

Aus der Klinik für Neurologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Sven Meuth

Axonale Regeneration in adulten retinalen Ganglienzellen bei konstitutiver Aktivität von GSK3 α/β

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Renate Golla
(2021)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. Dietmar Fischer

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Carsten Korth

„Nicht Kunst und Wissenschaft allein,
Geduld will bei dem Werke sein.“

(Johann Wolfgang von Goethe, Faust - Eine Tragödie)

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Leibinger M, Andreadaki A, Golla R, Levin E, Hilla AM, Diekmann H, Fischer D
(2017)

**Boosting CNS axon regeneration by harnessing antagonistic effects of
GSK3 activity.**

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of
America (PNAS); 114(27)

Zusammenfassung

Neurone des adulten zentralen Nervensystems (ZNS) von Säugetieren sind nicht befähigt, geschädigte Axone zu regenerieren. Im Gegensatz dazu ist die axonale Regeneration im peripheren Nervensystem (PNS) prinzipiell zwar möglich, aber oft unvollständig. In diesem Zusammenhang wird der Serin-Threonin Kinase Glykogen-Synthase Kinase 3 (GSK3) mit den beiden Isoformen GSK3 α und GSK3 β ein wesentlicher Einfluss auf regenerative Prozesse im PNS und ZNS zugeschrieben. Die Rolle von GSK3 wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Durch eine Phosphorylierung an Serin-21 (GSK3 α) und Serin-9 (GSK3 β) wird die Kinaseaktivität von GSK3 inhibiert. Unsere Arbeitsgruppe verwendete ein genetisches *knockin* Maus-Modell, bei dem GSK3 durch einen Aminosäureaustausch nicht inhibiert werden konnte und in physiologischen Mengen exprimiert wurde. Es konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die konstitutive GSK3-Aktivität axonale Regenerationsprozesse im PNS fördert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, anhand des gleichen GSK3 *knockin* Maus-Modells dessen Rolle im ZNS zu untersuchen. Zur Erforschung von Regenerationsmechanismen im ZNS kam das visuelle System mit den retinalen Ganglienzellen (RGZ) zum Einsatz. Eine axonale Schädigung erfolgte mittels einer Sehnervquetschung (SQ). Bei alleiniger SQ ist eine axonale Regeneration nicht möglich, weshalb zur Induktion des intrinsischen Regenerationsprogrammes eine Linsenverletzung (LV) notwendig war.

Durch die Methode des *Western Blot* konnte die Menge an inhibitorisch phosphorylierten GSK3 (pGSK3) ermittelt werden. Anhand von immunhistochemisch gefärbten Retinaschnitten erfolgte die Lokalisierung von pGSK3. Zudem wurden *wholemout*-Retinae immunhistochemisch gefärbt, um das Überleben von RGZ zu quantifizieren. Zuletzt wurde die axonale Regeneration in longitudinalen Sehnervenschnitten nach einer SQ und zusätzlicher LV untersucht.

Die Ergebnisse aus den *Western Blots* und der Immunhistochemie zeigten, dass eine SQ eine inhibitorische Phosphorylierung von GSK3 hauptsächlich in den RGZ induzierte. Auch im PNS führte eine Verletzung zur gesteigerten GSK3-Phosphorylierung. Bezüglich des Überlebens von RGZ führte erst das gleichzeitige Vorliegen von konstitutiv aktiver GSK3 α und GSK3 β zu einem marginal gesteigerten Überleben nach einer SQ sowie nach zusätzlicher LV. Dies könnte durch das Überwiegen der anti- über die pro-apoptotischen Effekte, welche beide in der Literatur beschrieben sind, erklärt werden. Des Weiteren ergab die Auswertung der histologischen Sehnervenschnitte, dass die konstitutive GSK3-Aktivität die limitierte Regeneration nach alleiniger SQ nicht beeinflusste. Die gesteigerte Regeneration nach einer LV wurde jedoch durch die konstitutive GSK3-Aktivität signifikant gehemmt.

Anhand der Ergebnisse war zu schlussfolgern, dass im Gegensatz zum PNS im ZNS der negative Effekt der GSK3-Aktivität dominierte. Als mögliche Ursache kann eine unterschiedliche Regulierung stromabwärts liegender Signalwege diskutiert werden, beispielsweise der Einfluss auf Mikrotubuli-assoziierte Proteine. Durch die Entschlüsselung der Signalwege könnten in Zukunft therapeutische Strategien abgeleitet werden, die zur Wiederherstellung von verlorengegangenen Funktion nach einer ZNS-Verletzung beitragen.

Summary

In the adult mammalian central nervous system (CNS) neurons are unable to regenerate injured axons. On the other hand, regeneration of axons in the peripheral nervous system (PNS) is possible in principle, but often incomplete. In this context, serine-threonine kinase glycogen synthase kinase 3 (GSK3), with its two isoforms GSK3 α and GSK3 β , is thought to have a crucial influence in regenerative processes both in the PNS and CNS. However, the role of GSK3 is controversially discussed in existing literature because of inconsistent results. Our group was able to show in a transgenic mouse model, in which GSK3 can not be inhibited because of an amino acid exchange and is expressed in physiological levels, that constitutive activity of GSK3 promotes peripheral nerve regeneration.

The aim of the current study was to investigate how constitutive activity of GSK3 affects axon regeneration in the CNS by using the above mentioned GSK3 knock in mouse model. Mechanisms of regeneration were examined in the visual system with the retinal ganglion cells (RGCs) as projection neurons of the CNS. An injury of the CNS was caused by crushing the optical nerve (ONC). Because axon growth after ONC is generally strongly limited, the intrinsic regeneration programme was induced by an inflammatory stimulation via lens injury. Due to the induction of axon regeneration, it was possible to investigate the influence of sustained GSK3 activity.

The semiquantitative protein detection of retinal lysate in western blot was used to examine the levels of pGSK3. Retina sections were immunohistochemically stained to localise the pGSK3 expression. Immunohistochemical staining of wholemount retinae was used for the quantification of surviving RGCs. Furthermore, regeneration of axons was quantified in longitudinal optic nerve sections.

Results from western blot and immunohistochemical staining showed that ONC increased phosphorylation and inactivation of GSK3 mainly in RGCs. This is consistent with the results from the PNS. Concerning survival of RGCs in immunohistochemical staining of wholemount retinae, constitutive activity of GSK3 α or GSK3 β had no effect after ONC and ONC combined with lens injury. Only when both isoforms were constitutively active, the survival of RGCs was slightly increased. Several studies revealed an anti- and a pro-apoptotic effect of GSK3 so that the shown increased survival could be explained by a stronger anti-apoptotic effect. Furthermore, in longitudinal optic nerve sections, it was shown that limited axon regeneration after ONC was not changed by sustained GSK3 activity but was decreased after induction of regeneration by lens injury.

Based on the results in this study, it can be concluded that similar to the PNS, GSK3 activity is inhibited after CNS injury. In contrast to the positive effect of sustained GSK3 activity in the PNS, the negative effect of sustained GSK3 activity dominates in the CNS. A possible reason for the opposing effects may lie in a different regulation of downstream targets of GSK3 (for example, the influence on microtubule associated proteins). Decryption of that downstream targets could enable developing therapeutical strategies in the future to help restore the lost function after an injury in the CNS.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
4E-BP1	<i>4E-binding protein 1</i>
6-BIO	<i>6-bromoindirubin-3'-oxime</i>
A	Alanin
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
Apaf-1	<i>apoptotic protease activating factor-1</i>
Bax	<i>BCL2-associated X protein</i>
<i>BC assay</i>	<i>bicinchoninic acid assay</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Cdk5	<i>cyclin-dependent kinase 5</i>
CGN	<i>cerebellar granule neuron</i>
ChABC	Chondroitinase ABC
CNS	<i>central nervous system</i>
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CNTF-R	<i>ciliary neurotrophic factor-Rezeptor</i>
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
CRMP2	<i>collapsin response mediator protein 2</i>
CSPG	Chondroitinsulfatproteoglykan
CTB	Choleratoxin B
DAPI	4,6 Diamidinon-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eIF2B	eukaryotischer Initiationsfaktor 2B
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
Fas-L	Fas-Ligand
Fas-R	Fas-Rezeptor
g	Gramm
GAP-43	<i>growth associated protein-43</i>
gp130	Glykoprotein 130
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3

GSK3 α / β ^{S21/A21/S9/A9}	GSK3 α / β ^{S/A} / GSK3
GSK3 α ^{S21/A21}	GSK3 α ^{S/A}
GSK3 β ^{S9/A9}	GSK3 β ^{S/A}
GTPase	Guaninnukleotid-bindendes Protein
hIL-6	Hyper-Interleukin-6
HSF-1	<i>heat shock factor-1</i>
Ig	Immunglobulin
IL1 β	Interleukin1 β
IL-6	Interleukin-6
IL-6-R	Interleukin-6-Rezeptor
IRDye	<i>infrared fluorescent dyes</i>
IS	Inflammatorische Stimulation
JAK	Januskinase
kDA	Kilodalton
ki	<i>knockin</i>
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LIF-R	<i>leukemia inhibitory factor-receptor</i>
LINGO 1	<i>LRR and Ig domain-containing Nogo receptor-interacting protein 1</i>
LV	Linsenverletzung
MAG	<i>myelin-associated glycoprotein</i>
MAP1B	<i>microtubule-associated protein 1B</i>
MAPs	<i>microtubule-associated proteins</i>
min	Minuten
mm	Millimeter
mM	Millimol
MT	Mikrotubuli
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NgR	Nogo-Rezeptor
nm	Nanometer
Nogo-A	<i>neurite outgrowth inhibitor-A</i>
Nr.	Nummer
NT-4/5	Neurotrophin-4/5
OMgp	<i>oligodendrocyte myelin glycoprotein</i>
Pam3Cys	<i>Tripalmitoyl-S-glyceryl cysteine</i>

PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PBS-T	<i>phosphate-buffered saline with tween</i>
PC12	<i>pheochromocytoma cell line 12</i>
PDK1/2	<i>phosphatidylinositol-dependent kinase 1/2</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PirB	<i>paired immunoglobuline like receptor B</i>
PNS	peripheres Nervensystem / <i>peripheral nervous system</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PTP σ	<i>transmembrane protein tyrosine phosphatase sigma</i>
RAG	Regenerations-assoziierte Gene
RGC	<i>retinal ganglion cell</i>
RGZ	retinale Ganglienzelle
RhoA	<i>ras homolog gene A</i>
ROCK	<i>rho-associated protein kinase</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
S	Serin
S6K1	S6-Kinase 1
SB-415286	<i>small molecular agent-415286</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i>
Sema3A	Semaphorin 3A
SHP2	<i>src homology phosphatase 2</i>
shRNA	<i>small hairpin ribonucleic acid</i>
sIL-6-R	<i>soluble Interleukin-6-receptor</i>
SM-216289	<i>small molecular agent-216289</i>
SN	Sehnerv
SOCS3	<i>suppressor of cytokine signaling 3</i>
SPRR1A	<i>small proline rich protein 1 A</i>
SQ	Sehnervquetschung
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
T	Threonin
TBS-T	<i>tris-buffered saline with tween</i>

TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TNFRSF19	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily 19</i>
TSC1/2	<i>tuberous sclerosis complex 1/2</i>
V	Volt
Wnt	<i>wingless-related integration site</i>
ZK	Zellkern
ZNS	zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Vorwort.....	1
1.2 Ursachen der Regenerationsinsuffizienz im ZNS.....	1
1.2.1 Inhibitorische Einflüsse der extrazellulären Umgebung	2
1.2.2 Inhibitorische intrazelluläre Einflüsse.....	7
1.3 Rolle von GSK3	13
1.3.1 Einfluss von GSK3 auf das Überleben von Zellen	14
1.3.2 Einfluss von GSK3 auf die axonale Regeneration	18
1.4 Der Sehnerv als Modell für die axonale Regeneration im ZNS	20
1.5 Ziele der Arbeit.....	23
2 Material und Methoden	25
2.1 Operative Verfahren.....	25
2.1.1 Material.....	25
2.1.2 Versuchstiere.....	26
2.1.3 Operationen.....	26
2.2 Mikroskopische Verfahren.....	28
2.2.1 Material.....	28
2.2.2 Immunhistochemie.....	30
2.2.3 Quantifizierung der axonalen Regeneration im Sehnerv	32
2.3 Biochemische Verfahren.....	33
2.3.1 Material.....	33
2.3.2 Semiquantitativer Proteinnachweis im <i>Western Blot</i>	36
2.4 Statistik	39
3 Ergebnisse	40
3.1 Auswirkung einer Sehnervquetschung auf die GSK3-Aktivität in retinalen Ganglienzellen.....	40

3.2 Auswirkung konstitutiv aktiver GSK3 auf das Überleben retinaler Ganglienzellen.....	43
3.3 Einfluss konstitutiv aktiver GSK3 auf die axonale Regeneration im verletzten Sehnerv.....	45
4 Diskussion	48
4.1 Eine Sehnervquetschung hemmt die GSK3-Aktivität in retinalen Ganglienzellen.....	48
4.2 Konstitutiv aktive GSK3 hat einen geringen neuroprotektiven Effekt.	51
4.3 Konstitutiv aktive GSK3 fördert nicht die Regeneration im verletzten Sehnerv, hemmt jedoch die linsenverletzungsinduzierte Regeneration.	53
4.4 Therapeutische Strategien zur Förderung der axonalen Regeneration .	55
4.5 Schlussfolgerungen	59
5 Literaturverzeichnis	61
6 Danksagung.....	73

1 Einleitung

1.1 Vorwort

Ein Organismus ist durch seine Auseinandersetzung mit der Umwelt immer wieder schädlichen Einflüssen ausgesetzt. Aus diesem Grund bedarf es zum weiteren Überleben einer ständigen Anpassung. Generell besitzt jeder Organismus im Tierreich die Fähigkeit zur Reparatur oder zum Ersatz beschädigter Zellen. Beispielsweise kann bei adulten Säugetieren die Verletzung eines peripheren Nervs zum erneuten Auswachsen des beschädigten Axons und damit der Wiederherstellung der ursprünglichen Funktion führen. Im Gegensatz zum peripheren Nervensystem (PNS) resultiert eine Schädigung des adulten zentralen Nervensystems (ZNS) in einem irreparablen Funktionsverlust. Neben dem Gehirn gehören auch das Rückenmark und das visuelle System zum ZNS. Eine Schädigung des Rückenmarks führt daher zu einer irreversiblen Lähmung und Sensibilitätsstörung. Eine Verletzung der Netzhaut oder des Sehnervs hat eine irreversible Erblindung zur Folge.

Bis heute ist die Regenerationsinsuffizienz des adulten ZNS nicht im Detail verstanden. Die Aufschlüsselung der zugrundeliegenden zellulären und molekularen Mechanismen ist Gegenstand ausführlicher Forschung. In vielen Studien wird letztendlich das Ziel verfolgt, therapeutische Ansätze zur Wiederherstellung verloren gegangener neurologischer Funktionen zu entwickeln. Zudem nimmt heutzutage die Lebenserwartung in den Industrieländern immer weiter zu. Die Entwicklung von Behandlungsmöglichkeiten neurodegenerativer Erkrankungen gewinnt deshalb zunehmend an Bedeutung.

1.2 Ursachen der Regenerationsinsuffizienz im ZNS

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts führte Ramón y Cajal Studien zur Entwicklung des Nervensystems und dessen zellulären Aufbau durch (Cajal, 1928). Anhand dieser postulierte er eine generelle Regenerationsinsuffizienz des adulten ZNS. Aus einer späteren Arbeit ging jedoch hervor, dass die Einbringung eines peripheren Nervenimplantats die axonale Regeneration verletzter zentraler Neurone ermöglichte (David and Aguayo, 1981). Der Ischiasnerv adulter Ratten

wurde dabei als Nerven­transplantat verwendet, um die beschädigte *Medulla oblongata* mit dem thorakalen Rückenmark zu verknüpfen. Es zeigte sich, dass die verletzten Axone der *Medulla oblongata* in die periphere Nervenbrücke einwuchsen. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass die Regenerationsfähigkeit des adulten ZNS nicht vollständig verloren geht. Zudem wurde daraus abgeleitet, dass das extrazelluläre Milieu im ZNS einen inhibitorischen Einfluss auf die Regenerationskapazität zentraler Neurone hat. Auch in einer Studie am Sehnerv konnte gezeigt werden, dass verletzte Axone der retinalen Ganglienzellen bei der Verwendung eines peripheren Nerven­transplantates zur Regeneration fähig waren (Vidal-Sanz et al., 1987). Dies unterstützt die Annahme, dass im ZNS extrazelluläre Faktoren das Wachstum beschädigter Axone hemmen. Das Ziel weiterer Studien war es, diese Faktoren zu identifizieren.

1.2.1 Inhibitorische Einflüsse der extrazellulären Umgebung

Myelin-assoziierte Regenerationshemmung

Myelin umgibt die Axone im ZNS und PNS spiralförmig (Geren, 1954; Bunge et al., 1961). Im ZNS wird die isolierende Myelinscheide von den zellulären Fortsätzen der Oligodendrozyten gebildet (Bunge et al., 1962). Oligodendrozyten gehören zur Gruppe der Gliazellen und kommen nur im ZNS vor (del Río-Hortega, 1928). Der Kontakt primärer Neuronenkulturen mit der Myelinmembran differenzierter Oligodendrozyten führte zu einer Reduktion des Neuritenwachstums (Schwab and Caroni, 1988). Isoliertes Myelin des ZNS, aber nicht des PNS, hemmte das Neuritenwachstum. Daraus wurde abgeleitet, dass das Myelin des ZNS wachstumshemmende Faktoren enthalten müsse.

Spätere Studien identifizierten die in der Myelinmembran befindlichen Proteine *neurite outgrowth inhibitor-A* (Nogo-A), *myelin-associated glycoprotein* (MAG) und *oligodendrocyte myelin glycoprotein* (OMgp) als wachstumshemmende Faktoren (Caroni and Schwab, 1988; McKerracher et al., 1994; Chen et al., 2000; GrandPre et al., 2000; Wang et al., 2002b). Die inhibitorische Wirkung der Proteine wird durch eine Interaktion mit dem Nogo-Rezeptor 1 (NgR1) in der Axonmembran vermittelt (GrandPre et al., 2000; Liu et al., 2002; Wang et al., 2002b).

NgR1 besitzt keine intrazelluläre Domäne und bildet zur Signaltransduktion einen ternären Komplex mit den Korezeptoren *LRR and Ig domain-containing Nogo receptor-interacting protein 1* (LINGO1) sowie entweder p75 oder *tumor necrosis factor receptor superfamily 19* (TNFRSF19) (Wang et al., 2002a; Mi et al., 2004; Park et al., 2005).

In vitro- und *in vivo*-Studien mit NgR1 *knockout* Tieren zeigten nur geringe disinhibitorische Effekte, obwohl NgR1 als Rezeptor für Nogo-A, MAG und OMgp postuliert wurde (Fischer et al., 2004a; Zheng et al., 2005). NgR2 konnte als weiterer Rezeptor für MAG bestimmt werden (Venkatesh et al., 2005). Als ein bedeutender Rezeptor für die inhibitorischen Moleküle wurde zudem *paired immunoglobuline like receptor B* (PirB) identifiziert (Atwal et al., 2008). Eine Hemmung von PirB mittels spezifischer Antikörper oder genetischem *knockout* kompensierte teilweise die Myelin-assoziierte Inhibition des Neuritenwachstums *in vitro*. Da die disinhibitorischen Effekte bei einer Hemmung von PirB stärker waren als bei einem *knockout* von NgR1, schrieben Atwal et al. (2008) PirB eine wesentlichere Rolle in der Signaltransduktion der Myelin-Inhibitoren zu.

Die Aktivierung von PirB und NgR hat stromabwärts eine Stimulation der GTPase *ras homolog gene A* (RhoA) mit Stimulation der *rho-associated protein kinase* (ROCK) zur Folge (Fournier et al., 2003). Eine Aktivierung des RhoA/ROCK-Signalweges verursacht eine Depolymerisation von Aktinfilamenten im axonalen Wachstumskegel, wodurch dieser kollabiert und die weitere axonale Wegfindung und Regeneration gehemmt wird (He and Koprivica, 2004). Der Wachstumskegel ist eine spezialisierte dynamische Struktur am Ende des auswachsenden Axons und enthält ein Netzwerk aus Aktinfilamenten und Mikrotubuli (Cajal, 1890; Gordon-Weeks, 2000). Die Ausbildung eines Wachstumskegels ist für die axonale Wegfindung und Regeneration wichtig.

Durch eine zeitgleiche Inaktivierung von PirB und NgR konnte die Myelin-assoziierte Inhibition nahezu vollständig eliminiert werden (Atwal et al., 2008).

Gliararbe als physikalische und chemische Barriere

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der zur Limitierung der axonalen Regeneration im ZNS beiträgt, ist die durch eine Verletzung hervorgerufene lokale Inflammation mit Ausbildung einer gliotischen Narbe (Cajal, 1928). Eine inflammatorische Reaktion aktiviert die ortsständigen Astrozyten und regt sie zur Proliferation an

(Clemente and Windle, 1954; Graeber et al., 1998). Daraufhin füllen die Astrozyten die Kavitäten der abgestorbenen Zellen aus. Ihre Fortsätze bilden am Läsionsrand ein dichtes Netzwerk, das als Astrogliose bezeichnet wird (Fitch et al., 1999; Wanner et al., 2013). Die Astrozyten produzieren zudem Intermediärfilamente, wie *glial fibrillary acidic protein* (GFAP), Vimentin und Nestin. Diese akkumulieren an der Läsionsstelle und tragen zur Bildung der Gliose bei, welche die Läsionsstelle abkapselt und dadurch eine physikalische Barriere schafft (Eliasson et al., 1999; Pekny et al., 1999). Sie schützt somit das unverletzte umliegende Gewebe vor weiterem Schaden. Letztlich führt die Glianarbe aber zu einer abortiven Aussprossung verletzter Axone (Cajal, 1928; Faulkner et al., 2004).

Neben der physikalischen Barriere besitzt die Glianarbe auch eine regenerationshemmende chemische Komponente. Chemorepulsive Faktoren werden von unterschiedlichen Zellen am Läsionsort sezerniert (Davies et al., 1996; Hilla et al., 2017; Hilla and Fischer, 2018). Im Rahmen inflammatorischer Prozesse sezernieren beispielsweise Makrophagen den *transforming growth factor β* (TGF β), der aktivierte Astrozyten zur Produktion und Freisetzung von Chondroitinsulfatproteoglykanen (CSPG) anregt (Fitch and Silver, 1997; Asher et al., 2000; Lagord et al., 2002).

CSPG sind Makromoleküle der extrazellulären Matrix und bestehen aus einem Glykoproteinkern, an den kovalent Seitenketten aus sulfatierten Glykosaminoglykanen gebunden sind (Bandtlow and Schwab, 2000; Rhodes and Fawcett, 2004). Mehrere Substanzen zählen zur Gruppe der CSPG, beispielsweise Neurokan oder Phosphokan. Sie interagieren mit Matrixmolekülen und Rezeptoren von Zelloberflächen. *In vitro*-Studien zeigten eine Hemmung des Neuritenwachstums bei Anwesenheit von CSPG (McKeon et al., 1991). Darüber hinaus verursacht eine CSPG-reiche Umgebung im verletzten Rückenmark einen Wachstumsstopp regenerierender Axone (Davies et al., 1999). Umgekehrt führt ein Abbau von CSPG an der Läsionsstelle mittels *chondroitinase ABC* zur gesteigerten Regeneration im verletzten Rückenmark (Bradbury et al., 2002).

Als Rezeptoren für die regenerationshemmende und repulsive Wirkung von CSPG konnten *transmembrane protein tyrosine phosphatase sigma* (PTP σ), NgR1 und NgR3 identifiziert werden (Shen et al., 2009; Dickendesher et al., 2012; Leibinger et al., 2012). Es wird derzeit diskutiert, dass die

Signalweiterleitung genau wie die der Myelin-assoziierten Proteine in RhoA mündet (Monnier et al., 2003; Dickendesher et al., 2012; Walker et al., 2012). Zur inhibitorischen chemischen Barriere trägt neben den CSPG auch das von Fibroblasten sezernierte Molekül Semaphorin 3A (Sema3A) bei (Pasterkamp et al., 1999; De Winter et al., 2002). Nachgewiesen wurde, dass eine Hemmung von Sema3A die axonale Regeneration fördert und die funktionelle Wiederherstellung nach Verletzung des Rückenmarks steigert (Kaneko et al., 2006).

