionsinduzierten Coll IV-Expression in der Fornixnarbe und in der Rückenmarksverletzung (n = 5). Diesen Tieren wurde der postkommissurale Fornix stereotaktisch durchtrennt.

3.5.2 Gruppe 2 - Transsektion des dorsalen Kortikospinaltraktes

Tiere dieser Gruppe wurden zur Erhebung des zeitlichen Verlaufs der BM-Expression im durchtrennten Rückenmark der Ratte benötigt. Den Tieren wurde der dorsale CST durchtrennt. Nach Überlebenszeiten von 2, 4, 5 und 7 d wurden die

Tiere durch Perfusion mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA) getötet und das Rückenmarksgewebe zur immunhistochemischen Aufarbeitung prozessiert. Die Tierzahl pro Überlebenszeitpunkt post Läsion (pL) (bis auf den Zeitpunkt 7 d) betrug $n = 3$ (7 d, $n = 25$).

3.5.3 Gruppe 3 - Einmalige 2,2'-Dipyridyl-Injektionen

Diese Gruppe sollte zeigen, ob einmalige Injektionen des Eisenchelators BPY ausreichen, um die läsionsinduzierte BM im Rückenmark der Ratte zu unterdrücken. Den Tieren wurde der dorsale CST durchtrennt. Sofort anschließend erhielten sie eine einmalige BPY Injektion (2 μ l, 10mM) mittels einer an einer Hamiltonspritze befestigten, fein ausgezogenen Glaskanüle in die Läsionsstelle. Nach Überlebenszeiten von 7 d wurden die Tiere durch Perfusion mit 4%igem PFA getötet und die BM-Expression immunhistochemisch analysiert ($n = 17$). Kontrolltiere erhielten Vehikel-Injektionen ($n = 16$).

3.5.4 Gruppe 4 - Kontinuierliche 2,2'-Dipyridyl-Applikation

Zweck dieser Gruppe war es, zu zeigen, ob eine einmalige BPY Injektion, kombiniert mit einer kontinuierlichen Applikation von BPY (i) durch Abdecken der Läsionsstelle mit BPY-getränktem Gelfoam oder (ii) durch BPY-Applikation mittels einer osmotischen Minipumpe (Alzet, verschiedene Modelle) zu einer Reduktion der BM führt.

- (i) Den Tieren wurde der dorsale CST durchtrennt. Anschließend erhielten sie eine einmalige BPY Injektion (2 μ l, 10mM, $n = 12$; 20mM, $n = 6$). Die Läsion wurde mit BPY-getränktem Gelfoam korrespondierender Konzentrationen abgedeckt um eine kontinuierliche Applikation des Chelators zu gewährleisten. Kontrolltiere erhielten Vehikel-Injektionen in Kombination mit vehikelgetränktem Gelfoam ($n = 8$).
- (ii) Nach Durchtrennung des dorsalen CST erhielten die Tiere eine einmalige BPY Injektion (2 μ l, 40mM). Zur kontinuierlichen Applikation wurden den Tieren BPY-beladene osmotische Minipumpen verschiedenen Typs implantiert:

- Alzet 1002, nominale Pumprate: 0,25 μ l/h, Pumpdauer: 14 d, n = 7
- Alzet 2ML2, nominale Pumprate: 5 μ l/h, Pumpdauer: 14 d, n = 6
- Alzet 2001, nominale Pumprate: 1 μ l/h, Pumpdauer: 7 d, n = 13

An die Minipumpen wurde ein Polyethylenschlauch angebracht, dessen Öffnung direkt über der Läsionsstelle plaziert wurde. Auf dem Rücken der Tiere wurde eine Hauttasche präpariert, in die die Pumpen stabil eingebracht werden konnten (Abb. 7). Kontrolltiere erhielten Vehikel-Injektionen in Verbindung mit Vehikel-beladenen osmotischen Minipumpen (je n = 8).

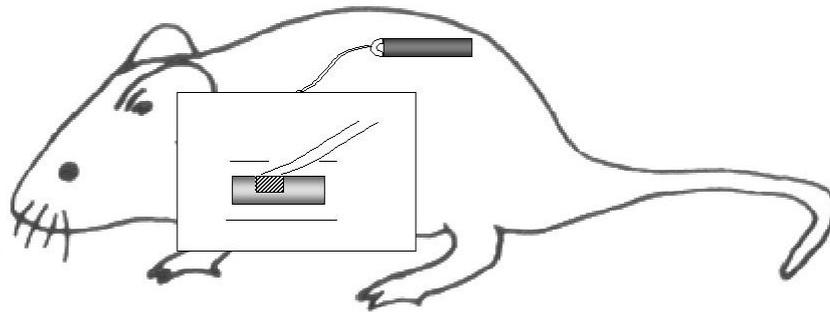


Abb. 7: Implantation einer osmotischen Minipumpe; das schraffierte Areal symbolisiert die Läsionsstelle

Nach Überlebenszeiten von 7 d wurden die Tiere durch Perfusion mit 4%igem PFA getötet und die BM-Expression immunhistochemisch analysiert.

3.5.5 Gruppe 5 – Kombinationsbehandelte Tiere

Tiere dieser Gruppe erhielten nach der Transsektion des dorsalen CST 6 (i) eine einmalige, sofortige Injektion (2 μ l, Überlebenszeiten: 7d, n = 6) bzw. (ii) 6 sofortige Injektionen (je 0,2 μ l, 4 Injektionen in den Schnitt, 2 Injektionen proximal der Läsionsstelle) des modifizierten PH-Inhibitors 5,5'-Dicarboxyl-2,2'-Dipyridyl (BPY-DCA, je 0,2 μ l) in die Läsionsstelle. Um die Proliferation und die EZM-Produktion von Fibroblasten selektiv zu inhibieren wurde kristallines 8-Br-cAMP mit einem Spatel in und auf die Läsionsstelle gebracht. Die Läsionsstelle wurde anschließend mit einem Ethylen-Vinyl-Acetat Kopolymer (Elvax) abgedeckt, das den PH-Inhibitor enthielt, um eine kontinuierliche Applikation der Substanz zu gewährleisten. Nach Überlebenszeiten von 7 d (n = 6), 12 d (n = 3), 14 d (n = 3) und 3 m (n = 5) wurden die Tiere durch Perfusion mit 4%igem PFA getötet und die BM-Expression

immunhistochemisch analysiert. Kontrolltiere erhielten (i) Vehikel-Injektionen und Vehikel-beladenes Elvax (Überlebenszeitpunkte: 7 d, n = 5) und (ii) Vehikel-Injektionen, Vehikel-beladenes Elvax und kristallines 8-Br-cAMP (Überlebenszeitpunkte: 7 d (n = 3) und 3 m (n = 6)). Die zweite Kontrollgruppe diente der Beurteilung der möglicherweise durch cAMP hervorgerufenen Effekte.

3.6 Elvax-Präparation

- Ethylen-Vinyl-Actetat Kopolymer-Kügelchen (Elvax, DuPont) wurden zu Dichlormethan geben, so daß eine 10%ige (w/v) Lösung entstand (unter dem Abzug!!).
- Auf einem Schüttler wurde 20 Minuten ständig gerührt, bis die Elvax-Kugeln komplett gelöst waren.
- Von der zu lösenden Substanz wurde eine 10x höher konzentrierte Stammlösung hergestellt als die Endkonzentration der Substanz in Elvax betragen sollte. Davon wurden 100 µl der Elvax-Dichlormethan Lösung zugesetzt.
- 1% (v/v) fast green (ungiftiger Farbstoff) wurde zugegeben.
- Auf einem Schüttler wurde 20 Minuten ständig gerührt, bis die Flüssigkeiten sich völlig vermischt hatten.
- 2 Objektträger (OT) wurden mit Leukosilk[®] zusammengeklebt und auf Trockeneis gelegt.
- Aus Parafilm[®] wurde ein Rahmen ausgeschnitten, der auf einen OT paßte.
- Mit einer Pasteurpipette wurde eine Tropfen der fertigen Lösung aufgetropft.
- Die OT wurden übereinandergeklappt und mit Fotoklammern fixiert.
- Die OT wurden bei -20°C eingefroren und das Lösemittel 1 Woche abgedampft oder das Elvax wurde im Exsikkator entwässert.

(Protokoll modifiziert nach Smith et al. 1995).

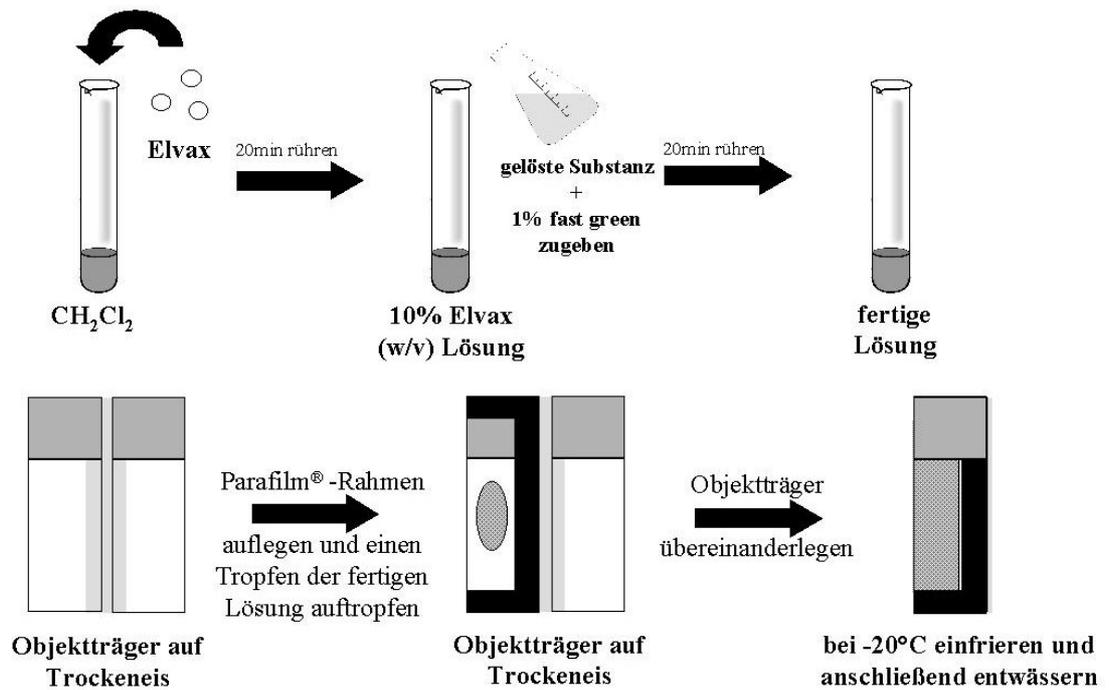


Abb. 8: Schematische Darstellung der Elvax-Präparation

3.7 Tracing

3.7.1 Stereotaktische Methoden

Bei dem verwendeten Stereotaxiegerät handelt es sich um den unter 3.4.1 beschriebenen Small animal adaptor. Die Koordinaten zur Markierung der kortikospinalen Zellkörper in Schicht V des sensomotorischen Kortex der Ratte wurden mit Hilfe des stereotaktischen Atlas¹ von Paxinos und Watson (1982) ermittelt.

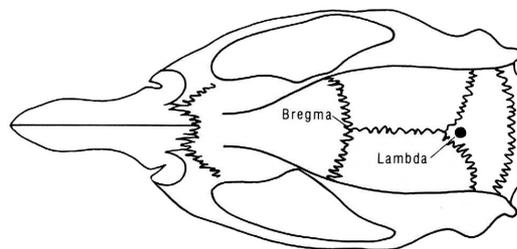


Abb. 9: Aufsicht auf einen Rattenschädel mit Schädelnähten und den Orientierungspunkten Bregma und Lambda.

Koordinaten:

Bregma A/P	L links	L rechts
-0,08 mm	+0,20 mm	-0,20 mm
-0,13 mm	+0,22 mm	-0,22 mm
-0,18 mm	+0,24 mm	-0,24 mm
-0,23 mm	+0,24 mm	-0,24 mm
-0,28 mm	+0,24 mm	-0,24 mm

Um die Lage des Schädels im Stereotaxiegerät zu überprüfen, wurde bei jedem Eingriff die Differenz zwischen Schädeldach und der Linea interauralis gemessen.

3.7.2 Injektion von biotinyliertem Dextranamin in den sensorimotorischen Kortex

Den Versuchstieren wurde nach initialer Enfluran-Inhalationsnarkose (Ethrane, Abbott) Chloralhydrat (400 mg/kg KG) i.p. injiziert. Den vollnarkotisierten Tieren wurde der Schädel geschoren und im Stereotaxiegerät arretiert. Dann wurde die Schädeldecke freipräpariert, die Nullpunkteinstellung am Tier überprüft und gegebenenfalls korrigiert (Differenz Schädeldach – Linea interauralis; Sollwert: 1 mm). Die Injektionskoordinaten wurden eingestellt, die Schädeldecke markiert und mit einem Zahnbohrer (Fine Science Tools, Ø 1,4 mm) an den markierten Stellen eröffnet.

Das biotinylierte Dextranamin (BDA, 10%) wurde mittels einer Injektionsapparatur in die kortikospinalen Zellkörper in Schicht V des sensomotorischen Kortex der Ratte injiziert. Die Injektionsapparatur bestand aus der Kanüle einer Mikroliterspritze (Hamilton, 10 µl, Modell 7110 N), auf die eine ausgezogene Glaskapillare (Spitzendurchmesser: 40-60 µm) aufgesetzt wurde, welche mit Siegelack fixiert wurde. Die Hamiltonspritze wurde mit Paraffinöl gefüllt, um das Auftreten von Totvolumina zu vermeiden. Nach Einstellung der Injektionskoordinaten wurden je 0,2 µl BDA in den jeweiligen Injektionsort (Koordinaten, siehe 3.7.1) druckappliziert. Nach erfolgter Injektion schloß sich eine 2-minütige Wartezeit an, bevor die Kanüle langsam zurückgefahren wurde.

3.8 Gewebeaufarbeitung

3.8.1 Perfusion

Den Versuchstieren wurde nach initialer Enfluran-Inhalationsnarkose Chloralhydrat (400 mg/kg KG) i.p. injiziert. Den vollnarkotisierten Tieren wurde der Thorax und die linke Herzkammer geöffnet. Eine an eine Perfusionspumpe (505S, Watson Marlowe) angeschlossene Kanüle wurde durch die linke Kammer bis in die Aorta vorgeschoben und mit einer Klemme fixiert. Anschließend wurde der rechte Vorhof geöffnet und für 2 min PBS (4°C) durch das Kreislaufsystem der Ratten gespült. Danach wurde mit ca. 500 ml 4%igem PFA für weitere 15 min perfundiert. Die Pumprate der Perfusionspumpe betrug 35 ml/min.

3.8.2 Gewebeentnahmen

3.8.2.1 Gewebeentnahme zur Herstellung frisch gefrorener Gewebeschnitte

Tieren mit Fornixläsion wurden nach initialer Enfluran-Inhalationsnarkose dekapitiert, die Schädeldecke mit einer Knochenzange eröffnet und das Gehirn entnommen. Kleinhirn und rechte Großhirnhemisphäre wurden abgetrennt und die linke Großhirnhemisphäre anschließend in Isopentan (Merck) bei -40°/-50°C schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Präparate trocken bei -20°C gelagert.

Tiere mit Rückenmarksläsion wurden nach initialer Enfluran-Inhalationsnarkose dekapitiert, die Wirbelsäule mit einer Knochenzange eröffnet und das Rückenmark entnommen. Anschließend wurde das Rückenmark in Isopentan (Merck) bei -40°/-50°C schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Präparate trocken bei -20°C gelagert. Diese Tiere wurden nicht perfundiert.

3.8.2.2 Gewebeentnahme zur Herstellung perfundierter Kryostatschnitte

Nach der Perfusion wurde den Tieren die Wirbelsäule von C₄ bis L₄ entnommen und über Nacht (ON) in 4% PFA bei 4°C nachfixiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Rückenmark mit einer feinen Knochenzange herauspräpariert und ON in 30%ige Saccharoselösung bei 4°C gelegt. Anschließend wurde das Gewebe gründlich mit PBS gewaschen und in Isopentan bei -40°/-50°C schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Gewebe trocken bei -20°C gelagert.

3.8.2.3 Gewebeentnahme zur Herstellung von Paraffinschnitten

Nach der Perfusion wurde den Tieren die Wirbelsäule von C₄ bis L₄ entnommen und über Nacht (ON) in 4% PFA bei 4°C nachfixiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Rückenmark mit einer feinen Knochenzange herauspräpariert und ON in PBS gewaschen.

3.8.3 Paraffineinbettung

Zunächst wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Ethanolreihe (EtOH, Merck) entwässert (30 min 70% EtOH, 1 h 90% EtOH, 1 h 100% Et OH, 1 h 100% EtOH). Der letzte Entwässerungsschritt bestand in einer Inkubation in Methylbenzoat (Merck) ON. Dann wurde das Rückenmark 15 min bei Raumtemperatur (RT) in Benzol (Merck) gelegt und anschließend für 30 min in einem Benzol/Paraffingemisch (1:10, v/v) bei 57°C in einem Wärmeschrank (Memmert) inkubiert. Darauf folgten mehrere Inkubationsschritte in reinem Paraffin (Histoplast) bei 57°C (4-maliges Wechseln des Paraffins, Inkubationszeit: je 1 h, die letzte Inkubation ON). Am darauffolgenden Tag wurde das Gewebe in Kautschukformen mit flüssigem Paraffin (57°C) eingebettet und zu Blöcken gegossen.

3.8.4 Anfertigung histologischer Schnittpräparate

3.8.4.1 Frisch gefrorenes Gewebe

Die frisch gefrorenen Schnitte wurden an einem Kryostaten (Gefriermikrotom, Leica 3000) hergestellt. Die Fornix-Präparatblöcke wurden in sagittaler Orientierung mit Tissue Freezing Medium (Jung) auf Objekthalter aufgefroren. Die Serienschritte (Schnittdicke: 10µm, Schnittrichtung: medial → lateral) wurden auf Adhäsions-Objektträger (Histobond, Marienfeld) aufgezogen, getrocknet und bei -20°C gelagert.

Die Rückenmarks-Präparatblöcke wurden in transversaler Orientierung mit Tissue Freezing Medium auf Objekthalter aufgefroren. Die Serienschritte (Schnittdicke: 10µm, Schnittrichtung: dorsal → ventral) wurden auf Adhäsions-Objektträger aufgezogen, getrocknet und bei -20°C gelagert.

3.8.4.2 Perfundierte Kryostatschnitte

Die perfundierten Kryostatschnitte wurden ebenfalls am Kryostaten hergestellt. Die Präparatblöcke wurden in parasagittaler Orientierung mit Tissue Freezing Medium auf Objekthalter aufgefroren. Die Serienschritte (Schnittdicke: 20µm, Schnittrichtung: lateral → lateral) wurden in 96-Loch Mikrotiterplatten in kryoprotektierter PB (0,5M + 25% Glycerin + 30% Ethylenglykol, Sigma) gesammelt und bei -20°C gelagert.

3.8.4.3 Paraffinschnitte

Für die meisten immunhistochemischen Untersuchungen wurden Paraffinschnitte an einem Paraffinmikrotom (RM 2035, Jung) hergestellt. Das Gewebe wurde in parasagittaler Orientierung geschnitten. Die Serienschritte (Schnittdicke: 10µm, Schnittrichtung: lateral → lateral) wurden auf Adhäsions-Objektträger aufgezogen, bei 57°C im Wärmeschrank ON getrocknet und bei RT gelagert.