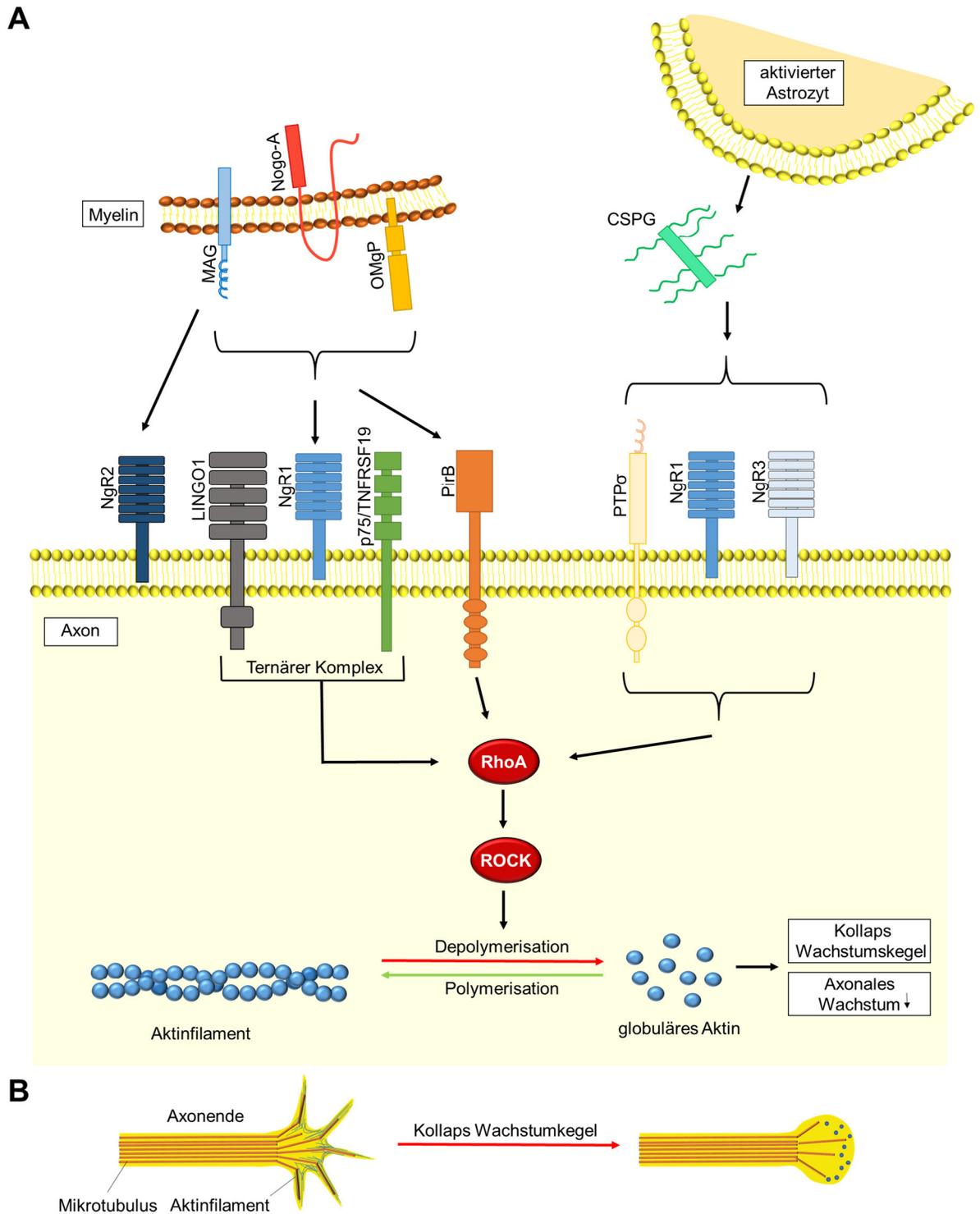


Abb. 1: Schema des inhibitorischen Signalweges der Myelin- und Glianarbe-assoziierten Faktoren

Die inhibitorischen Moleküle des Myelins und sezerniertes CSPG aus Astrozyten in der Glianarbe induzieren über spezifische Rezeptoren der Axonmembran einen Signalweg, der F-Aktin in den Filopodien des Wachstumskegels destabilisiert. Daraufhin kollabiert der Wachstumskegel

(A): Das von Oligodendrozyten gebildete Myelin enthält die Moleküle *oligodendrocyte myelin glycoprotein* (OMgp), *myelin-associated glycoprotein* (MAG) und *neurite outgrowth inhibitor-A* (Nogo-A). Diese binden an den in der Axonmembran befindlichen Nogo-Rezeptor 1 (NgR1) oder *paired immunoglobuline like receptor B* (PirB). MAG bindet ebenfalls Nogo-Rezeptor 2 (NgR2). Erfolgt eine Bindung an NgR1 wird die Formierung eines ternären Rezeptorkomplexes mit *LRR*

and Ig domain-containing Nogo receptor-interacting protein 1 (LINGO1) und entweder p75 oder tumor necrosis factor receptor superfamily 19 (TNFRSF19) initiiert. Stromabwärts der Rezeptoren kommt es über die Aktivierung von *ras homolog gene A* (RhoA) zu einer Aktivierung der *rho-associated protein kinase* (ROCK). Dies resultiert in einer Depolymerisation von Aktinfilamenten, woraufhin der Wachstumskegel kollabiert. Damit verbunden ist ein vermindertes axonales Wachstum. Zusätzlich führt das von aktivierten Astrozyten der Glianarbe sezernierte Chondroitinsulfatproteoglykan (CSPG) über eine Bindung an entweder *transmembrane protein tyrosine phosphatase sigma* (PTP σ), NgR1 oder NgR3 zur Aktivierung von RhoA/ROCK.

(B): Die Destabilisierung des Aktinzytoskeletts im Wachstumskegel führt zu dessen Kollaps.

1.2.2 Inhibitorische intrazelluläre Einflüsse

Eine alleinige Hemmung der inhibitorischen extrazellulären Moleküle zeigte sich als unzureichend für eine erfolgreiche axonale Regeneration, weshalb nach weiteren beeinflussenden Faktoren geforscht wurde (Goldberg and Frank, 1980; Chierzi et al., 1999; Zheng et al., 2005; Yiu and He, 2006). Mehrere Studien kamen zu dem Ergebnis, dass der Verlust der intrinsischen Regenerationskapazität zur Regenerationsinsuffizienz beiträgt (Goldberg and Frank, 1980; So and Aguayo, 1985; Chen et al., 1995). Die intrinsische Regenerationskapazität bezeichnet die Fähigkeit einer Zelle, nach einem traumatischen Ereignis die Aktivierung von Wachstumsprogrammen über intrazelluläre Signalwege zu steuern. Im Laufe der Entwicklung des ZNS nimmt jedoch die Regenerationskapazität ab (Shewan et al., 1995; Goldberg et al., 2002). Dieser Sachverhalt zeigte sich beispielsweise an embryonalen retinalen Zellkulturen, die zehnfach stärker auswuchsen als postnatale Zellkulturen (Goldberg et al., 2002). Für eine erfolgreiche Regeneration ist somit eine Reaktivierung der wachstumsassoziierten intrazellulären Signalwege ein entscheidender Faktor.

In Experimenten am Sehnerv wurde nachgewiesen, dass nach dessen Quetschung ein Großteil der retinalen Ganglienzellen (RGZ) einen apoptotischen Zelltod durchlaufen und nach 14 Tagen weniger als 10 % der Neurone überleben (Berkelaar et al., 1994). Das Zellsterben setzte dabei erst einige Tage nach der Verletzung ein. Es wird vermutet, dass die Sehnervquetschung eine Kaskade induziert, welche den apoptotischen Zelltod vermittelt.

Ein Mangel an retrograd transportierter neurotropher Substanzen wird als eine der Ursachen für die neuronale Apoptose diskutiert (Berkelaar et al., 1994; Rabacchi et al., 1994). Neurotrophe Faktoren sind Signalmoleküle, welche die

Differenzierung, das Überleben und die Regeneration von Nervenzellen steuern (Ebadi et al., 1997). Zu den neurotrophen Faktoren zählen die Neurotrophine. Die Neurotrophine *nerve growth factor* (NGF), *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) und Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) haben einen nachweislich neuroprotektiven Effekt auf RGZ (Cohen et al., 1994; Mansour-Robaey et al., 1994; Rabacchi et al., 1994). Der Einsatz einzelner Neurotrophine führt jedoch nur zu einem geringen regenerationsfördernden Effekt (Lu et al., 2004). Erst eine Kombination mehrerer Neurotrophine steigert das Überleben von RGZ und induziert axonales Wachstum (Logan et al., 2006).

Zudem wurde festgestellt, dass eine Verletzung der Augenlinse ein gesteigertes Überleben von RGZ bewirkt und die verletzten Axone im Sehnerv über die Läsionsstelle hinauswachsen können (Fischer et al., 2000; Leon et al., 2000; Fischer et al., 2001; Yin et al., 2003). Die positiven Effekte werden auf eine kontinuierliche Freisetzung der Linsenstrukturproteine, den β - und γ -Kristallinen, zurückgeführt (Fischer et al., 2008). In späteren Studien konnten die neuroprotektiven Effekte einer Linsenverletzung durch Injektion der *toll-like receptor 2* (TLR2) Agonisten Zymosan, ein Homopolysaccharid aus der Zellwand von Hefen, und Pam₃Cys, ein synthetisches Analogon von bakteriellem Lipoprotein, imitiert werden (Leon et al., 2000; Yin et al., 2003; Fischer et al., 2008; Hauk et al., 2010).

Das Verfahren der Linsenverletzung sowie die Injektion von Zymosan und Pam₃Cys werden unter dem Begriff der inflammatorischen Stimulation (IS) subsumiert. Durch eine IS werden retinale Astrozyten und Müllerzellen aktiviert, woraufhin die zur Interleukin-6-Familie gehörigen Zytokine *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), *leukemia inhibitory factor* (LIF) und Interleukin-6 (IL-6) exprimiert werden (Muller et al., 2007; Leibinger et al., 2009; Leibinger et al., 2013a; Leibinger et al., 2013b). CNTF und LIF sind maßgeblich an der Vermittlung der neuroprotektiven und regenerationsförderlichen Effekte der Linsenverletzung beteiligt (Leibinger et al., 2009).

Die Zytokine der IL-6-Familie übertragen ihr Signal in die Zelle durch Bildung eines spezifischen Rezeptorkomplexes (Heinrich et al., 2003). Zuerst bindet das Zytokin an einen α -Rezeptor (CNTF-Rezeptor [CNTF-R]; IL-6-Rezeptor [IL-6-R]). Dieser α -Rezeptor ist nicht an der intrazellulären Signalübertragung beteiligt, sondern rekrutiert im Komplex mit dem Zytokin weitere signaltransduzierende β -

Rezeptoren (Glykoprotein 130 [gp130]; LIF-Rezeptor [LIF-R]). Als signalübertragende Rezeptoren bindet CNTF zusammen mit CNTF-R die beiden β -Rezeptoren LIF-R und gp130. IL-6 bindet zusammen mit IL-6-R den β -Rezeptor gp130. LIF vermittelt das Signal direkt über eine Bindung an LIF-R und gp130. Darüber hinaus kann IL-6 durch die Bindung an einen löslichen IL-6-Rezeptor (sIL-6-R) das Signal an Zellen weitergeben, welche nicht IL-6-R, sondern nur gp130 exprimieren.

Der gebildete β -Rezeptorkomplex aktiviert die intrazelluläre Tyrosinkinase Januskinase (JAK). Anschließend kann JAK den Transkriptionsfaktor *signal transducers and activators of transcription 3* (STAT3) durch eine Phosphorylierung stimulieren. Phosphoryliertes STAT3 dimerisiert und transloziert in den Zellkern. Dort reguliert es als Transkriptionsfaktor die Expression regenerationsassoziierter Gene (RAG), wie *growth associated protein-43* (GAP-43) oder *small proline rich protein 1 A* (SPRR1A) (Fischer et al., 2004b; Fischer and Leibinger, 2012; Diekmann and Fischer, 2013). Die Expression von RAG geht einher mit dem Übergang der Zelle in einen aktiven regenerativen Zustand. Dadurch wird das Überleben von RGZ und das Längenwachstum regenerierender Axone nach einer Sehnervquetschung gesteigert (Fischer et al., 2004b). Es zeigte sich, dass die positiven IS-Effekte in entscheidendem Maße über die Expression und Aktivierung von STAT3 vermittelt werden (Leibinger et al., 2013a).

Als intrazellulärer Inhibitor des JAK/STAT3-Signalweges wurde der *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3) identifiziert (Smith et al., 2009). Eine Deletion von SOCS3 fördert die axonale Regeneration in dem verletzten Sehnerv (Smith et al., 2009).

Eine zytokinvermittelte Stimulation von JAK führt neben einer Stimulation von STAT3 ebenso zu einer Rekrutierung und Aktivierung von *src homology phosphatase 2* (SHP2) (Heinrich et al., 2003). SHP2 stimuliert daraufhin die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K). Die aktivierte PI3K katalysiert anschließend eine Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) (Cantley, 2002). PIP₃ wiederum stimuliert über die *phosphatidylinositol-dependent kinase 1/2* (PDK1/2) die Proteinkinase B auch AKT genannt. Der beschriebene PI3K/AKT-Signalweg ist an einer Vermittlung der positiven Effekte der IS beteiligt (Alonzi et al., 2001).

Einer der AKT nachgeschalteten Signalwege führt über eine Inhibition des *tuberous sclerosis complex 1/2* (TSC1/2) zur Stimulation des *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) (Manning and Cantley, 2003). Aktiviertes mTOR steigert die Proteintranslation, indem das translationshemmende *4E-binding protein 1* (4E-BP1) inhibiert und die S6-Kinase 1 (S6K1) stimuliert wird (Fingar et al., 2002). Eine IS verhindert die Abnahme der mTOR-Aktivierung nach einer Sehnervquetschung (Leibinger et al., 2012). Dadurch wird der Regenerationszustand aufrechterhalten und im Sinne einer Disinhibition die Empfindlichkeit der Axone gegenüber inhibitorisch wirkender Moleküle, wie Myelin und CSPG, gesenkt.

Der Versuch, die positiven Effekte der IS über eine exogene Zugabe von Zytokinen zu erzielen, zeigte jedoch nur eine limitierte Wirkung (Cui et al., 1999; Weise et al., 2000). Als hierfür ursächlich wird die kurze Halbwertszeit der Zytokine *in vivo* gesehen. Durch eine kontinuierliche Freisetzung von CNTF mittels viraler Vektoren kann das Überleben und die Regeneration von RGZ gefördert werden (Leaver et al., 2006).

Für die limitierten Effekte ist ebenso eine geringe Expression der α -Rezeptorkomponente der IL-6-Familie verantwortlich (Heinrich et al., 2003). Eine Verletzung des Sehnervs vermindert zusätzlich die Expression des α -Rezeptors CNTF-R in den RGZ, was das Ansprechen der Zytokine weiter reduziert (Miotke et al., 2007). Im Gegensatz zur α -Rezeptorkomponente wird gp130 als signalübertragende β -Rezeptoruntereinheit ubiquitär exprimiert (Heinrich et al., 2003).

Ein Umgehen der limitierten Signalvermittlung der natürlichen Zytokine ist durch die Verwendung des Designerzytokins hyper-Interleukin-6 (hIL-6) möglich (Leibinger et al., 2016). Bei hIL-6 handelt es sich um ein Fusionsprotein aus dem löslichen IL-6-Rezeptor und IL-6 (Fischer et al., 1997). Dieses kann direkt gp130 stimulieren. Eine direkte Aktivierung von gp130 ist wirksamer als über die zytokinvermittelte Rekrutierung der α -Rezeptorkomponente (Peters et al., 1998; Leibinger et al., 2016). In Kulturen von RGZ steigerte hIL-6 das Neuritenwachstum deutlich effizienter als CNTF oder IL-6 (Leibinger et al., 2016). Zurückgeführt wird dies auf eine stärkere Stimulation des JAK/STAT3-Signalweges. Durch eine kontinuierliche Freisetzung von hIL-6 in RGZ mittels intravitrealer Injektion eines hIL-6-exprimierenden Adeno-assoziierten Virus

(AAV) konnte die axonale Regeneration nach einer Sehnervquetschung noch stärker als eine alleinige Linsenverletzung gesteigert werden (Leibinger et al., 2016). Somit kann die Limitation der natürlichen Zytokine durch die Verwendung von hIL-6 umgangen werden.

Neben der IS wird mit der genetischen Depletion des Tumorsuppressors *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) ein weiterer Weg beschrieben, um das intrinsische Regenerationsprogramm von adulten RGZ zu aktivieren (Park et al., 2008). PTEN konvertiert PIP₃ zu PIP₂ und wirkt dadurch einer aktivierenden Phosphorylierung von AKT entgegen (Stambolic et al., 1998). Studien zeigten, dass ein *knockout* von PTEN das Überleben von RGZ nach einer Sehnervquetschung steigert und ein ausgeprägtes Längenwachstum regenerierender Axone induziert (Park et al., 2008). Ein *knockout* von PTEN führt zum Erhalt der mTOR-Aktivität, welche durch eine Sehnervquetschung reduziert wird. Eine Hemmung von mTOR mittels Rapamycin hatte ein fast vollständiges Ausbleiben der neuroprotektiven und regenerationsförderlichen Effekte des PTEN *knockout* zur Folge (Park et al., 2008).

Durch einen *knockout* von TSC1/2, welches stromaufwärts von mTOR liegt und zur verminderten Aktivierung von mTOR beiträgt, können größtenteils die gleichen neuroprotektiven Effekte und ein gesteigertes axonales Längenwachstum wie im PTEN *knockout* erreicht werden (Park et al., 2008). Aus diesem Grund wird die Wirkung des PTEN *knockout* überwiegend auf den Erhalt der mTOR-Aktivität zurückgeführt (Park et al., 2008). Da jedoch ein TRC1-*knockout* die PTEN *knockout* Effekte nicht vollständig imitieren konnte, werden weitere Komponenten für die Vermittlung der regenerationsförderlichen Effekte diskutiert.

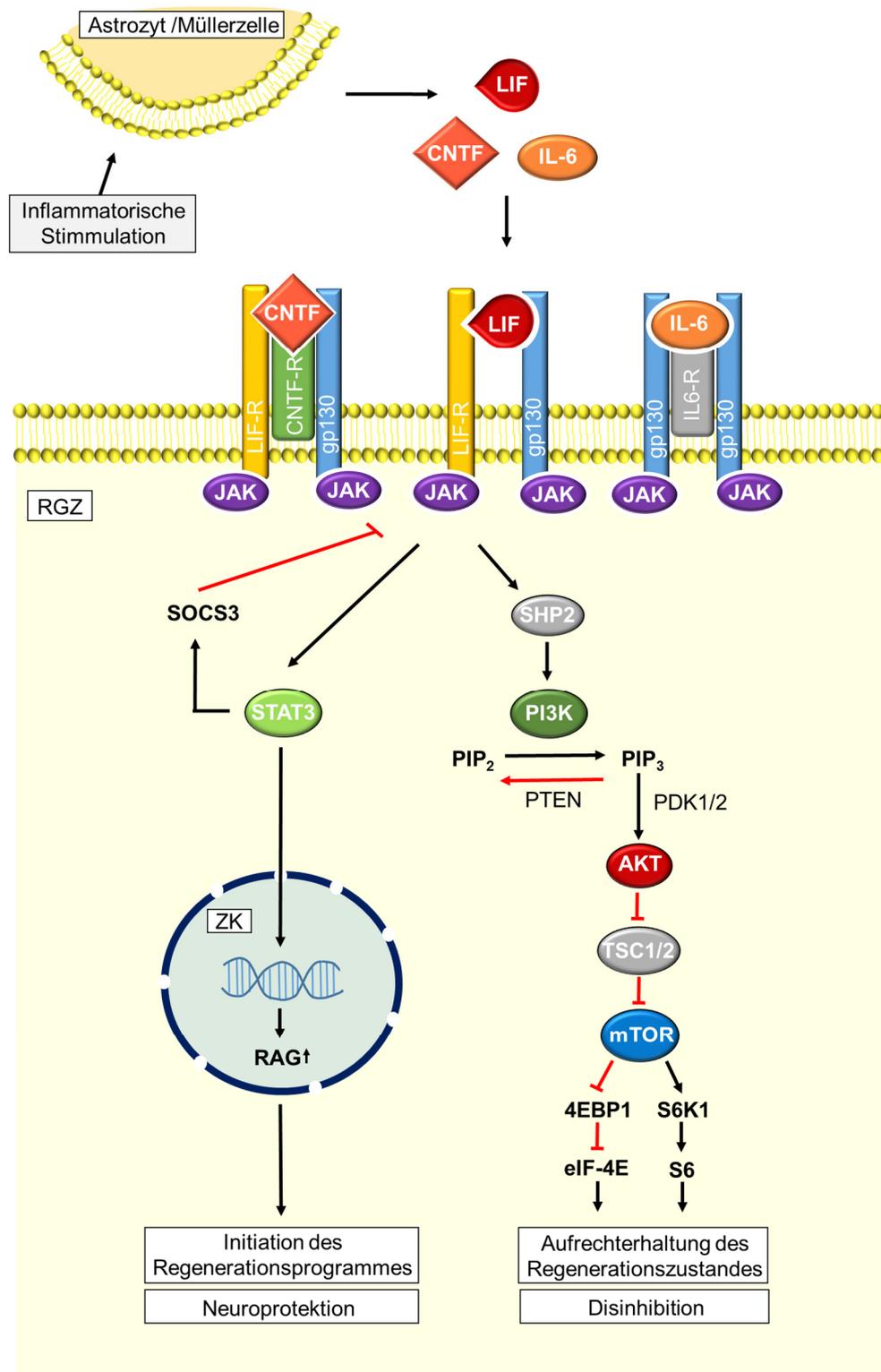


Abb. 2: Schema des Signalweges der inflammatorischen Stimulation

Eine inflammatorische Stimulation führt zur Aktivierung von Astrozyten und Müllerzellen, welche daraufhin die Zytokine der Interleukin-6-Familie *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), *leukemia inhibitory factor* (LIF) und Interleukin-6 (IL-6) sezernieren. Die Zytokine binden jeweils an spezifische Rezeptoren (CNTF-R, LIF-R, IL-6-R oder Gkypoprotein 130 [gp130]) der retinalen Ganglienzellen (RGZ). Dies stimuliert die Januskinase (JAK). JAK phosphoryliert den Transkriptionsfaktor *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) und aktiviert *src homology phosphatase 2* (SHP2). Phosphoryliertes STAT3 dimerisiert und transloziert in den Zellkern (ZK), woraufhin regenerationsassoziierte Gene (RAG) exprimiert werden. Der daraus resultierende regenerative Zustand führt zur Neuroprotection der RGZ. STAT3-vermittelt erfolgt

ebenso die Expression von *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3), was über die Hemmung von JAK als negative Rückkopplung fungiert. Durch JAK aktiviertes SHP2, stimuliert die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) umwandelt. PIP₃ stimuliert die *phosphatidylinositol-dependent kinase 1/2* (PDK1/2), welche durch eine Phosphorylierung die Proteinkinase B (AKT) aktiviert. Die Phosphatase *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) stellt durch die Umwandlung von PIP₃ zu PIP₂ einen Gegenspieler zu PI3K dar. Stromabwärts von AKT führt die Hemmung von *tuberous sclerosis complex 1/2* (TSC1/2) zur Stimulierung von *mechanistic target of rapamycin* (mTOR). Aktiviertes mTOR steigert die Proteinsynthese, indem das translationshemmende *4E-binding protein 1* (4E-BP1) gehemmt wird und die S6-Kinase 1 (S6K1) aktiviert wird. Dies führt zur Aufrechterhaltung des Regenerationszustandes und zur Disinhibition gegenüber inhibitorischer Umgebungsfaktoren.

1.3 Rolle von GSK3

Zu Beginn der 1980er-Jahre wurde eine für die Glykogen-Synthase hochspezifische Kinase, die Glykogen-Synthase Kinase 3 (GSK3), identifiziert (Embi et al., 1980). Bei GSK3 handelt es sich um eine ubiquitär exprimierte Serin/Threonin Kinase. Im Laufe der Zeit wurden über 40 Zielproteine von GSK3 identifiziert. Zu diesen zählen nicht nur metabolische Enzyme, sondern auch Transkriptionsfaktoren und Strukturproteine. Dadurch beeinflusst GSK3 entscheidend die Funktion, Struktur und das Überleben von Zellen (Jope and Johnson, 2004).

Es wurden zwei Isoformen, GSK3 α (51 kDa) und GSK3 β (46 kDa), in Säugetieren gefunden. Diese werden zwar von unterschiedlichen Genen kodiert, weisen jedoch eine nahezu identische Kinasedomänesequenz auf (Woodgett, 1990). Im Fall von GSK3 β wurden die beiden Splicevarianten GSK3 β ₁ und GSK3 β ₂ mit einer Abweichung von 13 Aminosäuren entdeckt.

Als einer der wichtigsten Regulatoren von GSK3 wird die Proteinkinase AKT angesehen (Cross et al., 1995). Eine Stimulation von PI3K führt zu einer Phosphorylierung von AKT an Threonin-308, wodurch es zu deren Aktivierung kommt (Alessi et al., 1996). Nachfolgend kann AKT die Kinaseaktivität von GSK3 über eine Phosphorylierung an Serin-21 (GSK3 α) und Serin-9 (GSK3 β) inhibieren (Cross et al., 1995). Eine Autophosphorylierung von Tyrosin-279 (GSK3 α) und Tyrosin-216 (GSK3 β) bewirkt dahingegen eine gesteigerte Enzymaktivität (Hughes et al., 1993; Wang et al., 1994; Cole et al., 2004).

Bei vielen Substraten von GSK3 ist zur Interaktion erst ein voriges *priming* des Substrates durch eine andere Kinase nötig (Frame and Cohen, 2001). Dies

bedeutet, dass das Substrat erst an einer anderen spezifischen Stelle phosphoryliert werden muss, bevor GSK3 das Substrat phosphorylieren kann. Neben dem *priming* trägt die Kolokalisation der Substrate mit GSK3 ebenfalls zu deren Regulierung bei (Beurel et al., 2015).

Eine Dysregulation von GSK3 konnte mit verschiedenen pathologischen Prozessen, wie Diabetes mellitus, Morbus Alzheimer und Schizophrenie, in Verbindung gebracht werden (Kozlovsky et al., 2002; Henriksen et al., 2003; Phiel et al., 2003). Die Funktion von GSK3 in der axonalen Regeneration des PNS und ZNS wird in der bestehenden Literatur kontrovers diskutiert und ist Gegenstand intensiver Forschung. Mehrere Studien stellten in unterschiedlichen Versuchsmodellen einen inhibitorischen Einfluss von GSK3 auf das axonale Wachstum nach einer Verletzung des ZNS fest (Dill et al., 2008; Miao et al., 2016). Entgegengesetzt zu den Ergebnissen im ZNS zeigte sich in Studien zum PNS eine Steigerung der axonalen Regeneration bei konstitutiver GSK3-Aktivität (Gobrecht et al., 2014; Diekmann and Fischer, 2016; Gobrecht et al., 2016).

Für eine erfolgreiche axonale Regeneration im ZNS sind mehrere Aspekte entscheidend. Neben dem Überleben der Nervenzelle und der Aktivierung des intrinsischen Regenerationsprogrammes ist das Überwinden der inhibitorischen zentralen Umgebung essenziell. Welchen Einfluss GSK3 auf die genannten Aspekte hat, wird in den nächsten Abschnitten erläutert.

1.3.1 Einfluss von GSK3 auf das Überleben von Zellen

Der programmierte Zelltod, als Apoptose bezeichnet, kann durch unterschiedliche Signalwege induziert werden. Dabei erfolgt die Einleitung der Apoptose entweder durch einen intrinsischen oder einen extrinsischen Apoptoseweg (Hengartner, 2000).

Der intrinsische Signalweg wird durch einen zellinternen Stimulus, beispielsweise einen DNA-Schaden oder oxidativen Stress, eingeleitet und führt zur Expressierung pro-apoptotischer Proteine. Dies resultiert in einer Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und einer Loslösung des *apoptotic protease activating factor-1* (Apaf-1). Dadurch kann das sogenannte Apoptosom gebildet werden, welches die Caspase-3 aktiviert, die wiederum den Zelltod einleitet.

Der extrinsische Signalweg erfolgt über eine Aktivierung der membranständigen

Todesrezeptoren Fas-Rezeptor (Fas-R) oder Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNF-R) durch extrazelluläre Faktoren, wie Fas-Ligand (FAS-L) oder *tumor necrosis factor α* (TNF α). Die Aktivierung des Todesrezeptors führt über eine Rekrutierung weiterer zellinterner Faktoren letztlich zu einer Aktivierung der Caspase-3, wodurch der Zelltod herbeigeführt wird.