3.9 Immunhistochemische Färbemethoden

Die Darstellungen der BM-Proteine, der Fasern und der Glianarbe erfolgten hauptsächlich an Paraffinschnitten. Es wurden Einfach- und Doppelmarkierungen durch indirekte Immunfluoreszenz (Abb. 10) und die Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode (Abb. 11) durchgeführt.

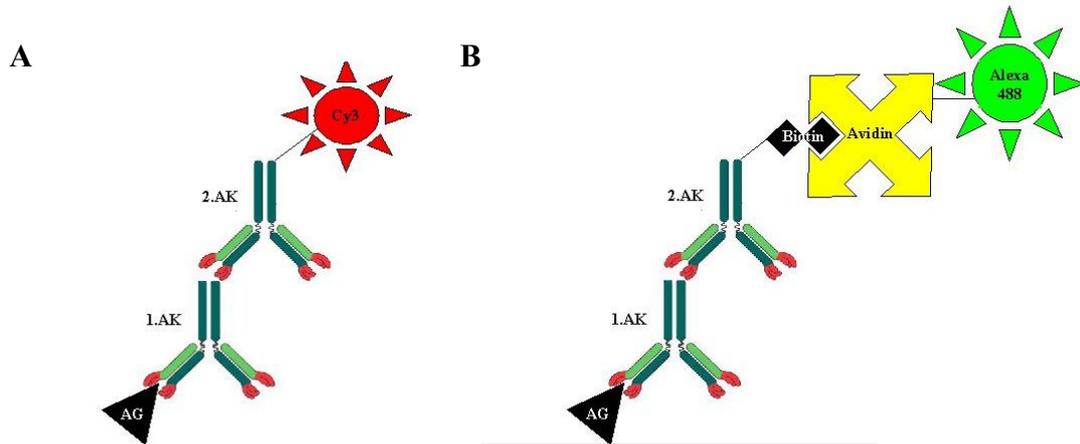


Abb. 10: Indirekte Immunfluoreszenzmethode mit fluoreszierendem Sekundärantikörper (A) und biotinyliertem Sekundärantikörper, welcher durch ein an Avidin gekoppeltes Fluorochrom detektiert wird (B). Hierbei wird das Antigen mit dem Primärantikörper inkubiert, so daß ein Antigen-Antikörper-Komplex entsteht. An diesen bindet in der zweiten Phase ein Fluorochrom-gekoppelter (A), bzw. biotinylierter (B) Sekundärantikörper. In (B) folgt ein dritter Schritt, in dem ein mit einem Fluorochrom gekoppeltes Avidin an den biotinylierten Sekundärantikörper bindet. AG: Antigen, 1.AK: Primärantikörper, 2.AK: Sekundärantikörper

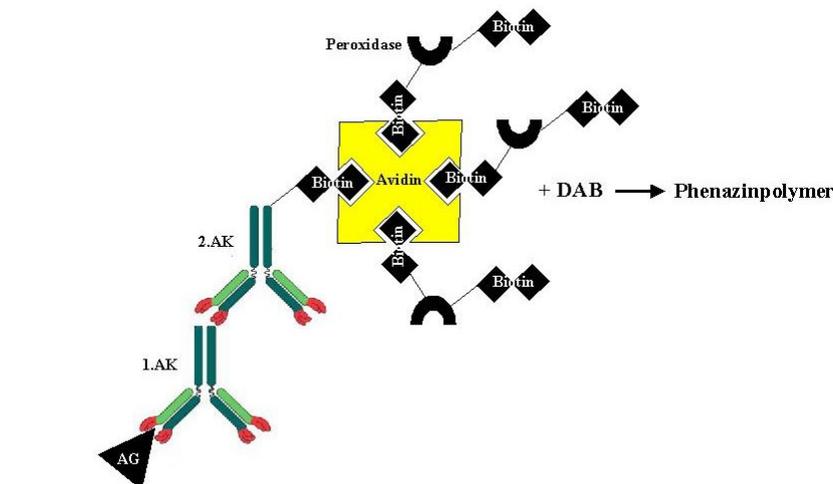


Abb. 11: AK-Nachweis mittels eines biotinylierten Sekundär-AK und der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex Technik. Der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC) bindet an das Biotin des Sekundär-Aks. Die Peroxidase des so entstandenen Komplexes oxidiert das DAB, wenn Wasserstoffperoxid als Elektronenakzeptor zur Verfügung steht, zu einem braunen Phenazinpolymer.

3.9.1 Färbeprotokolle

3.9.1.1 Frisch gefrorenes Gewebe

Die Schnitte wurden 10min bei RT getrocknet, für 10min bei -20°C mit Azeton fixiert und permeabilisiert, anschließend wieder für 10min bei RT getrocknet und anschließend 2x für 5min bei RT in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden EtOH-Reihe (50% bis 100% EtOH, je 2min bei RT) auf das Abreagieren endogener Peroxidasen in 1%igem H_2O_2 in Methanol (MeOH) vorbereitet. Um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers zu minimieren, wurden die Schnitte mit 3% Normalserum aus dem Tier, aus dem der Sekundärantikörper stammte geblockt (10min/RT). Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (Coll IV, 1:200) ON. Am nächsten Tag wurden die Schnitte sorgfältig mit PBS gewaschen, für 45min bei RT mit dem Sekundärantikörper (biotinylierter anti-Kaninchen AK, 1:150) inkubiert, wieder gewaschen und mit dem ABC-Kit (1:100) für 45min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte erneut gewaschen und in 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Sigma) inkubiert. Nach 1min wurde 0,01% H_2O_2 hinzugegeben um die Oxidation des DAB durch die Peroxidase zu starten. Der Antikörperdetektion schloß sich (i) eine Silber-Gold-Intensivierung oder eine (ii) NiCl_2 -Intensivierung an [(i): 3% (w/v) Methenamin (Merck) + 0,25% (w/v) Silbernitrat (Merck) + 0,25% (w/v) Natriumtetraborat in aqua bidest. 8-10min/ 56°C ; 0,05% (w/v) Goldchlorid in aqua bidest. 2min/RT; 2,5% (w/v) Natriumthiosulfat in aqua bidest. 1min/RT. (ii): 100 μl 8% NiCl_2 zu 100ml DAB-Lösung dazugeben].

3.9.1.2 Perfundierte Kryostatschnitte

Die Färbung der perfundierten Kryostatschnitte erfolgte frei-flottierend in 12-Loch Mikrotiterplatten. Die Gewebeschnitte wurden zunächst für 3 x 10min in PBS gewaschen. Anschließend wurden die endogenen Peroxidasen für 20min in 0,6% H_2O_2 in PBS abreagiert. Die Schnitte wurden sorgfältig gewaschen und mit 3% Normalserum geblockt. Die Primär-AK Inkubation (Coll IV, 1:100) erfolgte ON bei 4°C . Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte wieder gewaschen und für 1h mit

dem Sekundär-AK (siehe 3.9.1.1) bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Schnitte in ABC-Lösung (siehe 3.9.1.1) bei RT auf einem Schüttler inkubiert und die DAB-Reaktion angeschlossen. Diese Schnitte wurden alle mit NiCl_2 intensiviert.

3.9.1.3 Paraffinschnitte

(A) Coll IV-, LN- und Nidogen-Färbungen

- **DAB-Visualisierung**

Zur DAB-Visualisierung o.g. AK wurde das Protokoll in Abb. 12 exakt befolgt. Der AK-Detektion schloß sich eine Silber-Gold-Intensivierung oder eine NiCl_2 -Intensivierung an. Nach Entwässerung in einer aufsteigenden EtOH-Reihe wurden die Präparate mit DPX (Fluka) eingedeckelt und bei RT aufbewahrt.

- **Fluoreszenz-Visualisierung**

Zur Fluoreszenz-Visualisierung wurden ein Cy3-markierter Sekundär-AK und an Neutravidin gekoppeltes Alexa 488 verwendet. Bei den Fluoreszenzmarkierungen entfallen die Schritte 2. und 7. aus Abb. 12. Die fertig gefärbten Präparate wurden mit Vectashield (Vector) eingedeckelt und bei -20°C aufbewahrt.

(B) GFAP- und PAM- Färbungen

- **DAB-Visualisierung**

Siehe Punkt 1. Coll IV-, LN- und Nidogen-Färbungen. Die Antigen-Demaskierung (Abb. 12, Schritt 3) entfällt für diese AK.

- **Fluoreszenz-Visualisierung**

Siehe Punkt 1. Coll IV-, LN- und Nidogen-Färbungen. Die Antigen-Demaskierung (Abb. 12, Schritt 3) entfällt für diese AK.

(C) BDA-Färbungen

- **DAB-Visualisierung**

Siehe Punkt 1. Coll IV-, LN- und Nidogen-Färbungen. Bei BDA-Färbungen entfallen die Schritte 4., 5. und 6. aus Abb. 12.

- **Fluoreszenz-Visualisierung**

Siehe Punkt 1. Coll IV-, LN- und Nidogen-Färbungen. Bei BDA-Färbungen entfallen die Schritte 4., 5. und 6. aus Abb. 12.

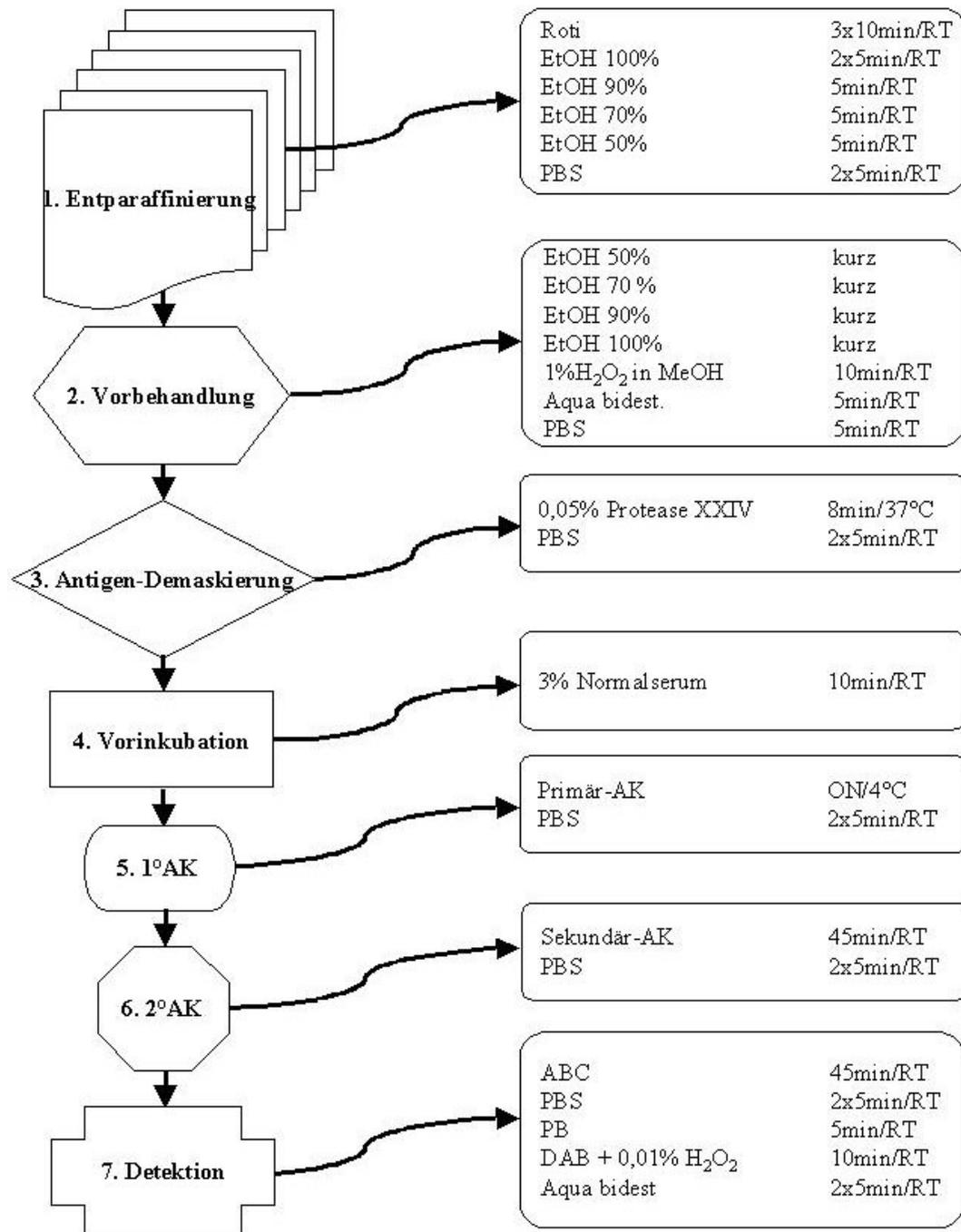


Abb. 12: Schematische Darstellung eines immunhistochemischen Färbeprotokolls für Paraffinschnitte

Zur Überprüfung der AK-Spezifität wurden alle immunhistochemischen Färbeprotokolle auch ohne den 1°AK durchgeführt. Diese Kontrollschnitte wiesen keine Färbung auf (Daten nicht gezeigt).

3.9.2 Antigenmaskierung in der Mikrowelle

Auf OT aufgezogene Schnitte oder frei flottierende Schnitte wurden in Demaskierungslösung H (auf Harnstoffbasis, Biologo) für unterschiedliche Inkubationszeiten und bei unterschiedlichen Wattleistungen in der Mikrowelle inkubiert.

3.10 Auswertung und Dokumentation

Alle Präparate wurden an einem Nikon Eclipse TE 200 Mikroskop mit Epifluoreszenz, differentiellem Interferenzkontrast (DIC) und Digitalkamera ausgewertet. Präparate, die fluoreszente Doppelmarkierungen zeigen, wurden an einem konfokalen Laserscanmikroskop (BioRad, MRC1024; Krypton-Argon Laser, Exzitationswellenlängen: 488 und 568 nm), an das ein Nikon Diaphot 200 Mikroskop angeschlossen war, zur Darstellung von Kollokalisierungen analysiert (werden die Aufnahmen aus zwei Kanälen übereinandergelegt und überlappt grüne mit roter Fluoreszenz, so erscheinen die kollokalisierenden Strukturen gelb). Die anatomischen Rekonstruktionen wurden mittels eines NeuroLucida Systems (MicroBrightField) an einem Nikon Eclipse 800 Mikroskop erstellt. Bei der Herstellung der Rekonstruktionen wurde der proximale Anteil des CST mit einer 10-fachen Vergrößerung analysiert, die Läsionsstelle und die distalen Bereiche mit einer 40-fachen Vergrößerung. Die Tiere die zu dieser Analyse herangezogen wurden, wurden zufällig ausgewählt. Die Transsektionsstelle wird im Folgenden als Läsion und der unmittelbar umgebende Gewebebereich als Läsionsareal bezeichnet. In allen Abbildungen wurden der Kortikospinal- und Fornixtrakt so orientiert, daß der jeweils proximale Stumpf der Fasertrakte auf der linken und der distale auf der rechten Seite abgebildet wurden.

4 Ergebnisse

4.1 Detektion der Basalmembran in unterschiedlich prozessiertem Rückenmarksgewebe

Die Detektion der läsionsinduzierten BM wurde in verschieden prozessierten Geweben nach 7d Überlebenszeit untersucht (Abb. 13).

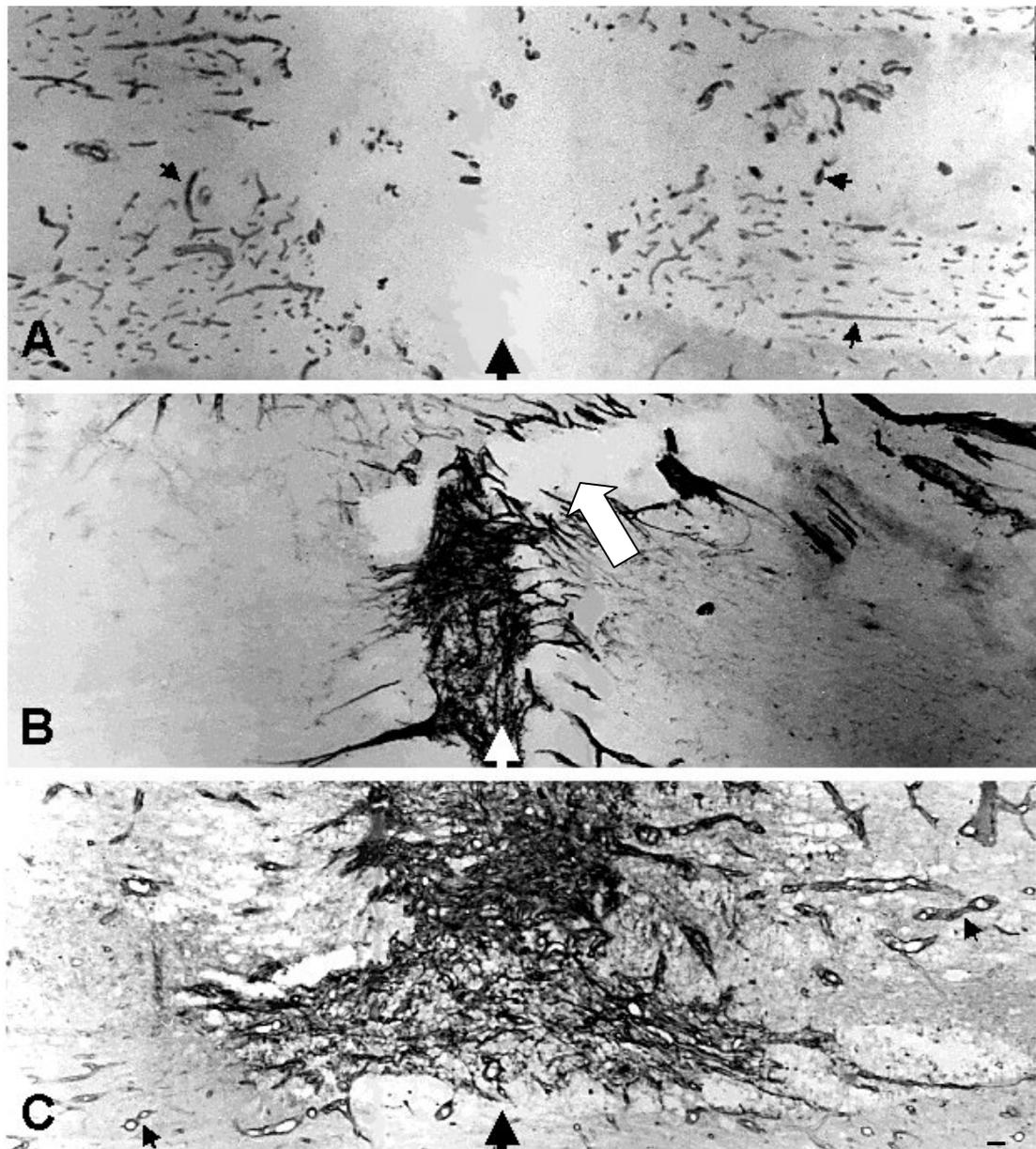


Abb. 13: Immunhistochemische Färbung gegen Coll IV auf frisch gefrorenem Gewebe (A), perfundierten Kryostatschnitten (B) und Paraffinschnitten (C). Die großen Pfeile (schwarz und weiß) markieren die Läsionsstelle, die kleinen Pfeile markieren Coll IV-immunopositive BM in Blutgefäßen. Der weiße Blockpfeil in B markiert ausgewaschenes Gewebe. Maßbalken in C für A-C: 100 μ m.

In frisch gefrorenem Gewebe konnte eine spezifische Coll IV-Färbung in der BM von Blutgefäßen erzielt werden. Die Läsionsstelle mit der Coll IV-immunopositiven BM war jedoch in keinem der untersuchten Tiere detektierbar (Abb. 13-A). In perfundierten Kryostatschnitten konnte die Läsionsstelle mit anti-Coll IV-AK immunhistochemisch markiert werden. Die BM der Blutgefäße war jedoch nicht darstellbar (Abb. 13-B). Antigen-Demaskierungsprozeduren, wie z.B. durch Inkubation in verschiedenen Enzymverdau (Pronase, Sigma; Trypsin, Sigma; Protease XXIV, Sigma; verschiedene Konzentrationen und Inkubationszeiten) oder durch Antigen-Demaskierung in der Mikrowelle (siehe 3.9.2) erbrachten bei freiflottierenden Schnitten keine akzeptablen Ergebnisse. Der Gewebeerhalt nach diesen Behandlungen war nicht zufriedenstellend bis nicht existent (Daten nicht gezeigt).

Auf Paraffinschnitten konnte mit einem herkömmlichen Protokoll keine anti-Coll IV-Färbung erzielt werden. Bei einer Antigen-Demaskierung in der Mikrowelle wurde die fragile BM-Struktur schwer beschädigt (Daten nicht gezeigt). Enzymatischer Verdau für 8 min bei 37°C mit Trypsin und Protease XXIV (Abb. 13-C), nicht jedoch mit Pronase, demaskierte die Coll IV-Epitope so gewebeschonend, daß sowohl Blutgefäße, als auch die läsionsinduzierte BM, spezifisch durch anti-Coll IV-AK immunhistochemisch angefärbt werden konnten. Im Vergleich zur Antigen-Demaskierung mit Trypsin ergab die Behandlung mit Protease XXIV intensivere Färbeergebnisse.

Die läsionsinduzierte Basalmembran lässt sich optimal in mit 4%igem Paraformaldehyd fixiertem Gewebe, das in Paraffin eingebettet und einer Antigen-demaskierung mit Protease XXIV unterzogen wurde, darstellen. Frisch gefrorene und Paraformaldehyd-fixierte Kryostatschnitte eignen sich nicht oder nur bedingt zur Detektion der kollagenhaltigen Wundheilungsnarbe im verletzten Rückenmark.

4.2 Expression basalmembran-spezifischer Proteine in der läsionsinduzierten Narbe

Die Expression von Proteinen, die eine Basalmembran charakterisieren, wurde durch immunhistochemische Färbung des Gewebes mit AK gegen Coll IV, LN und Nidogen, auf Paraffinserienschnitten 7d pL untersucht. Um die tuchartigen BM-

Strukturen in der Läsionsstelle von der BM der Blutgefäße zu unterscheiden wurde ein weiterer Serienschnitt mit AK gegen von Willebrandt Faktor, einem Faktor der Blutgerinnungskaskade, der nur in Blutgefäßen vorkommt immunhistochemisch gefärbt (Abb. 14).

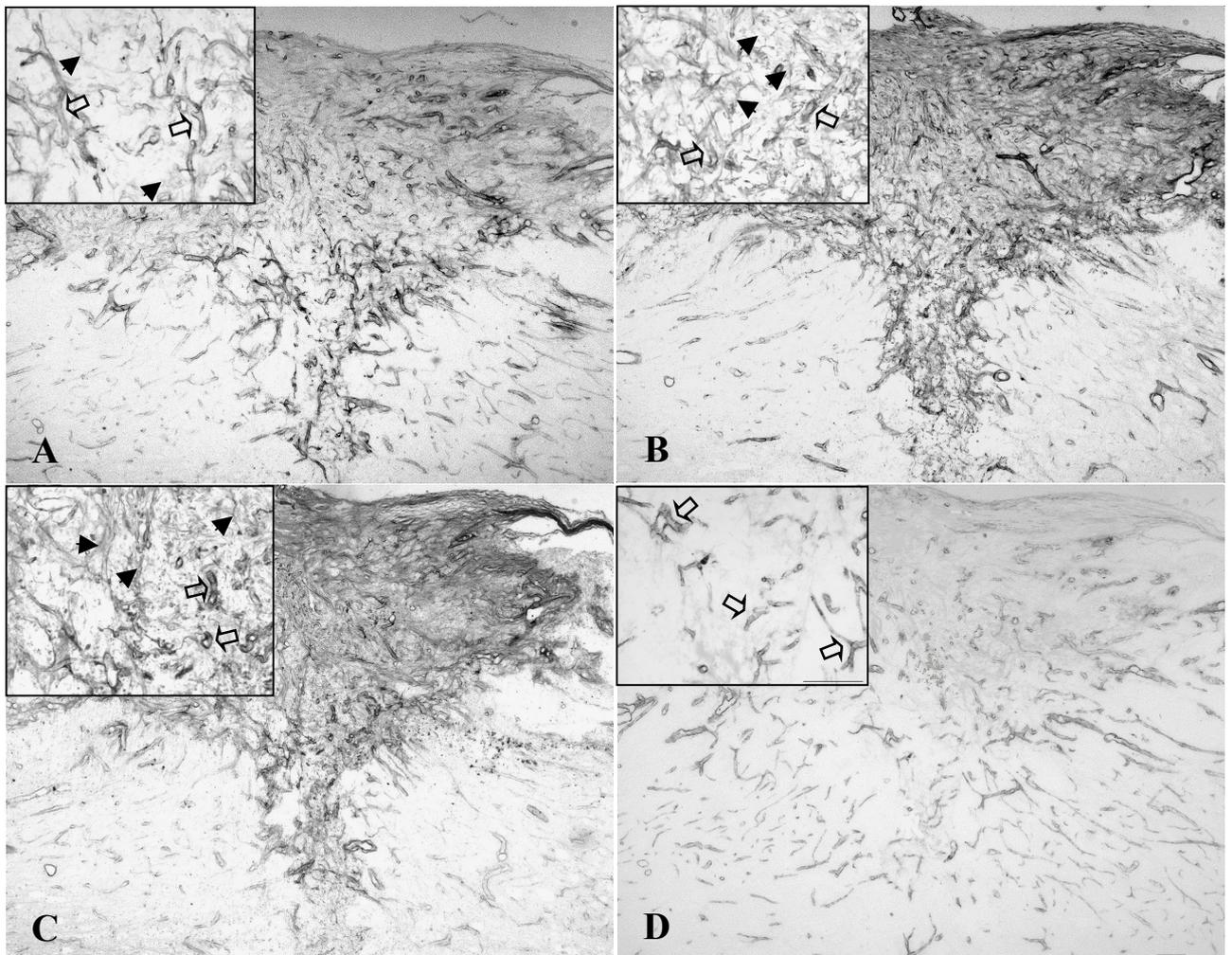


Abb. 14: Immunhistochemische Färbung der Läsionsstelle gegen Coll IV (A), LN (B), Nidogen (C) und von Willebrandt Faktor (D) auf Paraffinserienschnitten. Die Pfeilköpfe in den vergrößerten Bildausschnitten markieren tuchartige Basalmembranstrukturen, die offenen Pfeile markieren die Basalmembran der Blutgefäße. Maßbalken in D für A-D: 100 μ m.

Sowohl Coll IV (Abb. 14-A), LN (Abb. 14-B) als auch Nidogen (Abb. 14-C) wurden in der läsionsinduzierten Wundheilungsnarbe im verletzten Rückenmark exprimiert. Diese charakteristischen BM-Proteine konnten sowohl in der BM der Blutgefäße, als auch in den nicht an Blutgefäße assoziierten, tuchartigen Strukturen in der Läsionsstelle detektiert werden. Im Gegensatz dazu färbte der von Willebrandt Faktor AK ausschließlich die Blutgefäße in der Läsionsstelle (Abb. 14-D).

In der läsionsinduzierten Wundheilungsnarbe können die klassischen Basalmembrankomponenten Kollagen Typ IV, Laminin und Nidogen sowohl in der BM der Blutgefäße, als auch in tuchartigen Strukturen, die nicht an Blutgefäße assoziiert sind, nachgewiesen werden.

4.3 Zeitlicher Verlauf der Kollagen Typ IV-Expression in der Läsionsstelle

Der zeitliche Verlauf der BM-Bildung in der Läsionsstelle wurde durch immunhistochemische Färbung des Gewebes mit AK gegen Coll IV, auf Paraffinschnitten von Tieren unterschiedlicher Überlebenszeitpunkte zwischen 2d und 7d pL untersucht (Abb. 15).

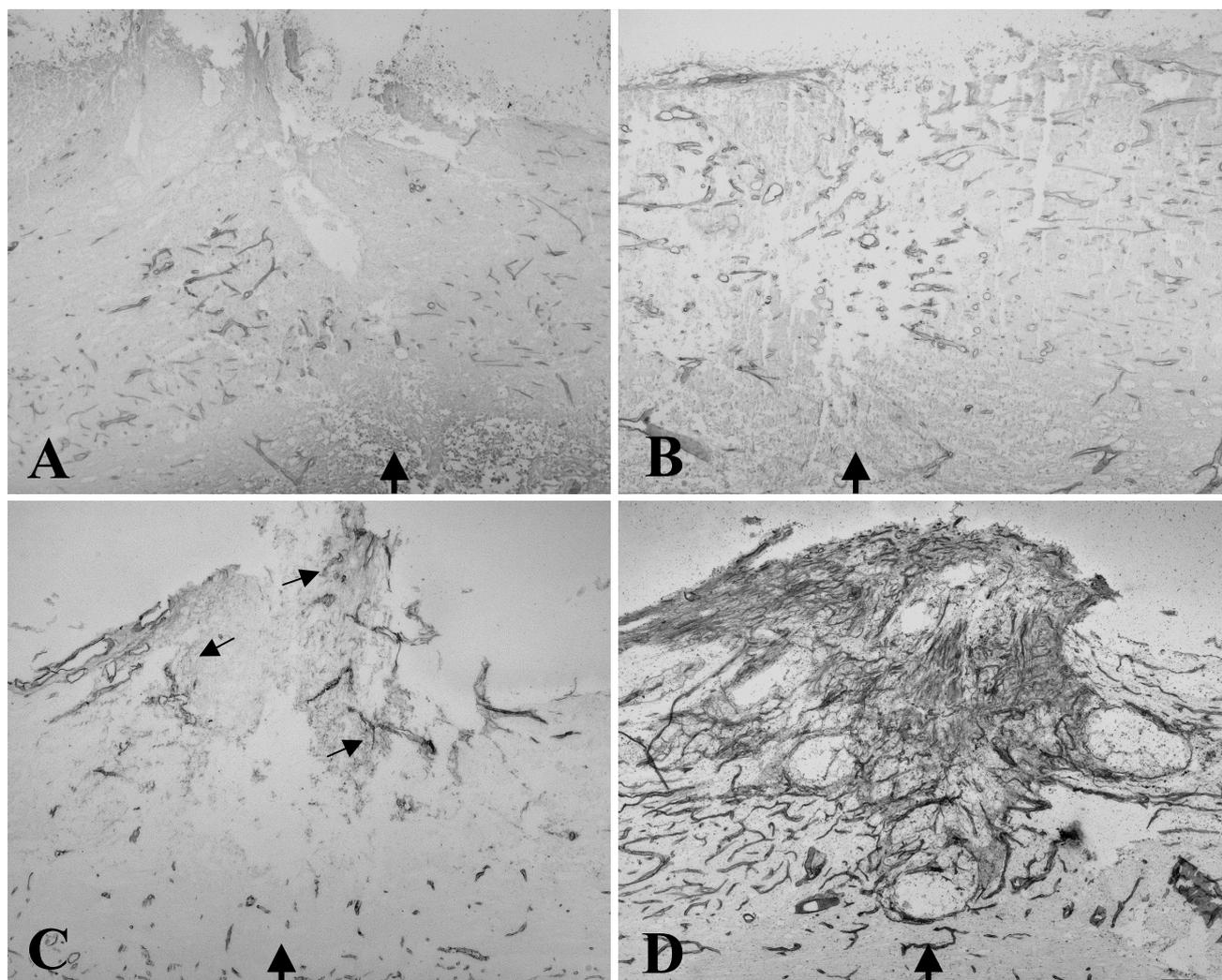


Abb. 15: Immunhistochemische Färbung gegen Coll IV auf Paraffinschnitten zu unterschiedlichen Überlebenszeitpunkten der lädierten Tiere (A-2d, B-4d, C-5d, D-7d pL). Die Pfeile markieren die Läsionsstelle, die Pfeilköpfe markieren sich entwickelnde BM-Strukturen 5d pL (C). Maßbalken in D für A-D: 100 μ m.

Nach 2 und 4d pL (Abb. 15-A+B) konnte in der Läsionsstelle noch keine tuchartige BM detektiert werden. Nach 5d pL (Abb. 15-C) bildeten sich erste tuchartige BM Strukturen, die 7d pL (Abb. 15-D) große Bereiche der Läsionsstelle ausfüllten.

Die ersten tuchartigen Basalmembranstrukturen im traumatisch verletzten Rückenmark können 5 Tage nach der Läsion immunhistochemisch nachgewiesen werden. 7 Tage nach der Läsion ist die kollagenhaltige Wundheilungsnarbe vollständig ausgebildet.

4.4 Extension der läsionsinduzierten Basalmembran im lädierten postkommissuralen Fornix und im verletzten Rückenmark der Ratte

Die rostro-caudale Extension der läsionsinduzierten BM im durchtrennten Fornix und im verletzten Rückenmark wurde anhand immunhistochemischer Färbungen gegen Coll IV 7d pL verglichen (Abb. 16).

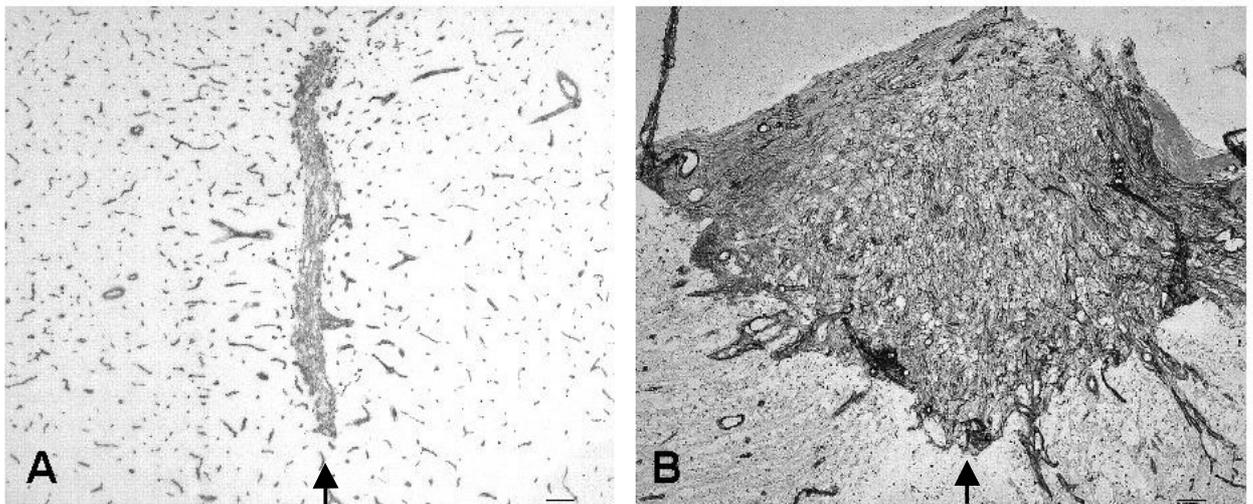


Abb. 16: Immunhistochemische Färbung gegen Coll IV auf sagittalen, frisch gefrorenen Kryostat- (A) und parasagittal geschnittenen Paraffinschnitten (B). A: Kollagenexpression nach Fornixtranssektion, B: Kollagenexpression nach Rückenmarkstranssektion. Die Pfeile markieren die Läsionsstelle. Maßbalken in A und B: 100 μ m.

Im Fornix-Transsektionsmodell bildete sich die kollagenhaltige Narbe genau in dem durch das Wolframdrahtmesser verursachten Schnittbereich aus. Die rostro-caudale Extension der Narbe betrug hier zwischen 50 und 100 μ m (Abb. 16-A). Das Coll IV-

immunopositive Areal nach Verletzung des Rückenmarks nahm erheblich mehr Raum ein, als der ursprüngliche Schnitt, der mit demselben Messer durchgeführt wurde, das auch bei der Fornixläsion verwendet wurde, erwarten ließ. Die rostro-caudale Extension der Narbe im Rückenmark erstreckte sich über 1200 bis 1800 μm (Abb. 16-B), d.h. sie war ca. 15x länger, als die im Fornix zu detektierende Narbe.

Die rostro-caudale Ausdehnung der läsionsinduzierten Wundheilungsnarbe im verletzten Rückenmark ist ca. 15x größer, als die im transsektierten Fornix.

4.5 Kollagen Typ IV-Expression in der Läsionsstelle nach 2,2'-Dipyridyl-Applikation

4.5.1 Kollagen Typ IV-Expression nach einmaliger 2,2'-Dipyridyl-Injektion

Der Effekt einer sofort nach der Läsion erfolgten BPY-Injektion wurde durch immunhistochemische Färbungen gegen Coll IV nach einer Überlebenszeit der Tiere von 7d pL untersucht (Abb. 17).

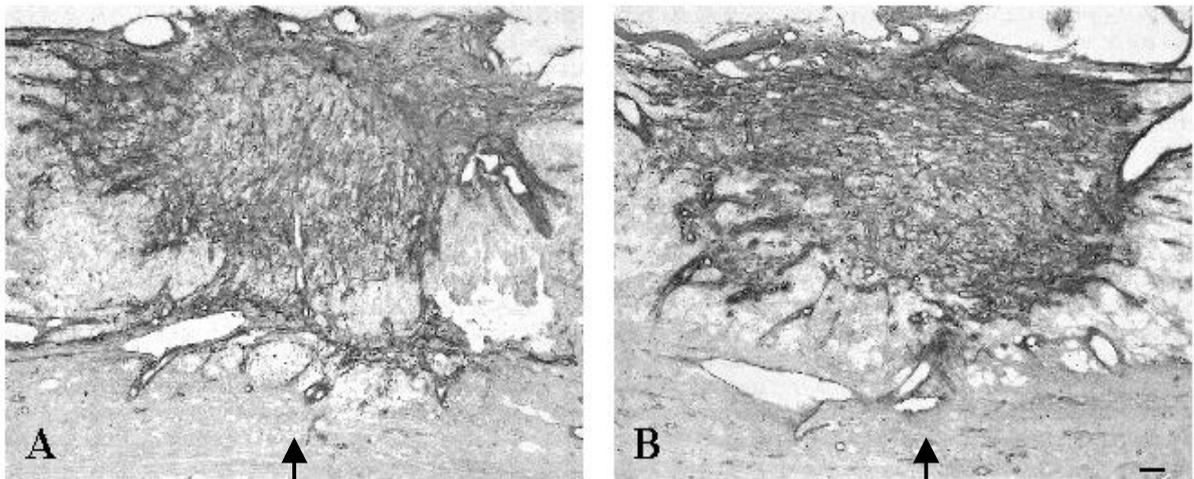


Abb. 17: Immunhistochemische Färbung gegen Coll IV auf parasagittalen Paraffinschnitten (A und B). A: Kollagenexpression nach sofortiger Vehikel-Injektion, B: Kollagenexpression nach sofortiger Injektion von 2 μl 10mM BPY. Die Pfeile markieren die Läsionsstelle. Maßbalken in B für A und B: 100 μm .