Mehrere Studien untersuchten den Einfluss von GSK3 auf das Überleben von Zellen. Dabei stellten sich in Abhängigkeit des Versuchsmodells pro- oder anti-apoptotische Effekte heraus (Pap and Cooper, 1998; Hoeflich et al., 2000). In Zusammenschau vieler Studien zeigte sich als Ursache für die gegensätzlichen Effekte von GSK3, dass GSK3 bezüglich der Apoptosesignalwege eine duale Funktion besitzt. GSK3 kann den intrinsischen Apoptoseweg fördern und den extrinsischen Apoptoseweg hemmen (Beurel and Jope, 2006). Durch eine Modulation der Signalwege an unterschiedlichen Stellen wird die Schwelle vermehrt oder vermindert in Richtung des Zelltodes verschoben.

Viele Studien beschäftigten sich mit dem Einfluss von GSK3 auf Faktoren, welche den intrinsischen Apoptoseweg fördern. So zeigte sich bei einer Vektoren vermittelten Überexpression von aktivem GSK3 in Zellkulturen, dass die Apoptoserate durch Modulation des Tumorsuppressors p53 und der Mitglieder der *B-cell-lymphoma-2* (Bcl-2)-Familie ansteigt (Pap and Cooper, 1998). Eine *in vitro* Studie deutet ebenso darauf hin, dass GSK3 β nach einer DNA-Schädigung mit p53 im Mitochondrium interagiert und so die Cytochrom-C-Freisetzung unterstützt (Watcharasit et al., 2003). Durch die Hemmung von GSK3 β wurde zudem die p53-vermittelte Expression des pro-apoptotischen *Bcl-2-associated X protein* (Bax) reduziert (Watcharasit et al., 2003). Darüber hinaus kann GSK3 β Bax aktivieren und dessen Translokation ins Mitochondrium fördern, sodass es zu einer vermehrten Freisetzung von Cytochrom C kommt (Linseman et al., 2004).

In der Literatur gab es außerdem Hinweise darauf, dass GSK3 β Nervenzellen für einen stressinduzierten Zelltod sensibilisiert und dadurch pro-apoptotisch wirkt (Li et al., 2002). Beispielsweise zeigte sich nach einem Hitzeschock als Stressreiz in GSK3 β -überexprimierenden Neuroblastomzellkulturen eine massive Steigerung der Caspase-3-Aktivität mit Induktion einer Apoptose (Bijur et al., 2000). Eine gleichzeitige Hemmung von GSK3 β durch Lithium verhinderte den Anstieg der Caspase-3-Aktivität.

Anhand weiterer Studien wurde eine negative Regulation von GSK3 auf Transkriptionsfaktoren, wie *heat shock factor 1* (HSF-1) und *cAMP response element binding protein* (CREB), nachgewiesen, welche für das Überleben und die Funktion der Zelle wichtig sind (Bullock and Habener, 1998; He et al., 1998; Sears et al., 2000). Darüber hinaus kann GSK3 β über eine inhibitorische Phosphorylierung des Initiationsfaktors eIF2B die Proteinsynthese hemmen und so das Gleichgewicht in der Zelle mehr in Richtung des Zelltodes verschieben (Pap and Cooper, 2002).

Gegen eine rein pro-apoptotische Wirkung von GSK3 spricht jedoch allein die Tatsache, dass genetisch veränderte Mäuse mit konstitutiv aktiver GSK3 keinen auffälligen Phänotyp besitzen (McManus et al., 2005). Durch Daten aus einer anderen Studie wurde zudem ein anti-apoptotischer Effekt von GSK3 nachgewiesen, da GSK3 β den TNF α -induzierten extrinsischen Apoptoseweg hemmte (Hoefflich et al., 2000). Aufgrund eines TNF α -vermittelten Leberversagens starben in der Studie die GSK3 β *knockout* Mäuseembryonen. Die Fibroblasten der GSK3 β -defizienten Mäuse zeigten sich dabei empfindlicher gegenüber TNF α . In einer weiteren Studie potenzierte eine Hemmung von GSK3 die durch den Todesrezeptor Fas-R induzierte Caspase-Aktivität (Song et al., 2004). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass GSK3 die Formierung des intrazellulären Todesrezeptorkomplexes hemmt und dadurch die weitere Signalübertragung und Aktivierung von Caspasen verhindert (Sun et al., 2008). Somit existieren in der Literatur mehrere Studien mit dem Nachweis eines anti-apoptotischen Effektes von GSK3 vermittelt über eine Hemmung des extrinsischen Apoptoseweges.

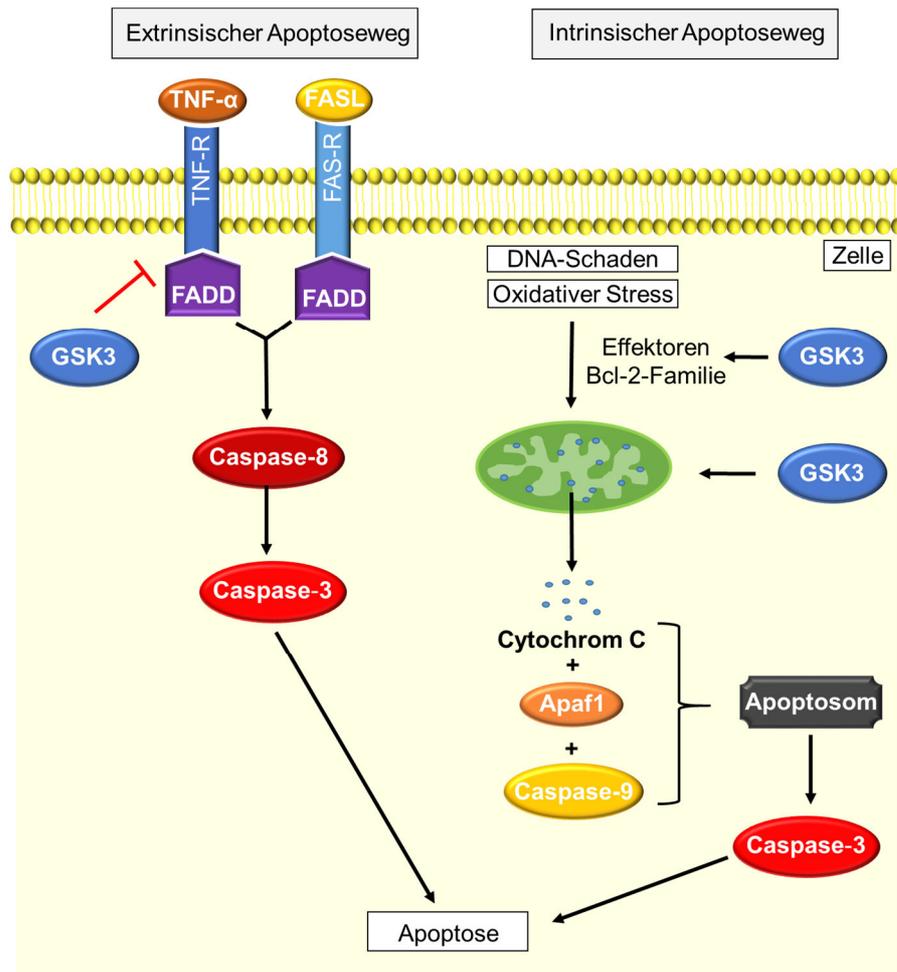


Abb. 3: Schematische Darstellung des Einflusses von GSK3 auf den extrinsischen und intrinsischen Apoptoseweg

GSK3 wirkt sich durch eine Hemmung der extrinsischen und Förderung der intrinsischen Apoptose gegensätzlich auf den Zelltod aus.

Über den *tumor necrosis factor α* (TNF α) oder Fas-Ligand (FAS-L) werden die membranständigen Todesrezeptoren Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNF-R) und Fas-Rezeptor (Fas-R) aktiviert. Daraufhin bindet das Adapterprotein *Fas-associated protein with death domain* (FADD) an den Rezeptor. Im weiteren Signalweg erfolgt über eine Aktivierung der Caspase-8 und 3 die Einleitung der Apoptose. GSK3 hemmt die Formierung des Todesrezeptorkomplexes und dadurch die weitere intrazelluläre Signalübertragung und Einleitung der Apoptose. Der intrinsische Apoptoseweg wird durch einen zellinternen Stimulus wie einen DNA-Schaden oder oxidativen Stress eingeleitet. Daraufhin werden pro-apoptotische Proteine der *B-cell lymphoma 2* Familie (Bcl-2-Familie) exprimiert. Dies führt zur Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium. Cytochrom C bildet zusammen mit dem *apoptotic protease activating factor-1* (Apaf-1) und der Caspase-9 das Apoptosom. Das Apoptosom aktiviert Caspase-3 was zur Induktion der Apoptose führt. GSK3 reguliert die Expression pro-apoptotischer Bcl-2-Proteine und unterstützt die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium, wodurch der intrinsische Apoptoseweg gefördert wird.

1.3.2 Einfluss von GSK3 auf die axonale Regeneration

Das Zytoskelett ist für die Morphologie einer Zelle, ihren intrazellulären Transport und ihre Beweglichkeit verantwortlich (Huber et al., 2013). Es stellt ein dynamisches Netzwerk dar, welches aus proteinhaltigen Filamenten gebildet wird. Zu den Filamenten des Zytoskeletts gehören Aktin, Intermediärfilamente und Mikrotubuli.

Mikrotubuli (MT) sind röhrenförmige, gerichtete Strukturen (Mandelkow and Mandelkow, 1994). Gebildet werden sie aus einer Dimerisierung der Proteine α -Tubulin und β -Tubulin. Die Tubulin-Heterodimere verknüpfen sich in Längsrichtung und bilden so Protofilamente. Durch eine seitliche Verknüpfung mehrerer Protofilamente entsteht ein spiralförmiger Mikrotubulus. MT sind keine starren Strukturen, sondern unterliegen einem permanenten dynamischen Auf- und Abbau. Das Vorliegen von Tubulin in einer tyrosinierten Form erhöht diese Dynamik und begünstigt das Wachstum (Gundersen et al., 1984; Wehland et al., 1984). Im Gegensatz dazu führt eine Detyrosinierung von Tubulin durch die Tubulin-Carboxypeptidase zur Stabilisierung des MT (Khawaja et al., 1988).

Verschiedene Moleküle regulieren die Organisation und Dynamik des MT. Zu den wichtigen Regulatoren zählen die *microtubule-associated-proteins* (MAPs) (Maccioni and Cambiasso, 1995). Im Gehirn ist ein bedeutender Vertreter dieser Gruppe das *microtubule associated protein 1B* (MAP1B) (Olmsted, 1986; Gordon-Weeks and Fischer, 2000; Gonzalez-Billault et al., 2001). In mehreren Studien konnte für MAP1B eine tragende Rolle in der neuronalen Entwicklung und im Wachstum von Axonen nachgewiesen werden (Crino et al., 1997; Cheng et al., 1999; Gordon-Weeks and Fischer, 2000; Gonzalez-Billault et al., 2001). Auch *collapsin response mediator protein 2* (CRMP2) wirkt sich im entscheidenden Maße auf die Stabilität von MT aus und beeinflusst die Axogenese sowie neuronale Polarität (Inagaki et al., 2001; Fukata et al., 2002; Arimura et al., 2004).

Sowohl CRMP2 als auch MAP1B sind Substrate von GSK3 (Lucas et al., 1998; Yoshimura et al., 2005). GSK3 kann MAP1B durch eine Phosphorylierung an Tyrosin-1265 oder Serin-1260 direkt aktivieren (Lucas et al., 1998; Goold et al., 1999; Trivedi et al., 2005). Phosphoryliertes MAP1B (pMAP1B) bindet vermehrt an α -Tubulin, wodurch dessen Detyrosinierung über die Tubulin-Carboxypeptidase gehemmt wird (Goold et al., 1999; Gonzalez-Billault et al.,

2003). Erhöhte pMAP1B-Level halten MT in einer dynamischen Form, wodurch pMAP1B die Migration von Neuronen sowie die Formation und das axonale Wachstum fördert (Gonzalez-Billault et al., 2001; Gordon-Weeks, 2004).

Durch konstitutiv aktive GSK3 wurde die axonale Regeneration in dem verletzten Ischiasnerv von *knockin* Mäusen beschleunigt (Gobrecht et al., 2014). Das gesteigerte axonale Wachstum im GSK3 *knockin* Tier korrelierte mit einer vermehrten Phosphorylierung von MAP1B und einer Reduktion stabiler detyrosinierter MT im Axon (Gobrecht et al., 2016). Daraus wurde abgeleitet, dass GSK3 über Beeinflussung der MT-Dynamik die Regeneration im PNS fördert. Eine Hemmung der Tubulin-Carboxypeptidase durch den Wirkstoff Parthenolid imitiert die regenerationsförderlichen GSK3 *knockin* Effekte (Fonrose et al., 2007; Gobrecht et al., 2016). Die Ergebnisse zeigen, dass eine Steigerung der MT-Dynamik über einen pMAP1B-vermittelten Erhalt dynamischer tyrosinierter MT für die Regeneration im PNS förderlich ist.

Ein weiterer wichtiger Regulator der MT-Dynamik ist CRMP2. CRMP2 bindet an Tubulin-Heterodimere und trägt dadurch zur Polymerisation der Mikrotubuli bei (Fukata et al., 2002). Eine Phosphorylierung von CRMP2 verringert dessen Aktivität und senkt die Interaktion mit Tubulin-Heterodimeren (Yoshimura et al., 2005). Wenn *cyclin-dependent kinase 5* (Cdk5) CRMP2 an Serin-522 phosphoryliert, kann GSK3 β CRMP2 an Threonin-514 inhibitorisch phosphorylieren (Yoshimura et al., 2005; Cole et al., 2006). Eine Inaktivierung des GSK3 β /CRMP2-Signalweges steigerte die Polymerisation von MT im Wachstumskegel und förderte die axonale Regeneration und Disinhibition aufsteigender sensorischer Bahnen im verletzten Rückenmark von Mäusen (Liz et al., 2014).

GSK3 beeinflusst somit verschiedene Proteine, die einen gegensätzlichen Effekt auf die Mikrotubulidynamik haben.

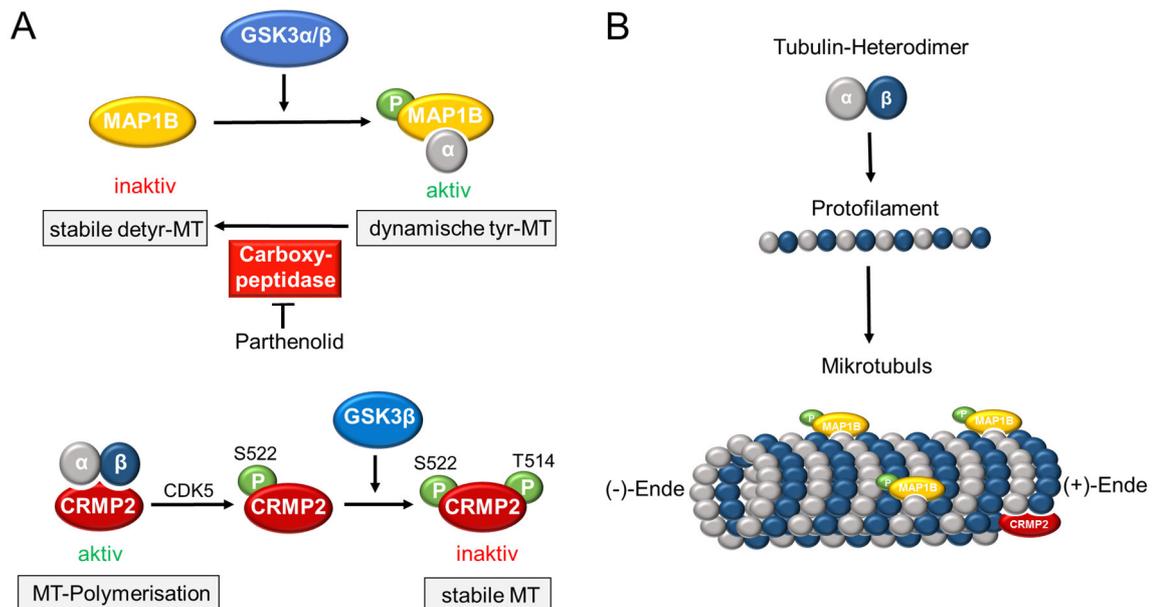


Abb. 4: Einfluss von GSK3 auf Mikrotubuli

GSK3 beeinflusst durch Aktivierung von MAP1B und Hemmung von CRMP2 Proteine, die einen gegensätzlichen Effekt auf die Mikrotubulodynamik haben.

(A): Die Dynamik der Mikrotubuli (MT) wird von *microtubule associated protein 1B* (MAP1B) und *collapsin response mediator protein 2* (CRMP2) maßgeblich reguliert. Eine Phosphorylierung (P) von MAP1B durch GSK3 α/β führt zur Bindung an α -Tubulin. Dadurch kann die Carboxypeptidase Tubulin nicht detyrosinieren und die MT bleiben dynamisch. Unphosphoryliertes MAP1B kann nicht an α -Tubulin binden, sodass vermehrt stabile detyrosinierte MT (detyr-MT) vorliegen. Eine pharmakologische Hemmung der Carboxypeptidase mittels Parthenolol, kann den Effekt von GSK3 imitieren. Aktives CRMP2 kann ein Tubulin-Heterodimer binden und zur Polymerisation der MT beitragen. Nach vorausgehender Phosphorylierung durch die *cyclin-dependent kinase 5* (CDK5) an Serin-522 (S522) kann GSK3 β CRMP2 an Threonin-514 (T514) durch Phosphorylierung inaktivieren. Die Bindung eines Tubulin-Heterodimers ist dadurch nicht mehr möglich, sodass der MT in stabilerer Form vorliegt.

(B): Die Proteine α - und β -Tubulin bilden zusammen ein Heterodimer. Danach lagern sich mehrere Tubulin-Heterodimere in Längsrichtung zu einem Protofilament zusammen. Durch eine seitliche Verknüpfung mehrerer Protofilamente entsteht ein spiralförmiger MT mit einem stabileren (-)-Ende und einem dynamisch wachsenden (+)-Ende. Sowohl pMAP1B als auch CRMP2 tragen zum Wachstum des MT bei.

1.4 Der Sehnerv als Modell für die axonale Regeneration im ZNS

Zur Erforschung der axonalen Regeneration im ZNS wurden in den letzten Jahrzehnten verschiedene Konzepte etabliert. Das Rückenmark ist ein häufig genutztes und klassisches Modell zur Untersuchung der zentralen Regenerationsinsuffizienz. Es verbindet die Körperperipherie mit dem Gehirn und enthält zahlreiche komplex verschaltete, auf- und absteigende Faserbahnen. Der erschwerte Zugangsweg zur Manipulation des Rückenmarks ist allerdings ein Nachteil dieses Modells.

Ein einfacheres Modell mit leichterem Zugangsweg ist das visuelle System. Die Retina ist neuroektodermalen Ursprungs und entwickelt sich aus dem Diencephalon. Dadurch ist sie ein Bestandteil des ZNS. Ein optischer Reiz wird über die Photorezeptoren an die Bipolarzellen und danach an die Projektionsneurone der Retina, die retinalen Ganglienzellen, weitergeleitet. Die Axone der RGZ werden von Oligodendrozyten im Sehnerv ummantelt und bündeln sich in der Struktur des Sehnervs. Im Unterschied zum Rückenmark erfolgt im Sehnerv selbst keine Verschaltung auf andere Neurone. Projektionsziele der RGZ sind Neurone im Mesencephalon (*Colliculus superior*), Thalamus (*Corpus geniculatum laterale*), *Nucleus suprachiasmaticus* und Prätektum. Im Gegensatz zum Rückenmark sind das Auge und der Sehnerv frei zugänglich. Mithilfe minimalinvasiver Eingriffe können RGZ manipuliert und untersucht werden. Beispielsweise werden in den Glaskörper bestimmte Stoffe oder Viren injiziert. Dadurch können spezifische Gene ausgeschaltet und ausgewählte Moleküle in RGZ exprimiert werden (Fischer et al., 2004a; Fischer et al., 2004b; Levin et al., 2019).

Das etablierte Modell des Sehnervs ermöglicht die Erforschung grundlegender Mechanismen der zentralen Regeneration. Viele Erkenntnisse, welche man aus Experimenten am Sehnerv erlangt hat, lassen sich auch auf andere Bereiche des ZNS übertragen und umgekehrt. Zudem können entwickelte therapeutische Strategien in einem nächsten Schritt am komplexeren Modell des Rückenmarks angewendet und untersucht werden.

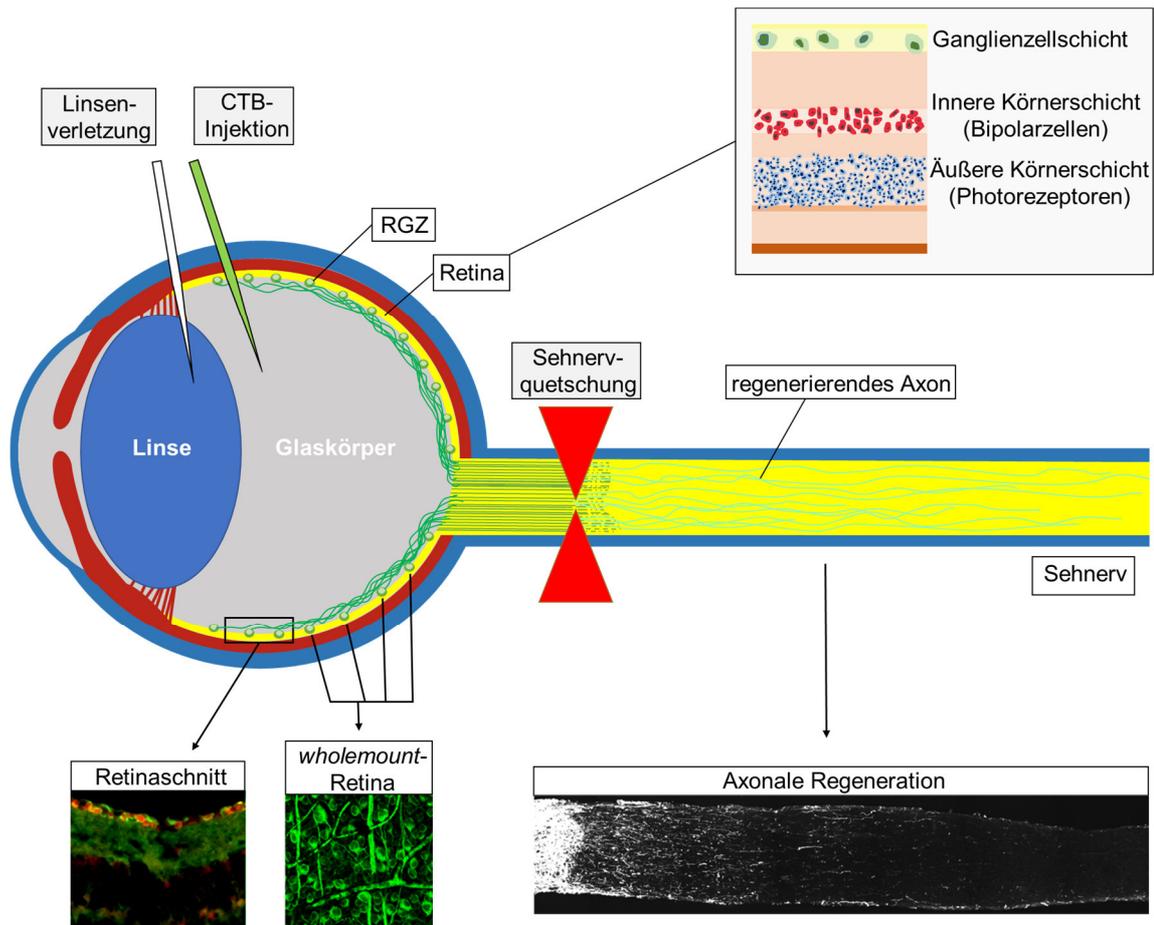


Abb. 5: Schematische Darstellung des Auges und Sehnervs als Modell für axonale Regeneration im ZNS

Das visuelle System enthält mit der Retina und dem Sehnerv Bestandteile des zentralen Nervensystems. In der vergrößerten schematischen Darstellung der Retina sind die Zellkörperenthaltenden Schichten hervorgehoben. Ein optischer Reiz wird von den Photorezeptoren über die Bipolarzellen an die retinalen Ganglienzellen (RGZ) weitergeleitet. Die Axone der RGZ bündeln sich im Sehnerv und projizieren in spezifische Zielgebiete im Gehirn. Eine Sehnervquetschung leitet in einem Großteil der RGZ die Apoptose ein und führt zur Degeneration verletzter Axone. Die zusätzliche Punktion der Linse mittels einer Mikrokapillare löst eine inflammatorische Stimulation aus, welche neuroprotektive und regenerationsförderliche Effekte vermittelt. Regenerierende Axone können durch eine intravitreale Injektion von fluoreszenzmarkierten Cholera-toxin B (CTB) in histologischen Längsschnitten des Sehnervs mikroskopisch dargestellt werden. Dadurch kann die axonale Regeneration beurteilt werden. Die Expression spezifischer Proteine in RGZ kann mithilfe immunhistochemischer Färbungen von histologischen Retinaschnitten untersucht werden. Das Überleben von RGZ nach einer Sehnervquetschung kann durch Präparation und immunhistochemischer Färbung einer *wholmount*-Retina erfolgen

1.5 Ziele der Arbeit

In der bestehenden Literatur wird der Einfluss von GSK3 auf die axonale Regeneration kontrovers diskutiert. Bis heute ist die exakte Rolle, welche die Isoformen GSK3 α und GSK3 β bei Regenerationsprozessen im PNS und ZNS einnehmen nicht hinreichend bekannt.

Verschiedene Studien untersuchten den Einfluss der GSK3-Aktivität auf die axonale Regeneration unter Verwendung von pharmakologischen Inhibitoren (Eldar-Finkelman and Martinez, 2011). Dabei können Nebenwirkungen auf andere Signalwege jedoch nicht ausgeschlossen werden. In anderen Studien erfolgte zur Steigerung der GSK3-Aktivität eine Vektoren vermittelte Überexpression von GSK3 (Pap and Cooper, 1998; Guo et al., 2016). Dies führte jedoch zu unphysiologisch erhöhten Mengen an GSK3.