Die Coll IV-Expression in der läsionsinduzierten Narbe nach Injektion von 2µl 10 mM BPY (Abb. 17-B) war in keinem untersuchten Tier immunhistochemisch von der nach einer Vehikel-Injektion (Abb. 17-A) zu unterscheiden.

Einmalige Injektionen des Eisenchelators 2,2'-Dipyridyl unterdrücken die Ausbildung der kollagenhaltigen Wundheilungsnarbe im verletzten Rückenmark nicht.

4.5.2 Kollagen Typ IV-Expression nach kontinuierlicher 2,2'-Dipyridyl-Applikation

Der Effekt einer sofort nach der Läsion erfolgten BPY-Injektion kombiniert mit einer kontinuierlichen Applikation von BPY (i) durch Abdecken der Läsion mit BPY-getränktem Gelfoam oder (ii) durch Gabe von BPY über einen Zeitraum von 7d pL mittels osmotischen Minipumpen wurde durch immunhistochemische Färbungen gegen Coll IV nach einer Überlebenszeit der Tiere von 7d pL untersucht (Abb. 18).

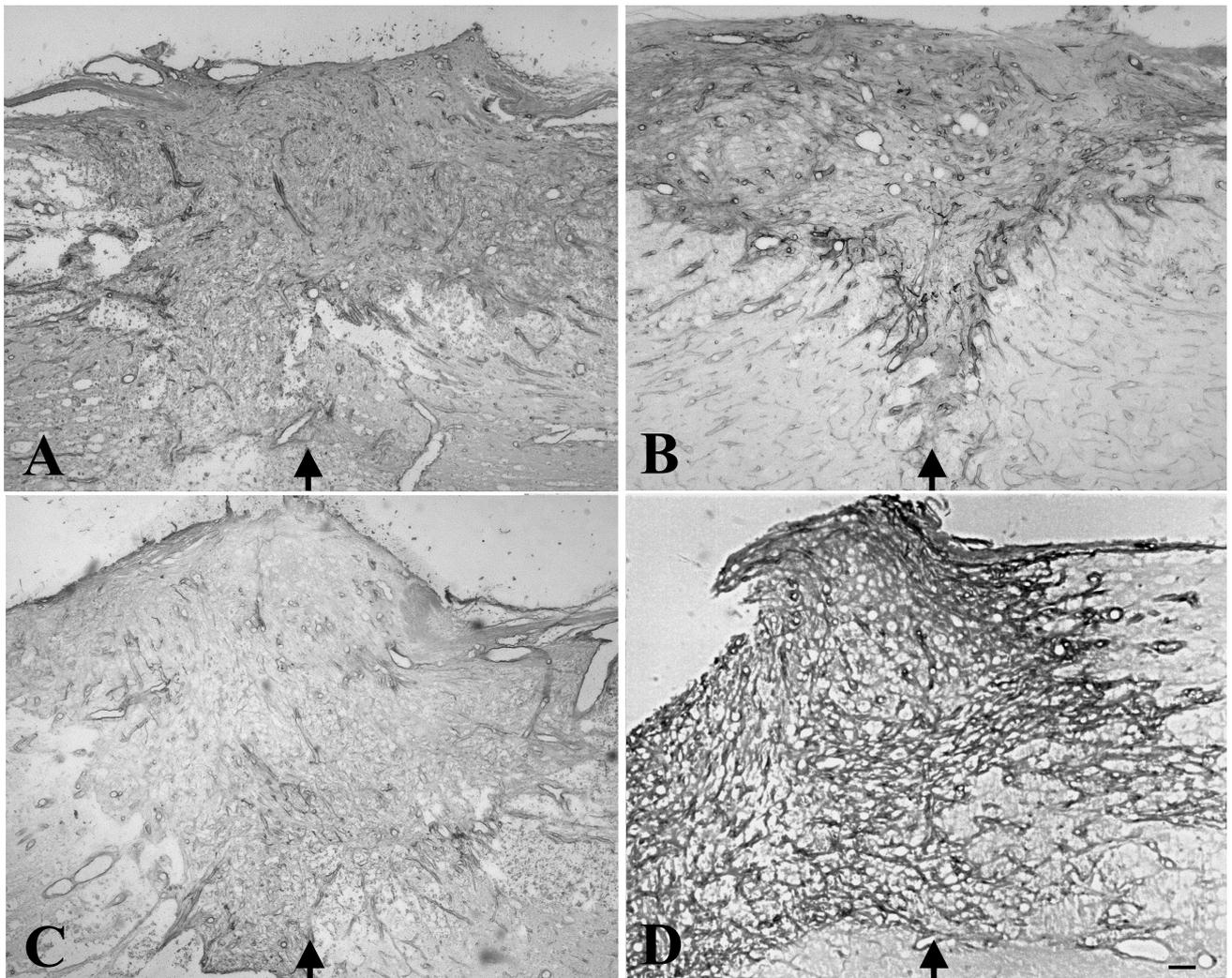


Abb. 18: Immunhistochemische Färbung gegen Coll IV auf parasagittalen Paraffinschnitten (A bis D). A: Kollagenexpression nach sofortiger Vehikel-Injektion und Abdeckung der Läsionsstelle mit vehikelgetränktem Gelfoam, B: Kollagenexpression nach sofortiger Injektion von 2µl 20mM BPY und anschließender Abdeckung der Läsionsstelle mit BPY-getränktem Gelfoam, C: Kollagenexpression nach sofortiger Vehikel-Injektion und kontinuierlicher Vehikelapplikation durch eine osmotische Minipumpe (Alzet 2001), D: Kollagenexpression nach sofortiger Injektion von 2µl 40mM BPY und kontinuierlicher BPY-Applikation durch eine osmotische Minipumpe (Alzet 2001). Maßbalken in D für A-D: 100µm.

Sowohl bei den Tieren, die BPY durch Gelfoam erhielten (Abb. 18-B), als auch bei den Tieren bei denen eine kontinuierliche Applikation von BPY durch osmotische Minipumpen erfolgte (Abb. 18-D), konnte keine deutliche Reduktion der läsionsinduzierten BM, verglichen mit den vehikelbehandelten Tieren (Abb. 18-A+C), festgestellt werden.

Kontinuierliche Applikation des Eisenchelators 2,2'-Dipyridyl durch substanzgetränkten Gelfoam oder durch osmotische Minipumpen führt nicht zur Unterdrückung der läsionsinduzierten Wundheilungsnarbe im verletzten Rückenmark.

4.6 Kollagen Typ IV-Expression in der Läsionsstelle nach Kombinationsbehandlung

Der Effekt von (i) einmaligen, sofortigen BPY-DCA Injektionen (2 μ l), kombiniert mit 8-Br-cAMP-Gabe und Abdeckung der Läsion mit BPY-DCA beladenem Elvax, sowie (ii) 6 sofortigen Injektionen von BPY-DCA in die Läsionsstelle, kombiniert mit 8-Br-cAMP-Gabe und einer kontinuierlichen Applikation von BPY-DCA durch Abdecken der Läsionsstelle mit BPY-beladenem Elvax wurde durch immunhistochemische Färbungen gegen Coll IV nach einer Überlebenszeit der Tiere von 7d pL untersucht (Abb. 19).

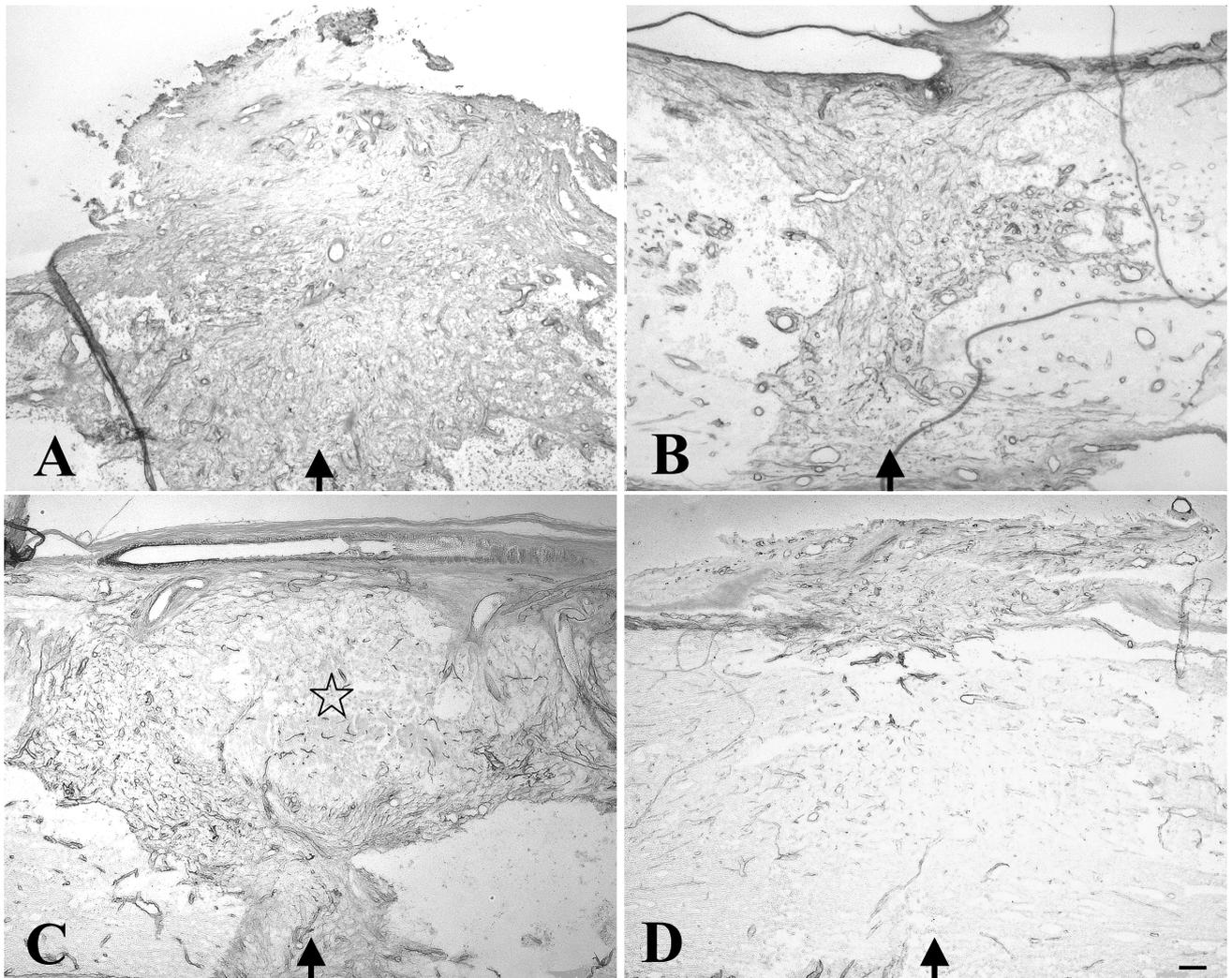


Abb. 19: Immunohistochemische Färbung gegen Coll IV auf parasagittalen Paraffinschnitten (A bis D). A: Kollagenexpression nach sofortiger Vehikel-Injektion und Abdeckung der Läsionsstelle mit vehikelbeladenem Elvax, B: Kollagenexpression nach sofortiger Vehikel-Injektion, Gabe von 8-Br-cAMP und Abdeckung der Läsionsstelle mit vehikelbeladenem Elvax, C: Kollagenexpression nach einmaliger, sofortiger Injektion von 2µl 40mM BPY-DCA, Gabe von 8-Br-cAMP und anschließender Abdeckung der Läsionsstelle mit BPY-DCA beladenem Elvax, D: Kollagenexpression nach 6 sofortigen Injektionen von je 0,2µl 40mM BPY-DCA, Gabe von 8-Br-cAMP und anschließender Abdeckung der Läsionsstelle mit BPY-DCA beladenem Elvax. Die Pfeile markieren die Läsionsstelle. Der Stern in C markiert das Areal in dem die BM durch einmalige Injektion von BPY-DCA reduziert wurde. Maßbalken in D für A-D: 100µm.

Die Kontrollen, die nur Vehikel bzw. Vehikel und kristallines 8-Br-cAMP erhielten wiesen keine BM-Reduktion in der Läsionsstelle auf (Abb. 19-A+B). Eine einmalige Injektion von BPY-DCA kombiniert mit 8-Br-cAMP und BPY-DCA beladenem Elvax führte zu einer partiellen Reduktion der läsionsinduzierten BM (Abb. 19-C, Stern). Erst mehrfache Injektionen von BPY-DCA kombiniert mit 8-Br-cAMP und

BPY-DCA beladenem Elvax führten zu einer kompletten BM Reduktion im Läsionsgebiet (Abb. 19-D).

Die Ausbildung der läsionsinduzierten Basalmembran im verletzten Rückenmark der Ratte kann durch mehrfache Injektionen des Eisenchelators 5,5'-Dicarboxy-2,2'-Dipyridyl in Verbindung mit kontinuierlicher Gabe der Substanz durch substanzbeladene Elvax-Polymere und unter zusätzlicher Hemmung der Proliferationsrate und Extrazellulärmatrixproduktion von Fibroblasten durch 8-Br-cAMP unterdrückt werden.

4.7 Zeitverlauf der Basalmembran-Reduktion nach Kombinationsbehandlung

Der zeitliche Verlauf der BM-Reduktion in der Läsionsstelle wurde durch immunhistochemische Färbung des Gewebes mit AK gegen Coll IV, auf Paraffinschnitten kombinationsbehandelter Tiere unterschiedlicher Überlebenszeitpunkte zwischen 7d und 14d pL untersucht (Abb. 20).

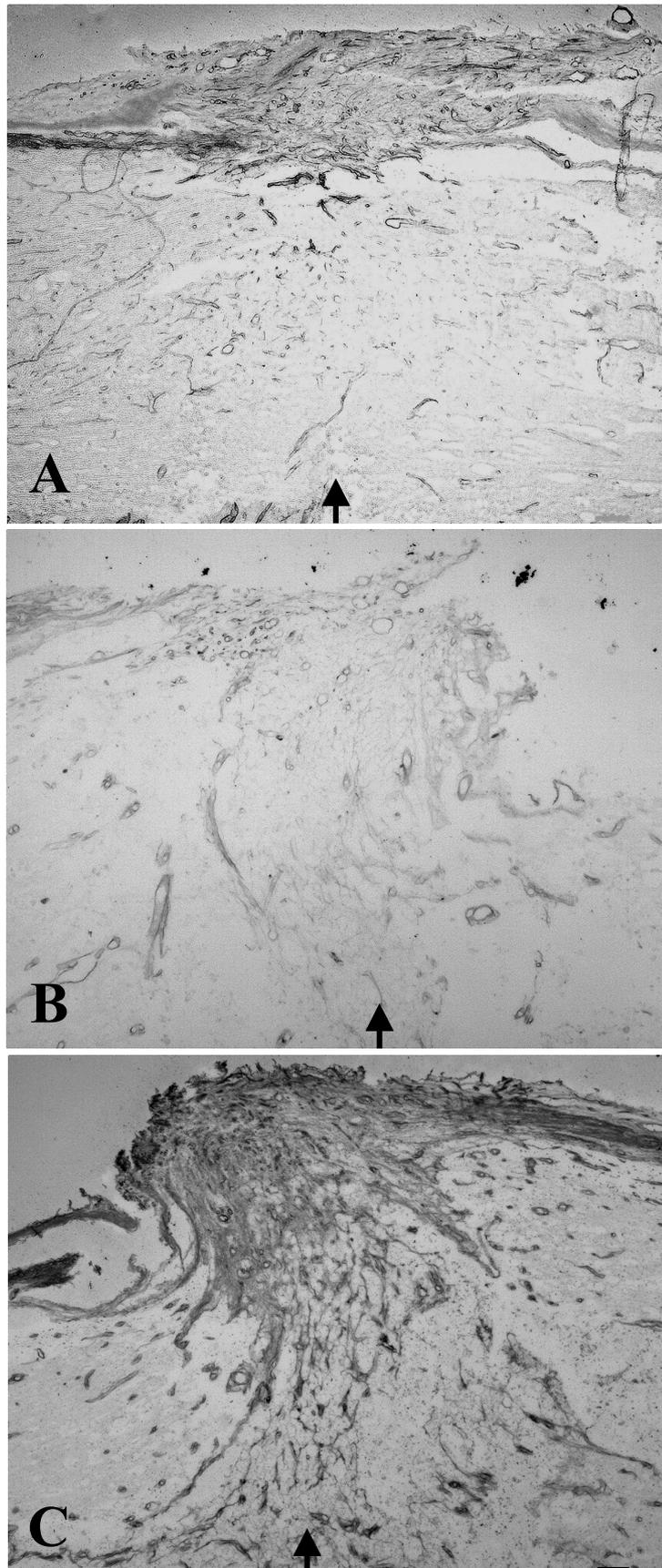


Abb. 20: Immunohistochemische Färbung gegen Coll IV auf Paraffinschnitten zu unterschiedlichen Überlebenszeitpunkten der lädierten und kombinationsbehandelten Tiere (A-7d, B-12d, C-14d pL). Die Pfeile markieren die Läsionsstelle. Maßbalken in C für A-C: 100 μ m.

Durch die Kombinationsbehandlung, bestehend aus 6 sofortigen Injektionen des Eisenchelators BPY-DCA (30 mM), der Gabe von kristallinem 8-Br-cAMP in die Läsionsstelle und der Abdeckung der Läsionsstelle mit BPY-DCA beladenem Elvax (90 mM), konnte eine transiente Reduktion der läsionsinduzierten BM bis zu 12d pL erzielt werden (Abb. 20-B). Nach 14d pL kam es jedoch in allen untersuchten Tieren zu einer Re-expression der tuchartigen BM-Strukturen im Läsionsgebiet (Abb. 20-C).

Durch die Kombinationsbehandlung aus mehrfachen Injektionen des Eisenchelators 5,5'-Dicarboxy-2,2'-Dipyridyl in Verbindung mit kontinuierlicher Gabe der Substanz durch substanzbeladene Elvax-Polymere und unter zusätzlicher Hemmung der Proliferationsrate und Extrazellulärmatrixproduktion von Fibroblasten durch 8-Br-cAMP kann die Ausbildung der kollagenhaltigen Wundheilungsnarbe für einen Zeitraum von ca. 12 Tagen transient unterdrückt werden. Die Narbe bildet sich nach 14 Tagen wieder aus.

4.8 Auswirkungen der Basalmembran-Reduktion auf den verletzten Kortikospinaltrakt

Um die Verteilung kortikospinaler Fasern in den verschiedenen Versuchsgruppen schematisch darzustellen wurden exemplarisch NeuroLucida-Rekonstruktionen von je 4 aufeinanderfolgenden 10 µm-dicken Paraffinschnitten hergestellt. Der CST wurde in diesen Tieren durch BDA-Injektionen in den Sensorimotorkortex markiert und histochemisch durch die ABC-Komplex Methode dargestellt (Abb. 21). Die Schnitte wurden, um sie miteinander vergleichen zu können, aus der Region der proximalen kortikospinalen Endigungen ausgewählt.

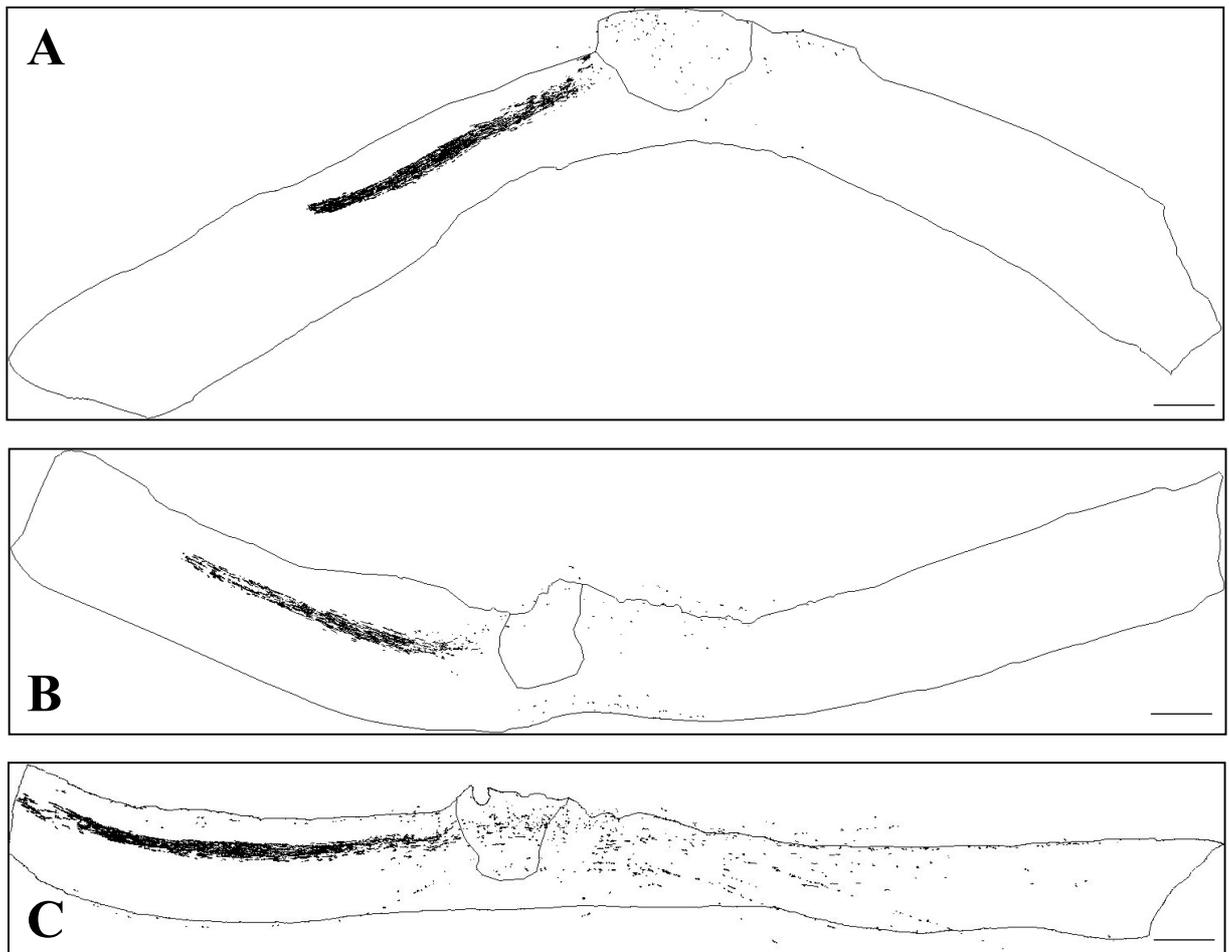


Abb. 21: NeuroLucida-Rekonstruktionen des BDA-markierten CST von je 4 konsekutiven Gewebeschnitten (10 μ m) eines vehikelbehandelten Kontrolltiers (A), eines Vehikel- und cAMP-behandelten Kontrolltiers (B) und eines kombinationsbehandelten Tiers (C). Die Fasern außerhalb der Begrenzungen des Rückenmarks repräsentieren submeningeal wachsende Fasern. Maßbalken in A-C: 1mm.

In vehikelbehandelten sowie in Vehikel- und cAMP-behandelten Kontrolltieren (Abb. 21-A+B) wuchsen wenige Fasern in die Läsionsstelle ein. In Vehikel- und cAMP-behandelten Kontrolltieren (Abb. 21-B) konnten mehr submeningeal wachsende Fasern als in nur vehikelbehandelten Tieren (Abb. 21-A) detektiert werden. In komplett behandelten Tieren wuchsen etliche CST-Fasern sowohl in die Läsionsstelle (Abb. 22-A+B), als auch in den distalen Teil (Abb. 22-C+D) des Rückenmarks ein (siehe auch Abb. 21-C). Regenerierende Fasern konnten bis zu 1,8 cm distal der proximalen kortikospinalen Endigungen nachgewiesen werden. Es besteht die Möglichkeit, daß einige Fasern noch über weitere Distanzen regenerierten. Größere Präparate wurden jedoch nicht untersucht.

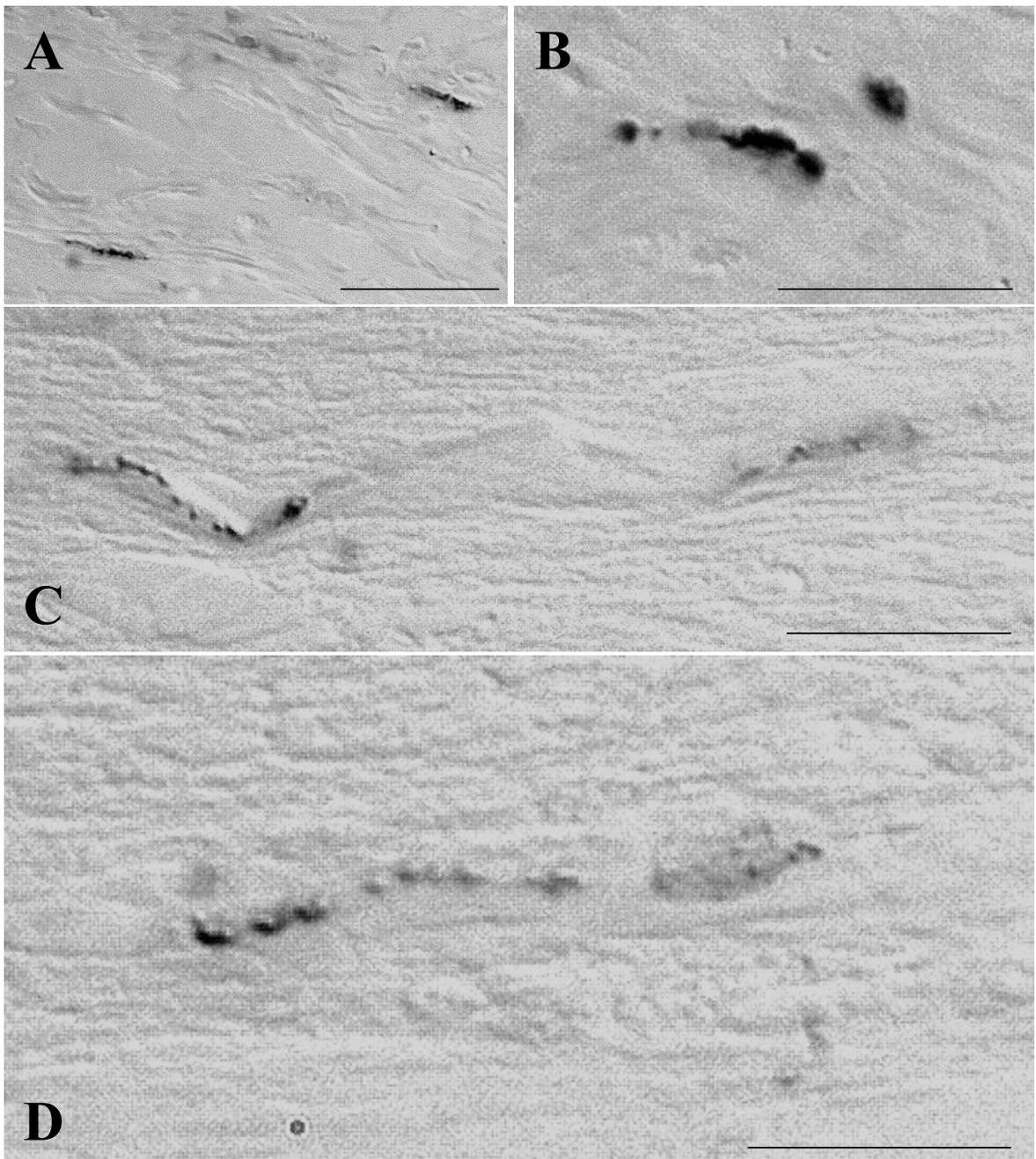


Abb. 22: Fotografien BDA-markierter, regenerierender kortikospinaler Fasern. A+B: regenerierende Fasern in der Läsionsstelle, C+D: regenerierende Fasern 10 (C) und 12 mm (D) distal der Läsionsstelle. Maßbalken in A-D: 50 μm

In kombinationsbehandelten Tieren und Vehikel- und cAMP-behandelten Kontrolltieren wuchsen etliche der regenerierenden kortikospinalen Fasern subdural oder subpial. Um zu bestätigen, daß es sich hierbei nicht um einen Färbeartefakt handelt, wurden fluoreszente Doppelmarkierungen gegen BDA (CST-Fasern) und Neurofilament (alle Fasern) durchgeführt. Diese wurden, um unspezifische Überlagerungen der Fluoreszenzfarbstoffe auszuschließen, an einem konfokalen Laserscanmikroskop analysiert (Abb. 23).

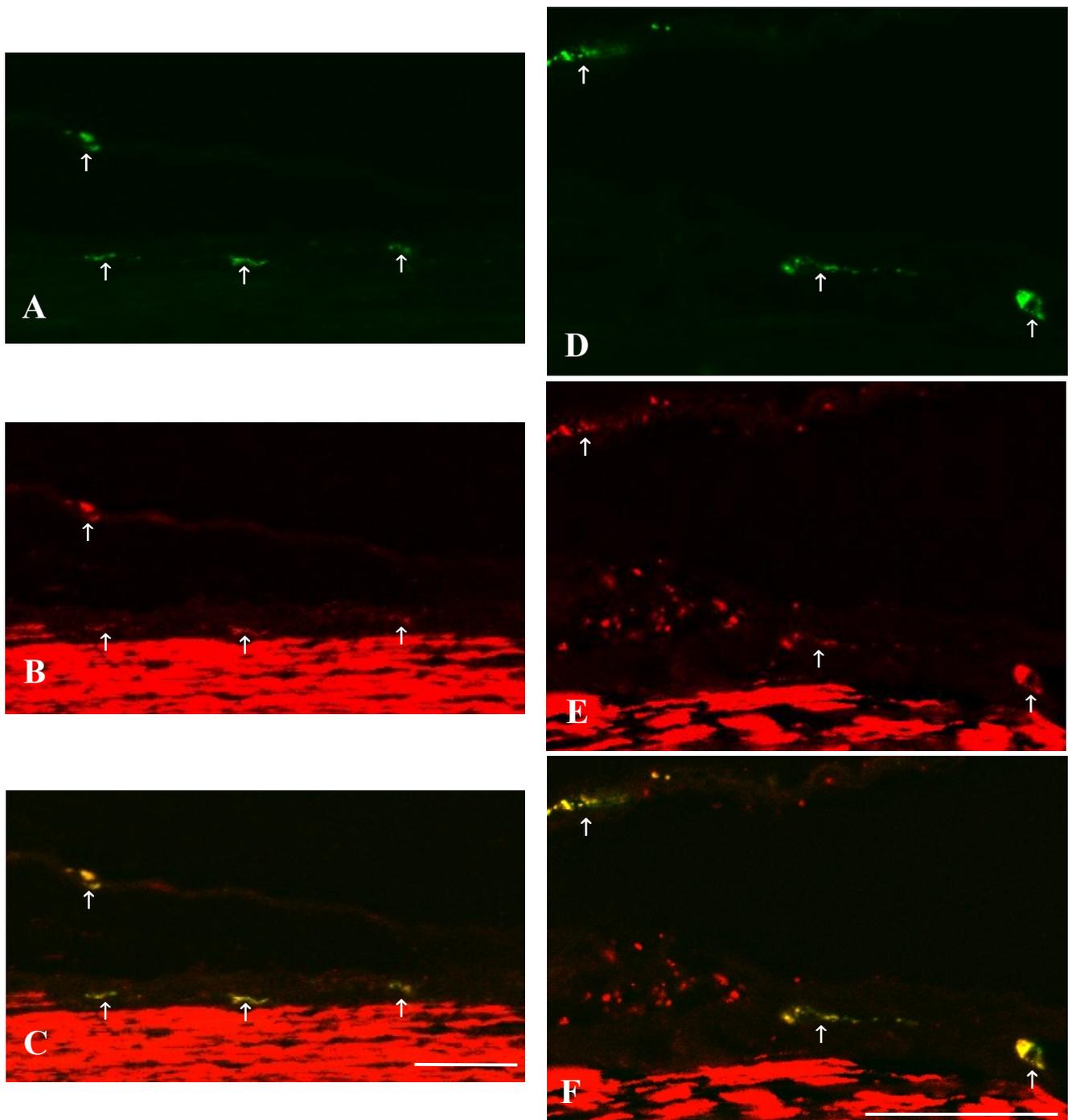


Abb. 23: Konfokale Aufnahmen fluoreszenter Doppelmarkierungen distal der Läsionsstelle. Regenerierende CST-Fasern wachsen subdural bzw. subpial. A+D: BDA-markierte CST-Fasern (grün), B+E: Axone, markiert mit PAM-AK (rot), C+F: Kolokalisation von A+B und D+E (räumlich übereinstimmende Strukturen erscheinen gelb). Maßbalken in C für A-C: 100 μ m; Maßbalken in F für D-F: 100 μ m.

Die markierten Fasern, die nicht im Gewebe zu liegen scheinen, waren mit der Dura mater assoziiert, die sich während der Gewebeprozessierung vom Schnitt abgelöst hatte. Die fluoreszente Alexa 488-Markierung des Tracers BDA (Abb. 23-A+D)

kolokalisierte (Abb. 23-C+F) mit der Cy3-Färbung gegen Neurofilament (Abb. 23-B+E).

Die transiente Unterdrückung der läsionsinduzierten Basalmembran führt zu einem Einwachsen kortikospinaler Fasern in die Läsionsstelle und zu deren Elongation bis zu 1,8 cm distal der proximalen kortikospinalen Endigungen. Etliche der regenerierenden Fasern wachsen entlang der Meningen.

5 Diskussion

5.1 Detektion der Basalmembranexpression im verletzten Rückenmark der Ratte

Im Transsektionsmodell des postkommissuralen Fornix konnte die läsionsinduzierte BM ohne weiteres in frisch gefrorenen Schnitten detektiert werden (Stichel et al., 1999a), siehe auch Abb. 16-A). Nach Transsektion des Rückenmarks jedoch konnte in frisch gefrorenem Gewebe die BM-Expression in der Läsionsstelle immunhistochemisch nicht nachgewiesen werden. Die fragile BM-Struktur wurde z.T. bereits während des Auffrierens der Gewebeschnitte, z.T. während der immunhistochemischen Färbung ausgewaschen. Die Färbung selbst konnte als spezifisch betrachtet werden, da die BM der Blutgefäße eine positive Coll IV-Immunreaktivität zeigten (Abb. 13-A, kleine Pfeile).

Perfundierte Kryostatschnitte zeigten eine massive Coll IV-Expression in der Läsionsstelle, die BM der Blutgefäße war jedoch nicht detektierbar (Abb. 13-B). Dieses immunhistochemische Erscheinungsbild war auf eine Maskierung der Antigene durch das Fixativ zurückzuführen. Nach PFA-Fixierung kommt es häufig zu einer Quervernetzung von Aminosäureresten mit den Aldehydgruppen des Fixativs. Diese Quervernetzungen verhindern sterisch, daß spezifische AK an die Proteinepitope, gegen die sie gerichtet sind, binden. Die Mechanismen der verschiedenen Antigen-Demaskierungsprotokolle sind bisher nicht geklärt (Ezaki, 2000). Daß die Läsionsstelle selbst immunopositiv für Coll IV erschien, lag zum Teil daran, daß, die Durchblutung der Schnittstelle läsionsbedingt gestört war und bei der Perfusion nicht gleichmäßig mit PFA durchspült wurde. Zum Anderen war anzunehmen, daß die Coll IV-Expression in einer frischen Narbe hochreguliert wurde, d.h. das immunhistochemische Detektionslevel erhöht war. Da die frei-flottierenden Gewebeschnitte keiner Antigen-Demaskierungsprozedur zugänglich waren, ohne daß der Gewebeerhalt übermäßig gelitten hätte, schied diese Art der Gewebeprozessierung zur Detektion der läsionsinduzierten BM aus. Darüber hinaus war der Gewebeerhalt dieser Schnitte selbst ohne Antigen-Demaskierungsprozeduren nicht in allen Fällen zufriedenstellend. Oftmals wurde ein Gewebeverlust an der Läsionsstelle beobachtet (Abb. 13-B, weißer Blockpfeil).

Paraffinschnitte zeigten ohne Antigen-Demaskierungsprozedur dasselbe immunhistochemische Färbefeld wie perfundierte Kryostatschnitte. Eine Antigen-Demaskierung in der Mikrowelle beeinträchtigte den Gewebeerhalt in der Läsionsstelle auch auf Paraffinschnitten stark (Daten nicht gezeigt). Durch die stabilisierenden Eigenschaften des Paraffins konnten die Schnitte aber enzymatischen Verdau für 8 min bei 37°C ausgesetzt werden, ohne daß das Gewebe oder die Läsionsstelle unter der Behandlung litten. Die besten Färbeergebnisse lieferte eine Antigen-Demaskierung mit 0,05%iger Protease XXIV in Tris-Puffer (Abb. 13-C). Die vermutete Wirkungsweise einer Antigen-Demaskierung durch enzymatischen Verdau, besteht in einem Abbau, der für eine AK-Bindung sterisch hinderlicher Protein-Aldehyd Quervernetzungen (Ezaki, 2000). Nach einer solchen Behandlung des Gewebes konnten sowohl die BM der Blutgefäße, als auch die Coll IV immunopositive Wundheilungsnarbe korrekt dargestellt werden. Dies ist im Besonderen von Bedeutung, wenn man eine Verminderung der Proteinexpression immunhistochemisch darstellen will. Da immunhistochemische Färbungen unterschiedliche stark ausfallen können, ist es von Vorteil im Präparat eine interne Kontrolle der Färbeintensität (in diesem Fall Blutgefäße) zu erhalten (siehe auch Hermanns und Müller, 2001a).

5.2 Expression basalmembran-spezifischer Proteine in der Narbe

In der Läsionsstelle kommt es nach der Verletzung zunächst zu einem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke. Nach einiger Zeit bildet sich aber die verletzungsbedingte Wundheilungsnarbe aus und in dem verletzten Areal werden neue Blutgefäße gebildet (Imperato-Kalmar et al., 1997). Neben der Angiogeneese bildet sich aber auch eine Coll IV-immunopositive, tuchartige Struktur aus, die nicht an Blutgefäße assoziiert ist. Eine Möglichkeit, diese Struktur als BM zu identifizieren, besteht in deren ultrastruktureller Untersuchung mit Hilfe eines Elektronenmikroskops. Feringa et al. wiesen Anfang der 80er Jahre elektronenmikroskopisch nach, daß die Stümpfe des Rückenmarks nach einer Totaltranssektion von BM umschlossen sind (Feringa et al., 1980). BM sind nun aber auf Proteinebene gut charakterisierte Matrices, daher kann auch ohne aufwändige ultrastrukturelle Untersuchungen gezeigt werden, daß bestimmte, BM-spezifische Proteine exprimiert werden. Aus diesem Grund wurde im folgenden Abschnitt

untersucht, ob typische, für BM beschriebene Proteine (Yurchenco und Schittny, 1990, Aumailley und Gayraud, 1998), sich in der tuchartigen Struktur der läsionsinduzierten Wundheilungsnarbe nachweisen lassen. In aufeinanderfolgenden Serienschritten konnten die BM-spezifischen Proteine LN, Coll IV und Nidogen nicht nur in Blutgefäßen, sondern auch in den läsionsinduzierten, tuchartigen Strukturen in der Verletzungsstelle in aufeinanderfolgenden Serienschritten nachgewiesen werden. Die Expressionsmuster der untersuchten Proteine waren lichtmikroskopisch nicht voneinander zu unterscheiden (Abb. 14-A-C). Ein Folgeschnitt, der gegen von Willebrandt Faktor, einen Faktor der Blutgerinnungskaskade gefärbt wurde, zeigt eine deutliche Blutgefäßfärbung, nicht aber eine Markierung der tuchartigen Strukturen (Abb. 14-D). Diese Ergebnisse bestätigten, daß sich nach traumatischer Verletzung des ZNS innerhalb der fibrösen Wundheilungsnarbe BM ausbilden, die nicht an Blutgefäße assoziiert sind.