Um herauszufinden, welchen Einfluss die GSK3-Aktivität auf die Regeneration im PNS hat, untersuchte unsere Arbeitsgruppe die axonale Regeneration im genetisch veränderten GSK3 α/β *knockin* Maus-Modell (Gobrecht et al., 2014). Ein Aminosäureaustausch von Serin-21 (GSK3 α) beziehungsweise Serin-9 (GSK3 β) zu Alanin verhindert spezifisch die AKT-medierte inhibitorische Phosphorylierung von GSK3. Dadurch ist GSK3 konstitutiv aktiv. Anders als beim Einsatz von Vektoren wird GSK3 jedoch in physiologischen Mengen exprimiert. Aus Studien unserer Arbeitsgruppe ging erstmals hervor, dass eine Ischiasnervverletzung zu einer vermehrten Inhibition von GSK3 führt (Gobrecht et al., 2014). Durch konstitutiv aktive GSK3 im GSK3 *knockin* Tier konnte zudem die axonale Regeneration im verletzten Ischiasnerv beschleunigt werden (Gobrecht et al., 2014).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, wie sich die konstitutive Aktivität von GSK3 auf die Regeneration im ZNS auswirkt. Hierfür wurde das beschriebene GSK3 α/β *knockin* Maus-Modell verwendet. Die Retina und der Sehnerv als Bestandteile des ZNS wurden als Versuchsmodell genutzt. Eine Verletzung des ZNS erfolgte durch eine Quetschung des Sehnervs. Als zusätzliche Behandlung wurde eine Linsenverletzung zur inflammatorischen Stimulation im Auge eingesetzt. Dies induzierte die axonale Regeneration im Sehnerv. Dadurch war die Analyse eines positiven oder negativen Effekts der konstitutiven GSK3-Aktivität auf die induzierte Regeneration möglich.

In vorliegender Arbeit wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Führt eine Sehnervquetschung alleine oder in Kombination mit einer Induktion des regenerativen Zustandes mittels Linsenverletzung zu einer gesteigerten Phosphorylierung von GSK3 in retinalen Ganglienzellen?
2. Welchen Einfluss haben konstitutiv aktive GSK3 α , GSK3 β oder GSK3 α/β auf das Überleben adulter retinaler Ganglienzellen nach einer alleinigen Sehnervquetschung oder in Kombination mit einer zusätzlichen Linsenverletzung?
3. Welche Auswirkung haben konstitutiv aktive GSK3 α , GSK3 β oder GSK3 α/β auf die axonale Regeneration im Sehnerv nach einer alleinigen Sehnervquetschung oder in Kombination mit einer zusätzlichen Linsenverletzung?

2 Material und Methoden

2.1 Operative Verfahren

2.1.1 Material

Verbrauchsmaterial:

Chirurgische Pinzette	FST Dumont, FR
Glaskapillare	WPI, USA
Injektionsnadel	Braun, DE
Kapsulotomieschere	Hermle, DE
Knochenzange	Hermle, DE
Nahtmaterial	Johnson&Johnson, USA
Objektträger	VWR International, DE
Pinzette Nr.4, Nr.5	FST Dumont, FR
Präparationsschere	Hermle, DE
Skalpell Nr.10, Nr. 11	Dahlhausen, DE
Skalpellhalter	Hermle, DE

Geräte:

Kryostat. CM3050 S	Leica, DE
Lichtquelle: CL 1500	Schott, DE
Präparations-Stereomikroskop: Stemi DV4	Carl Zeiss, DE

Chemikalien:

Augensalbe Gentamicin	Ursapharm, DE
Choleratoxin Untereinheit B (Alexa 488, 555)	Invitrogen, life technologies DE
Ketamin (Ketavet® 100 mg/mL)	Pfizer, DE
Paraformaldehyd 4 % (PFA)	Sigma-Aldrich, DE
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS; pH 7,4)	Gibco, life technologies, DE
Saccharose (Sucrose)	Sigma-Aldrich, DE

Einbettungsmedium: *Tissue Tek*
Xylazin (Rompun® 2 %)

Klinipath, NL
Bayer, DE

2.1.2 Versuchstiere

Für die Versuche wurden 2 bis 3 Monate alte männliche und weibliche Mäuse verwendet. Die genetisch veränderten *knockin* Mäuse wurden von Jackson Laboratory erworben. Dabei gehörte der Wildtyp dem Stamm C57BL/6,129/Ola(B6CF1) an. Die homozygoten *knockin* Mäuse $GSK3\alpha^{S21/A21}$ ($GSK3\alpha^{S/A}$) waren Teil des Stamms C57BL/6,129/Ola(B6CF1)-TgH($GSK3^{A21/A21}$), $GSK3\beta^{S9/A9}$ ($GSK3\beta^{S/A}$) des Stamms C57BL/6,129/Ola(B6CF1)-TgH($GSK3^{9A/9A}$) und $GSK3\alpha/\beta^{S21/A21/S9/A9}$ ($GSK3\alpha/\beta^{S/A}$) gingen auf den Stamm C57BL/6,129/Ola(B6CF1)-TgH($GSK3^{A21/A21/A9/A9}$) zurück. Das Körpergewicht der Mäuse variierte je nach Alter und Geschlecht zwischen 20 und 25 g. In Makrolonkäfigen mit einem 12-Stunden-Hell-Dunkel-Zyklus wurden jeweils 2 bis 5 Tiere gehalten. Die Tiere hatten einen *ad libitum* Zugang zu Trockenfutter und Wasser. Alle operativen Eingriffe und Organentnahmen genehmigte das Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (Aktenzeichen: 84-02.04.2013 A170, Genehmigungsnummer: G170/13).

2.1.3 Operationen

Präoperativ wurde bei den Versuchstieren eine Anästhesie mithilfe einer intraperitonealen Injektion eines Gemisches aus 60–80 mg/kg Ketamin und 10–15 mg/kg Xylazin eingeleitet. Der Narkoseeintritt wurde anhand des erloschenen Lidschlussreflexes überprüft. Für die anschließende Operation wurde das Tier mittels Maulklemme fixiert. Nach jedem operativen Eingriff erfolgte das Auftragen von Gentamicin-haltiger Salbe auf die Kornea des Auges. Dies dient dem Schutz vor einer Austrocknung. Alle operativen Eingriffe wurden freundlicherweise von Univ.-Prof. Dr. Dietmar Fischer und Dr. Marco Leibinger durchgeführt.

Sehnervquetschung

Um den Sehnerv zu quetschen, wurde das sich auf dem Schädel befindliche Fell abrasiert und die Haut sagittal mit einem Skalpell eingeschnitten. Die

Muskelschicht wurde freipräpariert, um so einen Zugang zum Sehnerv zu schaffen. Mit einer feinen Pinzette (Dumont Nr. 5, FR) wurde der Sehnerv intraorbital unmittelbar distal der Papille für 10 Sekunden gequetscht. Die Wunde wurde anschließend mit 3 bis 4 Stichen genäht. Im Rahmen der Überlebensstudie und der Studie zur axonalen Regeneration entnahmen wir das Gewebe 21 Tage nach der Sehnervquetschung. Für die Immunhistochemie und den *Western Blot* erfolgte die Gewebeentnahme nach 5 Tagen.

Linsenverletzung

Bei der Linsenverletzung wurde die Augenlinse perforiert. Dafür wurde in den posterioren Teil der Linsenkapsel transskleral und transretinal mit einer Mikrokapillare eingestochen. Dieses Trauma produzierte eine Katarakt mit deutlicher Eintrübung der Linse. Die sichtbare Eintrübung war ein Indikator für eine erfolgreich durchgeführte Linsenverletzung.

Intravitreale Injektion von Cholera toxin B

Vor einer intravitrealen Injektion von fluoreszenzmarkiertem Cholera toxin B (CTB) wurden 2,5 µL Kammerwasser mittels Mikrokapillare aus dem Auge entnommen. Unter Beachtung, die Linse nicht zu verletzen, wurde anschließend mit einer neuen Mikrokapillare 2,5 µL CTB transskleral, transretinal und intravitreal injiziert. Im Rahmen der Studie zur axonalen Regeneration erfolgte die intravitreale CTB-Injektion 19 Tage postoperativ und somit 3 Tage vor der Gewebeentnahme. Das CTB wurde von den RGZ aufgenommen und aktiv über Mikrotubuli im Axon transportiert. Dadurch konnten regenerierende Axone dargestellt werden.

Intrakardiale Perfusion und Gefriermikrotomie

Zur Gewinnung histologischer Schnitte der Retina und des Sehnervs wurden die Versuchstiere, wie unter Kapitel 2.1.3 beschrieben, narkotisiert. Auf einer Kunststoffplatte wurden die Versuchstiere fixiert. Daraufhin wurde der Brustkorb mittels Knochenzange geöffnet und das Herz freigelegt. Der rechte Herzvorhof wurde eingeschnitten, um den Abfluss der Perfusionsflüssigkeit zu ermöglichen. Dann wurde mit einer Injektionsnadel der linke Vorhof punktiert. Über die Injektionsnadel wurde so lange PBS infundiert, bis eine Leberaufhellung zu

bemerken war. Um das Gewebe zu fixieren, erfolgte anschließend die Perfusion mit Paraformaldehyd (PFA 4 %). Die Perfusion wurde nach merklicher Versteifung des Tieres beendet.

Nach der Perfusion wurde das Auge mitsamt dem Sehnerv freipräpariert. Über Nacht wurde das Gewebe in 4 %igen PFA bei 4 °C postfixiert. Um dem Gewebe weiter osmotisch Flüssigkeit zu entziehen, wurde es für 5 Stunden in 30 %iger Sucroslösung inkubiert. Auf einer Edelstahlplatte wurde das Auge mitsamt dem Sehnerv ausgerichtet und in Tissue-Tek bei -20 °C eingebettet. Nach vollständigem Erhärten wurden mittels Kryostat longitudinale Gefriermikrotomschnitte (14 µm Dicke) angefertigt und direkt auf den Objektträger aufgezogen. Die Lagerung der Gewebsschnitte erfolgte bei -20 °C.

2.2 Mikroskopische Verfahren

2.2.1 Material

Verbrauchsmaterial:

Deckgläschen	VWR, DE
Kapsulotomieschere	Hermle, Deutschland
Nitrozellulosemembran (0,45 µm)	Sartorius Stedim Biotech, DE
Objektträger	VWR, DE
Petrischale (35mm x 10mm)	Sarstedt, DE
Pinzette Nr.5	FST Dumont, FR
Pipette 10 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL	Eppendorf, DE
Pipettenspitzen 10 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL	Starlab, DE
Präparationsschere	Hermle, Deutschland
Skalpellklinge	Braun, DE

Geräte:

Fluoreszenzmikroskop Axio Observer D1	Carl Zeiss, DE
Kamera (AxioCam MR Rev3)	Carl Zeiss, DE
Laser Scanning Microscope LSM510	Carl Zeiss, DE
Lichtquelle CL1500 ECO	Carl Zeiss, DE
Präparations-Stereomikroskop IC M 80	Leica, DE

Chemikalien:

DAPI	Sigma-Aldrich, DE
Eselserum	Bio-Rad Serotec, USA
Glycerol	Sigma-Aldrich, DE
Kälberserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, DE
Mowiol 4-88 Reagent	Merck Millipore, DE
Paraformaldehyd 4 % (PFA)	Sigma-Aldrich, DE
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS; pH 7,4)	Gibco, life technologies, DE
Tris (Trizma® base)	Sigma-Aldrich, DE
Triton X100	Sigma-Aldrich, DE
Tween 20	Sigma-Aldrich, DE

Hergestellte Lösungen:

PBS-T:

0,05 % Tween 20
in PBS

Blockierlösung Retinaschnitte:

2 % BSA
5 % Eselserum
in PBS-T

Blockierlösung *wholemout*-Retina:

2 % BSA
10 % Eselserum
in PBS-T

Mowiol-Lösung:

10 % Mowiol
25 % Glycerol
25 % H₂O
in 0,2 M Tris (pH 8,5)

Primärantikörper:

Anti- β III-Tubulin (TUJ-1), monoklonal, Quelle: Maus
eingesetzte Verdünnung: 1:1000 in Blockierlösung Covance, USA

Anti-pGSK3 α (Ser21), monoklonal, Quelle: Hase
eingesetzte Verdünnung: 1:1000 in Blockierlösung Tebu-bio, DE

Anti-pGSK3 β (Ser9), monoklonal, Quelle: Hase
eingesetzte Verdünnung: 1:1000 in Blockierlösung CellSignaling, USA

Sekundärantikörper:

Anti-Maus IgG, Alexa Fluor 488, Quelle: Esel
eingesetzte Verdünnung: 1:1000 in Blockierlösung Invitrogen, USA

Anti-Hase IgG, Alexa Fluor 555, Quelle: Esel
eingesetzte Verdünnung: 1:1000 in Blockierlösung Invitrogen, USA

2.2.2 Immunhistochemie

Herstellung und Färbung von Retinaschnitten

Zur immunhistochemischen Färbung von Retinaschnitten wurden, wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben, longitudinale Gewebsschnitte des Auges angefertigt. Die eingefrorenen Schnitte wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Zur Entfernung des Einbettmediums wurden die Schnitte für 10 min in PBS überführt. Danach erfolgte zur Permeabilisierung und Fixierung des Gewebes eine Inkubation mit Methanol bei Raumtemperatur für 10 min.

Zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungen wurden die Schnitte anschließend mit Blockierlösung aus 2 %-igem bovinem Serumalbumin (BSA) und 5 %-igem Eselserum in PBS-T für eine Stunde inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation der Schnitte mit der jeweiligen Primärantikörperlösung (Anti- β III-Tubulin, Anti-pGSK3 α und Anti-pGSK3 β) über Nacht bei 4 °C. Um nicht gebundene Primärantikörper zu entfernen, wurde eine dreimalige Waschung mit PBS für je 10 min durchgeführt.

Daraufhin wurden die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss mit entsprechender Sekundärantikörperlösung (Anti-Maus IgG, Alexa Fluor 488 und Anti-Hase IgG, Alexa Fluor 555) gefärbt. Die Wahl des

Sekundärantikörpers richtete sich dabei nach der Quelle des Primärantikörpers. Um nicht gebundene Sekundärantikörper zu entfernen, wurde eine dreimalige Waschung mit PBS über 10 min vorgenommen.

Zur Visualisierung der einzelnen Retinaschichten wurden die Schnitte für eine Minute mit DAPI (4,6 Diamidinon-2-phenylindol) inkubiert. Dieser Farbstoff bindet selektiv an die DNA und bildet dadurch einen fluoreszierenden Komplex. Es erfolgte eine erneute Waschung mit PBS für 10 min.

Anschließend wurden die Schnitte unter Zugabe von Mowiol mit einem Deckglas eingedeckelt. Bis zur weiteren Verwendung wurden sie bei 4 °C aufbewahrt. Zur Auswertung der Schnitte wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bei 400-facher Vergrößerung erstellt.

Herstellung und Färbung einer *wholemout*-Retina

Zur Gewinnung einer sogenannten *wholemout*-Retina wurde das Versuchstier durch zervikale Dislokation getötet, und anschließend dessen Augen entnommen. Die Augen wurden in eine Petrischale mit PBS überführt. Mit einer Skalpellklinge wurde an der *Ora serrata* des Auges eingestochen. Dies ermöglichte einen Zugang für die Kapsulotomieschere. Zur Abtrennung der Kornea erfolgte entlang der *Ora serrata* ein zirkumferentieller Schnitt mit der Kapsulotomieschere. Die Linse wurde durch eine Pinzette herausgelöst, und so wurde die Retina freigelegt. Der Augenbecher wurde anschließend kleeblattförmig viermal in Richtung Papille bis zur Hälfte eingeschnitten. Dadurch entstanden vier Quadranten. Vorsichtig wurde die Retina vom Pigmentepithel abgelöst. Durch einen Schnitt unterhalb der Papille wurde sie vollständig aus dem Augenbecher entfernt. Anschließend wurde die Retina auf eine Nitrozellulosemembran flach ausgebreitet, und der Glaskörper wurde abgezogen.

Die auf der Nitrozellulosemembran befestigte Retina wurde daraufhin für 30 min in 4 %-iger PFA-Lösung bei Raumtemperatur fixiert. Danach erfolgte eine dreimalige Waschung für je 5 min mit PBS. Die Retina wurde durch eine anschließend einstündige Inkubation mit 2 %-igem Triton-X100 (in PBS) bei Raumtemperatur permeabilisiert. Zur Entfernung des Tritons wurde die Retina dreimal mit PBS für 5 min gewaschen. Danach dauerte die Inkubation mit Blockierlösung zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungen eine Stunde.

Anschließend inkubierte das Retinapräparat über Nacht bei 4 °C in Primärantikörperlösung (Anti- β III-Tubulin). Um nicht gebundene Primärantikörper zu entfernen, erfolgte eine dreimalige Waschung mit PBS über 10 min. Die Retina wurde daraufhin für eine Stunde lichtgeschützt mittels Sekundärantikörperlösung (Anti-Maus IgG, Alexa Fluor 488) bei Raumtemperatur gefärbt. Zur Entfernung nicht gebundener Sekundärantikörper wurde die *wholemout*-Retina dreimal für jeweils 5 min in PBS gewaschen.

Im nächsten Schritt wurde die immunhistochemisch gefärbte *wholemout*-Retina auf einen Objektträger mit Mowiol und einem runden Deckgläschen eingedeckelt. Danach wurden die eingedeckelten Schnitte für die Überlebensstudie herangezogen. Von jedem der vier Quadranten einer Retina wurden mindestens drei repräsentative Fotos mit einem Fluoreszenzmikroskop (400-fache Vergrößerung) aufgenommen. Von den Fotos wurden die β III-Tubulin positiven RGZ über Photoshop CS5 ausgezählt. Als Nächstes wurde von jedem Quadranten der Mittelwert berechnet und auf eine Fläche von einem Quadratmillimeter extrapoliert. Aus den extrapolierten Werten aller vier Quadranten wurde erneut der Mittelwert gebildet. Der so berechnete Wert ergab die Anzahl überlebender RGZ pro Quadratmillimeter in einer Retina.

2.2.3 Quantifizierung der axonalen Regeneration im Sehnerv

Zur Auswertung der axonalen Regeneration wurden, wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben, die hergestellten Sehnervenschnitte aufgetaut, und das Einbettmedium wurde in PBS innerhalb von 10 min aufgelöst. Anschließend wurde unter Zugabe von Mowiol der Schnitt mit einem Glas eingedeckelt.

Durch eine intravitreale Injektion fluoreszenzmarkierten CTBs waren die regenerierenden Axone im Fluoreszenzmikroskop darstellbar. Bei 200-facher Vergrößerung wurden Aufnahmen des Sehnervs von Beginn der Läsionsstelle nach distal im Längsverlauf gefertigt. Die einzelnen Aufnahmen wurden danach über Photoshop CS5 zu einem Bild zusammengefügt. An die Läsionsstelle wurde eine Skala mit 0,5-mm-Abstands-Schritten angelegt. Dadurch konnte die Auszählung regenerierender Axone bei 0,5 mm, 1 mm, 1,5 mm, 2 mm und 2,5 mm distal zur Läsionsstelle erfolgen. An den genannten Abständen wurde zudem die Sehnervenbreite ermittelt. So konnte die Anzahl der Axone auf 1 mm

Sehnervbreite extrapoliert werden. Von jedem Sehnerv gab es eine unterschiedliche Anzahl an Sehnervenschnitten. Darum wurden von jedem untersuchten Sehnerv fünf Sehnervenschnitte mit der jeweils höchsten Anzahl regenerierender Axone bei 0,5°mm ausgewählt. Aus den gewählten Sehnervenschnitten wurden anschließend Mittelwerte für die einzelnen Abstands-Schritte berechnet.

Repräsentative Bilder des Sehnervs für die Abbildungen 9 und 10 wurden mit einem Laser-Scanning-Mikroskop angefertigt.

2.3 Biochemische Verfahren

2.3.1 Material

Verbrauchsmaterial:

Kapsulotomieschere	Hermle, Deutschland
Mini-PROTEAN TGX Precast Gel AnykD	Bio-Rad, USA
Multi-Wellplatte (96er)	Thermo Scientific, USA
Pinzette Nr.5	FST Dumont, FR
Pipette 10 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL	Eppendorf, DE
Pipettenspitzen 10 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL	Starlab, DE
Präparationsschere	Hermle, Deutschland
Skalpellklinge	Braun, DE
Trans-Blot Turbo Nitrocellulose Transfer Pack	Bio-Rad, USA
Röhrchen (0,5mL, 1,5mL)	Eppendorf, DE

Geräte:

FluorChem E System	Protein Simple, USA
Inkubator (HERAcell 240i)	Thermo Scientific, USA
Lichtquelle CL1500 ECO	Carl Zeiss, DE
Odyssey Classic	LI-COR Biosciences, USA
Präparations-Stereomikroskop IC M 80	Leica, DE
Stromquelle (Consort EV265)	Hoefer, USA
TECAN Reader Genios Pro	Tecan, CHE
Thermomixer compact	Eppendorf, DE

Tischzentrifuge 5418	Eppendorf, DE
Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad, USA
Ultraschallgerät (Bandelin Sonoplus)	Bandelin electronic, DE

Chemikalien:

<i>BC assay kit</i>	Uptima, Interchim, DE
Destilliertes H ₂ O	Fischar, DE
Kälberserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, DE
Milchpulver	Carl Roth, DE
<i>Page Ruler Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Scientific, USA
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich, DE
WesternBright Chemilumineszenz (Substrat Sirius)	Biozym, DE

Hergestellte Lösungen:

Lysispuffer:

50 mM	Tris/HCl	Sigma-Aldrich, DE
150 mM	NaCl	Sigma-Aldrich, DE
250 mM	Sucrose	Sigma-Aldrich, DE
10 mM	NaF	Sigma-Aldrich, DE
1 mM	DTT	Sigma-Aldrich, DE
0,1 mM	Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich, DE
1 %	Triton X 100	Sigma-Aldrich, DE
0,1 %	SDS	Sigma-Aldrich, DE

Probenpuffer:

200 mM	Tris/HCl	Sigma-Aldrich, DE
6 %	SDS	Sigma-Aldrich, DE
20 %	Glycerin	Sigma-Aldrich, DE
0,1 %	Bronphenolblau	Sigma-Aldrich, DE
4 %	2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, DE
pH 8,8		

Laufpuffer:

25 mM	Tris (Trizma® base)	Sigma-Aldrich, DE
192 mM	Glycin	Sigma-Aldrich, DE
0,1 %	SDS	Sigma-Aldrich, DE

PBS-T:

500 mL	PBS 10x	Sigma-Aldrich, DE
4,5 L	dest.H ₂ O	Fischar, DE
2,5 mL	Tween 20	Sigma-Aldrich, DE

Blockierlösung:

5 % Milchpulver
in TBS-T

Primärantikörper:

Alle Primärantikörper sind gelöst in: 5 % BSA in PBST

Anti-pGSK3 α (Ser21), monoklonal, Quelle: Hase
eingesetzte Verdünnung: 1:1000
CellSignaling, USA

Anti-pGSK3 β (Ser9), monoklonal, Quelle: Hase
eingesetzte Verdünnung: 1:1000
CellSignaling, USA

Anti-pAKT (Thr308), monoklonal, Quelle: Hase
eingesetzte Verdünnung: 1:1000
CellSignaling, USA

Anti- β III-Tubulin (TUJ-1), monoklonal, Quelle: Maus
eingesetzte Verdünnung: 1:1000
Covance, USA

Sekundärantikörper:

Alle Sekundärantikörper sind gelöst in: 5 % Milchpulver in PBS-T

Anti-Hase IgG Peroxidase konjugiert, polyklonal
Quelle: Ziege, eingesetzte Verdünnung: 1:80000
Sigma-Aldrich, DE

Anti-Maus IgG IRDye 800 konjugiert, monoklonal

LI-COR, USA

Quelle: Ziege, eingesetzte Verdünnung: 1:20000

2.3.2 Semiquantitativer Proteinnachweis im *Western Blot*

Proteinlysatzgewinnung

Für die Gewinnung eines retinalen Proteinlysats wurden die Versuchstiere durch eine zervikale Dislokation getötet und deren Augen entnommen. Mit einer Skalpellklinge erfolgte an der *Ora serrata* ein Einstich. Durch eine Kapsulotomieschere wurde anschließend die Kornea abgetrennt. Nach Entfernung der Linse wurde die Retina vorsichtig herausgelöst und durch einen Schnitt unterhalb der Papille aus dem Augenbecher entnommen.

Die Retina wurde in ein Röhrchen mit Lysispuffer (75 µL) überführt. Als Nächstes wurde sie sonografisch lysiert. Für 10 min bei 5.000 rpm wurde die Probe zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Röhrchen pipettiert. Aus den Proteinlysaten gleicher Genotypen mit gleicher Behandlung wurde ein Lysatgemisch hergestellt. Die Lagerung der Lysate erfolgte bei -80 °C.

BC assay zur Proteinkonzentrationsbestimmung

Um im *Western Blot* die Menge eines bestimmten Proteins in unterschiedlichen Gruppen miteinander vergleichen zu können, muss die eingesetzte Gesamtproteinmenge der einzelnen Gruppen gleich sein. Dafür wurde die Proteinkonzentration der Retinalysate über einen *BC assay* bestimmt. Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe aus BSA (definierte Proteinmenge 2 mg/mL), H₂O und Lysispuffer hergestellt. In eine 96er Wellplatte wurden von jeder BSA-Verdünnung jeweils 12,5 µL in drei Wells pipettiert. Anschließend wurden für das Proteinlysate in drei Wells 11,5 µL H₂O vorgelegt. Danach wurden jeweils 1 µL Proteinlysate in die drei Wells hinzugefügt. Eine Pufferlösung aus Puffer A und B (Interchim *BC assay*) wurde im Verhältnis 50:1 hergestellt. In jedes Well wurden 100 µL Pufferlösung pipettiert. Danach wurde die Platte bei 37 °C für 30 min inkubiert.

Der Puffer B enthielt Kupfermoleküle, welche durch die Bindung an Proteine herausgelöst wurden. Dies erzeugte einen Farbumschlag von Grün nach Lila. Anschließend erfolgte eine photometrische Messung der Proben bei 562 nm

(TECAN-Reader). Durch die BSA-Standardreihe entstand eine Eichkurve, mit deren Hilfe die Proteinkonzentration der Proteinlysate abgelesen werden konnte. Anhand der gemessenen Proteinkonzentration konnte anschließend die für den *Western Blot* benötigte Retinalysatmenge berechnet werden. Dadurch war es möglich, bei Verwendung unterschiedlicher Retinalysate die gleiche Gesamtproteinmenge einzusetzen.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Proteintransfer

Zur berechneten Retinalysatmenge wurde im Verhältnis 1:1 ein Puffer hinzugefügt. Das im Puffer enthaltene anionische Natriumdodecylsulfat (SDS) lagerte sich an die Proteine an. Dadurch überdeckte es ihre Eigenladung und führte zum negativen Ladungsüberschuss. Das ebenfalls im Puffer enthaltene β -Mercaptoethanol ließ über seine reduzierende Wirkung einen Bruch der Disulfidbrücken entstehen. Die Proben wurden für 5 min bei 95 °C im Thermoblock denaturiert, wodurch die Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine aufgelöst wurden. Eine Auftrennung der Proteine im Gel konnte somit anhand ihres Molekulargewichts und unabhängig von ihrer Struktur oder Ladung erfolgen.