5.3 Zeitlicher Verlauf der Narbenbildung im traumatisch lädierten Rückenmark der Ratte

Um Hinweise auf ein mögliches therapeutisches Fenster zur Reduktion der BM-Expression im verletzten Rückenmark der Ratte zu erhalten, wurde der zeitliche Verlauf der Narbenbildung nach Verletzung immunhistochemisch untersucht. Im Modell des transektierten postkommissuralen Fornix begann sich die BM am Tag 4 pL auszubilden. Die pharmakologische Reduktion der läsionsinduzierten Narbe zeigte auch dann noch einen positiven Einfluß auf die Regeneration der transektierten Fasern, wenn die Behandlung erst 3 Tage pL erfolgte (Stichel et al., 1999b). Im transektierten Rückenmark sind bisher noch keine Experimente durchgeführt worden, die eine spätere Applikation der Behandlung beinhalten. Die läsionsinduzierte BM begann sich im verletzten Rückenmark jedoch erst am fünften Tag nach der Transsektion auszubilden (Abb. 15-C). Unter Einbeziehung der im Fornixmodell gewonnenen Daten läßt dies die Vermutung zu, daß eine Behandlung zur Reduktion der kollagenhaltigen Wundheilungsnarbe nicht unmittelbar nach der Verletzung eingeleitet werden muß. Auch wenn 5 d pL bereits alle Mechanismen der Kollagenproduktion in Gang gesetzt wurden, so kann doch von einem Zeitfenster von mindestens 2 Tagen nach Verletzung zum Beginn einer Behandlung zur BM-Reduktion ausgegangen werden. Diese Ergebnisse lassen die

Kombinationsbehandlung zur Reduktion der Wundheilungsnarbe zu einer potentiell klinisch anwendbaren Therapie werden.

5.4 Räumliche Ausdehnung der läsionsinduzierten Narbe im durchtrennten Rückenmark der Ratte

Nach der Transsektion des postkommissuralen Fornix bildete sich exakt in der Schnittstelle die das Wolfrahmdrahtmesser hinterlassen hatte, eine Wundheilungsnarbe mit einer rostro-caudalen Extension von 50-100 μm aus (Stichel et al., 1999a, siehe auch Abb. 16-A). Die rostro-caudale Ausdehnung der Narbe im Rückenmark war in allen untersuchten Tieren 12-18x so groß verglichen mit der im Fornix (Abb. 16-B). Die Ursache für diesen Unterschied in der BM-Expression ist vermutlich in der räumlichen Nähe der Rückenmarksläsion zu den Hirnhäuten zu suchen. Nach Verletzungen des Zentralnervensystems bei denen die Meningen verletzt werden, wandern Fibroblasten und meningeale Zellen in den Verletzungsbereich ein und sezernieren BM-Proteine, vermutlich um bei der Wiederherstellung der Basallamina der Blut-Hirn-Schranke mitzuwirken (Carbonell und Boya, 1988). Von migrierenden Fibroblasten ist bekannt, daß sie eine Vielzahl von EZM-Proteinen sezernieren (Halfter et al., 1990). Darüber hinaus exprimieren Fibroblasten große Mengen Kollagen IV, III, V und VI (Eckes et al., 2000). Die Fornixläsion wurde in tiefgelegenen Gebieten des Gehirns durchgeführt, was zur Folge hatte, daß wenige Fibroblasten bzw. meningeale Zellen in den Läsionsort einwandern konnten. Im Rückenmark war die Nähe der Verletzung zu den das ZNS umgebenden Hirnhäuten also vorrangig für die große Ausdehnung der Kollagen IV-immunopositiven BM verantwortlich.

5.5 Kollagen Typ IV-Expression in der Läsionsstelle nach 2,2'-Dipyridyl-Applikation

Im Rückenmark konnte nach einer einmaligen BPY Injektion, anders als im Modell des durchtrennten postkommissuralen Fornix, keine Reduktion der läsionsinduzierten Narbe erzielt werden (Abb. 17-B). Dieses Ergebnis hängt eng mit der Ausdehnung der Coll IV-immunopositiven Narbe im Rückenmark zusammen. Die inhibitorische Konzentration, bei der 50% der PH-Aktivität geblockt werden (IC_{50}) des BPY liegt bei 34,2 μM (Hales und Beattie, 1993). Offenbar ist diese Aktivität nicht

ausreichend, um die Expression sehr großer Mengen Coll IV in der größtmöglichen wasserlöslichen Konzentration (40mM) zu inhibieren. Dafür spricht auch, daß die einmalige Injektion des aktiveren PH-Inhibitors BPY-DCA (IC_{50} : 0,185 μ M, Hales und Beattie, 1993), kombiniert mit einer kontinuierlichen Gabe des Inhibitors mit Hilfe von substanzbeladenen Elvax-Polymeren, nur zu einer partiellen Reduktion der läsionsinduzierten BM führte (Abb. 19-C). Anders als von Weidner et al. 1999 beschrieben, kommt es also nach Applikation von BPY zu keiner Reduktion der läsionsinduzierten BM (Weidner et al., 1999). In der zitierten Arbeit wurden frei-flottierende Kryostatschnitte verwendet, in denen sich die Reduktion der Coll IV-immunopositiven Narbe nicht korrekt beurteilen ließ (siehe 5.1). Mehr noch, selbst bei kontinuierlicher Applikation des BPY durch substanzgetränkten Gelfoam oder osmotische Minipumpen konnte die Coll IV-Expression in der Läsionsstelle nicht reduziert werden (Abb 18-B+D). Die kontinuierliche Applikation des BPY durch Gelfoam und osmotische Minipumpen führte oft sogar zu einer stärkeren Coll IV-Expression in der Läsion. Grund hierfür ist sicherlich zum Einen die Tatsache, daß Gelfoam Fibroblasten anzieht (Angabe des Herstellers) und so zu einer Akkumulation dieser kollagenproduzierenden Zellen im Läsionsgebiet führt, und zum Anderen die Form der Applikation des BPY durch die osmotischen Minipumpen. Der Schlauch der an die Minipumpe angeschlossen war, wurde über der Läsion plaziert (Abb. 7). Es besteht die Möglichkeit, daß dieser die Oberfläche des Rückenmarks ständig, durch die Bewegungen der Tiere hervorgerufen, mechanisch verletzte und so den Wundheilungsprozess immer wieder neu in Gang setzte. Für diese Annahme spricht auch der Befund, daß die fibröse Wundheilungsnarbe in den so behandelten Tieren in vielen Fällen stärker als normal ausgeprägt war (Abb. 18-D).

5.6 Kollagen Typ IV-Expression in der Läsionsstelle nach Kombinationsbehandlung

Da die Gabe von BPY nicht ausreichte um die massive läsionsinduzierte Coll IV-immunopositive BM nach einer Verletzung des Rückenmarks zu unterdrücken, wurde zunächst nach einem potenteren Inhibitor der PH gesucht. Literaturdaten wiesen darauf hin, daß disubstituierte Dipyridyle eine effektivere Inhibition der PH erzielten, als BPY. Da diese Substanzen nicht kommerziell erhältlich waren,

synthetisierten Mitarbeiter des Instituts für Organische Chemie II der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf (siehe auch 3.2.1) ein 5,5'-disubstituiertes Derivat des BPY (BPY-DCA, IC_{50} : 0,185 μ M, (Hales und Beattie, 1993) nach einer Vorschrift von Case (Case, 1946). Wie im vorangehenden Abschnitt bereits beschrieben, führte auch eine einmalige Injektion dieses potenteren PH-Inhibitors, kombiniert mit einer kontinuierlichen Gabe des Inhibitors mit Hilfe von substanzbeladenen Elvax-Polymeren, nur zu einer partiellen Reduktion der läsionsinduzierten BM im verletzten Rückenmark (Abb. 19-C). Auch die kontinuierliche Applikation dieses PH-Inhibitors mittels osmotischer Minipumpen führte zu keiner signifikanten Reduktion der Coll IV-immunopositiven Narbe (Daten nicht gezeigt). Die Narbenbildung war so massiv, daß es nötig erschien, die Coll IV-Expression der kollagenproduzierenden Zellen selbst zu beeinflussen. Wie bereits unter 1.6.4.1 beschrieben, bestand eine Möglichkeit darin, die TGF β -vermittelte Proliferation und EZM-Produktion von Fibroblasten durch eine Erhöhung ihres intrazellulären cAMP Spiegels zu reduzieren. Zu diesem Zweck wurde membrangängiges, kristallines 8-Br-cAMP, zusätzlich zur Applikation des PH-Inhibitors BPY-DCA, in und auf die Läsionsstelle gegeben. Die behandelten Tiere erhielten also in Kombination 6 sofortige BPY-DCA Injektionen und 8-Br-cAMP. Abschließend wurde die Läsionsstelle mit einem Elvax-Polymer abgedeckt, das BPY-DCA enthielt, um eine kontinuierliche, gewebeschonende Applikation des PH-Inhibitors zu gewährleisten. Erst diese Kombinationsbehandlung führte zu einer reproduzierbaren, signifikanten Reduktion der läsionsinduzierten BM im verletzten Rückenmark (Abb. 19-D).

5.7 Zeitverlauf der Basalmembran-Reduktion nach Kombinationsbehandlung

Die Injektion von BPY führte im Läsionsmodell des durchtrennten postkommissuralen Fornix zu einer transienten Reduktion der Läsionsnarbe, d.h. die BM bildete sich 14 d nach Behandlung erneut aus (unveröffentlichte Beobachtung). Dieses Zeitfenster reichte aber offenbar verletzten Fornixfasern zur Regeneration. Um das Zeitfenster der BM-Reduktion in kombinationsbehandelten Tieren zu untersuchen, wurde die Coll IV-Expression in der Läsionsstelle zu den Überlebenszeitpunkten 7, 12 und 14 d nach der Läsion untersucht. Eine Reduktion der Coll IV-immunopositiven Wundheilungsnarbe konnte bis zu 12 d nach Läsion beobachtet werden (Abb. 20-B). Nach 14 d wurden in allen untersuchten Tieren Coll

IV-immunopositive, tuchartige BM-Strukturen detektiert (Abb. 20-C). Diese Ergebnisse zeigen, daß auch die durch Kombinationsbehandlung erzielte Reduktion der läsionsinduzierten BM von transienter Natur ist. Die Wiederausbildung der Narbe in der Läsionsstelle ist sicherlich von Vorteil mit Hinblick auf die Wiederherstellung der Blut-Hirn-Schranke und unter allgemeinen Aspekten des Wundverschlusses. Die Frage die sich aber stellte war, ob ein Zeitfenster von 12 Tagen ausreicht um eine Regeneration kortikospinaler Fasern zu ermöglichen. Wie im weiteren noch ausgeführt wird, reicht dieser Zeitraum tatsächlich aus, um einige kortikospinale Fasern durch die Läsionsstelle wachsen zu lassen. Ob sich die Anzahl dieser Fasern erhöhen ließe wenn die Narbe für einen längeren Zeitraum unterdrückt bliebe, muß in weiteren Versuchen geklärt werden.

5.8 Auswirkungen der Basalmembran-Reduktion auf den verletzten Kortikospinaltrakt

Wie bereits angesprochen wurde, reichte die Unterdrückung der Narbe für 12 d aus, einigen kortikospinalen Fasern die Regeneration über die Läsionsstelle hinaus zu ermöglichen. Abb. 21 zeigt die NeuroLucida Rekonstruktionen BDA-markierter, kortikospinaler Fasern in einem vehikelbehandelten Kontrolltier, einem vehikelbehandelten Tier das cAMP erhielt und einem kombinationsbehandelten Tier. In dem vehikelbehandelten Tier wuchsen wenige Fasern in die Läsionsstelle ein, die jedoch nicht in der Lage waren, die Narbe zu überwinden. Ähnlich stellte sich auch die Verteilung der Fasern in dem Kontrolltier das cAMP erhielt dar. Wenige Fasern wuchsen in die Läsionsstelle ein, eine Elongation dieser Fasern in den distalen Bereich des Rückenmarks konnte aber nicht beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigte das untersuchte kombinationsbehandelte Tier etliche kortikospinale Fasern, die in die Läsionsstelle einwuchsen und auch im distalen Bereich des Rückenmarks über 1,8 cm von der Region der proximalen kortikospinalen Endigungen entfernt zu detektieren waren. Anders als von Weidner et al. 1999 behauptet, führt die Unterdrückung der läsionsinduzierten Wundheilungsnarbe im verletzten Rückenmark in der vorliegenden Untersuchung zu kortikospinaler Regeneration. Die Diskrepanzen zwischen der vorliegenden Arbeit und den von Weidner et al. beschriebenen Ergebnissen lassen sich damit erklären, daß letztere von falschen Voraussetzungen ausgingen, nämlich, (i) daß eine einmalige Injektion von BPY

ausreichen würde, die läsionsinduzierte BM im verletzten Rückenmark der Ratte zu unterdrücken, (ii) sie eine unzureichende Art der Gewebeprozessierung gewählt hatten, um zu erkennen, daß dies nicht der Fall war und (iii) der Zeitpunkt nach dem die kortikospinalen Reaktionen analysiert wurden, falsch gewählt war. Es wurde zwar gezeigt, daß sich kortikospinale Regeneration 3 Wochen nach der Läsion detektieren läßt, jedoch nur, wenn das Wachstum der Axone durch neurotrophe Faktoren beschleunigt worden war (Grill et al., 1997).

Die hier beschriebene transiente Unterdrückung der Ausbildung einer läsionsinduzierten BM im Rückenmark der adulten Ratte führte zu einer erheblich verbesserten Regeneration durchtrennter kortikospinaler Fasern. Dieser Effekt war nicht auf die Gabe von cAMP zurückzuführen, wie die Kontrolltiere deutlich zeigten. Der einzige Unterschied, den die cAMP behandelten Tiere (Kontrollen und kombinationsbehandelte Tiere) gegenüber den nur mit Vehikel behandelten Kontrollen aufwiesen war die Zahl submeningeal wachsender CST-Axone. Trotz des Vorkommens von Fibroblasten in der Läsionsstelle ist nicht anzunehmen, daß deren bloße Anwesenheit die Regeneration verletzter kortikospinaler Axone behinderte. Entlang der Meningen wuchsen auch in vehikelbehandelten Kontrollen CST Fasern, obwohl anzumerken ist, daß die Zahl der dort wachsenden Fasern in cAMP-Kontrolltieren und komplett behandelten Tieren (Abb. 22) erhöht war, was möglicherweise mit der cAMP-Gabe zusammenhing. Eine Erhöhung des cAMP-Spiegels in Wachstumskegeln führt zu veränderten Wachstumseigenschaften von Axonen (Song et al., 1997, Nakao, 1998, Andersen et al., 2000). Möglicherweise reichte die cAMP Konzentration in der Läsionsstelle selbst nicht aus, die Wachstumskegel der regenerierenden CST-Fasern zu beeinflussen. Eine andere Erklärung bietet die Applikationsart des 8-Br-cAMP. Die kristalline Substanz wurde mit Hilfe eines Spatels in die Läsionsstelle eingebracht und auf der Läsionsstelle verteilt um die Fibroblasten der Meningen in Kontakt mit dem cAMP zu bringen. Es ist denkbar, daß der intraläsionale Applikationsort räumlich zu weit von den Wachstumskegeln der regenerierenden kortikospinalen Fasern entfernt war. Wie die Vehikelkontrollen zeigten, wuchsen immer einige CST-Fasern submeningeal (Abb. 23). Eventuell war die cAMP Konzentration an der Oberfläche des Rückenmarks hier ausreichend, das Faserwachstum entlang der Meningen zu verstärken. Die Beobachtung, daß regenerierende kortikospinale Fasern entlang der Hirnhäute

wachsen, wurde auch nach einer kompletten Transsektion des Rückenmarks und der Implantation olfaktorischer Gliazellen gemacht (Ramon-Cueto et al., 2000).

Daß der Kontakt mit Fibroblasten die Regeneration kortikospinaler Axone nicht beeinträchtigt und daß Kollagenmatrizes bekanntlich *in vitro* ein gutes Substrat für Neuritenwachstum darstellen (Ali et al., 1998, Chamberlain et al., 1998, Salgado-Ceballos et al., 1998) spricht erneut für die Annahme, daß die inhibitorische Natur der läsionsinduzierten Coll IV-immunopositiven Wundheilungsnarbe in an diese assoziierte Proteinen zu suchen ist, da Regeneration des CST auftrat, sobald diese Matrix an ihrer Entstehung gehindert wurde. Nach Implantation meningealer Fibroblasten in eine Rückenmarksläsion wurde sogar eine verstärkte Regeneration peptiderger und supraspinaler serotonerger Fasern beobachtet (Franzen et al., 1999). Diese Ergebnisse wurden mit der Produktion neurotropher Faktoren durch die implantierten Zellen erklärt. Im Gegensatz dazu wurde berichtet, daß der Kontakt zu leptomeningealen Zellen, die wachstumsfördernden Eigenschaften von Astrozyten beeinträchtigt (Ness und David, 1997). Daß die Coll IV-immunopositive Wundheilungsnarbe nicht für alle Fasern eine Wachstumsbarriere darstellt, zeigen auch Färbungen gegen Neurofilament. Die läsionsinduzierte Wundheilungsnarbe wird von verschiedenen Axonen unbekanntem Ursprungs penetriert (Abb. 24, Joosten et al., 2000). Es ist also davon auszugehen, daß verschiedene Fasertrakte des Rückenmarks unterschiedliche Voraussetzungen zur Regeneration benötigen. An die läsionsinduzierte BM sind sowohl HSPGs als auch CSPGs assoziiert, deren Auswirkungen auf axonale Regeneration kontrovers diskutiert werden (Stichel et al., 1999c). Möglicherweise bietet die BM sogar wachstumshemmenden Zellen eine Verankerungsmöglichkeit (Timpl und Dziadek, 1986). All diese an die läsionsinduzierte BM assoziierten Komponenten könnten indirekt durch die Unterdrückung der Wundheilungsnarbe beeinflusst werden.