Anschließend wurde ein SDS-Polyacrylamidgel in einen speziellen Elektrophoreseapparat eingespannt. Dessen Tank wurde mit Laufpuffer befüllt, und die Geltaschen des SDS-Polyacrylamidgels wurden damit ausgespült. Die erste Geltasche wurde mit einem Proteinstandard befüllt. Dieser ermöglicht später die Bestimmung des Molekulargewichts der Proteinbanden. Das denaturierte Probenpuffergemisch wurde nach 30 sec Zentrifugation bei 14.000 rpm in die restlichen Geltaschen pipettiert. Daraufhin wurde zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine eine Spannung von 150 V angelegt. Diese konnte nach Übertritt der Proben in das Trenngel auf 220 V erhöht werden. Sobald das Bromphenolblau des Probenpuffers das Ende des Trenngels erreicht hatte, konnte die Elektrophorese beendet werden.

Das Gel wurde entnommen und auf die Nitrozellulosemembran des *transfer packs* platziert. Auf das Gel und unter die Nitrozellulosemembran wurden die mit Transferpuffer benässten Filterpapiere gelegt. Der entstandene Gel-Membran-Stapel wurde in einer *Blot*-Kassette eingespannt. Danach wurde für 10 min bei 2.5 Ampere und 25 V ein elektrisches Feld angelegt. Die Proteine wanderten

dabei aus dem Gel in Richtung Anode und wurden in der Nitrozellulosemembran gebunden. Anschließend wurde die Membran entnommen.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Proteinbindung in der Nitrozellulosemembran erfolgte eine Ponceau-Färbung. Dafür wurde die Membran für 10 sec mit einem Azofarbstoff inkubiert. Der Farbstoff band reversibel an positive Aminogruppen der Proteine, sodass es zur Darstellung einzelner Proteinbanden kam. Durch mehrmaliges Waschen mit destilliertem Wasser wurde die Färbung komplett entfernt.

Immunologischer Proteinnachweis

Die Nitrozellulosemembran mit den gebundenen Proteinen wurde für eine Stunde in einer Blockierlösung (5 % Milchpulver in TBS-T) bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch wurden unspezifische Proteinbindungen abgesättigt. Im Anschluss daran wurde die Membran in spezifischer Primärantikörperlösung über Nacht bei 4 °C eingelegt. Danach erfolgte dreimal für 10 min eine Waschung der Membran mit PBS-T, um nicht gebundene Primärantikörper zu entfernen. Die Membran wurde anschließend mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der Sekundärantikörper richtete sich dabei gegen den Erzeugerorganismus des Primärantikörpers. Die Membran wurde dann dreimal für je 10 min mit PBS-T gewaschen. Dadurch wurden die nicht gebundenen Sekundärantikörper entfernt. Alle Inkubations- und Waschschriffe wurden unter Zuhilfenahme eines Schüttlers durchgeführt.

Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Entwicklersubstanz WesternBright Chemilumineszenz. Dessen zwei Komponenten wurden in einem 1:1-Verhältnis gemischt. Danach wurde die Membran für 2 min mit der gemischten Entwicklerlösung inkubiert. Zum Schutz vor Austrocknung wurde die Membran in Klarsichtfolie verpackt. Unter Verwendung einer Chemolumineszenz-Kamera erfolgte die Aufnahme der Peroxidase-katalysierten Lichtemission. Im Anschluss wurde die Membran dreimal über 10 min mit PBS-T gewaschen.

Die Membran wurde dann mit einem Nah-Infrarot-Fluoreszenz (IRDye 800)-markierten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur für eine Stunde lichtgeschützt inkubiert. Der Sekundärantikörper richtete sich gegen den Erzeugerorganismus des Primärantikörpers. Die Membran wurde danach dreimal für 10 min mit PBS-T gewaschen. Im nächsten Schritt fand die Detektion

der Proteinbande mittels Nah-Infrarot-Fluoreszenzkamera (Odyssey Classic) statt. Die Aufnahmen der Proteinbanden wurden mithilfe von Photoshop CS5 zu einer Abbildung zusammengestellt. Mit dem Programm ImageJ 1.51f wurde die densitometrische Quantifizierung der einzelnen Proteinbanden durchgeführt. Aus den gewonnenen Daten wurden Mittelwerte und Standardfehler berechnet. Die Behandlungsgruppen wurden gegen den unbehandelten Wildtyp, welcher den Wert 1 erhielt, normalisiert und im Balkendiagramm dargestellt.

2.4 Statistik

Im *Western Blot* und in den Studien zum Überleben von RGZ sowie zur axonalen Regeneration wurden jeweils quantitative Daten erhoben. Anhand dieser wurden Mittelwerte und Standardfehler über Microsoft Excel 2010 berechnet. In Diagrammen wurden die erhobenen Daten unter Verwendung der Mittelwerte und Standardfehler dargestellt. Die Auswertung einer Signifikanz zwischen einzelnen Gruppen und Behandlungen wurde mit dem Programm SigmaStat3.1 (Systat Software, Erkrath) durchgeführt. Mittels einfaktorieller Varianzanalyse (Analysis Of Variance, ANOVA) sowie mittels Gruppenvergleich nach Holm-Sidak wurden in der Studie zum Überleben von RGZ und der axonalen Regeneration (SQ+LV) die Signifikanzen erhoben. In der Studie zur axonalen Regeneration (SQ) erfolgte die Signifikanzberechnung mithilfe des t-Tests für unabhängige Stichproben. Für das Vorliegen einer statistischen Signifikanz wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ vorausgesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Auswirkung einer Sehnervquetschung auf die GSK3-Aktivität in retinalen Ganglienzellen

Eine veröffentlichte Studie unseres Arbeitskreises zeigte, dass eine axonale Ischiasnervverletzung zu einer inhibitorischen PI3K/AKT-vermittelten Phosphorylierung von GSK3 α und GSK3 β in Neuronen der lumbalen Hinterwurzelganglien führte (Gobrecht et al., 2014). Die Verhinderung einer Phosphorylierung und damit Hemmung von GSK3 α und GSK3 β durch einen *knockin* steigerte die axonale Regeneration im PNS. Um zu überprüfen, ob diese Ergebnisse auch auf das ZNS übertragbar sind, wurde zunächst die inhibitorische Phosphorylierung von GSK3 α/β nach einer Sehnervquetschung analysiert.

Hierfür wurden Retinalysate vom Wildtyp und von GSK3 $\alpha/\beta^{S/A}$ -Mäusen 5 Tage nach einer Sehnervquetschung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle hinsichtlich der inhibitorischen Phosphorylierung von GSK3 α an Serin-21 (S21) und GSK3 β an Serin-9 (S9) im *Western Blot* analysiert (Abb. 6A). In späteren Versuchen erfolgte eine Linsenverletzung zur Induktion der axonalen Sehnervregeneration. Deshalb wurden die Versuchsgruppen ebenso nach einer Sehnervquetschung mit zusätzlicher Linsenverletzung untersucht. Als Kontrolle für die beladene Proteinmenge fungierte der neuronale Marker β III-Tubulin.

Im unbehandelten Wildtyp waren nahezu keine Mengen an pGSK3 α oder pGSK3 β in den Retinalysaten nachweisbar. Eine Sehnervquetschung erhöhte die Phosphorylierung von GSK3 α und GSK3 β . Durch eine zusätzliche Linsenverletzung zeigte sich keine weitere Steigerung der inhibitorischen Phosphorylierung von GSK3 α und GSK3 β . Das fehlende Signal in der GSK3 $\alpha/\beta^{S/A}$ -Gruppe bestätigte die Spezifität des Antikörpers.

Eine inhibitorische Phosphorylierung von GSK3 α/β an S21 und S9 erfolgt hauptsächlich über Proteinkinase B (AKT) (Cross et al., 1995). AKT selbst wird wiederum über eine Phosphorylierung an Threonin-308 (pAKT) aktiviert (Alessi et al., 1996). Daher wurde auch untersucht, ob eine Sehnervquetschung ebenfalls eine Phosphorylierung von AKT induziert (Abb. 6B). Die *Western Blot-*

Analyse ergab ein moderates Signal für pAKT in unbehandelten Wildtyp-Retinae. Dahingegen resultierte eine Sehnervquetschung, wie zuvor für pGSK3 gezeigt, in einer Steigerung von pAKT.

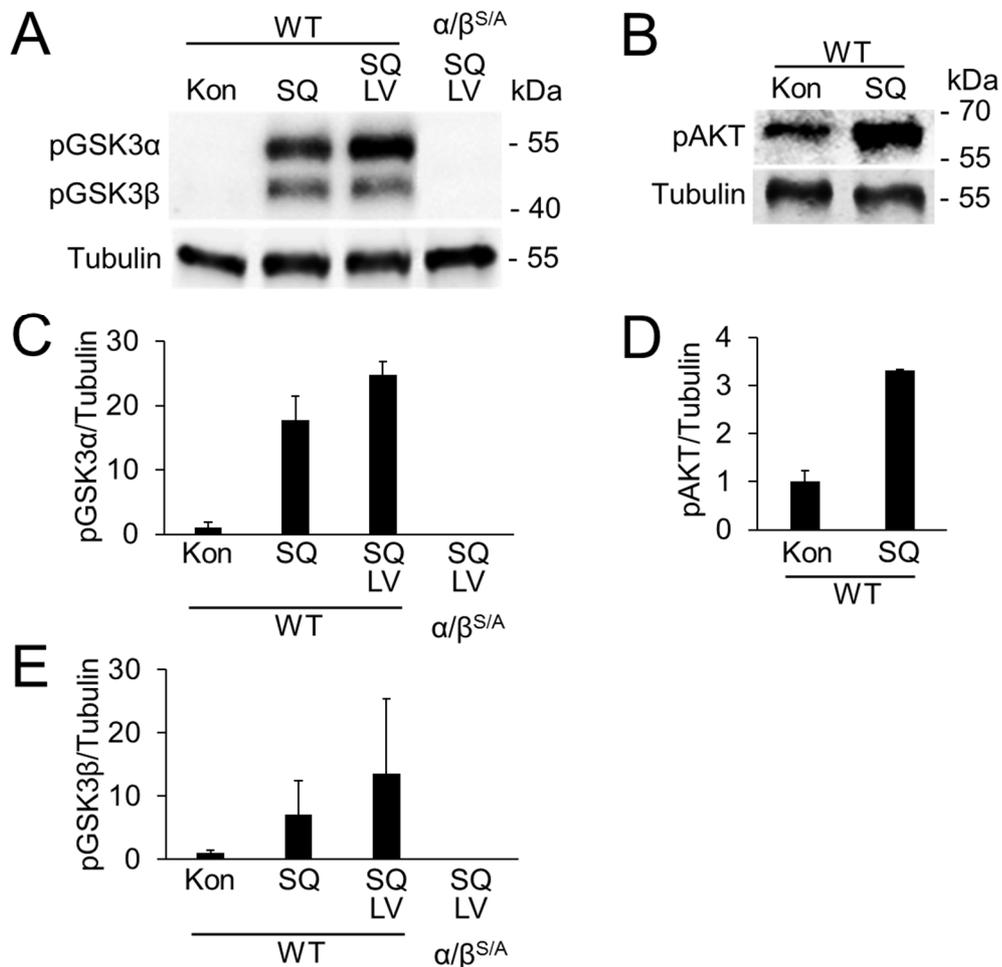


Abb. 6: Western Blots von pGSK3α, pGSK3β und pAKT von Retinalysaten:

(A): Western Blots von p^{S21}GSK3α (pGSK3α) und p^{S9}GSK3β (pGSK3β) von Retinalysaten von Wildtyp (WT) und GSK3α/β^{S/A} (α/β^{S/A}) Mäusen entweder unbehandelt (Kon) oder 5 Tage nach einer Sehnervquetschung (SQ) beziehungsweise SQ mit zusätzlicher Linsenverletzung (LV). Als Kontrolle für die beladenen Proteinmengen fungierte βIII-Tubulin (Tubulin). Mittels Angabe von kDa wurde die molekulare Proteingröße markiert. Eine SQ induzierte die inhibitorische Phosphorylierung von GSK3α und GSK3β. Eine zusätzliche LV führte zu keiner weiteren Steigerung der Phosphorylierung. Das fehlende Signal bei α/β^{S/A} bestätigte die Antikörper-Spezifität. **(B):** Western Blots von p^{T308}AKT (pAKT) von Retinalysaten von WT-Mäusen entweder unbehandelt (Kon) oder 5 Tage nach SQ. Eine SQ steigerte die aktivierende Phosphorylierung von AKT. **(C-E):** Densitometrische Quantifizierung der Western Blot Banden (A,B) von pGSK3α (C), pGSK3β (E) und pAKT (D) relativ zu βIII-Tubulin mit Normalisierung gegen WT-Kon. Es wurden in jeder Gruppe 2-3 Western Blots herangezogen.

Der Western Blot lieferte jedoch keine Aussage über die Lokalisation von pGSK3 im Gewebe. Aus diesem Grund wurde eine immunhistochemische Analyse mit

Retinaschnitten von Mäusen mit demselben Behandlungsschema durchgeführt (Abb. 7). Die RGZ wurden mithilfe einer Kofärbung gegen β III-Tubulin identifiziert. Eine zusätzliche Färbung der Zellkerne mittels 4,6 Diamidinon-2-phenylindol (DAPI) diente der Visualisierung einzelner retinaler Schichten. Im Wildtyp führte eine Sehnervquetschung zu einer gesteigerten inhibitorischen Phosphorylierung von GSK3 α und GSK3 β hauptsächlich in den β III-Tubulin-positiven RGZ.

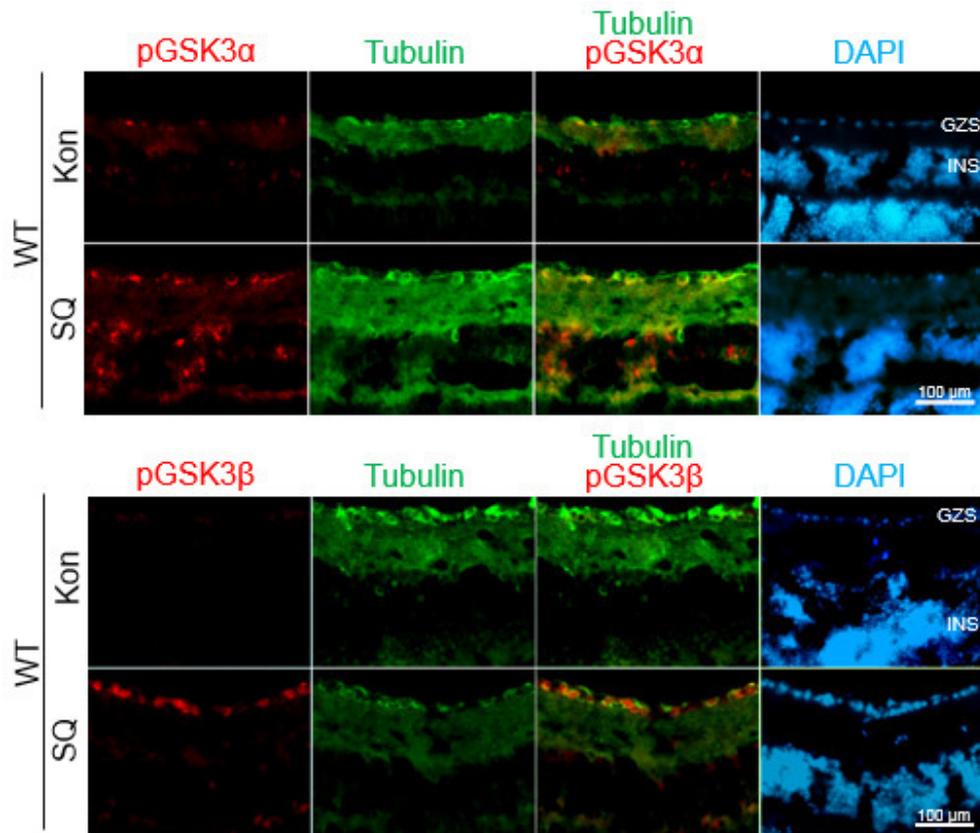


Abb. 7: Immunhistochemische Färbung von pGSK3 α und pGSK3 β in Retinaschnitten: Immunhistochemische Färbung von p^{S21}GSK3 α (pGSK3 α , rot) und p^{S9}GSK3 β (pGSK3 β , rot) in Retinaschnitten von Wildtyp (WT) Mäusen unbehandelt (Kon) oder 5 Tage nach Sehnervquetschung (SQ). RGZ wurden mit einer Färbung gegen β III-Tubulin (Tubulin, grün) visualisiert. DAPI (blau) diente der Visualisierung retinaler Schichten über die Zellkerne in der Ganglienzellschicht (GZS) und inneren nukleären Schicht (INS). Eine SQ induzierte eine inhibitorische Phosphorylierung von GSK3 α und GSK3 β hauptsächlich in den RGZ. Es wurde pro Gruppe ein Tier mit mindestens vier Retinaschnitten analysiert.

3.2 Auswirkung konstitutiv aktiver GSK3 auf das Überleben retinaler Ganglienzellen

Für eine erfolgreiche axonale Regeneration ist das Überleben der Nervenzelle essenziell. GSK3 kann über die Beeinflussung unterschiedlicher Signalwege die intrinsische Apoptose fördern und die extrinsische Apoptose hemmen (Beurel and Jope, 2006). Die Ergebnisse aus *Western Blots* und der Immunhistochemie zeigten, dass eine Sehnervquetschung eine inhibitorische Phosphorylierung von GSK3 α und GSK3 β in den RGZ induzierte. Um den Einfluss der GSK3-Aktivität auf das Überleben von RGZ zu untersuchen, wurden *wholamount*-Retinae vom Wildtyp, von GSK3 $\alpha^{S/A-}$, GSK3 $\beta^{S/A-}$ und GSK3 $\alpha/\beta^{S/A-}$ -Mäusen sowohl unbehandelt als auch 21 Tage nach einer Sehnervquetschung sowie mit zusätzlicher Linsenverletzung gewonnen (Abb. 8). Zur Visualisierung der RGZ erfolgte eine immunhistochemische Färbung mit Anti- β III-Tubulin. Mithilfe standardisierter Aufnahmen unter dem Fluoreszenzmikroskop konnten später die RGZ gezählt und deren Anzahl pro mm² bestimmt werden.

Die Anzahl von RGZ in den unbehandelten Retinae unterschied sich nicht von den untersuchten Genotypen. Eine alleinige Sehnervquetschung führte bei allen Gruppen zu einer dramatischen Reduktion der RGZ. Hierbei wiesen GSK3 $\alpha^{S/A-}$ und GSK3 $\beta^{S/A-}$ -Mäuse keinen signifikanten (α : $p = 0,79$; β : $p = 0,90$) Unterschied zum Wildtyp auf, wohingegen GSK3 $\alpha/\beta^{S/A-}$ -Tiere ein moderates, aber signifikant ($p = 0,001$) verbessertes Überleben zeigten.

In späteren Versuchen wurde die Linsenverletzung zur Induktion der axonalen Sehnervregeneration verwendet, weshalb zusätzlich die Versuchsgruppen der oben erwähnten Genotypen nach Sehnervquetschung mit Linsenverletzung untersucht wurden. In allen Gruppen war die Anzahl von RGZ durch die zusätzliche Linsenverletzung im Vergleich zur alleinigen Sehnervquetschung signifikant ($p < 0,001$) gesteigert. Die GSK3 $\alpha^{S/A-}$ und GSK3 $\beta^{S/A-}$ -Tiere wiesen keinen signifikanten (α : $p = 0,63$; β : $p = 0,87$) Unterschied zum Wildtyp auf, demgegenüber zeigten die GSK3 $\alpha/\beta^{S/A-}$ -Tiere ein moderates, aber signifikant ($p = 0,002$) verbessertes Überleben der RGZ.

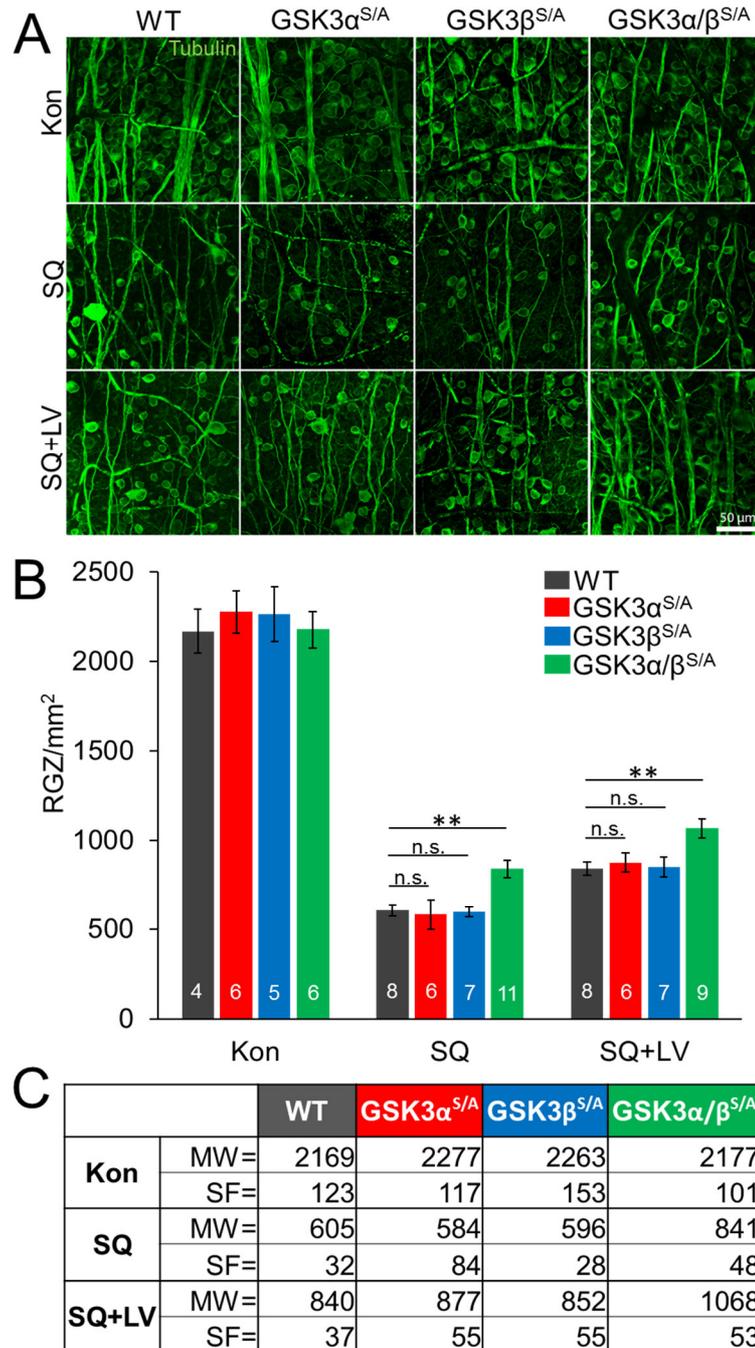


Abb. 8: Immunhistochemische Analyse des Überlebens retinaler Ganglienzellen:

(A): Repräsentative Darstellung von *wholemout*-Retinae von Wildtyp (WT), GSK3 $\alpha^{S/A}$ -, GSK3 $\beta^{S/A}$ - und GSK3 $\alpha/\beta^{S/A}$ -Mäusen entweder unbehandelt (Kon), 21 Tage nach einer Sehnervquetschung (SQ) oder Sehnervquetschung mit zusätzlicher Linsenverletzung (LV). RGZ wurden mittels β III-Tubulin-Färbung visualisiert. **(B-C):** Quantifizierung der Anzahl RGZ im Balkendiagramm mit Angabe der Stichprobenhöhe innerhalb der Balken und tabellarische Darstellung der Mittelwerte (MW) mit dazugehörigen Standardfehlern (SF). In der GSK3 $\alpha^{S/A}$ - und GSK3 $\beta^{S/A}$ -Gruppe zeigte sich nach SQ und SQ+LV kein signifikanter Unterschied im Überleben der RGZ verglichen mit dem WT. In der GSK3 $\alpha/\beta^{S/A}$ -Gruppe war das Überleben sowohl nach SQ als auch nach SQ+LV moderat, aber signifikant gesteigert. Es wurden mindestens vier Tiere pro Gruppe analysiert. Die Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt vom Gruppenvergleich nach Holm-Sidak erhoben. Behandlungseffekte: **: $p < 0,01$; n.s. = nicht signifikant.

3.3 Einfluss konstitutiv aktiver GSK3 auf die axonale Regeneration im verletzten Sehnerv

Nachdem gezeigt wurde, dass konstitutiv aktive GSK3 das Überleben der RGZ nur marginal und ausschließlich bei konstitutiver Aktivität beider Isoformen beeinflusste, wurde als Nächstes der Einfluss auf die axonale Sehnervregeneration untersucht. Hierfür wurden Sehnerven vom Wildtyp, von GSK3 $\alpha^{S/A-}$, GSK3 $\beta^{S/A-}$ und GSK3 $\alpha/\beta^{S/A-}$ -Mäusen sowohl 21 Tage nach alleiniger Sehnervquetschung als auch nach zusätzlicher Linsenverletzung untersucht. Durch eine zusätzliche Linsenverletzung war es möglich, einen potenziell positiven oder negativen Effekt von GSK3 auf die induzierte Regeneration zu erkennen. Zur Visualisierung regenerierender Axone erfolgte eine intravitreale Injektion von fluoreszenzmarkierten CTB 2 Tage vor der Gewebeentnahme. Nach Präparation und Einbettung des Sehnervs wurden longitudinale Schnitte angefertigt, anschließend wurde die Anzahl CTB-positiver Axone bei einem Abstand von 0,5 mm, 1 mm, 1,5 mm, 2 mm und 2,5 mm distal zur Läsionsstelle quantifiziert (Abb. 9, 10). Wildtypiere zeigten nach alleiniger Sehnervquetschung erwartungsgemäß eine stark limitierte Regeneration mit einem maximalen Auswachsen bis zu einer Distanz von 1,5 mm (Abb. 9). Ein signifikanter Unterschied zwischen der axonalen Regeneration von Wildtypieren und den jeweiligen GSK3 *knockin* Mäusen war nicht nachweisbar (α : $p = 0,38$; β : $p = 0,47$; α/β : $p = 0,66$).

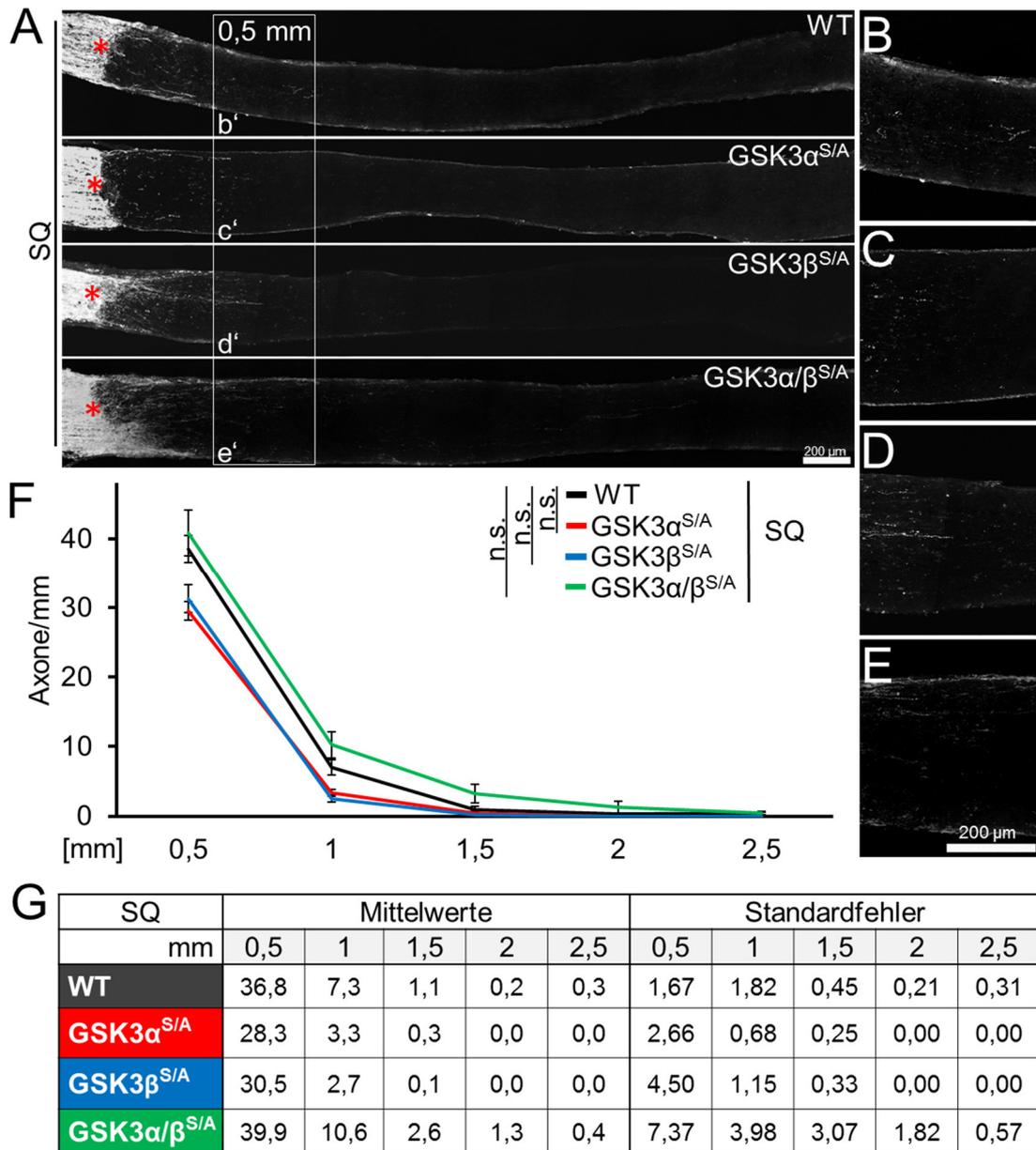


Abb. 9: Axonale Regeneration *in vivo* nach einer Sehnervquetschung:

(A): Repräsentative Bilder von longitudinalen Sehnervenschnitten aus Wildtyp (WT), GSK3 α ^{S/A}-, GSK3 β ^{S/A}- und GSK3 α/β ^{S/A}-Mäusen 21 Tage nach Sehnervquetschung (SQ). Die Axone wurden mittels intravitrealer Injektion von CTB markiert. Der Stern markiert die Läsionsstelle. **(B-E):** Vergrößerte Ausschnitte aus A bei 0,5 mm distal zur Läsionsstelle. **(F-G):** Quantifizierung der Anzahl regenerierender CTB-positiver Axone pro mm Sehnervbreite bei 0,5 bis 2,5 mm distal zur Läsionsstelle. Die GSK3 α ^{S/A}-, GSK3 β ^{S/A}- und GSK3 α/β ^{S/A}-Mäuse zeigten nach SQ keinen signifikanten (n.s.) Unterschied zum WT. Es wurden sechs bis acht Tiere pro Gruppe analysiert. Die Signifikanzen wurden mittels t-Test erhoben. Behandlungseffekte: n.s.= nicht signifikant

Da eine Linsenverletzung, wie in Abbildung 6 beschrieben, *per se* keinen Einfluss auf die GSK3-Aktivität hatte, konnte die Linsenverletzung genutzt werden, um die axonale Regeneration im Sehnerv zu induzieren und den Einfluss von GSK3 auf die Regeneration zu untersuchen. Wie in der Literatur bereits zuvor beschrieben,

induzierte eine zusätzliche Linsenverletzung zur Sehnervquetschung im Wildtyp eine signifikante Steigerung der axonalen Regeneration im Sehnerv. Die längsten Axone regenerierten dabei bis 2,5 mm distal zur Läsionsstelle. Im Gegensatz zum Wildtyp war in den $GSK3\alpha^{S/A-}$, $GSK3\beta^{S/A-}$ und $GSK3\alpha/\beta^{S/A-}$ Tieren die induzierte axonale Regeneration in den Sehnerv signifikant reduziert (α : $p = 0,004$; β : $p = 0,01$; α/β : $p = 0,04$).

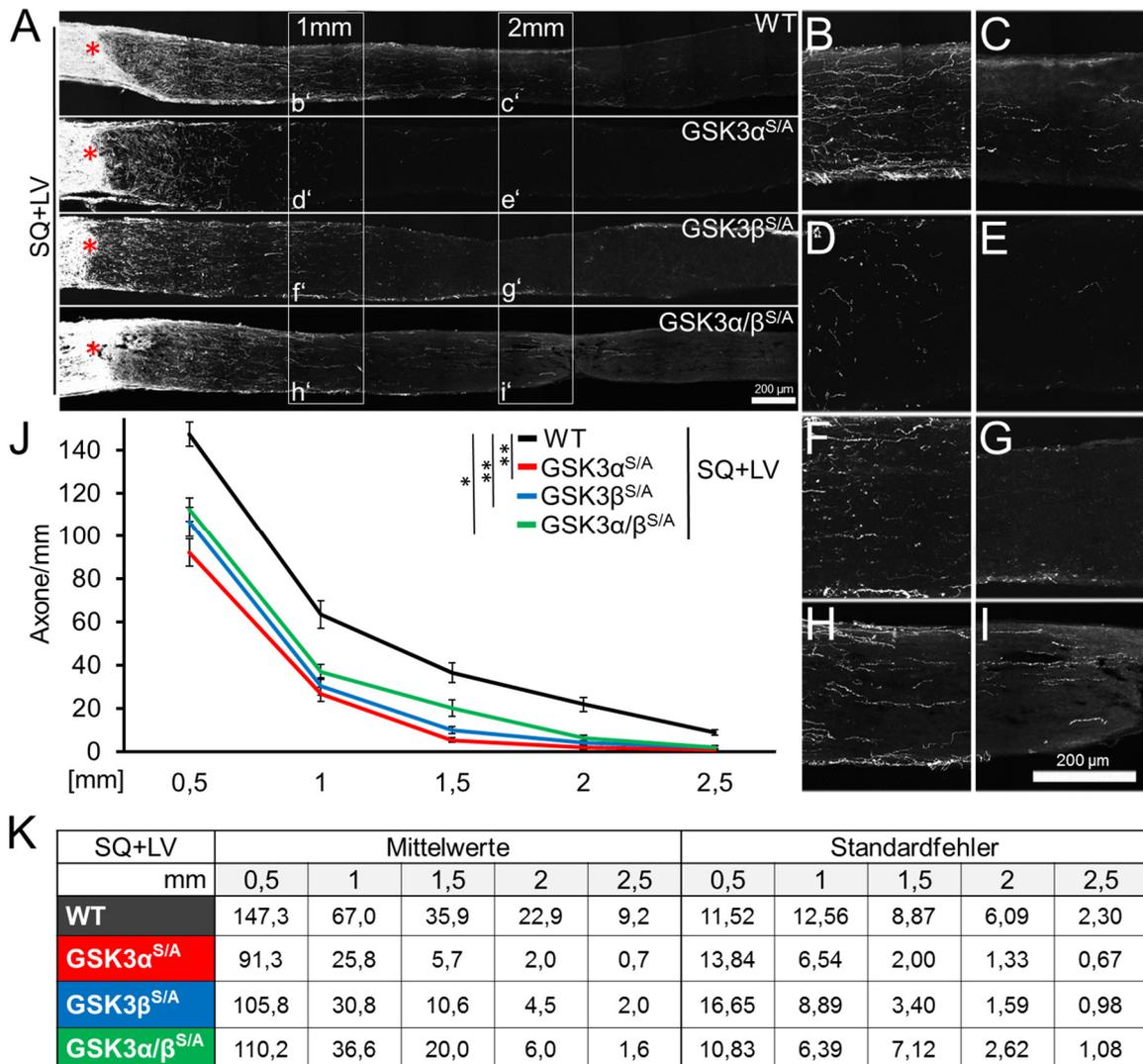


Abb. 10: Axonale Regeneration *in vivo* nach einer Sehnervquetschung und zusätzlicher Linsenverletzung:

(A): Repräsentative Bilder von longitudinalen Sehnervenschnitten aus Wildtyp (WT), $GSK3\alpha^{S/A-}$, $GSK3\beta^{S/A-}$ und $GSK3\alpha/\beta^{S/A-}$ Mäusen 21 Tage nach einer Sehnervquetschung und zusätzlicher Linsenverletzung (SQ+LV). Die Axone wurden mittels intravitrealer Injektion von CTB markiert. Der Stern markiert die Läsionsstelle. **(B-I):** Vergrößerte Ausschnitte aus A bei 1 und 2 mm distal zur Läsionsstelle. **(J-K):** Quantifizierung der Anzahl regenerierender CTB-positiver Axone pro mm Sehnervbreite bei 0,5 bis 2,5 mm distal zur Läsionsstelle. Die $GSK3\alpha^{S/A-}$, $GSK3\beta^{S/A-}$ und $GSK3\alpha/\beta^{S/A-}$ Mäuse zeigten nach SQ+LV ein signifikant verringertes Auswachsen regenerierender Axone im Vergleich zum WT. Es wurden sieben bis acht Tiere pro Gruppe analysiert. Die Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen wurde mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt vom Gruppenvergleich nach Holm-Sidak, erhoben. Behandlungseffekte: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

4 Diskussion

Die Rolle von GSK3 α und GSK3 β bezüglich der axonalen Regeneration im PNS und ZNS war im Vorfeld der vorliegenden Studie aufgrund kontroverser Literatur nicht geklärt. Ein Grund für die widersprüchlichen Ergebnisse kann unter anderem der unterschiedliche experimentelle Aufbau in den publizierten Studien sein (Diekmann and Fischer, 2015). So kann die Verwendung externer GSK3-Inhibitoren neben dem gewünschten Ziel auch andere Signalwege beeinflussen und dadurch Nebeneffekte herbeiführen. Bei dem Einsatz viraler Vektoren zur exogenen Expression von GSK3 kommt es zur Produktion unphysiologisch hoher Mengen an GSK3. Um diese unerwünschten Effekte zu umgehen, wurde in der vorliegenden Studie eine genetisch veränderte *knockin* Maus (GSK3 $\alpha/\beta^{S/A}$) verwendet. In dieser wird GSK3 in physiologischen Mengen exprimiert. Durch einen Aminosäureaustausch von Serin zu Alanin ist GSK3 nicht mehr inaktivierbar. Mithilfe dieses genetischen Modells wurde die Fragestellung adressiert, wie sich die konstitutive Aktivität von GSK3 auf die axonale Regeneration im ZNS auswirkt.

4.1 Eine Sehnervquetschung hemmt die GSK3-Aktivität in retinalen Ganglienzellen.

In Studien zeigten sich kontroverse Ergebnisse bezüglich der Fragestellung, inwiefern sich eine Verletzung des Nervensystems auf die Aktivität von GSK3 auswirkt. Aus weiteren Studien im PNS ging hervor, dass eine Verletzung des Ischiasnervs zu einer gesteigerten inhibitorischen Phosphorylierung von GSK3 α und GSK3 β in Hinterwurzelganglien führt (Saijilafu et al., 2013; Gobrecht et al., 2014; Gobrecht et al., 2016). Diese Daten ließen die Schlussfolgerung zu, dass eine Nervenverletzung im PNS eine Hemmung der GSK3-Aktivität auslöst. Dementsprechend zeigte sich in der vorliegenden Studie in den *Western Blots* und immunhistochemischen Färbungen, dass eine Sehnervenverletzung eine inhibitorische Phosphorylierung von GSK3 α/β in RGZ induzierte (Abb. 6, 7). Aus weiteren *Western Blot* Studien unserer Arbeitsgruppe wurde zudem deutlich, dass die gesteigerte inhibitorische Phosphorylierung von GSK3 α/β nicht auf

erhöhte Expressionslevel zurückzuführen war (Leibinger et al., 2017; Leibinger et al., 2019a).

Gegensätzlich dazu sind Ergebnisse aus einer Studie mit neuronalen PC12 und CGN-Zellkulturen (Dill et al., 2008). In dieser wurde der Effekt von CSPG auf die Expression von phosphoryliertem GSK3 β untersucht. CSPG ist Bestandteil der Glianarbe, welche sich um die Läsionsstelle des verletzten Nervs bildet (Fitch and Silver, 1997). Die Exposition der Zellkulturen mit CSPG reduzierte die Expression von inaktivem phosphorylierten GSK3 β . Als hierfür ursächlich wurden eine CSPG-vermittelte Inhibition von AKT und eine daraus resultierende verminderte Phosphorylierung von GSK3 diskutiert. Für die Auswertung im *Western Blot* wurden in der Studie die neuronalen Zellkulturen sowohl mit Zellkörpern als auch mit auswachsenden Neuriten einbezogen. Im Gegensatz dazu wurden in vorliegender Studie Lysate aus Retinae verwendet, das regenerierende Axon wurde somit nicht mitberücksichtigt. Eine möglicherweise unterschiedliche Phosphorylierung von GSK3 im Zellkörper und Axon könnte zu den widersprüchlichen Ergebnissen beitragen. Zudem handelt es sich bei Dill et al. (2008) um *in vitro* Versuche, während in der vorliegenden Studie *in vivo* Versuche durchgeführt wurden. Im lebenden Organismus *in vivo* existieren neben CSPG noch weitere Umgebungsfaktoren, die sich auf die axonale Regeneration auswirken können. Somit bildet die vorliegende Studie mit *in vivo*-vorbehandelten Tieren stärker die reale Situation im ZNS ab als das Zellkulturmodell von Dill et al. (2008).

In einer weiteren Studie mit gegensätzlichen Ergebnissen konnte in Quantifizierungen von immunhistochemisch gefärbten Retinaschnitten keine Steigerung der GSK3 β -Phosphorylierung ein, 3 oder 5 Tage nach einer Sehnervquetschung nachgewiesen werden (Guo et al., 2016). Durch die alleinige Auswertung immunhistochemisch gefärbter Retinaschnitte wurde bei Guo et al. (2016) nur ein geringer Anteil der Gesamtfläche der Retina und somit nur eine sehr geringe Anzahl von RGZ berücksichtigt. Dies schränkt eine Aussage über die ganze Retina ein. Demgegenüber entsteht bei der Methode der *wholemout*-Retina ein Überblick über die gesamte Netzhaut. In Studien unserer Arbeitsgruppe zeigte sich in immunhistochemischen Färbungen von *wholemout*-Retinae eine gesteigerte Phosphorylierung von GSK3 α und GSK3 β in RGZ 5 Tage nach einer Sehnervquetschung (Leibinger et al., 2017). Diese

Ergebnisse sind konsistent mit den durch *Western Blot* und immunhistochemischer Färbung gewonnenen Daten aus der vorliegenden Studie. Anders als bei Guo et al. (2016) werden die Ergebnisse zudem durch den *Western Blot* als weitere Methode untermauert (Abb. 6).

Bei genauer Betrachtung der immunhistochemisch gefärbten Retinaschnitte zeigte sich nicht nur eine Färbung der RGZ, sondern auch eine geringgradige Färbung der inneren nukleären Retinaschicht in den pGSK3 β und vor allem pGSK3 α gefärbten Retinaschnitten 5 Tage nach einer Sehnervquetschung (Abb. 7). Die innere nukleäre Schicht enthält Zellkörper von unterschiedlichen Zellen, beispielsweise Bipolar-, Amakrin- oder Müllerzellen. Es ist nicht auszuschließen, dass eine veränderte GSK3-Aktivität in anderen retinalen Zellen die Regeneration von RGZ beeinflusst. Zum Beispiel konnte durch eine veränderte Genexpression in Amakrinzellen die Regeneration von RGZ gesteigert werden (Zhang et al., 2019). Inwiefern sich die GSK3-Aktivität in anderen retinalen Zellen verändert und welche Auswirkungen dies auf andere Signalwege hat, müsste in zukünftigen Studien untersucht werden.

Im PNS wurde gezeigt, dass die verletzungsinduzierte GSK3-Inhibition hauptsächlich über den PI3K/AKT-Signalweg vermittelt wird (Saijilafu et al., 2013; Gobrecht et al., 2014). Eine Ischiasnervverletzung führte zu einer gesteigerten Phosphorylierung von AKT und GSK3 α/β in Hinterwurzelganglien (Saijilafu et al., 2013). Ergänzend wurde in Kulturen von Hinterwurzelganglien nachgewiesen, dass eine Hemmung von PI3K mittels des pharmakologischen Inhibitors LY294002 die inhibitorische Phosphorylierung von GSK3 α/β aufheben konnte (Gobrecht et al., 2014).

Interessanterweise konnte in vorliegender Studie in *Western Blots* von Retinalysaten, die von *in vivo* vorbehandelten Tieren gewonnen wurden, ebenfalls nachgewiesen werden, dass eine Sehnervquetschung eine gesteigerte Phosphorylierung von AKT bewirkt (Abb. 6B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch im ZNS der PI3K/AKT-Signalweg nach einer Verletzung an der Phosphorylierung von GSK3 beteiligt ist. Unterstützt wird dies durch weitere Studien, in denen eine Aktivierung von AKT mit einer gesteigerten Phosphorylierung von GSK3 β im ZNS einherging (Guo et al., 2016; Miao et al., 2016). Auch ein PTEN *knockout* führte zu einer gesteigerten Phosphorylierung

von GSK3 α und GSK3 β über eine vermehrte Aktivierung von AKT (Leibinger et al., 2019b).

4.2 Konstitutiv aktive GSK3 hat einen geringen neuroprotektiven Effekt.

In Experimenten am Sehnerv wurde gezeigt, dass nach dessen Quetschung ein Großteil der RGZ den apoptotischen Zelltod durchläuft (Berkelaar et al., 1994; Fischer and Leibinger, 2012). In der Literatur gibt es Hinweise, dass GSK3 das Überleben von Zellen durch Hemmung der extrinsischen Apoptose und Förderung der intrinsischen Apoptose beeinflusst (Beurel and Jope, 2006). Anhand immunhistochemischer Färbungen von *wholamount*-Retinae wurde in vorliegender Studie der Einfluss der GSK3-Aktivität auf das Überleben von RGZ untersucht. Es konnte keine signifikante Veränderung des Überlebens von RGZ nach einer Sehnervquetschung oder zusätzlichen Linsenverletzung durch konstitutiv aktive GSK3 α oder GSK3 β festgestellt werden (Abb. 8). Auch in anderen Studien beeinflusste konstitutiv aktive GSK3 β nicht das Überleben von RGZ (Guo et al., 2016; Huang et al., 2019).

Erst als GSK3 α und GSK3 β gleichzeitig in einer konstitutiv aktiven Form vorlagen, war ein gering gesteigertes Überleben von RGZ 3 Wochen nach einer Sehnervquetschung oder nach zusätzlicher Linsenverletzung nachweisbar (Abb. 8). Somit war die konstitutive Aktivität beider GSK3-Isoformen für einen geringen neuroprotektiven Effekt nötig. Liegt nur eine GSK3-Isoform konstitutiv aktiv vor, führt eine Sehnervquetschung möglicherweise zu einer verstärkten Hemmung der anderen Isoform, wodurch ein neuroprotektiver Effekt ausgeblieben sein könnte.

Nach Induktion des regenerativen Zustandes durch eine Linsenverletzung war das Überleben von RGZ durch konstitutiv aktive GSK3 α/β zusätzlich geringfügig gesteigert (Abb. 8). Diese Daten lassen die Schlussfolgerung zu, dass die neuroprotektive Wirkung von GSK3 α/β über andere Signalwege als über die der Linsenverletzung vermittelt wird. In einer weiteren Studie wurden ebenfalls AKT-unabhängige Signalwege, die zum Überleben von RGZ beitragen, diskutiert (Huang et al., 2019). Durch einen *knockout* von AKT1 wurden die neuroprotektiven Effekte von PTEN stark reduziert, dennoch waren überlebende

RGZ und regenerierende Axone nachweisbar (Huang et al., 2019). Zudem zeigte sich kein Einfluss von konstitutiv aktiver GSK3 α/β -Aktivität auf die neuroprotektiven Effekte des PTEN *knockout* (Leibinger et al., 2019b).

Eine mögliche Erklärung für den geringen neuroprotektiven Effekt der konstitutiven GSK3 α/β -Aktivität könnte die Hemmung der extrinsischen Apoptose sein (Beurel and Jope, 2006). TNF α ist ein wichtiger pro-apoptotischer Faktor, welcher über die Aktivierung zellständiger Todesrezeptoren die intrazelluläre Caspasekaskade und damit den Zelltod einleitet (Kischkel et al., 2000; Sivakumar et al., 2011). Durch eine Hemmung von GSK3 α/β mittels Lithium wurde in hippokampalen Zellen die TNF α -induzierte Apoptose gesteigert (Song et al., 2004). Dies deutete darauf hin, dass GSK3 α/β die TNF α -vermittelte Apoptose hemmt. Zudem zeigte sich, dass im Rahmen eines TNF α -vermittelten Leberzellunterganges GSK3 α/β die Leberzellen über eine NF κ B-Aktivierung vor dem TNF α -vermittelten Zelltod schützen konnte (Schwabe and Brenner, 2002). Dementsprechend förderte ein *knockout* von GSK3 β den TNF α -vermittelten Leberzelluntergang (Beg et al., 1995; Hoeflich et al., 2000). Darüber hinaus waren eine direkte Hemmung der Todesrezeptorformierung und somit eine Hemmung von Caspase-8 durch GSK3 α/β in einer Tumorzelllinie nachweisbar (Sun et al., 2008).

Die erzielten neuroprotektiven Effekte durch einen GSK3 α/β *knockin* waren insgesamt jedoch begrenzt, da nach einer Sehnervquetschung von ursprünglich durchschnittlich 2.177 RGZ/mm² nur noch 841 RGZ/mm² im Vergleich zu 605 RGZ/mm² im WildtypTier überlebten (Abb. 8 C). Angesichts des eher geringen neuroprotektiven Effektes ist zu bedenken, dass neben den anti-apoptotischen auch die pro-apoptotischen Effekte von GSK3 α/β Einfluss auf das Überleben von RGZ nehmen können. Beispielsweise wurde durch eine Transfektion von konstitutiv aktiven GSK3 β in zerebellären Körnerzellen der pro-apoptotische Faktor Bax vermehrt aktiviert und ins Mitochondrium transportiert (Linseman et al., 2004). Dadurch wurde die Apoptoserate gesteigert (Linseman et al., 2004). Ebenso zeigte sich durch eine Interaktion von GSK3 β mit dem Transkriptionsfaktor p53 eine Förderung der Apoptose (Pap and Cooper, 1998; Watcharasit et al., 2003). Für ein mögliches Dominieren der pro-apoptotischen Effekte von GSK3 sprach zudem der Nachweis, dass ein GSK3 α/β *knockout* über

eine gesteigerte mTOR-Aktivität zu einer starken Neuroprotektion von RGZ führte (Leibinger et al., 2019b).

Die in der Literatur widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse können aufgrund der gegensätzlichen pro- und anti-apoptischen Effekte von GSK3 zustande kommen. Letztlich bleibt es Aufgabe weiterer Studien, den genauen Wirkmechanismus von GSK3 auf das Überleben von RGZ zu untersuchen.

4.3 Konstitutiv aktive GSK3 fördert nicht die Regeneration im verletzten Sehnerv, hemmt jedoch die linsenverletzungsinduzierte Regeneration.

Neben der Neuroprotektion sind die Aktivierung des intrinsischen Regenerationsprogrammes und die Aufrechterhaltung des axonalen Wachstums trotz inhibitorischer extrazellulärer Moleküle für eine axonale Regeneration im ZNS entscheidend (Sun and He, 2010).

In der vorliegenden Studie fand nach einer Sehnervquetschung praktisch keine axonale Regeneration statt (Abb. 9). Dies steht im Einklang mit der in der Literatur beschriebenen Regenerationsunfähigkeit des ZNS (Cajal, 1928). Es zeigte sich, dass die konstitutive Aktivität von GSK3 α , GSK3 β oder GSK3 α/β die Regeneration im verletzten Sehnerv nicht förderte (Abb. 9) und somit keinen positiven Effekt auf die axonale Regeneration hatte. Da die axonale Regeneration nach alleiniger Sehnervquetschung nicht stattfindet, sind mögliche negative Effekte von GSK3 nach alleiniger Sehnervquetschung nicht nachweisbar.

Wie bereits in vorausgehenden Studien beschrieben, wurde erst durch eine zusätzliche inflammatorische Stimulation im Auge die Expression regenerationsassoziierter Gene, wie GAP43 oder SPRR1a, in RGZ induziert und damit die axonale Regeneration nach einer Sehnervquetschung angeregt (Fischer et al., 2004b; Hauk et al., 2010; Leibinger et al., 2017; Levin et al., 2019). In einer Studie unserer Arbeitsgruppe blieb die mittels inflammatorischer Stimulation induzierte Expression regenerationsassoziierter Gene in RGZ durch konstitutiv aktive GSK3 α/β unverändert (Leibinger et al., 2017). Die durch eine inflammatorische Stimulation induzierte axonalen Regeneration wurde jedoch in

vorliegender Arbeit durch konstitutiv aktive GSK3 α , GSK3 β oder GSK3 α/β signifikant reduziert (Abb. 10).