Anders als nach der Neutralisation myelinassoziierter inhibitorischer Proteine (NoGo-A, Brosamle et al. 2000) oder der Stimulation axonalen Wachstums durch neurotrophe Faktoren (Grill et al. 1997) wuchsen die kortikospinalen Fasern nach Unterdrückung der läsionsinduzierten BM durch das Narbengewebe hindurch. In den genannten experimentellen Ansätzen trat zwar ebenfalls kortikospinale Regeneration über lange Distanzen auf (bis zu 2 cm distal der Läsionsstelle), die Fasern wuchsen aber immer um die Läsionsstelle herum, durch nicht-myelinisierte Regionen der grauen Substanz. Eine Regeneration durch das Narbengewebe hindurch konnte

erstmalig durch den in dieser Arbeit verwendeten therapeutischen Ansatz erzielt werden. Diese Tatsache kann von entscheidender Bedeutung bei der Wiederherstellung funktioneller Prozesse sein, da die Möglichkeit fehlerhafter Enervation dadurch geringer wird. Ein weiterer Vorteil des hier vorgestellten pharmakologischen Ansatzes zur Stimulation axonaler Regeneration im verletzten Rückenmark ist, daß zumindest bisher keine Anzeichen dafür gefunden werden konnten, daß die Behandlung toxisch auf das umliegende Gewebe wirkt. Die Gabe neurotropher Faktoren führt dazu, daß der Allgemeinzustand der Tiere während der Behandlung stark leidet (Hermanns, unveröffentlichte Beobachtung). Die Tiere magern ab, zusätzlich werden inflammatorische Prozesse durch neurotrophe Faktoren begünstigt (Novikov, unveröffentlichte Ergebnisse). Klinische Studien, die die Gabe neurotropher Faktoren beinhalteten, mußten abgebrochen werden, da die Behandlung sich als schmerzhaft für die Patienten/innen herausstellte (Young et al. 2000). Im Gegensatz zu Zellimplantationsverfahren, ist die pharmakologische Unterdrückung der läSIONSINDUZIERTE BM unkompliziert, d.h. ohne aufwändige Zellkulturverfahren oder immunsuppressive Maßnahmen, durchzuführen. Auch im Hinblick auf eine spätere klinische Anwendung ist dieser Vorteil des Therapieverfahrens erheblich.

5.8.1 Proteoglykane als wachstumshemmende Proteine

Die inhibitorische Natur der Proteoglykane ist heute noch nicht vollständig geklärt. Die Expression von HSPGs wird von verschiedenen Arbeitsgruppen als positiv für axonales Wachstum bewertet (Tisay und Key, 1999), von anderen als wachstumshemmend betrachtet (Fernaund-Espinosa et al., 1998, Mendes et al., 2000). Auch CSPGs können sowohl wachstumsfördernd (Faissner et al., 1994, Koops et al., 1996, Clement et al., 1998) als auch wachstumshemmend (Fitch und Silver, 1999, Fidler et al., 1999) wirken. In dreidimensionalen Astrozytenkulturen konnte gezeigt werden, daß Axone besser wuchsen, wenn Inhibitoren der Proteoglykanbiosynthese zugesetzt wurden (Smith-Thomas et al., 1995). Die wachstumshemmende Wirkung der CSPGs könnte damit zusammenhängen, daß eine Interaktion von CSPGs mit Laminin die wachstumsfördernden Eigenschaften des letzteren hemmt (Zuo et al., 1998). Die kontroversen Ergebnisse, die bisher in Bezug auf die axonwachstumsbeeinflussenden Eigenschaften der Proteoglykane

erzielt wurden, hängen sicherlich damit zusammen, daß die meisten dieser Daten *in vitro* gewonnen wurden. Die Neurone, die in diesen Versuchen verwendet wurden, waren unterschiedlicher Herkunft und stammten in der Regel von embryonalen, bzw. postnatalen Tieren. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß die Rezeptorausstattung dieser Neurone sich untereinander und von denen adulter Tiere unterscheidet. Letzten Aufschluß darüber, welchen Einfluß Proteoglykane auf axonales Wachstum haben werden nur *in vivo* Experimente zeigen. Im Transsektionsmodell des postkommisuralen Fornix wurde durch die Unterdrückung der läsionsinduzierten BM auch die Expression von Proteoglykanen in der Läsionsstelle verändert. HSPGs, die an die tuchartigen Strukturen der BM assoziiert waren, waren nach Behandlung mit BPY nicht mehr detektierbar. Das Expressionsmuster von CSPGs in der Läsionsstelle änderte sich dahingehend, daß ohne BPY-Behandlung die Proteine an die BM assoziiert waren, nach BPY-Gabe jedoch eine periläsionelle, diffuse CSPG-Expression gefunden wurde. Regenerierende Fornixaxone wuchsen durch diese Regionen, die CSPG-Immunreaktivität zeigten hindurch (Stichel et al., 1999c). Diese Ergebnisse könnten in Unterschieden in den Proteoglykan-Konzentrationen oder – Zusammensetzungen begründet sein. Der Mechanismus der Inhibition axonalen Wachstums durch Proteoglykane ist also längst nicht geklärt. Abgesehen von dem Einfluß, den diese Moleküle auf Axone haben können, zeigten Denholm et al. z.B. kürzlich, daß die Proliferation von Fibroblasten nach Gabe von Chondroitinase B, welche die Zuckerseitenketten von Chondroitin-/Dermatansulfatproteoglykanen abbaut, reduziert werden kann (Denholm et al., 2000).

5.9 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die Unterdrückung der läsionsinduzierten, Coll IV-immunopositiven Wundheilungsnarbe zu kortikospinaler Regeneration im durchtrennten Rückenmark der adulten Ratte führt. Zum jetzigen Zeitpunkt ungeklärt sind jedoch die Fragen, wieviele Fasern des proximalen CST-Stumpfes die Läsionsstelle überwinden, ob die regenerierenden Fasern ihre Zielzellen erreichen und enervieren und ob die beobachtete Regeneration zu einer funktionellen Erholung der kombinationsbehandelten Tiere führt. Die erste Frage wird zur Zeit von uns durch Quantifizierung der Fasern 3 mm proximal des Läsionszentrums, in der Läsionsstelle und 1 und 2 mm distal des Läsionszentrums

untersucht. Diese Analyse wird demnächst abgeschlossen sein. Die Frage nach der Enervation der Zielzellen könnte durch elektronenmikroskopische Untersuchungen der Zielzellregion beantwortet werden. CST-Fasern können, wie in der vorliegenden Arbeit, mit BDA, Motoneurone durch Injektion der B-Untereinheit des Cholera Toxins in den Ischiasnerv markiert werden (Vercelli et al., 2000). Die Assoziation der markierten Strukturen könnte anschließend ultrastrukturell untersucht werden. Durch eine derartige histologische Analyse bliebe jedoch die Frage ungeklärt, ob es bei den enervierten Motoneuronen Subtypen gibt, die spezifisch angesteuert werden müssen. Der deutlich wichtigste ausstehende Beweis dafür, daß die in dieser Arbeit vorgestellte Therapie zu funktioneller axonaler Regeneration führt sind Verhaltenstests, die eine motorische Erholung der behandelten Tiere zeigen. Da die Transsektion des dorsalen CST auf thorakaler Höhe keine eindeutig erkennbaren motorischen Ausfälle zur Folge hat, ist eine funktionelle Erholung der behandelten Tiere nicht offensichtlich. Der CST der Ratte ist funktionell erforderlich für sogenannte „geschickte“, feinmotorische Bewegungen. Diese können z.B. durch das Laufverhalten der Tiere auf Gittern, kinematische Analysen auf Laufbändern, die Fähigkeit der Tiere einen dünnen Balken zu überqueren und Fußabdruckanalysen, sowie die Analyse des Laufverhaltens im offenen Feld (BBB-Score, Basso et al., 1995) untersucht werden (Metz et al., 2000a). Die angesprochenen Analysen werden zur Zeit in unserem Labor vorbereitet.

Da der CST als besonders schwer regenerierender Trakt gilt (Brosamle et al. 2000), wurde er für die vorliegende Untersuchung ausgewählt. Zur Zeit noch ungeklärt ist jedoch, inwieweit die Regeneration anderer absteigender motorischer (z.B. des Traktus Rubrospinalis) oder aufsteigender sensorischer Trakte von der Unterdrückung der läsionsinduzierten BM beeinflusst wird.

Obwohl die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sehr ermutigend sind, ist es dennoch sehr unwahrscheinlich, daß es eine einzige Ursache (nämlich die läsionsinduzierte Narbe) für das Unvermögen zentralnervöser Axone zur Regeneration gibt. Da auch die unter 1.7.3 vorgestellten Therapieansätze Teilerfolge bei der Regeneration verletzter Fasertrakte erzielen konnten, wäre es von Vorteil, einige dieser Ansätze mit der pharmakologischen Reduktion der Narbe zu kombinieren. Eine Zusammenarbeit unserer Arbeitsgruppe mit einigen der angesprochenen Labors ist zur Zeit in Vorbereitung.

6 Literatur

1. Ali,S.A., Pappas,I.S., und Parnavelas,J.G. (1998). Collagen type IV promotes the differentiation of neuronal progenitors and inhibits astroglial differentiation in cortical cell cultures. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **110**, 31-38.
2. Andersen,P.L., Webber,C.A., Kimura,K.A., und Schreyer,D.J. (2000). Cyclic AMP prevents an increase in GAP-43 but promotes neurite growth in cultured adult rat dorsal root ganglion neurons. *Exp. Neurol.* **166**, 153-165.
3. Annunen,P., Autio-Harmainen,H., und Kivirikko,K.I. (1998). The novel type II prolyl 4-hydroxylase is the main enzyme form in chondrocytes and capillary endothelial cells, whereas the type I enzyme predominates in most cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 5989-5992.
4. Aumailley,M. und Gayraud,B. (1998). Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J. Mol. Med.* **76**, 253-265.
5. Bandtlow,C.E. und Schwab,M.E. (2000). NI-35/250/nogo-a: A neurite growth inhibitor restricting structural plasticity and regeneration of nerve fibers in the adult vertebrate CNS. *GLIA* **29**, 175-181.
6. Basso,D.M., Beattie,M.S., und Bresnahan,J.C. (1995). A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J. Neurotrauma* **12**, 1-21.
7. Basso,D.M., Beattie,M.S., und Bresnahan,J.C. (1996). Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp. Neurol.* **139**, 244-256.
8. Beattie,M.S., Shuman,S.L., und Bresnahan,J.C. (1998). Apoptosis and spinal cord injury. *The Neuroscientist* **4**, 163-171.
9. Beattie,M.S. und Bresnahan,J.C. (2000). Cell Death, Repair, and Recovery of Function after Spinal Cord Contusion Injuries in Rats. In *Neurobiology of Spinal Cord Injury*, R.G.Kalb and S.M.Strittmatter, eds. (Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.), pp. 1-21.

10. Becker, T., Anliker, B., Becker, C.G., Taylor, J., Schachner, M., Meyer, R.L., und Bartsch, U. (2000). Tenascin-R inhibits regrowth of optic fibers in vitro and persists in the optic nerve of mice after injury. *GLIA* **29**, 330-346.
11. Behrman, A.L. und Harkema, S.J. (2000). Locomotor training after human spinal cord injury: a series of case studies. *Phys. Ther.* **80**, 688-700.
12. Benfey, M. und Aguayo, A.J. (1982). Extensive elongation of axons from rat brain into peripheral nerve grafts. *Nature* **296**, 150-152.
13. Bernstein, J.J., Getz, R., Jefferson, M., und Kelemen, M. (1985). Astrocytes secrete basal lamina after hemisection of rat spinal cord. *Brain Res.* **327**, 135-141.
14. Bracken, M.B. (2000). Pharmacological interventions for acute spinal cord injury. *Cochrane. Database. Syst. Rev.* **2**, CD001046.
15. Bradbury, E.J., Khemani, S., Von, R., King, Priestley, J.V., und McMahon, S.B. (1999). NT-3 promotes growth of lesioned adult rat sensory axons ascending in the dorsal columns of the spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 3873-3883.
16. Bradham, D.M., Igarashi, A., Potter, R.L., und Grotendorst, G.R. (1991). Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J. Cell Biol.* **114**, 1285-1294.
17. Brekken, R.A. und Sage, E.H. (2000). SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix. *Matrix Biol.* **19**, 569-580.
18. Brook, G.A., Plate, D., Franzen, R., Martin, D., Moonen, G., Schoenen, J., Schmitt, A.B., Noth, J., und Nacimiento, W. (1998). Spontaneous longitudinally orientated axonal regeneration is associated with the Schwann cell framework within the lesion site following spinal cord compression injury of the rat. *J. Neurosci. Res.* **53**, 51-65.
19. Brosamle, C., Huber, A.B., Fiedler, M., Skerra, A., und Schwab, M.E. (2000). Regeneration of lesioned corticospinal tract fibers in the adult rat induced by a recombinant, humanized IN-1 antibody fragment. *J. Neurosci.* **20**, 8061-8068.
20. Brown, J.C. und Timpl, R. (1995). The collagen superfamily. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **107**, 484-490.

21. Bundesen, L. Q., Janis, L. S., Bregman, B. S., und Kromer, L. F. Alterations of EphB2 proteins following spinal cord injury in the adult rat. Abstract Book of the 30st annual meeting of the Society for Neuroscience. 2000.
22. Bunge,R.P. (1983). Aspects of schwann cell and fibroblast function relating to central nervous system regeneration. In Spinal cord reconstruction, C.C.Kao, R.P.Bunge, und P.J.Reier, eds. (New York: Raven Press), pp. 261-270.
23. Carbonell,A.L. und Boya,J. (1988). Ultrastructural study on meningeal regeneration and meningo-glial relationships after cerebral stab wound in the adult rat. *Brain Res.* **439**, 337-344.
24. Case, F. H. The synthesis of certain substituted 2,2'-bipyridyls. *Journal of the American Chemical Society* 68, 2574-2577. 1946.
25. Chamberlain,L.J., Yannas,I.V., Hsu,H.P., Strichartz,G., und Spector,M. (1998). Collagen-GAG substrate enhances the quality of nerve regeneration through collagen tubes up to level of autograft. *Exp. Neurol.* **154**, 315-329.
26. Cheng,H., Cao,Y., und Olson,L. (1996). Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function [see comments]. *Science* **273**, 510-513.
27. Clement,A.M., Nadanaka,S., Masayama,K., Mandl,C., Sugahara,K., und Faissner,A. (1998). The DSD-1 carbohydrate epitope depends on sulfation, correlates with chondroitin sulfate D motifs, and is sufficient to promote neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* **273**, 28444-28453.
28. Coleman,W.P., Benzel,D., Cahill,D.W., Ducker,T., Geisler,F., Green,B., Gropper,M.R., Goffin,J., Madsen,P.W., III, Maiman,D.J., Ondra,S.L., Rosner,M., Sasso,R.C., Trost,G.R., und Zeidman,S. (2000). A critical appraisal of the reporting of the National Acute Spinal Cord Injury Studies (II and III) of methylprednisolone in acute spinal cord injury. *J. Spinal Disord.* **13**, 185-199.
29. Crowe,M.J., Bresnahan,J.C., Shuman,S.L., Masters,J.N., und Beattie,M.S. (1997). Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys [published erratum appears in Nat Med 1997 Feb; 3(2):240]. *Nat. Med.* **3**, 73-76.

30. Denholm,E.M., Cauchon,E., Poulin,C., und Silver,P.J. (2000). Inhibition of human dermal fibroblast proliferation by removal of dermatan sulfate. *Eur. J. Pharmacol.* **400**, 145-153.
31. Duncan,M.R., Frazier,K.S., Abramson,S., Williams,S., Klapper,H., Huang,X., und Grotendorst,G.R. (1999). Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *FASEB J.* **13**, 1774-1786.
32. Eckes,B., Zigrino,P., Kessler,D., Holtkotter,O., Shephard,P., Mauch,C., und Krieg,T. (2000). Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis. *Matrix Biol.* **19**, 325-332.
33. Edgerton,V.R., Roy,R.R., Hodgson,J.A., Prober,R.J., de Guzman,C.P., und de Leon,R. (1991). A physiological basis for the development of rehabilitative strategies for spinally injured patients. *J. Am. Paraplegia Soc.* **14**, 150-157.
34. Eng,L.F., Ghirnikar,R.S., und Lee,Y.L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem. Res.* **25**, 1439-1451.
35. Ezaki,T. (2000). Antigen retrieval on formaldehyde-fixed paraffin sections: its potential drawbacks and optimization for double immunostaining. *Micron.* **31**, 639-649.
36. Faissner,A., Clement,A., Lochter,A., Streit,A., Mandl,C., und Schachner,M. (1994). Isolation of a neural chondroitin sulfate proteoglycan with neurite outgrowth promoting properties. *J. Cell Biol.* **126**, 783-799.
37. Fawcett,J.W. und Asher,R.A. (1999). The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res. Bull.* **49**, 377-391.
38. Feringa,E.R., Kowalski,T.F., und Vahlsing,H.L. (1980). Basal lamina formation at the site of spinal cord transection. *Ann. Neurol.* **8**, 148-154.
39. Feringa,E.R., Kowalski,T.F., Vahlsing,H.L., und Frye,R.A. (1979). Enzyme treatment of spinal cord transected rats. *Ann. Neurol.* **5**, 203-206.
40. Feringa,E.R., Kowalski,T.F., und Vahlsing,H.L. (1985). Basal lamina at the site of spinal cord injury in normal, immunotolerant and immunosuppressed rats. *Neurosci. Lett.* **54**, 225-230.

41. Fernaud-Espinosa, I., Nieto-Sampedro, M., und Bovolenta, P. (1998). A neurite outgrowth-inhibitory proteoglycan expressed during development is similar to that isolated from adult brain after isomorphic injury. *J. Neurobiol.* **36**, 16-29.
42. Fidler, P.S., Schuette, K., Asher, R.A., Dobbertin, A., Thornton, S.R., Calle-Patino, Y., Muir, E., Levine, J.M., Geller, H.M., Rogers, J.H., Faissner, A., und Fawcett, J.W. (1999). Comparing astrocytic cell lines that are inhibitory or permissive for axon growth: the major axon-inhibitory proteoglycan is NG2. *J. Neurosci.* **19**, 8778-8788.
43. Fitch, M.T. und Silver, J. (1997). Glial cell extracellular matrix: boundaries for axon growth in development and regeneration. *Cell Tissue Res.* **290**, 379-384.
44. Fitch, M.T. und Silver, J. (1999). Beyond the glial scar. Cellular and molecular mechanisms by which glial cells contribute to CNS regenerative failure. In *CNS regeneration: basic science and clinical advances*, M.H. Tuszynski und J.H. Kordower, eds. (Academic Press), pp. 55-88.
45. Franklin, T.J., Hales, N.J., Johnstone, D., Morris, W.B., Cunliffe, C.J., Millest, A.J., und Hill, G.B. (1991). Approaches to the design of anti-fibrotic drugs. *Biochem. Soc. Trans.* **19**, 812-815.
46. Franzen, R., Martin, D., Daloz, A., Moonen, G., und Schoenen, J. (1999). Grafts of meningeal fibroblasts in adult rat spinal cord lesion promote axonal regrowth. *Neuroreport* **10**, 1551-1556.
47. Frazier, K., Williams, S., Kothapalli, D., Klapper, H., und Grotendorst, G.R. (1996). Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J. Invest. Dermatol.* **107**, 404-411.
48. Geisler, F.H., Dorsay, F.C., Grieco, G., Piva, S., Poonian, D., und Fiorentini, R. (2000). The GM1 ganglioside acute spinal cord injury (SCI) study I - baseline observations and their influence on outcomes. *Restorative Neurology and Neuroscience* **16**, 203-204.
49. Grill, R., Murai, K., Blesch, A., Gage, F.H., und Tuszynski, M.H. (1997). Cellular delivery of neurotrophin-3 promotes corticospinal axonal growth and partial functional recovery after spinal cord injury. *J. Neurosci.* **17**, 5560-5572.