Unterstützt werden diese Ergebnisse durch andere Studien, in denen nach Regenerationsstimulation durch eine Steigerung der AKT-Aktivität, die axonale Regeneration durch eine Überexpression von konstitutiv aktiven GSK3 β in RGZ gehemmt wurde (Guo et al., 2016; Miao et al., 2016). Auch die durch einen PTEN *knockout* induzierte Regeneration wurde durch Überexpression von konstitutiv aktiven GSK3 β inhibiert (Huang et al., 2019). Zudem zeigte sich, dass konstitutiv aktive GSK3 β in hippocampalen Zellkulturen die Ausbildung eines Axons verhinderte (Jiang et al., 2005).

Als umgekehrte Schlussfolgerung ergab sich, dass eine Hemmung der GSK3 β -Expression mittels shRNA in einer gesteigerten axonalen Regeneration in den verletzten Sehnerv resultierte (Leibinger et al., 2017). Auch eine konditionelle Deletion von GSK3 β steigerte die axonale Regeneration in den verletzten Sehnerv (Guo et al., 2016; Miao et al., 2016; Leibinger et al., 2017; Huang et al., 2019). Im Rückenmarksmodell führte zudem eine Hemmung von GSK3 mittels externer Inhibitoren, wie Lithium oder SB-415286, ebenfalls zu einer Steigerung des axonalen Wachstums im verletzten Rückenmark (Dill et al., 2008).

Während der Fokus in der bestehenden Literatur auf GSK3 β als dominierende Isoform im ZNS liegt, konnte in vorliegender Arbeit auch ein hemmender Effekt von konstitutiv aktiver GSK3 α nachgewiesen werden (Soutar et al., 2010) (Abb. 10).

Interessanterweise stehen diese Ergebnisse im Gegensatz zu Daten aus dem PNS, wo die konstitutive Aktivität von GSK3 einen förderlichen Einfluss auf die Regeneration im verletzten Ischiasnerv hat (Gobrecht et al., 2014). Zurückgeführt wurden die positiven Effekte auf eine GSK3-vermittelte vermehrte Phosphorylierung des Mikrotubuli-assoziierten Proteins MAP1B im axonalen Wachstumskegel (Diekmann and Fischer, 2015; Gobrecht et al., 2016). Dadurch lagen vermehrt dynamisch wachsende tyrosinierte Mikrotubuli vor, was mit einer gesteigerten axonalen Regeneration im Ischiasnerv korrelierte.

In Studien unserer Arbeitsgruppe zeigte sich bei einem *knockin* von GSK3 α/β in RGZ-Kulturen eine vermehrte Phosphorylierung von MAP1B in den Neuriten (Grozdanov et al., 2010; Leibinger et al., 2017). Ein entscheidender Unterschied zum PNS war jedoch eine ebenso gesteigerte inhibitorische Phosphorylierung

des Mikrotubuli-assoziierten Proteins CRMP2 durch aktives GSK3 (Leibinger et al., 2017). CRMP2 bindet an Tubulin-Heterodimere und trägt dadurch zur Polymerisation der Mikrotubuli bei (Fukata et al., 2002). Während die Inhibition von CRMP2 in peripheren Hinterwurzelganglien nur im Zellkörper und nicht in den Axonen des Ischiasnervs beobachtet wurde, war im ZNS eine gesteigerte Phosphorylierung von CRMP2 in den RGZ und deren Axonen zu vermerken (Gobrecht et al., 2016; Leibinger et al., 2017). Daher wurde als Ursache für die reduzierte axonale Regeneration bei konstitutiv aktiver GSK3 die Überlagerung der positiven Effekte von pMAP1B durch die verstärkte Inhibition von CRMP2 diskutiert.

Diese Hypothese wird durch eine Studie unterstützt, in welcher durch Verhinderung der GSK3-vermittelten CRMP2-Inhibition ein förderlicher Effekt auf das Wachstum der Mikrotubuli im Wachstumskegel und die axonale Regeneration im verletzten Rückenmark nachweisbar war (Liz et al., 2014).

Ebenfalls konnte in weiteren Studien unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Expression von konstitutiv aktiven CRMP2 die axonale Regeneration im ZNS fördert (Leibinger et al., 2017; Leibinger et al., 2019a). Durch einen zusätzlichen *GSK3 α / β knockin* wurde die axonale Regeneration noch weiter gesteigert. Diese Daten ließen die Schlussfolgerung zu, dass der *GSK3 α / β knockin* durch Phosphorylierung von MAP1B erst dann einen positiven Effekt auf die axonale Regeneration im ZNS hat, wenn die hemmende Wirkung von GSK3 auf CRMP2 neutralisiert wird.

In Zusammenschau der Daten aus der vorliegenden Studie und der bestehenden Literatur lässt sich schlussfolgern, dass die GSK3-Aktivität im ZNS sowohl positive als auch negative Effekte auf die axonale Regeneration hat. Bei isoliert gesteigerter GSK3-Aktivität überwiegen jedoch im ZNS die negativen Effekte.

4.4 Therapeutische Strategien zur Förderung der axonalen Regeneration

In der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass der negative Effekt der GSK3-Aktivität im ZNS dominiert. Somit besteht in der Hemmung von GSK3 ein erfolgversprechender Ansatz zur Förderung der axonalen Regeneration. In Tieren mit einem konditionellen *GSK3 β knockout* zeigte sich

bereits eine starke axonale Regeneration nach Verletzung des Sehnervs (Guo et al., 2016; Miao et al., 2016; Leibinger et al., 2017; Huang et al., 2019). Ein konditioneller *knockout* ist jedoch als therapeutische Strategie durch die Voraussetzung einer genetischen Manipulation vor einer Verletzung nicht umzusetzen. Die Verwendung externer Inhibitoren bietet dagegen eine Anwendungsmöglichkeit.

Beispielsweise führte die Verwendung selektiver GSK3-Inhibitoren, wie SB-216763 und SB-415286, welche GSK3 durch Inhibition der ATP-Bindung unabhängig von einer Phosphorylierung an Serin hemmen, zu einer gesteigerten axonalen Regeneration verletzter zentraler Nerven (Coghlan et al., 2000; Dill et al., 2008; Seira et al., 2010). Auch eine Hemmung der GSK3 β -Expression mittels shRNA steigerte die axonale Regeneration in den verletzten Sehnerv (Leibinger et al., 2017). Im Rückenmarksmodell bewirkte zudem eine Hemmung von GSK3 durch Lithium ebenfalls eine Steigerung des axonalen Wachstums (Dill et al., 2008). Lithium ist bereits ein erprobtes Medikament in der Therapie psychologischer Erkrankungen (Cade, 1982). Eine systemische oder lokale Gabe von Lithium ist somit als eine mögliche Therapieoption zur Steigerung der axonalen Regeneration zu diskutieren.

Neben einer Hemmung von GSK3 besteht eine andere Strategie darin weiter stromabwärts von GSK3 einzugreifen. Die Expression von konstitutiv aktiven CRMP2 konnte bereits den negativen Effekt von konstitutiv aktiver GSK3 neutralisieren und die Regeneration steigern (Leibinger et al., 2017).

Ein weiterer Ansatz wäre die Verhinderung der Inhibition von CRMP2. Eine Inhibition von CRMP2 durch GSK3 benötigt zuvor eine *priming*-Phosphorylierung durch CDK5 (Yoshimura et al., 2005; Cole et al., 2006). In PC12-Zellkulturen und im verletzten Ischiasnerv konnte durch den Einsatz des CDK5-Inhibitors Roscovitin, ein synthetisches Purinanalogon, das Neuritenwachstum in PC12-Zellkulturen und die axonale Regeneration im verletzten Ischiasnerv gesteigert werden (Law et al., 2016). Das Weiteren wird CDK5 durch Sema3A aktiviert, welches Bestandteil der chemischen Glianarbe ist (Uchida et al., 2005). Eine Hemmung von Sema3A mittels des *small molecular agent*-216289 (SM-216289) konnte nachweislich die axonale Regeneration im verletzten Rückenmark verbessern (Kaneko et al., 2006).

In weiteren Studien muss untersucht werden, ob die positiven Effekte von Roscovitin und SM-216289 ebenfalls auf die axonale Regeneration des Sehnervs zu übertragen sind.

Neben einer Hemmung der negativen Effekte von GSK3 kann die Förderung der positiven Effekte der GSK3-Aktivität zur Steigerung der axonalen Regeneration beitragen. Die positiven Effekte von GSK3, die man im PNS über eine Aktivierung von MAP1B sieht, sind auch im ZNS herbeizuführen (Leibinger et al., 2017). Parthenolid, ein Sesquiterpenlacton, das aus dem Mutterkraut gewonnen wird, imitiert den Effekt von MAP1B stromabwärts von GSK3 durch Hemmung der Tubulin-Carboxypeptidase (Fonrose et al., 2007). Dies führt zum Erhalt tyrosinierter dynamischer Mikrotubuli (Fonrose et al., 2007). Anders als bei konstitutiv aktiver GSK3 beeinflusst es jedoch nicht die CRMP2-Aktivität. Im PNS konnten durch eine lokale intraneurale Applikation von Parthenolid im verletzten Ischiasnerv die axonale Regeneration und funktionelle Wiederherstellung beschleunigt werden (Diekmann and Fischer, 2016; Gobrecht et al., 2016). Um die maximalen Effekte zur Steigerung der Mikrotubulidynamik zu erzielen, sollte Parthenolid mit einer Inhibition von GSK3 kombiniert werden. Es bedarf weiterer Studien, um eine derartige Kombination im ZNS zu untersuchen.

Die Effekte von MAP1B und CRMP2 zielen beide über eine Förderung der Mikrotubulipolymerisation auf eine gesteigerte Motilität des Wachstumskegels ab (Gonzalez-Billault et al., 2001; Fukata et al., 2002; Gordon-Weeks, 2004). Auch die Verwendung von Paclitaxel, welches in niedriger Konzentration die Mikrotubulipolymerisation im Wachstumskegel fördert, konnte die axonale Regeneration nach einer Sehnervenverletzung steigern (Sengottuvel and Fischer, 2011; Sengottuvel et al., 2011).

Allen Verfahren, die direkt am Wachstumskegel wirken, ist gemein, dass eine deutliche Steigerung der Regeneration durch eine zusätzliche Aktivierung des intrinsischen Regenerationsprogrammes zu erreichen ist (Sengottuvel et al., 2011; Heskamp et al., 2013; Leibinger et al., 2017; Levin et al., 2019; Terheyden-Keighley and Fischer, 2019). Dies zeigte sich auch in einer Studie, in welcher durch eine Linsenverletzung zusätzlich zur Sehnervquetschung die axonale Regeneration nach GSK3 β *knockout* oder nach GSK3 *knockin* mit Expression von konstitutiv aktiven CRMP2 noch stärker gefördert wurde (Leibinger et al., 2017).

Entscheidende Signalwege in der Aktivierung des intrinsischen Regenerationsprogrammes sind der JAK/STAT3- und PI3K/AKT/mTOR-Signalweg (Alonzi et al., 2001; Manning and Cantley, 2003; Fischer et al., 2004b; Fischer, 2012; Leibinger et al., 2012; Heskamp et al., 2013; Leibinger et al., 2013a; Diekmann et al., 2015). Durch eine Linsenverletzung oder intravitreale Injektion von Pam₃Cys werden die Signalwege über die Freierdung von CNTF/LIF/IL-6 aktiviert (Fischer et al., 2000; Muller et al., 2007; Leibinger et al., 2009; Hauk et al., 2010). Die Verwendung des künstlichen hyper-Interleukin-6 (hIL-6) stimulierte in noch stärkerem Ausmaß als die zuvor verwendeten Methoden die JAK/STAT3- und PI3K/AKT/mTOR-Signalwege in RGZ und führte zu einer robusten axonalen Sehnervregeneration (Leibinger et al., 2016). Eine Kombination aus Aktivierung des intrinsischen Regenerationsprogrammes, beispielsweise durch Pam₃Cys oder hIL-6, sowie Steigerung der Mikrotubulidynamik durch Aktivierung von MAP1B und CRMP2 kann als Ansatz zur weiteren Steigerung der Regeneration diskutiert werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Beeinflussung nur eines Faktors für eine erfolgreiche axonale Regeneration nicht ausreicht. Vielmehr muss eine koordinierte Manipulation mehrerer Angriffspunkte, wie die Aktivierung des intrinsischen Regenerationsprogrammes, die Förderung der Mikrotubulidynamik und die Hemmung inhibitorischer extrazellulärer Faktoren, erfolgen, um eine robuste axonale Regeneration zu erreichen.

Dabei muss bedacht werden, dass die Induktion einer anhaltenden Regeneration nur der erste Schritt zur Wiederherstellung der ursprünglichen Funktion ist. In nachfolgenden Schritten müssen die ursprünglichen Zielgebiete wiedergefunden und neu innerviert werden. Diese Prozesse sind hochkomplex und genau wie die initiale Induktion der axonalen Regeneration Gegenstand aktueller Forschung. In einem letzten Schritt ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dem Tiermodell auf den Menschen zu überprüfen, um Therapiemöglichkeiten auch erfolgreich beim Patienten anwenden zu können.

4.5 Schlussfolgerungen

Die Neurone des ZNS von Säugetieren sind im Gegensatz zum PNS nicht befähigt, beschädigte Axone zu regenerieren. Der Einfluss von GSK3 auf die axonale Regeneration wurde in Studien bereits beschrieben und kontrovers diskutiert.

Im PNS führte eine Verletzung des Ischiasnervs zu einer vermehrten inhibitorischen Phosphorylierung von GSK3 in den Hinterwurzelganglien (Gobrecht et al., 2014). In vorliegender Studie konnte erstmals nachgewiesen werden, dass auch eine Sehnervenverletzung die inhibitorische Phosphorylierung von GSK3 α/β in RGZ steigert (Abb. 6, 7).

Während die GSK3-Aktivität im PNS zu einer gesteigerten axonalen Regeneration führte, zeigte sich im verletzten Sehnerv keine Veränderung auf die axonale Regeneration bei konstitutiv aktiver GSK3 (Abb. 9). Da ohne eine zusätzliche Stimulation des Regenerationsprogrammes die axonale Regeneration im ZNS stark limitiert ist, erfolgte zusätzlich zur Sehnervquetschung eine Linsenverletzung. Erst nach einer Induktion des Regenerationsprogrammes durch eine Linsenverletzung war eine signifikante Hemmung der axonalen Regeneration durch konstitutiv aktive GSK3 nachweisbar (Abb. 10). Andere Studien, die ebenfalls nach Aktivierung der Regeneration einen negativen Effekt der GSK3-Aktivität nachwiesen, unterstützen die erhobenen Daten (Guo et al., 2016; Miao et al., 2016; Huang et al., 2019).

Vergleicht man die Studien, so hat die GSK3-Aktivität einen gegensätzlichen Effekt auf die axonale Regeneration im PNS und ZNS. Als hierfür ursächlich kann die gegensätzliche Wirkung von GSK3 auf die im Wachstumskegel enthaltenen Mikrotubuli diskutiert werden. GSK3 phosphoryliert die Mikrotubuli-assoziierten Proteine MAP1B, was zu einer gesteigerten Mikrotubulidynamik führt (Diekmann and Fischer, 2015, 2016; Gobrecht et al., 2016), und CRMP2, was in vermehrt stabilen Mikrotubuli resultiert (Lucas et al., 1998; Yoshimura et al., 2005). Im ZNS hatte eine Hemmung von CRMP2 durch GSK3 eine Maskierung der positiven Effekte von GSK3 auf MAP1B zur Folge (Leibinger et al., 2017). Die gegensätzliche Wirkung von GSK3 konnte durch die Kombination aus einer Expression von konstitutiv aktiven CRMP2 und konstitutiv aktiven GSK3

aufgehoben werden und führte zu einer robusten axonalen Regeneration (Leibinger et al., 2017; Leibinger et al., 2019a).

Für eine anhaltende Regeneration ist die Initiation des intrinsischen Regenerationsprogrammes und das Überleben der Zelle essenziell. Nur das gleichzeitige Vorliegen von konstitutiv aktiver GSK3 α und GSK3 β erbrachte einen neuroprotektiven Effekt, der marginal das Überleben der RGZ nach einer Sehnervquetschung oder zusätzlichen Linsenverletzung steigerte (Abb. 8). Der Literatur ist zu entnehmen, dass GSK3 gegensätzliche Effekte auf die Apoptose hat: Förderung der intrinsischen und Hemmung der extrinsischen Apoptose (Beurel and Jope, 2006). Der geringe neuroprotektive Effekt von GSK3 α/β kann durch eine Hemmung der extrinsischen Apoptose diskutiert werden.

Aus den Erkenntnissen der vorliegenden Studie zusammen mit der aktuellen Literatur können neue potenzielle Therapieansätze entwickelt werden. Da die Regenerationsinsuffizienz im ZNS durch mehrere Aspekte bedingt ist, sollte ein Therapiekonzept aus der Modulation mehrerer Faktoren bestehen. Dazu zählt die Initiation des intrinsischen Regenerationsprogrammes im Neuron beispielsweise mittels Pam₃Cys- Injektion oder hIL-6 (Leon et al., 2000; Fischer et al., 2008; Hauk et al., 2010; Leibinger et al., 2016; Fischer, 2017; Leibinger et al., 2019c). Zusätzlich sollte das Wachstum der Mikrotubuli im regenerierenden Axon gefördert werden. Durch Parthenolid können die positiven pMAP1B-Effekte auf die Mikrotubulidynamik imitiert werden (Gobrecht et al., 2016). Die vermehrte Aktivierung von CRMP2 kann durch eine Hemmung von GSK3 mittels Lithium, SB-216763 oder SB-415286 sowie durch eine Verwendung des Sema3A-Inhibitors SM-216289 erfolgen (Stambolic et al., 1996; Coghlan et al., 2000; Kaneko et al., 2006).

Neben der Induktion einer robusten axonalen Regeneration müssten in nachfolgenden Schritten die ursprünglichen Zielgebiete reinnerviert werden.

5 Literaturverzeichnis

- Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO Journal* 15:6541-6551.
- Alonzi T, Middleton G, Wyatt S, Buchman V, Betz UA, Muller W, Musiani P, Poli V, Davies AM (2001) Role of STAT3 and PI 3-kinase/Akt in mediating the survival actions of cytokines on sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* 18:270-282.
- Arimura N, Menager C, Fukata Y, Kaibuchi K (2004) Role of CRMP-2 in neuronal polarity. *J Neurobiol* 58:34-47.
- Asher RA, Morgenstern DA, Fidler PS, Adcock KH, Oohira A, Braistead JE, Levine JM, Margolis RU, Rogers JH, Fawcett JW (2000) Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. *J Neurosci* 20:2427-2438.
- Atwal JK, Pinkston-Gosse J, Syken J, Stawicki S, Wu Y, Shatz C, Tessier-Lavigne M (2008) PirB is a functional receptor for myelin inhibitors of axonal regeneration. *Science* 322:967-970.
- Bandtlow CE, Schwab ME (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.
- Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D (1995) Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* 376:167-170.
- Berkelaar M, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ (1994) Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci* 14:4368-4374.
- Beurel E, Jope RS (2006) The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog Neurobiol* 79:173-189.
- Beurel E, Grieco SF, Jope RS (2015) Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther* 148:114-131.
- Bijur GN, De Sarno P, Jope RS (2000) Glycogen synthase kinase-3beta facilitates staurosporine- and heat shock-induced apoptosis. Protection by lithium. *J Biol Chem* 275:7583-7590.
- Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, Fawcett JW, McMahon SB (2002) Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 416:636-640.
- Bullock BP, Habener JF (1998) Phosphorylation of the cAMP response element binding protein CREB by cAMP-dependent protein kinase A and glycogen synthase kinase-3 alters DNA-binding affinity, conformation, and increases net charge. *Biochemistry* 37:3795-3809.
- Bunge MB, Bunge RP, Ris H (1961) Ultrastructural study of remyelination in an experimental lesion in adult cat spinal cord. *J Biophys Biochem Cytol* 10:67-94.
- Bunge MB, Bunge RP, Pappas GD (1962) Electron microscopic demonstration of connections between glia and myelin sheaths in the developing

- mammalian central nervous system. *The Journal of cell biology* 12:448-453.
- Cade JF (1982) Lithium Salts in the Treatment of Psychotic Excitement. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry* 16:129-133.
- Cajal Ry (1928) *Cajal's Degeneration & Regeneration of the Nervous System*. Oxford University Press, London.
- Cajal S (1890) Notas anatómicas. I. Sobre la aparición de las expansiones celulares en la médula embrionaria. *Gac Sanit Barc* 12:413-419.
- Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296:1655-1657.
- Caroni P, Schwab ME (1988) Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron* 1:85-96.
- Chen DF, Jhaveri S, Schneider GE (1995) Intrinsic changes in developing retinal neurons result in regenerative failure of their axons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7287-7291.
- Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, Christ F, Schwab ME (2000) Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 403:434-439.
- Cheng A, Krueger BK, Bambrick LL (1999) MAP5 expression in proliferating neuroblasts. *Developmental Brain Research* 113:107-113.
- Chierzi S, Strettoi E, Cenni MC, Maffei L (1999) Optic nerve crush: axonal responses in wild-type and bcl-2 transgenic mice. *J Neurosci* 19:8367-8376.
- Clemente CD, Windle WF (1954) Regeneration of severed nerve fibers in the spinal cord of the adult cat. *Journal of Comparative Neurology* 101:691-731.
- Coghlan MP, Culbert AA, Cross DA, Corcoran SL, Yates JW, Pearce NJ, Rausch OL, Murphy GJ, Carter PS, Roxbee Cox L, Mills D, Brown MJ, Haigh D, Ward RW, Smith DG, Murray KJ, Reith AD, Holder JC (2000) Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem Biol* 7:793-803.
- Cohen A, Bray GM, Aguayo AJ (1994) Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) increases adult rat retinal ganglion cell survival and neurite outgrowth in vitro. *J Neurobiol* 25:953-959.
- Cole A, Frame S, Cohen P (2004) Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. *Biochem J* 377:249-255.
- Cole AR, Causeret F, Yadirgi G, Hastie CJ, McLauchlan H, McManus EJ, Hernandez F, Eickholt BJ, Nikolic M, Sutherland C (2006) Distinct priming kinases contribute to differential regulation of collapsin response mediator proteins by glycogen synthase kinase-3 in vivo. *J Biol Chem* 281:16591-16598.
- Crino PB, Trojanowski JQ, Eberwine J (1997) Internexin, MAP1B, and nestin in cortical dysplasia as markers of developmental maturity. *Acta Neuropathol* 93:619-627.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378:785-789.

- Cui Q, Lu Q, So KF, Yip HK (1999) CNTF, not other trophic factors, promotes axonal regeneration of axotomized retinal ganglion cells in adult hamsters. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40:760-766.
- David S, Aguayo AJ (1981) Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science* 214:931-933.
- Davies SJ, Field PM, Raisman G (1996) Regeneration of cut adult axons fails even in the presence of continuous aligned glial pathways. *Exp Neurol* 142:203-216.
- Davies SJ, Goucher DR, Doller C, Silver J (1999) Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. *J Neurosci* 19:5810-5822.
- De Winter F, Oudega M, Lankhorst AJ, Hamers FP, Blits B, Ruitenberg MJ, Pasterkamp RJ, Gispen WH, Verhaagen J (2002) Injury-induced class 3 semaphorin expression in the rat spinal cord. *Exp Neurol* 175:61-75.
- del Río-Hortega P (1928) Tercera aportacion al conocimiento morfologico e interpretacion funcional de la oligodendroglia.
- Dickendesher TL, Baldwin KT, Mironova YA, Koriyama Y, Raiker SJ, Askew KL, Wood A, Geoffroy CG, Zheng B, Liepmann CD, Katagiri Y, Benowitz LI, Geller HM, Giger RJ (2012) NgR1 and NgR3 are receptors for chondroitin sulfate proteoglycans. *Nat Neurosci* 15:703-712.
- Diekmann H, Fischer D (2013) Glaucoma and optic nerve repair. *Cell Tissue Res* 353:327-337.
- Diekmann H, Fischer D (2015) Role of GSK3 in peripheral nerve regeneration. *Neural Regen Res* 10:1602-1603.
- Diekmann H, Fischer D (2016) Parthenolide: a novel pharmacological approach to promote nerve regeneration. *Neural Regen Res* 11:1566-1567.
- Diekmann H, Kalbhen P, Fischer D (2015) Active mechanistic target of rapamycin plays an ancillary rather than essential role in zebrafish CNS axon regeneration. *Front Cell Neurosci* 9:251.
- Dill J, Wang H, Zhou F, Li S (2008) Inactivation of glycogen synthase kinase 3 promotes axonal growth and recovery in the CNS. *J Neurosci* 28:8914-8928.
- Ebadi M, Bashir RM, Heidrick ML, Hamada FM, Refaey HE, Hamed A, Helal G, Baxi MD, Cerutis DR, Lassi NK (1997) Neurotrophins and their receptors in nerve injury and repair. *Neurochem Int* 30:347-374.
- Eldar-Finkelman H, Martinez A (2011) GSK-3 Inhibitors: Preclinical and Clinical Focus on CNS. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 4:32.
- Eliasson C, Sahlgren C, Berthold CH, Stakeberg J, Celis JE, Betsholtz C, Eriksson JE, Pekny M (1999) Intermediate filament protein partnership in astrocytes. *J Biol Chem* 274:23996-24006.
- Embi N, Rylatt DB, Cohen P (1980) Glycogen Synthase Kinase-3 from Rabbit Skeletal Muscle. *European Journal of Biochemistry* 107:519-527.
- Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV (2004) Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci* 24:2143-2155.
- Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J (2002) Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev* 16:1472-1487.
- Fischer D (2012) Stimulating axonal regeneration of mature retinal ganglion cells and overcoming inhibitory signaling. *Cell Tissue Res* 349:79-85.