50. Grotendorst, G.R. (1997). Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev.* **8**, 171-179.
51. Hadley, S.D. und Goshgarian, H.G. (1997). Altered immunoreactivity for glial fibrillary acidic protein in astrocytes within 1 h after cervical spinal cord injury. *Exp. Neurol.* **146**, 380-387.
52. Hales, N.J. und Beattie, J.F. (1993). Novel inhibitors of prolyl 4-hydroxylase. 5. The intriguing structure- activity relationships seen with 2,2'-bipyridine and its 5,5'-dicarboxylic acid derivatives. *J. Med. Chem.* **36**, 3853-3858.
53. Halfter, W., Dong, S., Schurer, B., und Cole, G.J. (1998). Collagen XVIII is a basement membrane heparan sulfate proteoglycan. *J. Biol. Chem.* **273**, 25404-25412.
54. Halfter, W., Liverani, D., Vigny, M., und Monard, D. (1990). Deposition of extracellular matrix along the pathways of migrating fibroblasts. *Cell Tissue Res.* **262**, 467-481.
55. Hammond, E.N., Tetzlaff, W., Mestres, P., und Giehl, K.M. (1999). BDNF, but not NT-3, promotes long-term survival of axotomized adult rat corticospinal neurons in vivo. *Neuroreport* **10**, 2671-2675.
56. Hermanns, S. Eigenschaften und Einfluß implantierter Schwannzellen im durchtrennten postkommissuralen Fornix der adulten Ratte. 1-70. 1997. Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Neurologische Klinik, Labor für Molekulare Neurobiologie. Diplomarbeit.
57. Hermanns, S. und Müller, H.W. (2001a). Preservation and detection of lesion-induced collagenous scar in the CNS depend on the method of tissue processing. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* **7**, 162-167.
58. Hermanns, S., Reiprich, P., und Müller, H.W. (2001b). A reliable method to reduce collagen scar formation in the lesioned rat spinal cord. *J. Neurosci. Meth.* **in Druck**.
59. Hesse, S., Malezic, M., Lucke, D., und Mauritz, K.H. (1998). Stellenwert der funktionellen Elektrostimulation bei Patienten mit Querschnittlähmung [Value of functional electrostimulation in patients with paraplegia]. *Nervenarzt* **69**, 300-305.
60. Houweling, D.A., Bar, P.R., Gispen, W.H., und Joosten, E.A. (1998). Spinal cord injury: bridging the lesion and the role of neurotrophic factors in repair. *Prog. Brain Res.* **117:455-71**, 455-471.

-
61. Hulsebosch,C.E., Hains,B.C., Waldrep,K., und Young,W. (2000). Bridging the gap: from discovery to clinical trials in spinal cord injury. *J. Neurotrauma* **17**, 1117-1128.
62. Hurlbert,R.J. (2000). Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an inappropriate standard of care. *J. Neurosurg.* **93**, 1-7.
63. Ikeda,H., Wu,G.Y., und Wu,C.H. (1992). Evidence that an iron chelator regulates collagen synthesis by decreasing the stability of procollagen mRNA. *Hepatology* **15**, 282-287.
64. Imperato-Kalmar,E.L., McKinney,R.A., Schnell,L., Rubin,B.P., und Schwab,M.E. (1997). Local Changes in Vascular Architecture Following Partial Spinal Cord Lesion in the Rat. *Experimental Neurology* **145**, 322-328.
65. Jakeman,L.B., Wei,P., Guan,Z., und Stokes,B.T. (1998). Brain-derived neurotrophic factor stimulates hindlimb stepping and sprouting of cholinergic fibers after spinal cord injury. *Exp. Neurol.* **154**, 170-184.
66. Joosten,E.A., Dijkstra,S., Brook,G.A., Veldman,H., und Bar,P.R. (2000). Collagen IV deposits do not prevent regrowing axons from penetrating the lesion site in spinal cord injury. *J. Neurosci. Res.* **62**, 686-691.
67. Kagan,H.M. (2000). Intra- and extracellular enzymes of collagen biosynthesis as biological and chemical targets in the control of fibrosis. *Acta Trop.* **77**, 147-152.
68. Kalderon,N. und Fuks,Z. (1996). Structural recovery in lesioned adult mammalian spinal cord by x- irradiation of the lesion site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 11179-11184.
69. Kermer,P., Klocker,N., Labes,M., und Bahr,M. (2000). Insulin-like growth factor-I protects axotomized rat retinal ganglion cells from secondary death via PI3-K-dependent Akt phosphorylation and inhibition of caspase-3 In vivo. *J. Neurosci.* **20**, 2-8.
70. Kivirikko,K.I. und Myllyla,R. (1985). Post-translational processing of procollagens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **460**, 187-201.
71. Koeberle,P.D. und Ball,A.K. (1999). Nitric oxide synthase inhibition delays axonal degeneration and promotes the survival of axotomized retinal ganglion cells. *Exp. Neurol.* **158**, 366-381.

-
72. Koops,A., Kappler,J., Junghans,U., Kuhn,G., Kresse,H., und Müller,H.W. (1996). Cultured astrocytes express biglycan, a chondroitin/dermatan sulfate proteoglycan supporting the survival of neocortical neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **41**, 65-73.
73. Kothapalli,D., Hayashi,N., und Grotendorst,G.R. (1998). Inhibition of TGF-beta-stimulated CTGF gene expression and anchorage- independent growth by cAMP identifies a CTGF-dependent restriction point in the cell cycle. *FASEB J.* **12**, 1151-1161.
74. Kowalski,T.F., Vahlsing,H.L., und Feringa,E.R. (1979). Lidase treatment of spinal cord transected rats. *Ann. Neurol.* **6**, 78-79.
75. Lee,S.K. und Wolfe,S.W. (2000). Peripheral nerve injury and repair. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* **8**, 243-252.
76. Liesi,P., Kaakkola,S., Dahl,D., und Vaheri,A. (1984). Laminin is induced in astrocytes of adult brain by injury. *EMBO J.* **3**, 683-686.
77. Liesi,P. (1985). Laminin-immunoreactive glia distinguish regenerative adult CNS systems from non-regenerative ones. *EMBO J.* **4**, 2505-2511.
78. Liu,X.Z., Xu,X.M., Hu,R., Du,C., Zhang,S.X., McDonald,J.W., Dong,H.X., Wu,Y.J., Fan,G.S., Jacquin,M.F., Hsu,C.Y., und Choi,D.W. (1997). Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J. Neurosci.* **17**, 5395-5406.
79. Liu,Y., Kim,D., Himes,B.T., Chow,S.Y., Schallert,T., Murray,M., Tessler,A., und Fischer,I. (1999). Transplants of fibroblasts genetically modified to express BDNF promote regeneration of adult rat rubrospinal axons and recovery of forelimb function. *J. Neurosci.* **19**, 4370-4387.
80. Logan,A., Green,J., Hunter,A., Jackson,R., und Berry,M. (1999). Inhibition of glial scarring in the injured rat brain by a recombinant human monoclonal antibody to transforming growth factor-beta2. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 2367-2374.
81. Matinian,L.A. und Andreasian,A.S. (1973). Enzyme therapy in organic lesions of the spinal cord. *Akademia Nauk Armenian SSR (English translation: Los Angeles: Brain Information Service, University of California, 1976, 156pp)* 94pp.

-
82. McDonald, J.W., Liu, X.Z., Qu, Y., Liu, S., Mickey, S.K., Turetsky, D., Gottlieb, D.I., and Choi, D.W. (1999). Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat. Med.* **5**, 1410-1412.
83. Mendes, F.A., Onofre, G.R., De Freitas, M.S., Silva, L.C., Moura, N., V, and Cavalcante, L.A. (2000). Contribution of heparan sulfate to the non-permissive role of the midline glia to the growth of midbrain neurites. *GLIA* **29**, 260-272.
84. Menet, V., Gimenez, Y.R., Sandillon, F., and Privat, A. (2000). GFAP null astrocytes are a favorable substrate for neuronal survival and neurite growth. *GLIA* **31**, 267-272.
85. Metz, G.A., Merkler, D., Dietz, V., Schwab, M.E., and Fouad, K. (2000a). Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. *Brain Res.* **883**, 165-177.
86. Metz, G.A. and Whishaw, I.Q. (2000b). Skilled reaching an action pattern: stability in rat (*Rattus norvegicus*) grasping movements as a function of changing food pellet size. *Behav. Brain Res.* **116**, 111-122.
87. Nakao, N. (1998). An increase in intracellular levels of cyclic AMP produces trophic effects on striatal neurons developing in culture. *Neuroscience* **82**, 1009-1020.
88. Ness, R. and David, S. (1997). Leptomeningeal cells modulate the neurite growth promoting properties of astrocytes in vitro. *GLIA* **19**, 47-57.
89. Novikova, L.N., Novikov, L.N., and Kellerth, J.O. (2000). Survival effects of BDNF and NT-3 on axotomized rubrospinal neurons depend on the temporal pattern of neurotrophin administration. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 776-780.
90. Pasterkamp, R.J., De, W.F., Giger, R.J., and Verhaagen, J. (1998). Role for semaphorin III and its receptor neuropilin-1 in neuronal regeneration and scar formation? *Prog. Brain Res.* **117:151-70**, 151-170.
91. Pihlajaniemi, T., Helaakoski, T., Tasanen, K., Myllyla, R., Huhtala, M.L., Koivu, J., and Kivirikko, K.I. (1987). Molecular cloning of the beta-subunit of human prolyl 4-hydroxylase. This subunit and protein disulphide isomerase are products of the same gene. *EMBO J.* **6**, 643-649.

-
92. Ramon-Cueto,A., Cordero,M.I., Santos-Benito,F.F., und Avila,J. (2000). Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron* **25**, 425-435.
93. Ramon y Cajal, S. (1928) Degeneration and regeneration of the nervous system. New York, Hafner.
94. Rapalino,O., Lazarov-Spiegler,O., Agranov,E., Velan,G.J., Yoles,E., Fraidakis,M., Solomon,A., Gepstein,R., Katz,A., Belkin,M., Hadani,M., und Schwartz,M. (1998). Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat. Med.* **4**, 814-821.
95. Reier,P.J., Stensaas,L.J., und Guth,L. (1983). The astrocytic scar as an impediment to regeneration in the central nervous system. In Spinal cord reconstruction, C.C.Kao, R.P.Bunge, und P.J.Reier, eds. (New York: Raven Press), pp. 163-195.
96. Ridet,J.L., Penealet,P., Belcram,M., Giraudeau,B., Chastang,C., Philippon,J., Mallet,J., Privat,A., und Schwartz,L. (2000). Effects of spinal cord X-irradiation on the recovery of paraplegic rats. *Exp. Neurol.* **161**, 1-14.
97. Sado,Y., Kagawa,M., Naito,I., Ueki,Y., Seki,T., Momota,R., Oohashi,T., und Ninomiya,Y. (1998). Organization and expression of basement membrane collagen IV genes and their roles in human disorders. *J. Biochem. (Tokyo)* **123**, 767-776.
98. Salgado-Ceballos,H., Guizar-Sahagun,G., Feria-Velasco,A., Grijalva,I., Espitia,L., Ibarra,A., und Madrazo,I. (1998). Spontaneous long-term remyelination after traumatic spinal cord injury in rats. *Brain Res.* **782**, 126-135.
99. Schnell,L. und Schwab,M.E. (1990). Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature* **343**, 269-272.
100. Schumacher,P.A., Siman,R.G., und Fehlings,M.G. (2000). Pretreatment with calpain inhibitor CEP-4143 inhibits calpain I activation and cytoskeletal degradation, improves neurological function, and enhances axonal survival after traumatic spinal cord injury. *J. Neurochem.* **74**, 1646-1655.

101. Shen, Y.J., DeBellard, M.E., Salzer, J.L., Roder, J., und Filbin, M.T. (1998). Myelin-associated glycoprotein in myelin and expressed by Schwann cells inhibits axonal regeneration and branching. *Mol. Cell Neurosci.* **12**, 79-91.
102. Shuman, S.L., Bresnahan, J.C., und Beattie, M.S. (1997). Apoptosis of Microglia and Oligodendrocytes After Spinal Cord Contusion in Rats. *Journal of Neuroscience Research* **50**, 798-808.
103. Smith-Thomas, L.C., Stevens, J., Fok-Seang, J., Faissner, A., Rogers, J.H., und Fawcett, J.W. (1995). Increased axon regeneration in astrocytes grown in the presence of proteoglycan synthesis inhibitors. *J. Cell Sci.* **108**, 1307-1315.
104. Smith, A.L., Cordery, P.M., und Thompson, I.D. (1995). Manufacture and release characteristics of Elvax polymers containing glutamate receptor antagonists. *J. Neurosci. Methods* **60**, 211-217.
105. Song, H.J., Ming, G.L., und Poo, M.M. (1997). cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones [published erratum appears in Nature 1997 Sep 25;389(6649):412]. *Nature* **388**, 275-279.
106. Stichel, C.C. und Müller, H.W. (1994). Relationship between injury-induced astrogliosis, laminin expression and axonal sprouting in the adult rat brain. *J. Neurocytol.* **23**, 615-630.
107. Stichel, C.C., Lips, K., Wunderlich, G., und Müller, H.W. (1996). Reconstruction of transected postcommissural fornix in adult rat by Schwann cell suspension grafts. *Exp. Neurol.* **140**, 21-36.
108. Stichel, C.C. und Müller, H.W. (1998). The CNS lesion scar: new vistas on an old regeneration barrier. *Cell Tissue Res.* **294**, 1-9.
109. Stichel, C.C., Hermanns, S., Luhmann, H.J., Lausberg, F., Niermann, H., D'Urso, D., Servos, G., Hartwig, H.G., und Müller, H.W. (1999a). Inhibition of collagen IV deposition promotes regeneration of injured CNS axons. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 632-646.
110. Stichel, C.C., Niermann, H., D'Urso, D., Lausberg, F., Hermanns, S., und Müller, H.W. (1999b). Basal membrane-depleted scar in lesioned CNS: characteristics and relationships with regenerating axons. *Neuroscience* **93**, 321-333.

-
111. Stichel,C.C., Lausberg,F., Hermanns,S., und Müller,H.W. (1999c). Scar modulation in subacute and chronic CNS lesions: effects on axonal regeneration. *Restorative Neurology and Neuroscience* **15**, 1-15.
112. Stichel,C.C., Hermanns,S., Lausberg,F., und Müller,H.W. (1999d). Effects of Schwann cell suspension grafts on axon regeneration in subacute and chronic CNS traumatic injuries. *GLIA* **28**, 156-165.
113. Theriault,E., Frankenstein,U.N., Hertzberg,E.L., und Nagy,J.I. (1997). Connexin43 and astrocytic gap junctions in the rat spinal cord after acute compression injury. *J. Comp Neurol.* **382**, 199-214.
114. Timpl,R. und Dziadek,M. (1986). Structure, Development, and Molecular Pathology of Basement Membranes. In International Review of Experimental Pathology, (London: Academic Press Inc. Ltd.), pp. 1-112.
115. Tisay,K.T. und Key,B. (1999). The extracellular matrix modulates olfactory neurite outgrowth on ensheathing cells. *J. Neurosci.* **19**, 9890-9899.
116. Vercelli,A., Repici,M., Garbossa,D., und Grimaldi,A. (2000). Recent techniques for tracing pathways in the central nervous system of developing and adult mammals. *Brain Res. Bull.* **51**, 11-28.
117. Weidner,N., Blesch,A., Grill,R.J., und Tuszynski,M.H. (1999a). Nerve growth factor-hypersecreting Schwann cell grafts augment and guide spinal cord axonal growth and remyelinate central nervous system axons in a phenotypically appropriate manner that correlates with expression of L1. *J. Comp Neurol.* **413**, 495-506.
118. Weidner,N., Grill,R.J., und Tuszynski,M.H. (1999b). Elimination of basal lamina and the collagen "scar" after spinal cord injury fails to augment corticospinal tract regeneration. *Exp. Neurol.* **160**, 40-50.
119. Wirth,E.D., Reier,P.J., Fessler,R.G., und Anderson,D.K. (2000). Intraspinal transplantation - update of ongoing clinical study. *Restorative Neurology and Neuroscience* **16**, 191-191.

-
120. Xu,X.M., Chen,A., Guenard,V., Kleitman,N., und Bunge,M.B. (1997). Bridging Schwann cell transplants promote axonal regeneration from both the rostral and caudal stumps of transected adult rat spinal cord. *J. Neurocytol.* **26**, 1-16.
121. Xu,X.M., Zhang,S.X., Li,H., Aebischer,P., und Bunge,M.B. (1999). Regrowth of axons into the distal spinal cord through a Schwann-cell- seeded mini-channel implanted into hemisected adult rat spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 1723-1740.
122. Young,W. (2000). Molecular and Cellular Mechanisms of Spinal Cord Injury Therapies. In *Neurobiology of Spinal Cord Injury*, R.G.Kalb und S.M.Strittmatter, eds. (Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.), pp. 241-275.
123. Yurchenco,P.D. und O'Rear,J.J. (1994). Basal lamina assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 674-681.
124. Yurchenco,P.D. und Schittny,J.C. (1990). Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.* **4**, 1577-1590.
125. Zilles,K. und Rehkämper,G. (1993). Funktionelle Neuroanatomie. (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag).
126. Zuo,J., Neubauer,D., Dyess,K., Ferguson,T.A., und Muir,D. (1998). Degradation of chondroitin sulfate proteoglycan enhances the neurite- promoting potential of spinal cord tissue. *Exp. Neurol.* **154**, 654-662.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Arbeitsgruppe für Molekulare Neurobiologie der Neurologischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität zu Düsseldorf.

Für die Möglichkeit, die Arbeit in der Neurologischen Klinik anfertigen zu können, möchte ich mich bei Prof. Dr. H.-J. Freund bedanken.

Herrn Prof. Dr. Hans Werner Müller danke ich sehr für die interessante Fragestellung, die Betreuung der Arbeit, seine wertvollen Anregungen, die wissenschaftliche Freiheit, die er mir ließ und seine auf mich zugeschnittenen Motivationsstrategien, die nicht zuletzt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Heinz Mehlhorn danke ich ebenfalls sehr herzlich für die Betreuung der Arbeit, und wünsche seinem und meinem Bewegungsapparat gute Besserung.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei PD Dr. Christine C. Stichel-Gunkel und Dr. Friederike Lausberg, die mich ein Stück des Weges begleitet haben.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors für Molekulare Neurobiologie und dem gesamten Wittelabor danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre, viel Spaß und die stets vorhandene wissenschaftliche und logistische Unterstützung. Im Besonderen möchte ich mich hier bei meinen Freundinnen und Kolleginnen Margarete Czardybon und Birgit Hasse dafür bedanken, daß sie immer für mich da waren und mich auch durch ihren eigenen Einsatz bei Bedarf motivierten.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern Ursel und Horst Hermanns, die immer an mich glaubten und mich jederzeit nach Kräften unterstützt haben. Danke Mami, für alles! Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Harry Lubba, dem Lebensgefährten meiner Mutter, der sich während meiner Promotionsphase die eine oder andere Geschichte anhören mußte.

Danken möchte ich ebenfalls ganz besonders meinen Freundinnen und Kolleginnen Marcia Gasis und Petra Reiprich für ihre technische und psychologische Unterstützung und Nicole Klapka für ihre logistische Hilfe und eine Menge Spaß in der TVA und auf Reisen. Ohne Euch wäre vieles nicht möglich und wenn doch, sicherlich halb so lustig gewesen! (Und wenn alle Stricke reißen, macht Nicole ein florierendes Taxiunternehmen - Schwerpunkt Krankentransporte - auf).

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Lebensgefährten Guido Hopp, der mich durch alle Höhen und Tiefen während der Anfertigung dieser Arbeit (und davor und hoffentlich auch danach) rückhaltlos unterstützt hat. Ich liebe Dich.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Düsseldorf, im Mai 2001