- Fischer D (2017) Hyper-IL-6: a potent and efficacious stimulator of RGC regeneration. *Eye (Lond)* 31:173-178.
- Fischer D, Leibinger M (2012) Promoting optic nerve regeneration. *Prog Retin Eye Res* 31:688-701.
- Fischer D, Pavlidis M, Thanos S (2000) Cataractogenic lens injury prevents traumatic ganglion cell death and promotes axonal regeneration both in vivo and in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:3943-3954.
- Fischer D, Heiduschka P, Thanos S (2001) Lens-injury-stimulated axonal regeneration throughout the optic pathway of adult rats. *Exp Neurol* 172:257-272.
- Fischer D, He Z, Benowitz LI (2004a) Counteracting the Nogo receptor enhances optic nerve regeneration if retinal ganglion cells are in an active growth state. *J Neurosci* 24:1646-1651.
- Fischer D, Petkova V, Thanos S, Benowitz LI (2004b) Switching mature retinal ganglion cells to a robust growth state in vivo: gene expression and synergy with RhoA inactivation. *J Neurosci* 24:8726-8740.
- Fischer D, Hauk TG, Muller A, Thanos S (2008) Crystallins of the beta/gamma-superfamily mimic the effects of lens injury and promote axon regeneration. *Mol Cell Neurosci* 37:471-479.
- Fischer M, Goldschmitt J, Peschel C, Brakenhoff JPG, Kallen K-J, Wollmer A, Grotzinger J, Rose-John S (1997) A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat Biotech* 15:142-145.
- Fitch MT, Silver J (1997) Activated macrophages and the blood-brain barrier: inflammation after CNS injury leads to increases in putative inhibitory molecules. *Exp Neurol* 148:587-603.
- Fitch MT, Doller C, Combs CK, Landreth GE, Silver J (1999) Cellular and molecular mechanisms of glial scarring and progressive cavitation: in vivo and in vitro analysis of inflammation-induced secondary injury after CNS trauma. *J Neurosci* 19:8182-8198.
- Fonrose X, Ausseil F, Soleilhac E, Masson V, David B, Pouny I, Cintrat JC, Rousseau B, Barette C, Massiot G, Lafanechere L (2007) Parthenolide inhibits tubulin carboxypeptidase activity. *Cancer Res* 67:3371-3378.
- Fournier AE, Takizawa BT, Strittmatter SM (2003) Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS. *J Neurosci* 23:1416-1423.
- Frame S, Cohen P (2001) GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 359:1-16.
- Fukata Y, Itoh TJ, Kimura T, Menager C, Nishimura T, Shiromizu T, Watanabe H, Inagaki N, Iwamatsu A, Hotani H, Kaibuchi K (2002) CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat Cell Biol* 4:583-591.
- Geren BB (1954) The formation from the schwann cell surface of myelin in the peripheral nerves of chick embryos. *Experimental cell research* 7:558-562.
- Gobrecht P, Leibinger M, Andreadaki A, Fischer D (2014) Sustained GSK3 activity markedly facilitates nerve regeneration. *Nat Commun* 5:4561.
- Gobrecht P, Andreadaki A, Diekmann H, Heskamp A, Leibinger M, Fischer D (2016) Promotion of Functional Nerve Regeneration by Inhibition of Microtubule Detyrosination. *J Neurosci* 36:3890-3902.
- Goldberg JL, Klassen MP, Hua Y, Barres BA (2002) Amacrine-signaled loss of intrinsic axon growth ability by retinal ganglion cells. *Science* 296:1860-1864.

- Goldberg S, Frank B (1980) Will central nervous systems in the adult mammal regenerate after bypassing a lesion? A study in the mouse and chick visual systems. *Experimental Neurology* 70:675-689.
- Gonzalez-Billault C, Avila J, Caceres A (2001) Evidence for the role of MAP1B in axon formation. *Mol Biol Cell* 12:2087-2098.
- Gonzalez-Billault C, Jimenez-Mateos EM, Caceres A, Diaz-Nido J, Wandosell F, Avila J (2003) Microtubule-associated protein 1B function during normal development, regeneration, and pathological conditions in the nervous system. *J Neurobiol* 58:48-59.
- Goold RG, Owen R, Gordon-Weeks PR (1999) Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation of microtubule-associated protein 1B regulates the stability of microtubules in growth cones. *Journal of Cell Science* 112:3373-3384.
- Gordon-Weeks PR (2000) *Neuronal Growth Cones*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Gordon-Weeks PR (2004) Microtubules and growth cone function. *J Neurobiol* 58:70-83.
- Gordon-Weeks PR, Fischer I (2000) MAP1B expression and microtubule stability in growing and regenerating axons. *Microsc Res Tech* 48:63-74.
- Graeber MB, Lopez-Redondo F, Ikoma E, Ishikawa M, Imai Y, Nakajima K, Kreutzberg GW, Kohsaka S (1998) The microglia/macrophage response in the neonatal rat facial nucleus following axotomy. *Brain Res* 813:241-253.
- GrandPre T, Nakamura F, Vartanian T, Strittmatter SM (2000) Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 403:439-444.
- Grozdanov V, Muller A, Sengottuvel V, Leibinger M, Fischer D (2010) A method for preparing primary retinal cell cultures for evaluating the neuroprotective and neuritogenic effect of factors on axotomized mature CNS neurons. *Curr Protoc Neurosci Chapter 3:Unit3* 22.
- Gundersen GG, Kalnoski MH, Bulinski JC (1984) Distinct populations of microtubules: tyrosinated and nontyrosinated alpha tubulin are distributed differently in vivo. *Cell* 38:779-789.
- Guo X, Snider WD, Chen B (2016) GSK3beta regulates AKT-induced central nervous system axon regeneration via an eIF2Bepsilon-dependent, mTORC1-independent pathway. *Elife* 5:e11903.
- Hauk TG, Leibinger M, Muller A, Andreadaki A, Knippschild U, Fischer D (2010) Stimulation of axon regeneration in the mature optic nerve by intravitreal application of the toll-like receptor 2 agonist Pam3Cys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:459-464.
- He B, Meng YH, Mivechi NF (1998) Glycogen synthase kinase 3beta and extracellular signal-regulated kinase inactivate heat shock transcription factor 1 by facilitating the disappearance of transcriptionally active granules after heat shock. *Mol Cell Biol* 18:6624-6633.
- He Z, Koprivica V (2004) The Nogo signaling pathway for regeneration block. *Annu Rev Neurosci* 27:341-368.
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374:1-20.
- Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-776.

- Henriksen EJ, Kinnick TR, Teachey MK, O'Keefe MP, Ring D, Johnson KW, Harrison SD (2003) Modulation of muscle insulin resistance by selective inhibition of GSK-3 in Zucker diabetic fatty rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284:E892-900.
- Heskamp A, Leibinger M, Andreadaki A, Gobrecht P, Diekmann H, Fischer D (2013) CXCL12/SDF-1 facilitates optic nerve regeneration. *Neurobiol Dis* 55:76-86.
- Hilla AM, Fischer D (2018) Studying the Role of Microglia in Neurodegeneration and Axonal Regeneration in the Murine Visual System bio-protocol 8.
- Hilla AM, Diekmann H, Fischer D (2017) Microglia Are Irrelevant for Neuronal Degeneration and Axon Regeneration after Acute Injury. *J Neurosci* 37:6113-6124.
- Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR (2000) Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF- κ B activation. *Nature* 406:86-90.
- Huang H, Miao L, Yang L, Liang F, Wang Q, Zhuang P, Sun Y, Hu Y (2019) AKT-dependent and -independent pathways mediate PTEN deletion-induced CNS axon regeneration. *Cell Death Dis* 10:203.
- Huber F, Schnauß J, Rönicke S, Rauch P, Müller K, Fütterer C, Käs J (2013) Emergent complexity of the cytoskeleton: from single filaments to tissue. *Advances in Physics* 62:1-112.
- Hughes K, Nikolakaki E, Plyte SE, Totty NF, Woodgett JR (1993) Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *Embo j* 12:803-808.
- Inagaki N, Chihara K, Arimura N, Menager C, Kawano Y, Matsuo N, Nishimura T, Amano M, Kaibuchi K (2001) CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 4:781-782.
- Jiang H, Guo W, Liang X, Rao Y (2005) Both the Establishment and the Maintenance of Neuronal Polarity Require Active Mechanisms: Critical Roles of GSK-3 β and Its Upstream Regulators. *Cell* 120:123-135.
- Jope RS, Johnson GVW (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends in Biochemical Sciences* 29:95-102.
- Kaneko S, Iwanami A, Nakamura M, Kishino A, Kikuchi K, Shibata S, Okano HJ, Ikegami T, Moriya A, Konishi O, Nakayama C, Kumagai K, Kimura T, Sato Y, Goshima Y, Taniguchi M, Ito M, He Z, Toyama Y, Okano H (2006) A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nat Med* 12:1380-1389.
- Khawaja S, Gundersen GG, Bulinski JC (1988) Enhanced stability of microtubules enriched in dephosphorylated tubulin is not a direct function of dephosphorylation level. *The Journal of cell biology* 106:141-149.
- Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A (2000) Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 12:611-620.
- Kozlovsky N, Belmaker RH, Agam G (2002) GSK-3 and the neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol* 12:13-25.
- Lagord C, Berry M, Logan A (2002) Expression of TGF β 2 but not TGF β 1 correlates with the deposition of scar tissue in the lesioned spinal cord. *Mol Cell Neurosci* 20:69-92.
- Law V, Dong S, Rosales JL, Jeong M-Y, Zochodne D, Lee K-Y (2016) Enhancement of Peripheral Nerve Regrowth by the Purine Nucleoside

- Analog and Cell Cycle Inhibitor, Roscovitine. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 10.
- Leaver SG, Cui Q, Plant GW, Arulpragasam A, Hisheh S, Verhaagen J, Harvey AR (2006) AAV-mediated expression of CNTF promotes long-term survival and regeneration of adult rat retinal ganglion cells. *Gene Ther* 13:1328-1341.
- Leibinger M, Andreadaki A, Fischer D (2012) Role of mTOR in neuroprotection and axon regeneration after inflammatory stimulation. *Neurobiol Dis* 46:314-324.
- Leibinger M, Andreadaki A, Diekmann H, Fischer D (2013a) Neuronal STAT3 activation is essential for CNTF- and inflammatory stimulation-induced CNS axon regeneration. *Cell Death Dis* 4:e805.
- Leibinger M, Hilla AM, Andreadaki A, Fischer D (2019a) GSK3-CRMP2 signaling mediates axonal regeneration induced by Pten knockout. *Commun Biol* 2:318.
- Leibinger M, Hilla AM, Andreadaki A, Fischer D (2019b) GSK3-CRMP2 signaling mediates axonal regeneration induced by Pten knockout. *Commun Biol* 2:318-318.
- Leibinger M, Zeitler C, Gobrecht P, Andreadaki A, Fischer D (2019c) Transneuronal delivery of designer-cytokine enables functional recovery after complete spinal cord injury. *bioRxiv:831271*.
- Leibinger M, Muller A, Andreadaki A, Hauk TG, Kirsch M, Fischer D (2009) Neuroprotective and axon growth-promoting effects following inflammatory stimulation on mature retinal ganglion cells in mice depend on ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor. *J Neurosci* 29:14334-14341.
- Leibinger M, Muller A, Gobrecht P, Diekmann H, Andreadaki A, Fischer D (2013b) Interleukin-6 contributes to CNS axon regeneration upon inflammatory stimulation. *Cell Death Dis* 4:e609.
- Leibinger M, Andreadaki A, Gobrecht P, Levin E, Diekmann H, Fischer D (2016) Boosting Central Nervous System Axon Regeneration by Circumventing Limitations of Natural Cytokine Signaling. *Mol Ther* 24:1712-1725.
- Leibinger M, Andreadaki A, Golla R, Levin E, Hilla AM, Diekmann H, Fischer D (2017) Boosting CNS axon regeneration by harnessing antagonistic effects of GSK3 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Leon S, Yin Y, Nguyen J, Irwin N, Benowitz LI (2000) Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve. *J Neurosci* 20:4615-4626.
- Levin E, Leibinger M, Gobrecht P, Hilla A, Andreadaki A, Fischer D (2019) Muscle LIM Protein Is Expressed in the Injured Adult CNS and Promotes Axon Regeneration. *Cell Rep* 26:1021-1032 e1026.
- Li X, Bijur GN, Jope RS (2002) Glycogen synthase kinase-3beta, mood stabilizers, and neuroprotection. *Bipolar Disord* 4:137-144.
- Linseman DA, Butts BD, Precht TA, Phelps RA, Le SS, Laessig TA, Bouchard RJ, Florez-McClure ML, Heidenreich KA (2004) Glycogen Synthase Kinase-3 β Phosphorylates Bax and Promotes Its Mitochondrial Localization during Neuronal Apoptosis. *The Journal of Neuroscience* 24:9993-10002.
- Liu BP, Fournier A, GrandPre T, Strittmatter SM (2002) Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor. *Science* 297:1190-1193.

- Liz MA, Mar FM, Santos TE, Pimentel HI, Marques AM, Morgado MM, Vieira S, Sousa VF, Pemble H, Wittmann T, Sutherland C, Woodgett JR, Sousa MM (2014) Neuronal deletion of GSK3beta increases microtubule speed in the growth cone and enhances axon regeneration via CRMP-2 and independently of MAP1B and CLASP2. *BMC Biol* 12:47.
- Logan A, Ahmed Z, Baird A, Gonzalez AM, Berry M (2006) Neurotrophic factor synergy is required for neuronal survival and disinhibited axon regeneration after CNS injury. *Brain* 129:490-502.
- Lu P, Yang H, Jones LL, Filbin MT, Tuszynski MH (2004) Combinatorial therapy with neurotrophins and cAMP promotes axonal regeneration beyond sites of spinal cord injury. *J Neurosci* 24:6402-6409.
- Lucas FR, Gould RG, Gordon-Weeks PR, Salinas PC (1998) Inhibition of GSK-3beta leading to the loss of phosphorylated MAP-1B is an early event in axonal remodelling induced by WNT-7a or lithium. *J Cell Sci* 111 (Pt 10):1351-1361.
- Maccioni RB, Cambiazo V (1995) Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol Rev* 75:835-864.
- Mandelkow E, Mandelkow E-M (1994) Microtubule structure. *Current Opinion in Structural Biology* 4:171-179.
- Manning BD, Cantley LC (2003) United at last: the tuberous sclerosis complex gene products connect the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway to mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling. *Biochemical Society Transactions* 31:573-578.
- Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ (1994) Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1632-1636.
- McKeon RJ, Schreiber RC, Rudge JS, Silver J (1991) Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J Neurosci* 11:3398-3411.
- McKerracher L, David S, Jackson DL, Kottis V, Dunn RJ, Braun PE (1994) Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron* 13:805-811.
- McManus EJ, Sakamoto K, Armit LJ, Ronaldson L, Shpiro N, Marquez R, Alessi DR (2005) Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis. *Embo j* 24:1571-1583.
- Mi S, Lee X, Shao Z, Thill G, Ji B, Relton J, Levesque M, Allaire N, Perrin S, Sands B, Crowell T, Cate RL, McCoy JM, Pepinsky RB (2004) LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci* 7:221-228.
- Miao L, Yang L, Huang H, Liang F, Ling C, Hu Y (2016) mTORC1 is necessary but mTORC2 and GSK3beta are inhibitory for AKT3-induced axon regeneration in the central nervous system. *Elife* 5.
- Miotke JA, MacLennan AJ, Meyer RL (2007) Immunohistochemical localization of CNTFR α in adult mouse retina and optic nerve following intraorbital nerve crush: Evidence for the axonal loss of a trophic factor receptor after injury. *The Journal of Comparative Neurology* 500:384-400.
- Monnier PP, Sierra A, Schwab JM, Henke-Fahle S, Mueller BK (2003) The Rho/ROCK pathway mediates neurite growth-inhibitory activity associated

- with the chondroitin sulfate proteoglycans of the CNS glial scar. *Mol Cell Neurosci* 22:319-330.
- Muller A, Hauk TG, Fischer D (2007) Astrocyte-derived CNTF switches mature RGCs to a regenerative state following inflammatory stimulation. *Brain* 130:3308-3320.
- Olmsted JB (1986) Microtubule-associated proteins. *Annu Rev Cell Biol* 2:421-457.
- Pap M, Cooper GM (1998) Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem* 273:19929-19932.
- Pap M, Cooper GM (2002) Role of translation initiation factor 2B in control of cell survival by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3beta signaling pathway. *Mol Cell Biol* 22:578-586.
- Park JB, Yiu G, Kaneko S, Wang J, Chang J, He XL, Garcia KC, He Z (2005) A TNF receptor family member, TROY, is a coreceptor with Nogo receptor in mediating the inhibitory activity of myelin inhibitors. *Neuron* 45:345-351.
- Park KK, Liu K, Hu Y, Smith PD, Wang C, Cai B, Xu B, Connolly L, Kramvis I, Sahin M, He Z (2008) Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway. *Science* 322:963-966.
- Pasterkamp RJ, Giger RJ, Ruitenber MJ, Holtmaat AJ, De Wit J, De Winter F, Verhaagen J (1999) Expression of the gene encoding the chemorepellent semaphorin III is induced in the fibroblast component of neural scar tissue formed following injuries of adult but not neonatal CNS. *Mol Cell Neurosci* 13:143-166.
- Pekny M, Johansson CB, Eliasson C, Stakeberg J, Wallen A, Perlmann T, Lendahl U, Betsholtz C, Berthold CH, Frisen J (1999) Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. *The Journal of cell biology* 145:503-514.
- Peters M, Blinn G, Solem F, Fischer M, zum Büschenfelde K-HM, Rose-John S (1998) In Vivo and In Vitro Activities of the gp130-Stimulating Designer Cytokine Hyper-IL-6. *The Journal of Immunology* 161:3575-3581.
- Phiel CJ, Wilson CA, Lee VM, Klein PS (2003) GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature* 423:435-439.
- Rabacchi SA, Ensini M, Bonfanti L, Gravina A, Maffei L (1994) Nerve growth factor reduces apoptosis of axotomized retinal ganglion cells in the neonatal rat. *Neuroscience* 63:969-973.
- Rhodes KE, Fawcett JW (2004) Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS? *J Anat* 204:33-48.
- Saijilafu, Hur EM, Liu CM, Jiao Z, Xu WL, Zhou FQ (2013) PI3K-GSK3 signalling regulates mammalian axon regeneration by inducing the expression of Smad1. *Nat Commun* 4:2690.
- Schwab ME, Caroni P (1988) Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro. *J Neurosci* 8:2381-2393.
- Schwabe RF, Brenner DA (2002) Role of glycogen synthase kinase-3 in TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and apoptosis in hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283:G204-211.
- Sears R, Nuckolls F, Haura E, Taya Y, Tamai K, Nevins JR (2000) Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev* 14:2501-2514.

- Seira O, Gavin R, Gil V, Llorens F, Rangel A, Soriano E, del Rio JA (2010) Neurites regrowth of cortical neurons by GSK3beta inhibition independently of Nogo receptor 1. *J Neurochem* 113:1644-1658.
- Sengottuvel V, Fischer D (2011) Facilitating axon regeneration in the injured CNS by microtubules stabilization. *Commun Integr Biol* 4:391-393.
- Sengottuvel V, Leibinger M, Pfreimer M, Andreadaki A, Fischer D (2011) Taxol Facilitates Axon Regeneration in the Mature CNS. *The Journal of Neuroscience* 31:2688-2699.
- Shen Y, Tenney AP, Busch SA, Horn KP, Cuascut FX, Liu K, He Z, Silver J, Flanagan JG (2009) PTPsigma is a receptor for chondroitin sulfate proteoglycan, an inhibitor of neural regeneration. *Science* 326:592-596.
- Shewan D, Berry M, Cohen J (1995) Extensive regeneration in vitro by early embryonic neurons on immature and adult CNS tissue. *J Neurosci* 15:2057-2062.
- Sivakumar V, Foulds WS, Luu CD, Ling EA, Kaur C (2011) Retinal ganglion cell death is induced by microglia derived pro-inflammatory cytokines in the hypoxic neonatal retina. *J Pathol* 224:245-260.
- Smith PD, Sun F, Park KK, Cai B, Wang C, Kuwako K, Martinez-Carrasco I, Connolly L, He Z (2009) SOCS3 Deletion Promotes Optic Nerve Regeneration In Vivo. *Neuron* 64:617-623.
- So KF, Aguayo AJ (1985) Lengthy regrowth of cut axons from ganglion cells after peripheral nerve transplantation into the retina of adult rats. *Brain Research* 328:349-354.
- Song L, Zhou T, Jope RS (2004) Lithium facilitates apoptotic signaling induced by activation of the Fas death domain-containing receptor. *BMC Neurosci* 5:20.
- Soutar MP, Kim WY, Williamson R, Peggie M, Hastie CJ, McLauchlan H, Snider WD, Gordon-Weeks PR, Sutherland C (2010) Evidence that glycogen synthase kinase-3 isoforms have distinct substrate preference in the brain. *J Neurochem* 115:974-983.
- Stambolic V, Ruel L, Woodgett JR (1996) Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol* 6:1664-1668.
- Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW (1998) Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95:29-39.
- Sun F, He Z (2010) Neuronal intrinsic barriers for axon regeneration in the adult CNS. *Curr Opin Neurobiol* 20:510-518.
- Sun M, Song L, Li Y, Zhou T, Jope RS (2008) Identification of an antiapoptotic protein complex at death receptors. *Cell Death Differ* 15:1887-1900.
- Terheyden-Keighley D, Fischer D (2019) The role of muscle LIM protein in the nervous system. *Neural Regen Res* 14:1907-1908.
- Trivedi N, Marsh P, Goold RG, Wood-Kaczmar A, Gordon-Weeks PR (2005) Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylation of MAP1B at Ser1260 and Thr1265 is spatially restricted to growing axons. *J Cell Sci* 118:993-1005.
- Uchida Y, Ohshima T, Sasaki Y, Suzuki H, Yanai S, Yamashita N, Nakamura F, Takei K, Ihara Y, Mikoshiba K, Kolattukudy P, Honnorat J, Goshima Y (2005) Semaphorin3A signalling is mediated via sequential Cdk5 and GSK3β phosphorylation of CRMP2: implication of common

- phosphorylating mechanism underlying axon guidance and Alzheimer's disease. *Genes to Cells* 10:165-179.
- Venkatesh K, Chivatakarn O, Lee H, Joshi PS, Kantor DB, Newman BA, Mage R, Rader C, Giger RJ (2005) The Nogo-66 receptor homolog NgR2 is a sialic acid-dependent receptor selective for myelin-associated glycoprotein. *J Neurosci* 25:808-822.
- Vidal-Sanz M, Bray GM, Villegas-Perez MP, Thanos S, Aguayo AJ (1987) Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat. *J Neurosci* 7:2894-2909.
- Walker BA, Ji SJ, Jaffrey SR (2012) Intra-axonal translation of RhoA promotes axon growth inhibition by CSPG. *J Neurosci* 32:14442-14447.
- Wang KC, Kim JA, Sivasankaran R, Segal R, He Z (2002a) P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* 420:74-78.
- Wang KC, Koprivica V, Kim JA, Sivasankaran R, Guo Y, Neve RL, He Z (2002b) Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* 417:941-944.
- Wang QM, Fiol CJ, DePaoli-Roach AA, Roach PJ (1994) Glycogen synthase kinase-3 beta is a dual specificity kinase differentially regulated by tyrosine and serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem* 269:14566-14574.
- Wanner IB, Anderson MA, Song B, Levine J, Fernandez A, Gray-Thompson Z, Ao Y, Sofroniew MV (2013) Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury. *J Neurosci* 33:12870-12886.
- Watcharasit P, Bijur GN, Song L, Zhu J, Chen X, Jope RS (2003) Glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) binds to and promotes the actions of p53. *J Biol Chem* 278:48872-48879.
- Wehland J, Schroeder M, Weber K (1984) Organization of microtubules in stabilized meristematic plant cells revealed by a rat monoclonal antibody reacting only with the tyrosinated form of alpha-tubulin. *Cell Biol Int Rep* 8:147-150.
- Weise J, Isenmann S, Klocker N, Kugler S, Hirsch S, Gravel C, Bahr M (2000) Adenovirus-mediated expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF) rescues axotomized rat retinal ganglion cells but does not support axonal regeneration in vivo. *Neurobiol Dis* 7:212-223.
- Woodgett JR (1990) Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *Embo j* 9:2431-2438.
- Yin Y, Cui Q, Li Y, Irwin N, Fischer D, Harvey AR, Benowitz LI (2003) Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration. *J Neurosci* 23:2284-2293.
- Yiu G, He Z (2006) Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci* 7:617-627.
- Yoshimura T, Kawano Y, Arimura N, Kawabata S, Kikuchi A, Kaibuchi K (2005) GSK-3beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell* 120:137-149.
- Zhang Y, Williams PR, Jacobi A, Wang C, Goel A, Hirano AA, Brecha NC, Kerschensteiner D, He Z (2019) Elevating Growth Factor Responsiveness and Axon Regeneration by Modulating Presynaptic Inputs. *Neuron* 103:39-51.e35.

Zheng B, Atwal J, Ho C, Case L, He XL, Garcia KC, Steward O, Tessier-Lavigne M (2005) Genetic deletion of the Nogo receptor does not reduce neurite inhibition in vitro or promote corticospinal tract regeneration in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 102:1205-1210.

6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen außerordentlichen Dank nachstehenden Personen entgegenbringen ohne die meine Dissertation niemals möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt zunächst besonders Prof. Dr. Dietmar Fischer, meinem Doktorvater, der es mir ermöglichte in seiner Arbeitsgruppe an der interessanten Fragestellung meiner Dissertationsschrift zu forschen. In zahlreichen Gesprächen half er mir bei der Ausgestaltung von Ideen und unterstützte mich stets bei der Lösung von Problemen. Sein Erfahrungsschatz in der Forschung trug im großen Maße zu dem Gelingen dieser Forschungsarbeit bei.

Des Weiteren möchte ich meinem Betreuer Dr. Marco Leibinger meinen außerordentlichen Dank aussprechen. Über die ganze Zeit der Doktorarbeit widmete er sich geduldig all meinen Fragen und gab mir stets gute Ratschläge und Anregungen. Von seiner reichen Erfahrung konnte ich viel Lernen. Ohne seine intensive Betreuung und Hilfe wäre mir die Fertigstellung dieser Arbeit niemals möglich gewesen.

Ferner möchte ich meiner ganzen Arbeitsgruppe danken. Sie haben mich herzlich aufgenommen und waren mir immer ein Stütze in manch schweren Zeiten. Sie waren stets zu jeder Hilfe und einen guten Witz bereit. Ohne sie wäre ich wahrscheinlich manches Mal verzweifelt.

Vielen Dank möchte ich auch dem Zweitgutachter Prof. Dr. med. Carsten Korth für die Begutachtung dieser Arbeit aussprechen.

Tief verbunden und dankbar bin ich im besonderen Maße meiner Familie und meinen Freunden. Sie hatten stets ein offenes Ohr für all meine nicht wenig vorhandenen Sorgen, gaben mir menschlichen Halt und schenkten mit Kraft und Mut. Ohne sie wäre es mir unmöglich meine Ziele zu erreichen.